

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
БИОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Ивона З. Величковић

„Фитохемијска анализа и биолошка активност
екстраката *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus*
discolor Weihe & Nees и *R. serpens* Weihe ex Lej &
Court (Rosaceae)“

докторска дисертација

Београд, 2021

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ivona Z. Veličković

„Phytochemical analysis and biological activity of
Prunus mahaleb L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor*
Weihe & Nees and *R. serpens* Weihe ex Lej & Court
extracts (Rosaceae)“

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:

Др Славица Грујић, доцент, ментор
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Др Жељко Жижак, виши научни сарадник, ментор
Институт за онкологију и радиологију Србије

Др Наташа Симин, ванредни професор, члан
Универзитет у Новом Саду – Природно-математички факултет

Др Марија Иванов, научни сарадник, члан
Универзитет у Београду – Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“,
Институт од Националног значаја за Републику Србију

Др Соња Дулетић Лаушевић, редовни професор, члан
Универзитет у Београду – Биолошки факултет

Датум одбране: _____

Захвалница

Овом приликом бих желела да исказем захвалност свима који су дали допринос приликом израде ове докторске дисертације.

Најпре бих захвалила својим менторима – **Др Славици Грујић** на дугогодишњој сарадњи, на помоћи приликом конципирања теме, великој подршци и стручним саветима приликом писања докторске дисертације чиме је њен квалитет знатно побољшан; **Др Жељку Жишку** на увек јасним и прецизним одговорима на сва моја питања у вези са антипролиферативном активношћу, као и на корисним сугестијама приликом писања радова и тезе.

Др Марији Иванов захваљујем на помоћи приликом одређивања антимикуробне активности екстракта, на стручним саветима и ведрини којом је олакшала и улепшала наш рад у лабораторији. Велику захвалност дугујем и свим колегама из Миколошке лабораторије, посебно **Др Марини Соковић** и мом колеги и пријатељу, **Дејану Стојковићу**, на пријатној радној атмосфери, предусретљивости и стручним саветима.

Професорки Др Наташи Симин захваљујем на LC-MS/MS анализи екстракта, на професионалности и изузетној посвећености приликом читања радова и тезе.

Професорки Др Соњи Дулетић Лаушевић дугујем велику искрену захвалност на корисним саветима приликом писања докторске тезе, на спремности да несебично подели знање и увек помогне. Велико хвала на пријатељству и подршци током свих ових година.

Професору **Др Петру Марину** хвала на указаном поверењу да учествујем на пројекту „Микроморфолошка, фитохемијска и молекуларна истраживања – систематски, еколошки и применљиви аспекти“, на помоћи приликом прикупљања биљног материјала и његовој детерминацији. Професору **Др Зорану Кривошеју** најсрдачније захваљујем на детерминацији биљног материјала.

Велику захвалност дугујем свим колегама са **Катедре за морфологију и систематику биљака** који су свако на свој начин помагали током свих фаза израде ове докторске дисертације, посебно **Др Данки Буквички** и **Др Немањи Рајчевић** на стручним и пријатељским саветима. Неизмерну захвалност дугујем мојим колегињама и пријатељицама, **Јасмини Градојевић**, **Др Ксенији Милески**, **Др Ани Алимпић Арадски** и **Мариани Оалђе** на колегијалности, несебично подељеном знању, стручним саветима и помоћи у свим фазама израде докторске тезе, на пријатељству и подршци коју су ми пружале и дивној сарадњи због које је сваки посао постао лак и забаван, а свака препрека премостива.

Највећу захвалност ипак дугујем својој породици и пријатељима.

Мојим бакама, **Веру** и **Драгици**, на љубави и подршци током целог живота, посебно мојој **Дади** што ми је усадила жељу за учењем и образовањем, бескрајно хвала.

Мојим родитељима, **Верници** и **Зорану** дугујем неизрециву захвалност за безусловну љубав и што су сестру и мене научили правим, непролазним вредностима, на разумевању за моје изборе и подршци да остварим своје снове.

Огромну захвалност дугујем и родитељима свог супруга, **Гордани** и **Мирољубу**, што су свих ових година били и моји други родитељи, без ваше љубави и подршке ово заиста не би било могуће.

Сестри **Тијани**, мом највећем животном пријатељу, и њеној породици дугујем неизмерну захвалност за сву љубав, разумевање и подршку коју ми увек и свуда пружају. **Лени**, **Сари** и **Матији** хвала за сваки осмех, пољубац и загрљај, учинили сте да овај пут буде лакши.

Не постоје речи којима бих могла да исказем захвалност коју осећам према мојим момцима, мом супругу **Марку** и синовима **Лазару** и **Богдану**, што су били моја оаза љубави и спокоја, покретачка снага и инспирација свих ових година, због тога њима овај рад и посвећујем.

Докторска дисертација је урађена у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије „Микроморфолошка, фитохемијска и молекуларна истраживања – систематски, еколошки и применљиви аспекти“ (ОИ173029).

Експериментални део докторске дисертације је урађен у следећим лабораторијама:

- ***Фитохемијској лабораторији*** Катедре за морфологију и систематику биљака Биолошког факултета Универзитета у Београду,
- ***Лабораторији за модификаторе биолошког одговора*** Института за онкологију и радиологију Србије,
- ***Лабораторији за испитивање природних ресурса фармаколошки и биолошки активних једињења*** Департмана за хемију, биохемију и заштиту животне средине Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду и
- ***Миколошкој лабораторији*** Одељења за физиологију биљака Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ – Института од националног значаја за Републику Србију Универзитета у Београду.

Фитохемијска анализа и биолошка активност екстраката *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor* Weihe & Nees и *R. serpens* Weihe ex Lej & Court (Rosaceae)

САЖЕТАК

Циљ ове докторске дисертације је био испитивање хемијског састава и биолошких активности екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens*.

Екстракти су добијени ултразвучном екстракцијом екстрагенсима различите поларности (вода, етанол и ацетон).

Екстракти листова и плодова *R. discolor* и *R. serpens* су били богатији фенолним једињењима од екстраката врста рода *Prunus*. LC-MS/MS методом је квантификовано 11 фенолних киселина и семиквантификовано 5 антоцијана. У њиховим екстрактима преовлађивале су хлорогенска, кафена и гална киселина, док је најзаступљенији антоцијанин у екстрактима плодова био цијанидин-глукозид/галактозид. Доминантне фенолне киселине у екстрактима *P. mahaleb* су биле *p*- и *o*-кумаринска, протокатехинска и гална, а код *P. spinosa* *p*-хидрокси-бензоева, гална, кафена, *p*-кумаринска и хлорогенска.

Водени екстракт листа *R. serpens* је показао најјачу антиоксидантну активност у коришћеним тестовима (DPPH, ABTS, FRAP и TRC), осим у случају β -каротен/линолеинска киселина теста где је највећу активност испољио ацетонски екстракт плода исте врсте.

Антимикробна активност је одређена микродилуционом методом, а екстракти *R. discolor* и *R. serpens* су испољили јаче антибактеријско и антифунгално дејство у односу на екстракте врста рода *Prunus*.

Цитотоксична активност различитих екстраката према HeLa, K562 и MDA-MB-453 ћелијским линијама је испитана МТТ тестом. Показано је да екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens* имају значајнији цитотоксични ефекат него екстракти врста рода *Prunus*. Морфолошком анализом ћелијске смрти и Annexin V-FITC/PI методом бојења је утврђено да екстракти цитотоксични ефекат остварују апоптозом малигнућ ћелија, а анализом дистрибуције ћелија по фазама ћелијског циклуса да доводе до пораста G1 ћелија, као и пораста броја апоптотичних (subG1 пик) ћелија.

Сви испитивани екстракти су успешније инхибирали α -глукозидазу, него α -амилазу, при чему су се посебно истакли етанолни екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens*.

У овом раду су први пут представљени резултати хемијског састава и биолошких активности за врсту *R. serpens*, као и антидијабетичне активности за екстракте листова преостале три врсте.

Добијени резултати указују да екстракти листова и плодова испитиваних врста испољавају бројне биолошке активности пре свега захваљујући синергистичком дејству фенолних једињења, те да се потенцијално могу применити као нутрацеутици и у фитотерапији.

Кључне речи: Rosaceae, *Prunus*, *Rubus*, екстракти, фенолна једињења, LC-MS/MS, антиоксидантна активност, антимикробна активност, антидијабетична активност, антитуморска активност

Научна област: Биологија

Ужа научна област: Морфологија, фитохемија и систематика биљака

УДК број: 582.711.713:582.711.712:615.451.1:581.45:581.47:547.623:633.8

Phytochemical analysis and biological activity of *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor* Weihe & Nees and *R. serpens* Weihe ex Lej & Court extracts (Rosaceae)

ABSTRACT

This study was aimed to evaluate the chemical composition and bioactivity of *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* and *R. serpens* leaves and fruits.

The extracts of the above-mentioned species were obtained by ultrasound-assisted extraction using solvents of different polarity (water, ethanol and acetone).

The extracts of *R. discolor* and *R. serpens* species contained higher amounts of phenols than extracts of *Prunus* species. LC-MS/MS analysis enabled the identification of 11 phenolic acids and semi-quantification of 5 anthocyanins. The dominant phenolic acids in *R. discolor* and *R. serpens* extracts were chlorogenic, caffeic and gallic, whilst cyanidin-glucoside/galactoside was the main anthocyanin in their fruit extracts. The main phenolic acids in *P. mahaleb* extracts were *p*- and *o*-coumaric, protocatechuic and gallic and in *P. spinosa* *p*-hydroxybenzoic, gallic, caffeic, *p*-coumaric and chlorogenic acids.

The aqueous leaf extract of *R. serpens* exhibited the highest antioxidant activity in all used tests (DPPH, ABTS, FRAP and TRC tests), except in β -caroten-bleaching assay where its acetone extract was the most active.

Antimicrobial activity was determined by microdilution protocol and *R. discolor* and *R. serpens* showed stronger antibacterial and antifungal activity than examined *Prunus* species.

The cytotoxic activity towards HeLa, K562 and MDA-MB-453 human malignant cell lines was evaluated by MTT test. The leaf extracts of *R. discolor* and *R. serpens* possessed more significant cytotoxic effects than extracts of *Prunus* species. Morphological analysis of cell death and Annexin V-FITC/PI method proved proapoptotic effects of extracts which were responsible for its cytotoxicity. The cell cycle distribution analyses showed that extracts increased number of G1 cells as well as number of apoptotic cells (subG1 peak).

All examined extracts showed better α -glucosidase than α -amylase inhibitory effects whereby *R. discolor* and *R. serpens* ethanol leaf extracts were particularly active.

In this study, results of chemical composition and biological activity of *R. serpens*, as well as results of antidiabetic effects of leaf extracts of other three species, were presented for the first time.

The presented results indicate that the examined plant species exhibited promising bioactivities mostly due to synergism of present phenolic compounds and therefore could be potentially applied as nutraceuticals and in phytopharmacy.

Keywords: Rosaceae, *Prunus*, *Rubus*, extracts, phenolic compounds, LC-MS/MS, antioxidant activity, antimicrobial activity, antidiabetic activity, antitumor activity

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Morphology, phytochemistry and systematics of plants

UDC number: 582.711.713:582.711.712:615.451.1:581.45:581.47:547.623:633.8

САДРЖАЈ:

1. Увод	1
1.1. Лековите биљке кроз историју.....	2
1.2. Фамилија Rosaceae – опште одлике и класификација	5
1.2.1. Опште одлике и таксономски положај рода <i>Prunus</i> L.	6
1.2.2. Опште одлике и таксономски положај рода <i>Rubus</i> L.	8
1.3. Лековите врсте фамилије Rosaceae и њихова примена	12
1.3.1. Лековите биљке рода <i>Prunus</i> L.	14
1.3.2. Лековите биљке рода <i>Rubus</i> L.	15
1.4. Секундарни метаболити биљака фамилије Rosaceae.....	16
1.4.1. Секундарни метаболити биљака	16
1.4.2. Биљни феноли	17
1.4.3. Флавоноиди	17
1.4.4. Антоцијанидини.....	20
1.4.5. Фенолне киселине.....	23
1.4.6. Остали секундарни метаболити биљака из фамилије Rosaceae.....	25
1.5. Антиоксидантна активност.....	26
1.5.1. Слободни радикали	26
1.5.2. Антиоксиданти	28
1.5.3. Антиоксидантна активност биљака из фамилије Rosaceae	28
1.6. Антимикробна активност.....	30
1.6.1. Микроорганизми	30
1.6.2. Антимикробна резистенција.....	30
1.6.3. Карактеристике тестираних бактерија.....	32
1.6.4. Карактеристике тестираних микромицета	34
1.6.5. Антимикробна активност биљака фамилије Rosaceae	36
1.7. Антитуморска активност.....	37
1.7.1. Канцер и канцерогенеза	37
1.7.2. Савремени приступ лечењу малигних болести	40
1.7.3. Улога биљних продуката у профилакси малигних обољења	41
1.7.4. Антитуморска активност биљака фамилије Rosaceae	42
1.8. Антидијабетична активност	43
1.8.1. Дијабетес мелитус (лат. <i>Diabetes mellitus</i>)	43
1.8.2. Савремени приступ лечењу дијабетеса.....	44
1.8.3. Улога биљних продуката у профилакси дијабетеса	45

1.8.4.	Антидијабетична активност биљака из фамилије Rosaceae.....	45
2.	Циљеви истраживања	48
3.	Материјал и методе	50
3.1.	Материјал	50
3.1.1.	Биљни материјал	50
3.1.2.	Микроорганизми	51
3.1.3.	Ћелијске линије.....	51
3.1.4.	Хранљиве подлоге (медијуми)	52
3.1.5.	Хемикалије и реагенси.....	52
3.2.	Методе	53
3.2.1.	Екстракција.....	53
3.2.2.	Фитохемијска анализа екстракта (TPC, TFC, TAC, TMAC, LC-MS/MS)	54
3.2.3.	Одређивање антиоксидантне активности (DPPH, ABTS, FRAP, TRC и β -каротен/линолна киселина тест)	57
3.2.4.	Одређивање антимикуробне активности	61
3.2.5.	Одређивање антитуморске активности.....	62
3.2.6.	Одређивање антидијабетичне активности.....	65
3.2.7.	Статистичка обрада резултата.....	66
4.	Резултати и дискусија	68
4.1.	Фитохемијски састав екстракта листовца и плодова <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	68
4.1.1.	Садржај укупних фенола, флавоноида, антоцијана и мономера антоцијана.....	68
4.1.2.	LC-MS/MS анализа водених и етанолних екстракта	80
4.2.	<i>In vitro</i> биолошка активност екстракта листовца и плодова <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	91
4.2.1.	Антиоксидантна активност и корелација са хемијским саставом	91
4.2.2.	Антимикуробна активност и корелација са хемијским саставом	112
4.2.3.	Антитуморска активност и корелација са хемијским саставом	135
4.2.4.	Антидијабетична активност и корелација са хемијским саставом.....	145
5.	Закључци	153
6.	Литература	155
Прилог 1	175
Прилог 2	176
Прилог 3	184
	Списак скраћеница.....	184
	Списак табела.....	187
	Списак слика.....	190

УВОД

1. Увод

Последњих година водећи узроци смртности широм планете су биле кардиоваскуларне болести, мождани удар, канцери, хронична опструкција плућа, дијабетес мелитус типа 2, неуродегенеративне болести и престанак бубрежне активности (Harris, 2019). Наведене хроничне болести преобладају као последица нездравих животних навика, неправилне исхране и стреса због чега долази до поремећаја равнотеже у односу стварања слободних радикала и ћелијских антиоксидантних механизма за њихово уклањање (Willett и сар., 2006). Стога су многа савремена истраживања усмерена ка проналажењу нових антиоксиданата који би могли да превенирају настанак и развој ових болести.

Биљке обилују биолошки активним секундарним метаболитима чија је примарна улога, између осталог, антиоксидантна заштита. Захваљујући присуству антиоксиданата многе од њих испољавају лековита својства, те су постале интегративни део традиционалних медицина широм света.

Пратећи корене употребе појединих лековитих биљака откривена су значајна фармаколошки активна једињења данашњице, као што су дигитоксин, резерпин, тубокурарин, ефедрин, ергометрин, атропин, винбластин, аспирин и др. (Ghorbani и сар., 2006). Истовремено, велики број лекова је дизајниран на основу структуре биолошки активних агенаса биљног порекла.

Лабораторијски синтетисани лекови су креирани да делују на циљни орган, те су ефикаснији и ефективнији у третману болести, међутим често се услед дуготрајне употребе јављају нежељени пропратни ефекти који штетно утичу на цео организам (Jamshidi-Kia и сар., 2018). Поред тога, интензивна примена антибиотика и антимикотика широког спектра доводи до селекције резистентних патогених микроорганизама и представља један од водећих проблема у здравству, нарочито у болничким срединама (Krstić, 2018). Осим што су узрочници болести, многи патогени микроорганизми су и изазивачи кварења намирница (Savić, 2015).

Насупрот томе, биљне дроге готово да немају штетних ефеката. Биљке су кроз дуг временски период развијале ефикасан одбрамбени одговор на инфекције узроковане микробима, па су дроге биљног порекла комплексне смеше активних компонентни које често испољавају синергистички ефекат, те је појава резистенције мање вероватна.

Због свега наведеног, последњих деценија су повећане потребе за биолошки активним агенсима природног порекла, те су лековите биљке предмет бројних студија (Da Silva и сар., 2019). Штавише, повећава се свест о њиховој важности и у јавности, тако да конзументи радије бирају како лекове, тако и намирнице и козметичке препарате природног порекла. У прилог томе говоре и подаци Светске здравствене организације (енгл. *World Health Organisation; WHO*), према којима се више од 80% светске популације при лечењу ослања на природне лекове биљног порекла (Chen и сар., 2016; Jamshidi-Kia и сар., 2018). Процењује се да од укупног броја биљних врста свега 14 до 28% има примену у медицинске сврхе, док је само 17% експериментално истражено. Стога, биљке представљају још увек недовољно испитан, али лако доступан и обновљив извор лековитих сировина за дизајнирање нових медикамената (Mamedov, 2012).

Фамилија Rosaceae је једна од врстама најбогатијих међу цветницама, са дугом историјом употребе у различитим културама. Велики број представника ове фамилије су економски изузетно значајне врсте, па није изненађујуће што су биле предмет

бројних истраживања. Обиље литературних података указује на значајне биолошке активности секундарних метаболита изолованих из различитих представника ове фамилије, као што су: антиоксидантна (Oszmianski и сар., 2007; Kähkönen и Heinonen, 2003; Seeram и сар., 2001; Barros и сар., 2010; Conforti и сар., 2011), антимикуробна (Panizzi и сар., 2000; Martini и сар., 2009; Piccirillo и сар., 2013), анти-инфламаторна (Shin и сар., 2014), неуропротективна (Tavares и сар., 2012), хипогликемијска (Jouad и сар., 2002), антитуморска и друге (Baek и сар., 2013; George и сар., 2014).

Имајући у виду да нису сви представници фамилије Rosaceae подједнако добро истражени, као предмет проучавања ове студије су изабране самоникле врсте родова *Prunus* и *Rubus*, о којима има врло мало објављених научних података. Циљ овог рада био је да се испита њихов фитохемијски састав и биолошке активности да би се употпунила постојећа сазнања и потенцијално применила у фитофармацији, прехранбеној и козметичкој индустрији.

1.1. Лековите биљке кроз историју

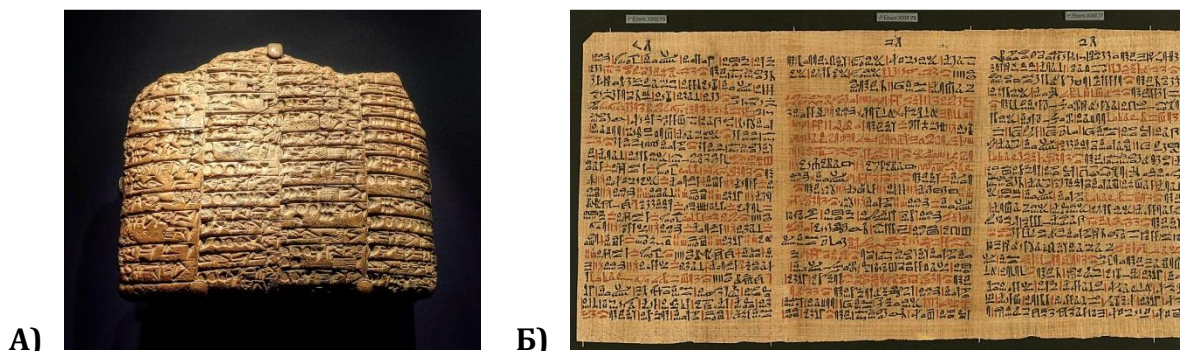
Биљке су још од давних времена саставни део човековог живота. Првобитно су служиле као храна и склониште, да би убрзо постале део различитих верских обреда и ритуала, при чему су им придаване и магијске моћи. Истовремено су почела да се откривају и њихова лековита својства. Археолошки докази стари преко 60.000 година указују да је још праисторијски човек препознао лековитост појединих биљака и у њима тражио лек за брже исцељење рана и уклањање болова (Khan, 2014; Sewell и Rafieian-Koraei, 2014; Jamshidi-Kia и сар., 2018). Следећи друге биљоједе и ослањајући се на сопствени инстинкт, човек је искуствено стицао прва знања о биљкама из свог окружења, како би касније почео да их култивише и проналази нове могућности њихове употребе у свакодневном животу. Стечена знања су се преносила генерацијама усменим путем, да би се са зачетком првих цивилизација појавили и најстарији писани документи са простора данашњег Блиског Истока, Кине, Индије, а касније и централне Азије и Грчке.

Најстарији међу њима су садржани у индијским светим књигама, Риг-Веди и Атарва-Веди, које заправо представљају зачетак индијске традиционалне медицине, Ајурведе. Назив Ајурведа (*āyur*¹ и *veda*²) на санскриту означава „науку о животу“. То је прва ризница људског знања о физиолошком и холистичком приступу у медицини и успостављању равнотеже у организму помоћу лековитих биљака (Patwardhan, 2005; Khan, 2014; Rahman и сар., 2019). Из Ајурведе су произашле бројне примене активних секундарних метаболита биљака у терапијске сврхе. Тако су алкалоиди из *Rauwolfia* употребљени за лечење хипертензије, а из врста рода *Holarrhena* у третману амебијазе, затим псоралени за витилиго, куркумин за запаљенске процесе, а стероидни лактони и њихови гликозиди као имуномодулатори (Patwardhan, 2005). Такође, на Далеком истоку је написана и књига коју поједини фармакоисторичари сматрају првом светском фармакопејом (2800. г. п. н. е.). Реч је о кинеској књизи о корењу и травама под називом *Che-Nung-pen-ts'ao-ching* где је описано 365 биљних дрога, међу којима су и *Rhei rhisoma*, *Camphora*, *Cinamtomii cortex* и *Theae folium* (Pаројчић и Stupar, 2003). Сумерски запис на глиненој плочици (**Слика 1**), настао око 1700. г. п. н. е. у древном Нипуру (Месопотамија) садржи описе 12 различитих рецепата за израду лекова и преко 250 биљних врста које су у те сврхе коришћене. Поједине међу њима су богате алкалоидима, као што су *Papaver somniferum* L. (мак), *Hyoscyamus niger* L. (буника) и

¹ Живот

² Наука

Mandragora officinarum L. (мандрагора) (Pаројчић и Stupar, 2003; Jamshidi-Kia и сар., 2018). Незнатно касније написан је и Еберсов папирус у Теби (Египат) (1552. г. п. н. е.) (Слика 1) у ком се помињу бројне лековите биљке из различитих родова и фамилија, као и начини њихове примене: *Hyosciamus niger* L. (буника), *Punica granatum* L. (нар), *Allium sera* L. (црни лук), *A. sativum* L. (бели лук), *Centaurium erythraea* Rafn (кичица), *Coriandrum sativum* L. (коријандер), *Juniperus communis* L. (клека) и *Salix alba* L. (бела врба) (Pаројчић и Stupar, 2003; Loriaux, 2006).



Слика 1. Писани документи о употреби лековитих биљака: **А)** глинена плочица из Нипура (Месопотамија) (фото: Mary Harrch); **Б)** Еберсов папирус из Тебе (Египат) (фото: Nanf музеј у Берлину).

Током Старог века развоју медицине, фармације и фитофармације највише су допринели Стари Грци – Хипократ, Аристотел, Теофраст, Диоскорид и Гален. Ипак, најистакнутији утицај је имао Диоскорид (40-90. г.), војни лекар, хирург и фармацеут из првог века нове ере (Pаројчић и Stupar, 2003; Jamshidi-Kia и сар., 2018). Путујући са римском војском, Диоскорид је био у прилици да проучава биљке из различитих крајева, да би око 77. г. своја сазнања објединио у делу *De Materia Medica*. То је класично дело Старог века у ком је описано укупно 944 различите дроге, од којих је чак 657 биљног порекла. Многе наведене биљке имају примену и данас, као: *Matricaria chamomilla* L. (камилица), *Hedera helix* L. (бршљан), *Althaea officinalis* L. (бели слез), *Hypericum perforatum* L. (кантарион), *Urtica dioica* L. (коприва), *Salvia officinalis* L. (жалфија), *Petroselinum crispum* L. (першун) и друге (Pаројчић и Stupar, 2003). Поред припреме лекова и њиховог дејства, Диоскорид је описао и саме лековите биљке, називе на другим језицима, начин прикупљања, и станишта на којима расту. Већина описаних биљака испољава благо до умерено дејство, мада има и изузетака, укључујући и поједине алкалоидне врсте. *De Materia Medica* је све до ренесансе била основа *materia medicae* због чега је Диоскоридов утицај на утемељивање и развој фармакогнозије непроцењив (Sewell и Rafieian-Koraei, 2014).

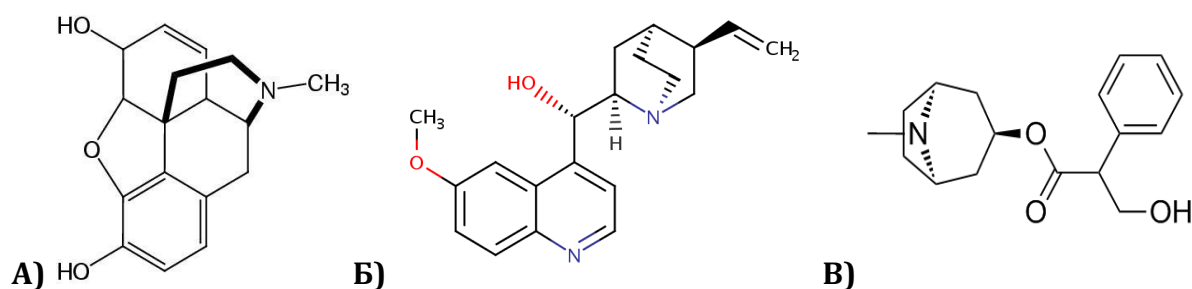
Век касније, Гален (129-199. г.), знаменити лекар и мислилац је истраживао употребу биљака у медицинске сврхе при чему се користио различитим методама екстракције како би из биљака добио стабилне и ефикасне лекове. Поред тога, творац је и првог списка тзв. паралелних дрога *De succedanus*, односно лекова сличног или истог фармаколошког дејства (Pаројчић и Stupar, 2003).

Арапски и персијски природњаци су током средњег века употпуњавали и преносили античка знања. Најбитнија дела ове епохе су Авиценин *Canon Medicinae*, Ибн ал-Баитаров *Liber Magnae Collectionis Simplicum Alimentorum et Medicamentorum* и Разијев *Al Hawi*. Ипак, све до ренесансе *materia medicae* се није значајније мењала (Sewell и Rafieian-Koraei, 2014; Jamshidi-Kia и сар., 2018).

Морепловачке експедиције су током XIII, XIV и XV века довеле до великих географских открића што је омогућило трговину производима и ресурсима између удаљених крајева света. Самим тим и промет биљака је повећан, те су у Европу доспеле многе до тада непознате зачинске и лековите биљке из других поднебља. Истовремено је дошло и до интеракција различитих култура и размене сазнања, научних и технолошких постигнућа, па је напредак науке био неминован.

Ренесансни лекар, природњак и филозоф, Парацелзус (1493-1541.) творац је „Теорија сигнатура“ и утемељивач ијатрохемије, токсикологије и хомеопатије (Borzelleca, 2000). Парацелзусова „Теорија сигнатура“ се заснива на хипотези да се „слично сличним лечи“ (лат. *similia similibus curantur*), односно да је за сваку болест могуће пронаћи лек у природи пратећи облике, боје, укусе лековитих биљака и минерала и ефекте које испољавају на људски организам. Парацелзусова заоставштина је оставила трага кроз потоње векове, пре свега због употребе хемијских супстанци у изради лекова, при чему се изузетно водило рачуна о адекватном дозирању (Šolić, 2016; Paroјčić и Stupar, 2003; Júnior и сар., 2011).

Интересовање за проучавање хемијских одлика супстанци биљног порекла је порасло, што је резултирало и изолацијом првих биоактивних једињења почетком XIX века, као што су морфин из *Papaver somniferum* L., хинидин из врста рода *Cinchona* и атропин из *Atropa bella-dona* L. (Paroјčić и Stupar, 2003; Júnior и сар., 2011) (Слика 2).



Слика 2. Структурне формуле: А) морфина; Б) хинидина; В) атропина.

Наредних деценија научници су се посветили трагању за новим фармаколошки активним једињењима природног порекла, те се број идентификованих и изолованих секундарних метаболита биљака константно увећавао. Испитивањем биолошких активности изолованих чистих једињења постаје јасно да она углавном имају израженији ефекат него биљне дроге из којих су изоловане. Интензивира се рад на упознавању њихове структуре и креирању синтетских аналога ради једноставније, економичније и обимније производње. Постепено синтетски лекови у потпуности замењују природне фармаколошки активне супстанце које су послужиле као модели за њихову производњу, а природни извори лековитих сировина, укључујући и биљке, падају у запећак. Међутим, савременим истраживањима утврђено је да вештачка једињења, иако ефикасна у лечењу одређених болести, имају углавном доста негативних пропратних ефеката на читав организам, што поново у жижу интересовања враћа природне лековите сировине (Sewell и Rafieian-Koraei, 2014).

1.2. Фамилија Rosaceae – опште одлике и класификација

Фамилија Rosaceae броји преко 3.000 врста груписаних у 122 рода и представља једну од економски најзначајнијих фамилија ангиосперми (Potter и сар., 2002; Heywood, 2007). Обухвата зељасте, жбунасте и дрвенасте вишегодишње, ретко једногодишње биљке (Гајић и сар., 1972; Judd и сар., 1999). Поједини представници поседују ризоме, а има и оних са пузећим изданком. Најчешће су листопадни, са листовима углавном наизменичног, ретко наспрамног распореда. Прости су или трочлано, перасто или прстасто сложени. Јављају се увек са стипулама. Актиноморфни, обично двополни, бели или обојени цветови се образују појединачно или груписани у рацемозне или цимозне цвасти. Цветни омотач је хетерохламидан, ређе апеталан, као код представника родова *Alchemilla* и *Sanguisorba*. Чашицу чини најчешће 5 или 3-4 слободна зелена листића, који алтернирају са круничним, а неретко поседују *calyx duplex*. Андрецеум и гинецеум су уобичајено сачињени из великог броја прашника, односно карпела. Карпеле су слободне или само при основи срасле, са 1-2 семена заметка, понекад и више. Плодови у оквиру ове фамилије су разноврсни, укључујући мешак, орашицу, коштуницу, збирну орашицу и збирну коштуницу (Гајић и сар. 1972; Tatić и Blečić, 1988).

Назив фамилије Rosaceae датира из XVIII века када се први пут помиње у Adanson-овом делу *Familles des plantes*. Ипак, *International Code of Botanical Nomenclature (ICBN)* за аутора признаје ботаничара Antoine Laurent de Jussieu (1789), јер у својој класификацији Linneaus-ову биномну номенклатуру употпуњује таксономском методологијом којом се користио Adanson (Hummer и Janick, 2009).

Фамилија Rosaceae обухвата веома разнолике врсте, без јасно дефинисаних синапоморфних карактера који би указали на монофилетско порекло групе. Постојање хипанцијума, редукованог ендосперма или његово одсуство, као и постојање великог броја прашника су могући синапоморфни карактери за фамилију Rosaceae (Judd и Olmstead, 2004), али нејасни филогенетски односи са другим фамилијама у оквиру реда Rosales доводе у питање њихову поузданост. Ипак, новији молекуларни докази указују на монофилетско порекло фамилије Rosaceae (Morgan и сар., 1994; Evans и сар., 2000; Potter и сар., 2002).

На основу морфологије плода, фамилијом Rosaceae су традиционално обухваћене 4 потфамилије:

- Spiraeoideae,
- Rosoideae,
- Amygdaloideae (Prunoideae) и
- Maloideae.

Потфамилију Spiraeoideae чине врсте са плодом у виду мешка и 9 (15, 17) хромозома. Врсте потфамилије Rosoideae имају орашице и 7, 8 или 9 хромозома. Потфамилија Amygdaloideae (Prunoideae) карактерише се коштуницама као плодовима и присуством 8 хромозома, док потфамилија Maloideae има специфичан плод *rottum*³ и 17 хромозома. Међутим, филогенетски подаци добијени на основу молекуларних доказа подржавају постојање три монофилетске групе у оквиру фамилије Rosaceae и то потфамилија Rosoideae, Amygdaloideae (Prunoideae) и Maloideae, али истовремено указују и на полифилетско порекло потфамилије Spiraeoideae, те на потребе за ревидирањем таксономије унутар фамилије (Morgan и сар., 1994).

³ Посебан облик коштунице.

Фамилија Rosaceae је готово космополитског распрострањења, а највећи диверзитет врста је на Северној хемисфери (Tatić и Blečić, 1988). Плодови бројних представника су широко заступљени у људској исхрани, укључујући припаднике родова *Malus* (јабуре), *Pyrus* (крушке), *Prunus* (шљиве, брескве, трешње, вишне и бадеми), *Rubus* (малине и купине) и *Fragaria* (јагоде) (Potter и сар., 2002). Осим у људској исхрани користе се и за производњу различитих прехранбених и козметичких производа, намештаја, али и као извор лековитих сировина (Janick, 2005; Ercisli, 2007).

1.2.1. Опште одлике и таксономски положај рода *Prunus* L.

Род *Prunus* L. се убраја у фамилију Rosaceae, потфамилију Amygdaloideae (односно Prunoideae) (Rehder, 1940; Willis, 1985; Yü и сар., 1986; Ghora и Panigrahi, 1995; Mabberley, 1997; Lee и Wen, 2001; Shi и сар., 2013). Род обухвата углавном листопадне, ретко зимзелене биљке дрвенасте или жбунасте форме. Листови су прости, различитих облика и величине у опсегу од неколико до 15 cm. Најчешће су назубљеног или тестерастог обода. Цветови су беле или ружичасте боје, петочлани, са једним тучком и 10 до 20 или више прашника. Јављају се пре или истовремено са листањем, појединачно или груписани у просте рацемозне цвасти (грозд, гроњу или штит). Плод је коштуница величине од 0,5 до 10 cm (Webb, 1968; Јовановић, 1972).

Током последњих 300 година проблематиком класификације рода *Prunus* L. у ширем смислу (лат. *sensu lato* (скр. *s. l.*)) се бавило више таксонома и њихови ставови су се често доста разликовали (Shi и сар., 2013). Пре Linneaus-a, Tournefort је 1700. године предложио класификацију засновану првенствено на морфологији плода, по којој се у *Prunus s. l.* убраја 6 родова: *Amygdalus* L., *Armeniaca* Miller, *Cerasus* Miller, *Laurocerasus* Duhamel, *Persica* Miller и *Prunus* L. у ужем смислу (лат. *sensu stricto* (скр. *s. s.*)) (Lee и Wen, 2001; Shi и сар., 2013). Пола века касније, у свом делу *Species Plantarum* Linneaus је прихватио само 3 од наведених 6 родова: *Amygdalus*, *Padus* и *Prunus s. s.* (Linneaus, 1753), да би након неколико година променио став и поделио *Prunus s. l.* на 4 рода: *Padus* (укључујући и *Laurocerasus* из Tournefort-ове класификације), *Armeniaca*, *Cerasus* и *Prunus* (Lee и Wen, 2001). Наредних година, класификацију Tournefort-a и Linneaus-a и њихов концепт о већем броју мањих родова подржали су многи систематичари (Komarov, 1971; Yü и сар., 1986; Ghora и Panigrahi 1995). Tournefort-ови и Linneaus-ови следбеници су уводили бројне измене на основу којих су разликовали између 5 и 8 родова у оквиру *Prunus s. l.* (Shi и сар., 2013). С друге стране, поједини таксономи су били склонији концепту једног рода који би обухватао све врсте *Prunus s. l.* Тако су, на пример, Gray (1859), а нешто касније и Bentham и Hooker (1865) предложили класификацију којом би Tournefort-ове родове обухватили јединственим родом *Prunus* у који су затим уврстили 3, односно 7 подродова (Shi и сар., 2013). Следбеници ове идеје су наредних деценија јединствени род *Prunus* делили на различити број подродова. Тако су Koehne (1893) и Focke (1894) издвојили 7 подродова у оквиру рода, различитих у односу на оне које су претходно описали Bentham и Hooker (1865). Koehne (1911) је касније разликовао 4 подрода: *Amygdalus*, *Cerasus*, *Padus* и *Prunophora* (= *Prunus*). Затим је Rehder (1940) јединственим родом обухватио 5 подродова: *Prunus s. s.*, *Amygdalus*, *Cerasus*, *Padus* и *Laurocerasus* (Lee и Wen, 2001). Rehder-ова (1940) класификација је наишла на велики број истомошљеника (Groh и Senn, 1940; Reynders и Saleses, 1989; Yilmaz и сар., 2009; Radford, Ahles и Bell, 2010) и данас је једна од најшире прихваћених.

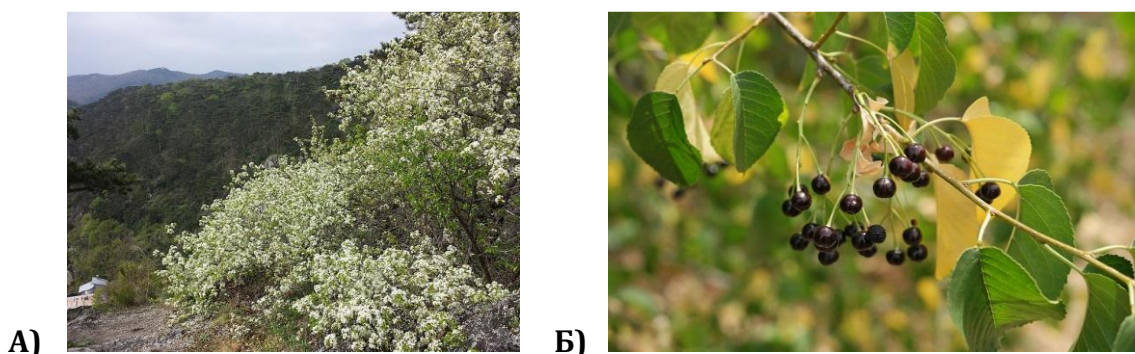
Класификација *Prunus s. l.* је доста проблематична, јер се углавном базирала на неколико морфолошких карактера, због чега постоји потреба да се детаљније истражи њихова конвергенција, како би могли да се посматрају у светлу филогенетских односа

између врста (Lee и Wen, 2001; Shi и сар., 2013). Ипак, новија истраживања базирана на молекуларним доказима иду у прилог теорији о једном свеобухватном роду *Prunus s. l.* (Bortiri и сар., 2001; Lee и Wen, 2001; Potter и сар., 2007).

Род *Prunus*, схваћен у овом ширем смислу, обухвата близу 200 врста распрострањених углавном у умереној климатској зони северне хемисфере, мада има представника и у тропској и суптропској зони (Lee и Wen, 2001; Shi и сар., 2013). Род обухвата многобројне економски значајне представнике, као што су брескве (*P. persica* L.), шљиве (*P. domestica* L., *P. cerasifera* Ehrh., *P. americana* Marshall), кајсије (*P. armeniaca* L.), бадеми (*P. communis* L. var. *dulcis* Borkh., *P. communis* var. *amygdala* (L.) Huds.), трешње (*P. avium* L., *P. pseudocerasus* Lindl., *P. serrulata* Lindl.) чији су плодови изузетно заступљени у људској исхрани и користе се свежи, смрзнути или као полазне сировине за припрему различитих прехранбених производа (сокова, џемова, слаткиша, сладоледа, уља, воћних ракија и вина) (Shi и сар., 2013). Поред тога, имају употребну вредност и у дрвној индустрији, а неретко се користе и као украсне биљке (Yilmaz и сар., 2009).

1.2.1.1. *Prunus mahaleb* L.

Опште одлике врсте – *P. mahaleb* (рашељка, магрива, турска вишња, магиња) је биљка висине до 10 m која расте као ниско дрво или жбун (Слика 3). Крошња је округласта и густа. Стабло је прекривено тамносмеђом кором која у старости пуца и мирише на кумарин. Гране су најпре зеленкасте и прекривене нежним трихомама, да би касније постале светлосмеђе и голе. На изданцима се развијају светлосмеђи јајастипупољци. Листови су на петељкама, сјајног светлозеленог лица и жућкастог и длакавог наличја. Јајастог до округластог су облика, зашиљени при врху, тупотестерастог обода. У периоду од априла до маја, истовремено са листањем, долази и до цветања. Бели, миришљави цветови су груписани у штитове или кратке гроздове. Плод је округласто-јајаста коштуница опорог и горког укуса која сазрева у периоду лета, током јула и августа. Приликом сазревања плод мења боју од жуте преко црвенкасте до црне (Webb, 1968; Јовановић, 1972).



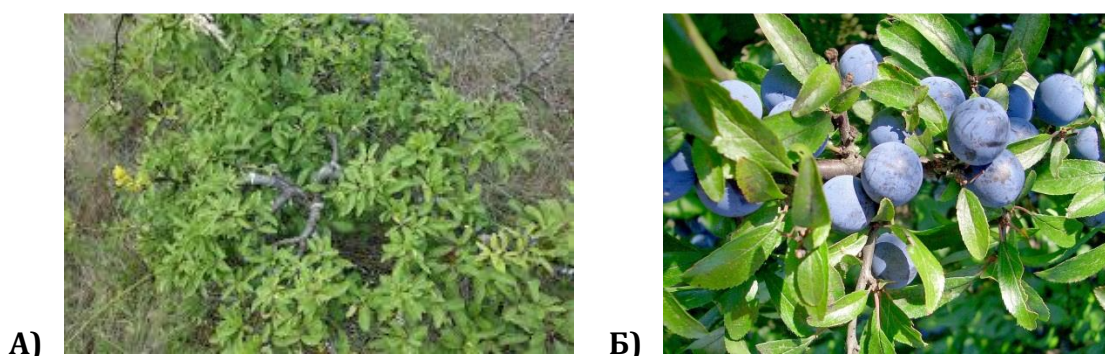
Слика 3. *Prunus mahaleb* L.: А) цела биљка (фото: Stefan.lefnaer); Б) изданак са листовима и плодовима (фото: непознати аутор).

Станиште – *P. mahaleb* је ксеротермна и термофилна врста која се на јужним странама нагиба среће и на висинама до 900 m н. в. најчешће на кречњачким и серпентинским подлогама. Углавном расте у шумама грабића (*Carpinetum orientalis*) и црног граба (*Ostryetum carpinifoliae*) (Јовановић, 1972).

Опште распрострањење – *P. mahaleb* расте на простору средње и јужне Европе, средње Азије, Закавказја и Крима. У пустињским, степским и шумостепским крајевима се јавља као гајена врста (Јовановић, 1972).

1.2.1.2. *Prunus spinosa* L.

Опште одлике врсте – *P. spinosa* (трњина, црни трн, трн, трнула, мачја шљива, дивља шљива) је листопадна жбунаста биљка округле крошње висине до 4 метра која често образује шибљаке (Слика 4). Млади изданци су смеђе до црвенкасте боје и прекривени трњем. Листови су елиптичног до објајастог облика, заобљени на врху, клинасти при основи, оштро или тупо тестерасто назубљеног обода. Бели цветови се јављају пре листања, током априла и маја, појединачни су или груписани по два. Плод је плавичастоцрна коштуница киселог и опорог укуса која сазрева крајем лета, током августа и септембра (Webb, 1968; Јовановић, 1972).



Слика 4. *Prunus spinosa* L.: А) надземни део (фото: Milimidragan 92); Б) изданак са листовима и плодовима (фото: Rita Bernhardt).

Станиште – *P. spinosa* је ксеротермна и хелиофилна врста која добро подноси ниске температуре, а карактеристична је за умереноконтиненталне шибљаке (Јовановић, 1972). Расте по утринама, дуж канала, путева и ветрозаштитних појасева (Veličković, 2013).

Опште распрострањење – *P. spinosa* је широко распрострањена европска биљна врста, која не расте једино на крајњем северу континента. Поред тога, расте и у Тунису, Малој Азији и Ирану (Јовановић, 1972).

1.2.2. Опште одлике и таксономски положај рода *Rubus* L.

Род *Rubus* L. се уврштава у фамилију Rosaceae, потфамилију Rosoideae (Potter и сар., 2007). Овим родом су обухваћене листопадне зељасте или жбунасте вишегодишње биљке трновитог стабла. Листови су најчешће трчлано до седмочлано перасто или прстасто сложени. Појединачни листићи су назубљеног обода. Двополни, петочлани цветови се јављају појединачно или груписани у рацемозне цвасти (грозд или метлицу). Крунични листићи су беле, ружичасте до црвене боје. Присутан је заравњен хипанцијум са конвексном цветном ложом, велики број прашника и оплодних листића. Плод је збирна коштуница (Neslop-Harrison, 1968; Татић, 1972).

Род *Rubus* L. чини 12 подродова од којих су највећи *Idaeobatus* (117 врста), *Malachobatus* (115 врста) и *Rubus* (= *Eubatus*; 132 врсте), док су преостали родови сачињени из мањег броја врста (**Табела 1**) (Alice и Campbell, 1999).

Табела 1. Списак 12 подродова у оквиру рода *Rubus* L. (преузето са изменама од Alice и Campbell, 1999).

ПОДРОД	БРОЈ ВРСТА
<i>Anoplobatus</i> (Focke) Focke	6
<i>Chamaebatus</i> (Focke) Focke	5
<i>Chamaemorus</i> (Hill) Focke	1
<i>Comaropsis</i> (Rich.) Focke	2
<i>Cylactis</i> (Raf.) Focke	14 (4 секције)
<i>Dalibarda</i> (L.) Focke	5
<i>Dalibardastum</i> Focke	4
<i>Idaeobatus</i> (Focke) Focke	117 (9 секција)
<i>Lampobatus</i> Focke	10
<i>Malachobtus</i> (Focke) Focke	115 (7 секција)
<i>Orobatus</i> Focke	19
<i>Rubus</i> L. (= <i>Eubatus</i> Focke)	132 (6 секција)

Таксономски односи у оквиру рода су изузетно компликовани због постојања хибридизације, полиплоидије и апомиксиса, који резултирају изузетном морфолошком разноликошћу. Томе додатно доприноси и непостојање јединственог концепта врсте (Gustafsson, 1943; Weber, 1996). Класификација унутар рода, због свега наведеног, вековима представља један од највећих изазова за систематичаре (Alice и Campbell, 1999).

Linnaeus (1753) је све врсте објединио под називом „*Rubus fruticosus*“, који су задржали чак и неки савремени ботаничари (Weber, 1996). Зачетником таксономије овог рода и првим батологистом (енгл. *batologist*⁴) сматра се немачки ботаничар Weihe (1779-1834) који је утврдио морфолошке карактере који се и данас користе приликом класификације врста рода *Rubus* и представио их у свом делу „*Rubi Germanici*“ (1822-1827). Такође, Weihe је приликом описа врста први посебну пажњу посветио морфолошким одликама једногодишњег изданка (лат. *primocane*) (Weber, 1996). Након Weihe-а, ботаничари, превасходно из средње, северне и западне Европе, су почели да се хватају у коштац са компликованим таксономским односима у оквиру рода *Rubus* и у покушају да их разреше користили су различите приступе.

Током XIX и почетком XX века, највећи утицај на батологију (енгл. *batology*⁵) је имало тада заступљено веровање да је Бог створио живот на Земљи, па самим тим и биљне врсте, те да је њихов број коначан. Због тога су многи таксономи тог доба били склони да сваки жбун купине због незнатних разлика у хабитусу опишу под новим

⁴ Назив изведен из грч. *βάτος* (купина); ботаничар који се бави проучавањем врста рода *Rubus*

⁵ Научна дисциплина која се бави проучавањем врста рода *Rubus*

именом. Неки од заговорника ове методологије су били Müller (1858, 1859), Boulay (1864-1869), Genevier (1869, 1881), Forester (1878) и Kinscher (1909) (Weber, 1996).

У другој половини XIX века Kuntze (1867) је развио нови приступ проблему таксономије врста рода *Rubus* који је описао у свом делу „*Reforme deutscher Brombeeren*“ (Weber, 1996). Он је сматрао да су све врсте у оквиру рода настале хибридизацијом неколико постојећих које је означио као прародитељске. Ово је уједно и прва вештачка класификација у оквиру рода која је следбенике нашла пре свега међу холандским и шведским таксономима (Haveman и De Ronde, 2013).

Истовремено, поједини таксономи су увидели потребу да се број врста рода *Rubus* умањи или бар одржава константним, због чега су тежили да нове таксоне уместо као врсте описују као подврсте или варијетете већ описаних. Један од најистакнутијих заговорника оваквог приступа је био Sudre (1908-1913) (Weber, 1996; Haveman и De Ronde, 2013). Он је уједно и творац једне широко заступљене вештачке класификације коју је изложио у свом делу „*Rubi Europae*“. Последица оваквог приступа је да су многи полифилетски таксони сврставани под исту врсту, што осим што није имало никаквог таксономског значаја, доводило је ботаничаре у заблуду, па је дошло до стагнације батологије (Weber, 1996).

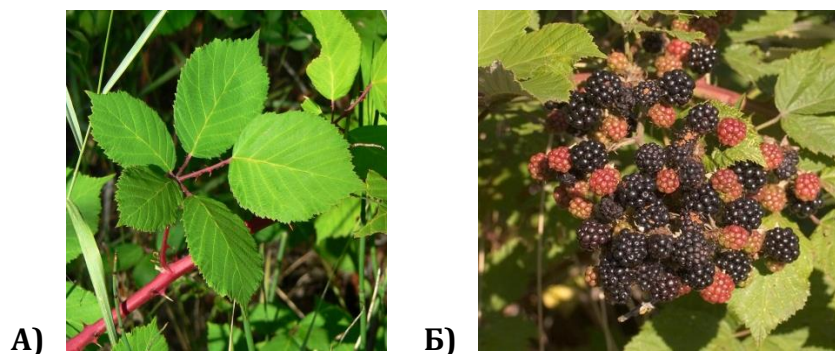
Један од најистакнутијих батологиста, Focke (1834-1922) је први увидео важност појединих биолошких одлика на основу којих би требало описивати искључиво врсте. Он је такође сматрао да приликом описивања нових врста треба водити рачуна о фертилности полена, као и о величини ареала (Weber, 1996). Сличног мишљења је био и Gustaffson (Weber, 1996). На томе се делимично базира и велика реформа у батологији коју је спровео Weber током XX века. Зачеци реформе се заправо називају у Van de Beek-овој докторској дисертацији, а Weber их је усвојио, уобличио и представио у свом чувеном прегледу врста рода *Rubus* северозападне Европе (Weber, 1972). Weber-ова реформа се базира на свеобухватном мапирању великих пространа, прикупљању и поређењу биљног материјала са нових локалитета и оних на којима је први пут пронађен (лат. *loci classici*), као и поређење са хербаријумским збиркама првих батологиста. Такође, приликом дефинисања врста битан критеријум је била и ширина ареала. Стога би само регионално и широко распрострањени биотипови, чији је ареал пречника између 50 и 250 km, односно већи од 500 km, редоследом, требало да се узму у разматрање као засебне врсте (Weber, 1972). Weber-ова реформа заснована на прагматичном концепту врсте је омогућила да се број врста смањи, да се оне организују у један уређен систем, чиме је рад батологиста доста олакшан, а сама батологија знатно унапређена. Међутим, класификација заснована на прагматичном концепту врсте не одсликава односе између природних врста. На основу ове класификације не стиче се увид у генетичке разлике између појединих врста, њихову еволуцију нити филогенетске односе. Због тога у новије време изван број критичара, међу којима су и Holub (1997), Bijlsma и Haveman (2007) и Loos (2008), сматра да је треба унапредити или у потпуности одбацити (Haveman и De Ronde, 2013).

Према најновијим подацима из базе *The plant list* (2013) род *Rubus* L. обухвата 1568 врста док је статус 5162 назива још увек неразјашњен. Врсте овог рода су саставни део аутохтоне флоре на свим континентима изузев Антарктика. Јављају се на најразличитијим стаништима, од морских приобаља до планинских врхова (Alice и Campbell, 1999). Продукују плодове који се користе у свакодневной исхрани, као и за припрему различитих прехранбених производа (сокова, џемова, слаткиша, сладоледа...) (Hummer, 2010). Осим економског, имају и велики еколошки значај, јер су бројни

представници инвазивне коровске врсте, а учествују и у раној сукцесији у шумска станишта (Alice и Campbell, 1999).

1.2.2.1. *Rubus discolor* Weihe & Nees

Опште одлике врсте - *R. discolor* (купина) је биљка високог и повијеног јаког угластог стабла светломрке до црвенкасте боје (Слика 5). Изданци су најпре сиволавичасти, глатки са ретким трихомама, а касније се развијају ретки и јаки трнови. Трнови су при основи проширени, а могу бити усправни или српасто повијени. Листови су непарно перасто сложени из пет крупних листића сиволавичастиог лица и беличастиог наличја обраслог трихомама. Терминални листић је јајастог до овалног облика и кратко зашиљен при врху. Терминални и базални листићи су смештени на кратким дршчицама, док су приперци седећи. Цвасти су пирамидалног облика, сачињене од крупних белих до светлоружичастих цветова. На осовинама се јављају многобројне трихоме и српасто повијени или коленасти трнови. Чашични листићи су обрасли трихомама и након цветања опадају. Крунични листићи су јајастог до овалног облика. Прашници су беле до светлоружичасте боје, надрастају тучкове и у антерама продукују стерилна поленова зрна. Цветна ложка, антере прашника и карпеле су обрасли трихомама. Плод је крупна збирна коштуница (Heslop-Harrison, 1968; Татић, 1972).



Слика 5. *Rubus discolor* Weihe & Nees: А) лист (фото: Stan Shebs); Б) плод (фото: Charles Brun).

Станиште – *R. discolor* је биљка топлих, сувих станишта. Расте по утринама и поред путева (Татић, 1972).

Опште распрострањење – Широко је распрострањена у Европи. Јавља се на подручју од Француске, па све до Средоземља и Балкана (Татић, 1972).

1.2.2.2. *Rubus serpens* Weihe ex Lej & Court

Опште одлике врсте – *R. serpens* (шумска купина) је пузећа врста округластог, готово воштано пресвученог изданка (Слика 6). На изданцима, прекривеним трихомама, се развијају трочлано до петочлано сложени жућкастозелени листови. Појединачни листићи су са ретким трихомама уско тестерасто назубљеног обода, док је терминални листић елиптичан, при основи заобљен, а при врху кратко зашиљен. Малобројни бели цветови су груписани у кратке и уске цвасти. Бели прашници надвисују жигове тучка (Heslop-Harrison, 1968; Татић, 1972).

Станиште – *R. serpens* расте у шумама (Татић, 1972).

Опште распрострањење – Биљка је распрострањена у западној и централној Европи, али и на простору Босне и Херцеговине и Републике Србије (Татић, 1972).



Слика 6. *Rubus serpens* Weihe ex Lej & Court. на локалитету Јастребац (фото: И. З. Величковић).

1.3. Лековите врсте фамилије Rosaceae и њихова примена

Литературни подаци указују на вишевековну традиционалну употребу биљака фамилије Rosaceae у различитим крајевима света. Већина лековитих биљака ове фамилије се користи у третману болести дигестивног, урогениталног, циркулаторног и респираторног система. За добијање биљне дроге користе се како надземни, тако и подземни делови, али и биљни ексудати. Ипак, у народној медицини се у лековите сврхе најчешће користе плод и лист, а затим цвет, семе и корен (Ogah и сар., 2014; Dogan и сар., 2016; Khan и Shinwari, 2016). Биљни материјал се може применити директно или у облику инфуза, декокта, тинктура и сл. Осим самостално, биљна дрога се примењује и у комбинацији са другим биљним врстама и/или другим састојцима попут брашна, меда и млека (Khan и Shinwari, 2016).

Међу родовима ове фамилије, најбогатији лековитим врстама и стога најучесталије коришћени у народној медицини су *Prunus*, *Rosa*, *Rubus*, *Crataegus*, *Fragaria*, *Pyrus* и *Malus*, наведеним редоследом (Khan и Shinwari, 2016), (Слика 7).

Врсте рода *Prunus* се традиционално користе као диуретици, адстрингенти, дијафоретици, лаксативи, спазмолитици, аналгетици и антидијабетици (Darias и сар., 1989; Yeşilada и сар., 1999; Pieroni, 2000; Miraldi и сар., 2001).

Биљке из рода *Rosa* се примењују због свог благо лаксативног, адстрингентног, анти-инфламаторног и аналгетског дејства, а благотворно делују и на имунитет (Achuthan и сар., 2003; Yi и сар., 2007).

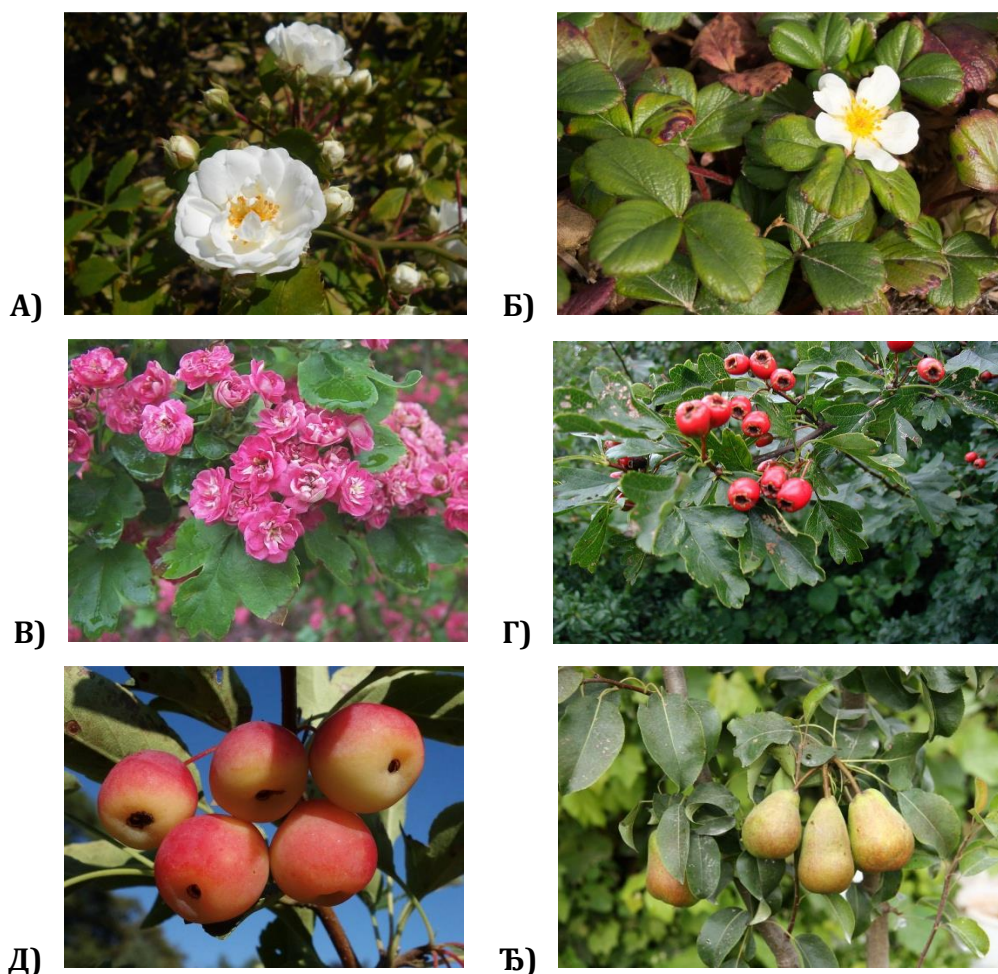
Припадници рода *Rubus* се традиционално употребљавају у лечењу стерилитета, канцера, нефритиса, прехладе, кашља, дијареје, хемороида, екцема, ублажавању болова, јачању вида и бржем зарастању рана (Yeşilada и сар., 1999; Kültür, 2007; Leonti и сар., 2010).

Врсте рода *Crataegus* су делотворне у третману кардиоваскуларних обољења, регулисању крвног притиска, артериосклерозе и срчане инсуфицијенције, а испољавају и седативно и диуретичко дејство (Kirakosyan и сар., 2003; Jurikova и сар., 2012; Kostić и

сар., 2012; Salmanian и сар., 2014; Antonio и сар., 2015; Aksoy-Sagirli и сар., 2017; El-Hela и сар., 2017).

Врсте рода *Fragaria* се примењују код кожных и респираторних инфекција, упале уха и грла, уринарних, кардиоваскуларних и гастроинтестиналних обољења, дијабетеса, канцера бубрега и дојке. Такође, потпомажу епителизацију након озледе и опекотина насталих услед претераног излагања Сунчевим зрацима (Liberal и сар., 2014; Dyduch-Siemińska и сар., 2015; Roshan и сар., 2019).

Представници рода *Pyrus* се у народној медицини користе у лечењу кашља, прехладе, констипације, регулисању диурезе, диспепсије, дисменореје, за снижавање липида у крви и против дијареје (Li X. и сар., 2014; Lee и сар., 2015; Lia и сар., 2015).



Слика 7. Лековити представници фамилије Rosaceae: **А)** *Rosa alba* L. – цвет (фото: Salicyna); **Б)** *Fragaria chiloensis* L. – надземни део (фото: Elaine са Grey Cats); **В)** *Crataegus laevigata* (Poir.) DC. – цвет (фото: Jerzy Opiola); **Г)** *Crataegus monogyna* Jacq–плод (фото: Siebrand); **Д)** *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes – плод (фото: Arb O'Retum); **Ђ)** *Pyrus communis* L. – плод (фото: Tauno Erik).

Врсте рода *Malus* се традиционално употребљавају за регулисање пробаве, хипертензије, хиперлипидемије и хипергликемије (Li D. и сар., 2014). С обзиром да су објекат истраживања докторске дисертације врсте које припадају родовима *Prunus* и *Rubus*, у наставку ће бити више речи о лековитим биљкама наведених родова.

1.3.1. Лековите биљке рода *Prunus* L.

Врсте рода *Prunus* испољавају широк дијапазон фармаколошких дејстава због чега су интегративни део народних медицина различитих крајева (Слика 8). Традиционално се користе као диуретици, адстрингенци, пургативи, аналгетици, седативи, у лечењу астме, диспепсије, кашља и дијабетеса (Karabegović и сар., 2014; Ruiz-Rodríguez и сар., 2014, Jesus и сар., 2020).

Листови, цветна дршка и цветови врсте *P. avium* се примењују код дигестивних проблема, као лаксативи, карминативи и спазмолитици. Испољавају вазодилаторно и кардиотонично дејство. Такође, ублажавају тегобе настале кретањем калкулуса из бубрега (Sargin и сар., 2015). Плодови ове биљке се користе у лечењу уринарних инфекција (Zlatković и сар., 2014), дијареје, тонзилитиса и маларичне грознице (Šarić-Kundalić и сар., 2011), а делују и као експекторанси и лаксативи (Idolo и сар., 2010).

Лаксативно дејство имају и плодови *P. domestica*, који се поред тога употребљавају и у регулисању хипертензије и хиперлипидемије (Šarić-Kundalić и сар., 2011).

Плодови и цветови *P. divaricata* се користе као антихипертензиви (Polat и Satil, 2012), кардиотоници и вазодилатори, а ефикасни су и у лечењу атеросклерозе и дијабетеса (Sargin и сар., 2015).

Плодови *P. dulcis* су делотворни у третману гастритиса, улкуса и нервозе, а пупољци и цветови *P. orientalis* се користе за ублажавање симптома алергија, за брже исцељење опекотина и рана (Sargin и сар., 2015).

Листови, пупољци и цветне дршке *P. cerasus* су ефикасни у регулисању диурезе и срчане аритмије, као и за дезинфекцију коже лица (Šarić-Kundalić и сар., 2011). Плодови ове врсте се употребљавају као дигестиви (Cavero и сар., 2011).

P. mahaleb се у народној медицини користи као емолијент горњих дисајних путева, аналгетик, дијафоретик, у лечењу бронхитиса и дијабетеса (Miraldi и сар., 2001; Sargin и сар., 2015).

P. spinosa се употребљава као антихипертензив, диуретик, дигестив, адстрингент, аналгетик, за лечење дијареје, прехладе, кашља и астме (Cavero и сар., 2011; Di Novella и сар., 2013; Calvo и Cavero, 2014; Alarcón и сар., 2015).

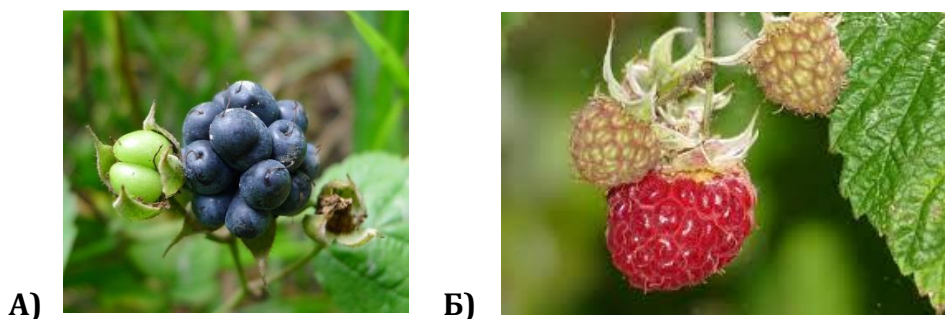


Слика 8. Традиционално коришћене лековите биљке рода *Prunus*: **А)** *P. divaricata* Ledeb. – плод (фото: N. V. Terekhina); **Б)** *P. dulcis* Mill. – плод (фото: Katja Schulz); **В)** *P. cerasus* L. – цвет (фото: Andrew Butko).

1.3.2. Лековите биљке рода *Rubus* L.

Плодови врста овог рода су веома заступљени у исхрани. У традиционалној медицини су, због своје лековитости, поред плодова, примену нашли и други делови биљака овог рода (Слика 9). Припадници рода *Rubus* се у народној медицини примењују у лечењу стерилитета, канцера, нефритиса, прехладе, кашља, дијареје, хемороида, екцема, ублажавању болова, јачању вида и бржем зарастању рана (Yeşilada и сар., 1999; Kültür, 2007; Leonti и сар., 2010).

Листови и плодови *R. idaeus* помажу у ублажавању симптома инфекције грла, уринарних и респираторних путева, дијареје, а учествују и у опуштању утерусне мускулатуре приликом порођаја. Користе се за детоксикацију организма, као облоге за хематоме и маске за негу суве коже лица. Надземни део биљке се користи за лечење стерилитета (Menković и сар., 2011; Šarić-Kundalić и сар., 2011; Di Novella и сар., 2013; Dei Cas и сар., 2015).



Слика 9. Традиционално коришћене лековите биљке рода *Rubus*: **А)** *R. caesius* L. – плод (фото: Gailhampshire); **Б)** *R. idaeus* L. – плод (фото: Bernard Dupont).

Изданци, корен и плод *R. canescens* делују као тоници, диуретици, антихипертензиви и антидијабетици. Корен се још употребљава у лечењу пнеумоније и простатитиса, као и за побољшање апетита. Пупољци и цветови имају карминативно и лаксативно дејство (Altundag и Ozturk, 2011; Polat и Satil, 2012; Sargin и сар., 2015).

Лист и плод *R. ulmifolius* се примењују за побољшање имуног система и крвне слике, брже зарастање рана, а цветови и изданци за испирање грла, лечење прехладе и респираторних проблема (Idolo и сар., 2010; Zlatković и сар., 2014; Alarcón и сар., 2015).

Литературни подаци указују и на примену *R. caesius* и *R. fruticosus* у третману дерматолошких, гастроинтестиналних, уринарних, гинеколошких и респираторних обољења (Leonti и сар., 2010).

R. hirtus и *R. sanctus* се примењују у регулисању нивоа шећера у крви, а *R. niveus* код менструалних проблема (Altundag и Ozturk, 2011; Sargin и сар., 2015; Malik и сар., 2015).

1.4. Секундарни метаболити биљака фамилије Rosaceae

1.4.1. Секундарни метаболити биљака

Једна од основних одлика биљног организма је могућност стварања глукозе процесом фотосинтезе. Настала глукоза се даље трансформише стварајући најзначајније групе биомолекула, као што су угљени хидрати (полисахариди), аминокиселине (касније протеини) и масне киселине (касније липиди). Појмом примарни метаболизам обухваћени су како процес фотосинтезе, тако и процеси даље трансформације глукозе до поменутих група једињења. Процеси примарног метаболизма се код биљака одвијају истим биосинтетским путевима, а њихови продукти омогућавају биљном организму нормално функционисање, раст и репродукцију (Kovačević, 2002).

Под секундарним метаболизмом се подразумевају даље модификације насталих угљених хидрата, аминокиселина и липида различитим биосинтетским путевима. Управо због непостојања јединственог биосинтетског пута, секундарни метаболити су веома бројна и разноврсна група једињења.

Првобитно се сматрало да су секундарни метаболити споредни производи биљног метаболизма без неког већег значаја за биљни организам, превасходно због чињенице да су у биљкама углавном присутни у малим количинама (Bourgauд и сар., 2001). Међутим, развој аналитичких техника, првенствено хроматографије, је довео до открића великог броја различитих секундарних метаболита и настанка нове научне дисциплине, фитохемије (Bourgauд и сар., 2001). Последњих деценија, напретком биохемије и молекуларне биологије омогућена је примена софистициранијих техника, што је резултирало бољим разумевањем хемијске структуре, биолошке функције секундарних метаболита и њихове потенцијалне примене.

Првенствена улога секундарних метаболита биљака је да их прилагоде копненом начину живота и омогуће им опстанак у таквој средини. Секундарни метаболити штите биљке од штетног *UV* (енгл. *ultraviolet*⁶) зрачења и од прекомерне транспирације. Синтетишу се као фитоалексини када дође до инфекције различитим патогеним микроорганизмима. Поред тога, делују као атрактанти, привлаче различите врсте опрашивача, те обезбеђују полинацију, као и дистрибуцију плодова и семена. Са еколошког аспекта, секундарни метаболити су важан чинилац алелопатских односа. Осим тога, често испољавају и репелентно дејство (Bourgauд и сар., 2001; Kovačević, 2002; Marin, 2003).

Захваљујући бројним биолошким улогама које испољавају, као и великој хемијској разноликости, секундарни метаболити се могу груписати на много начина. Ипак, уобичајено се користи класификација заснована на разликама у биосинтетском путу којим настају по којој је могуће издвојити три велике групе: феноле, терпене и стероиде и алкалоиде (Harborne, 1999).

Представници фамилије Rosaceae обилују секундарним метаболитима првенствено из групе фенолних једињења (Ogah и сар., 2014; Sameeullah и сар., 2018).

⁶ Ултраљубичасто зрачење

1.4.2. Биљни феноли

Феноли представљају највећу и најбоље истражену групу секундарних метаболита која је заступљена код свих биљака. Карактерише их присуство ароматичног прстена за који је везана једна или више хидроксилних група (Hidalgo и Almaјано, 2017). Осим варирања у броју и распореду угљеничних атома и хидроксилних група везаних за угљеников скелет, шароликости унутар ове групе једињења значајно доприноси естерификација органским киселинама и гликозилација (Li Н. и сар., 2012).

У зависности од критеријума, постоје бројне класификације фенолних једињења, а једна од најчешће коришћених је она по којој се деле на две велике групе: флавоноиде и нефлавоноидна једињења (Li Н. и сар., 2012.; Kabera 2014; Durazzo и сар., 2019). Флавоноиди су најбројнија група фенолних једињења широко распрострањена у биљном свету (Crozier и сар., 2006). Најзначајнија нефлавоноидна једињења су фенолне киселине, танини, лигнини и стилбени (Hussain и сар., 2019).

Фенолна једињења имају бројне важне улоге за биљни организам, као што су заштита од патогених микроорганизама, штетних инсеката, привлачење опрашивача и многе друге (Li Н. и сар., 2012). Квалитативни и квантитативни састави фенолних једињења су подложни утицају генетичких (врста, подврста, варијетет) и срединских фактора (локалитет, климатски услови, састав земљишта, изложеност сунцу) (Reyes-Carmona и сар., 2005; Dossett и сар., 2010; Дујмовић-Пургар и сар., 2012; Lee и сар., 2012). Осим тога, хемијски састав и количина полифенола могу варирати у зависности од биљног органа, фенофазе и старости биљке, начина складиштења биљног материјала и сл. (Acosta-Montoya и сар., 2010).

Феноли испољавају широк спектар биолошких активности: антипролиферативну, антиканцерогену, антидијабетичну, антимикробну, антиинфламаторну, антивирусну и пре свега антиоксидантну (Hidalgo и Almaјано, 2017). Антиоксидантна активност полифенола је последица њихове способности да донирају електрон слободнорадикалским врстама при чему, захваљујући могућности делокализације електронског облака у ароматичном прстену, формирају стабилније феноксил радикале (Hidalgo и Almaјано, 2017).

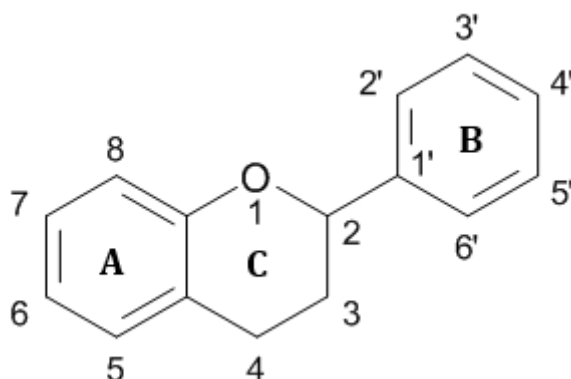
1.4.3. Флавоноиди

Назив „флавоноид“ датира из 1895. године када је Kostanesku изоловао први флавоноид и назвао га „флафон“ (лат. *flavus*⁷). Касније, 1952. године, су овај појам употребили Geisman и Hinseinner како би означили биљне пигменте карактеристичне структуре од 15 угљеникових атома организованих у три прстена обележена латиничним словима А, В и С (Јанићијевић и сар., 2008). Флавоноиди (С6-С3-С6) су у основи изграђени од два ароматична прстена повезана С3 јединицом (Crozier и сар., 2006; Dai и Mumper, 2010; Tsao, 2010; Durazzo и сар., 2019) (**Слика 10**).

Основна структурна јединица флавоноида, С6-С3-С6, се образује као продукт два одвојена биосинтетска пута и то пута шикимске киселине и ацетогенинског пута. Прекурсор у путу шикимске киселине су продукти разградње глукозе, фосфоенолпируват и еритроза-4-фосфат, који кондензацијом дају шикимску киселину као кључни интермедијер. Шикимска киселина је прекурсор у синтези ароматичних аминокиселина (фенилаланина, тирозина и триптофана). Наведене ароматичне аминокиселине даљом трансформацијом формирају фенилпропаноиде, једињења С6-С3 типа,

⁷ Жут

као и В и С прстен флавоноида (Delgado-Vargas и Paredes-Lopez, 2002). Ацетогенинским биосинтетским путем се образује А прстен флавоноида кондензацијом ацетил-СоА и три молекула малонил-СоА интермедијера (Crozier и сар., 2006).



Слика 10. Основна структура флавоноида – два ароматична прстена (А и В), повезана С3 јединицом.

Основна структура флавоноида подлеже различитим трансформацијама, као што су хидроксилације, метилације хидроксилних група, димеризације, везивање неорганског сулфата и гликозилације хидроксилних група и флавоноидног језгра чиме настају *O*- односно *C*-гликозиди (Veličković, 2013; Malik и сар., 2015; Khoddami и сар., 2013). Такође, флавоноиди, често показују тенденцију ка полимеризацији чиме настају танини (Veličković, 2013). Супституенти везани за основну флавоноидну структуру утичу на поларност флавоноида, биолошку расположивост флавоноидних једињења, као и њихову биолошку активност (Tsao, 2010; Durazzo и сар., 2019).

До данас је описано преко 8000 флавоноида и њихових деривата и тај број се непрекидно увећава (Lattanzio, 2013). На основу степена хидроксилације и варијација хемијске структуре С прстена могу се поделити у неколико подгрупа. Најзаступљеније међу њима су: флаволи, флавоноли, флаван-3-оли, изофлаволи, флаванони и антоцијанидини (El Gharras, 2009; Tsao, 2010). Поред наведених, у флавоноиде се убрајају и поједине, у исхрани мање присутне групе једињења, као што су дихидрофлаволи, флаван-3,4-диоли, кумарини, халкони, дихидрохалкони и аурони (Crozier и сар., 2006).

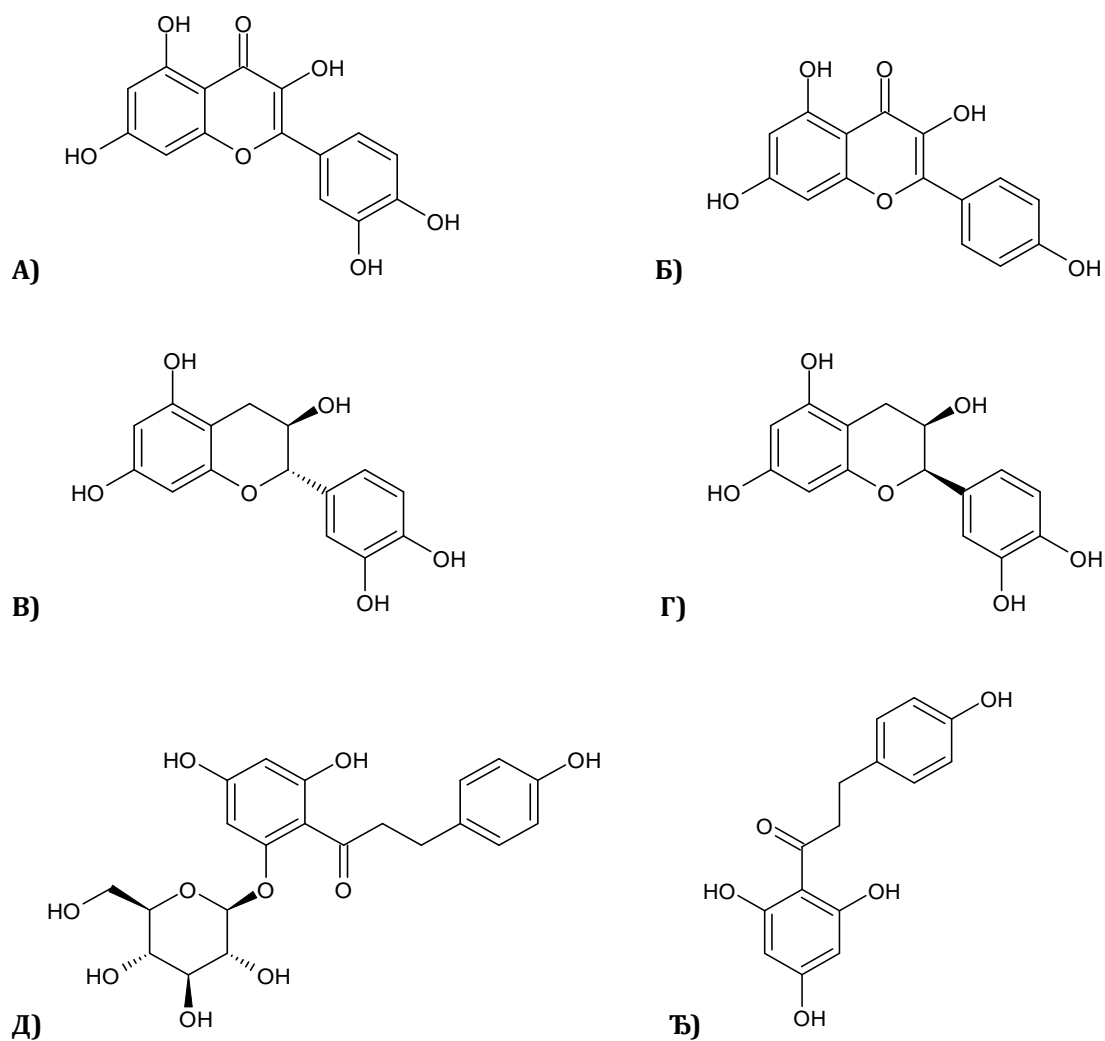
Флавоноиди представљају групу биљних пигмената и као такви се могу наћи у свим биљним органима слободни или коњуговани са угљеним хидратима и органским киселинама (Durazzo и сар., 2019). Ипак, највећа концентрација флавоноида је у епидермису листова, цветова и перикарпу плодова (Crozier и сар., 2006). Жута боја потиче од халкона, аурона и флавонола, док разне нијансе црвене, плаве и љубичасте потичу од антоцијана. Уколико нису сами обојени, флавоноиди могу доприносити боји пигмената као копигменти (Kovačević, 2002).

Иако главна улога флавоноида у биљкама још увек није утврђена, познат је њихов значај за полинацију и распрострањавање плодова. Флавоноиди биљкама пружају заштиту од штетних спољашњих утицаја као што су *UV* зрачење, слободни радикали, хербивори, патогени микроорганизми (бактерије и гљиве) при чему испољавају читав низ биолошких активности (Kovačević, 2002; Marin, 2003; Crozier и сар., 2006; Veličković, 2013).

Флавоноиди имају способност хватања слободних радикала и инхибиције бројних ензима. Захваљујући томе флавоноиди су фармаколошки активне компоненте које испољавају антимикуробна, анти-инфламаторна, антиоксидантна, хепатопротективна и друга својства (Kovačević, 2002; Marin, 2003; Durazzo и сар., 2019). Имају улогу у лечењу поремећаја изазваних инсуфицијенцијом периферних лимфних и крвних судова повећавајући њихову еластичност и прокрвљеност, кардиоваскуларних и неуродегенеративних болести, а делују и као диуретици, спазмолитици, антиалергетици, и цитостатици (Kovačević, 2002).

Последњих деценија влада велико интересовање за проучавање флавоноида, па је број биљних препарата на бази ових једињења у сталном порасту. Често се поред изолованих једињења у терапијске сврхе користе и смеше неколико једињења где до изражаја долази њихов синергистички ефекат (Kovačević, 2002).

У представницима фамилије Rosaceae до сада су идентификовани флавоноли, флаваноли, антоцијани, изофлаволи и дихидрохалкони. Флавоноли су углавном присутни у облику гликозилата, најчешће глукозе и рамнозе, а најзаступљенији су кверцетин и кемферол гликозиди (Слика 11).



Слика 11. Структурне формуле флавона, флаванола и дихидрохалкона: А) кверцетин; Б) кемферол; В) катехин; Г) епикатехин; Д) флоризин; Ђ) флоретин.

За разлику од флавонола, флаваноли се јављају и у слободном облику или образују полимере (кондензоване танине). Доминантна флаванолна једињења су стереоизомери катехина, катехин и епикатехин (**Слика 11**). Коњуговани облици дихидрохалкона, флоризин и флоретин (**Слика 11**), су пронађени у плодовима врста родова *Malus* и *Pyrus* (Ogah и сар., 2014). Антоцијани су широко распрострањени у припадницима фамилије Rosaceae, о чему ће више речи бити у наставку.

Из врста рода *Prunus* изоловани су бројни флавоноиди. Martini и сар. (2017) су испитивали фенолни састав 6 култивара *P. avium* и утврдили присуство различитих флавоноидних једињења, пре свега флаванол-3-ола (катехина, епикатехина, епикатехин-3-галата, катехин глукозида, ди-, тетра- и пентамера процијанидина), флавонола (кверцетин-3-О-рутинозида, кверцетин-3-О-глукозида, кверцетин-3-О-хексозида, кверцетин-7-О-глукозид-3-О-рутинозида, кемферол-3-глукозида, кемферол-3-рутинозида, кемферол-хексозо-рамнозо-хексозида) и других флавоноида (нарингенин-хексозида, таксифолин-рутинозида, таксифолин-хексозида). Мосан и сар. (2018) су у култиварима *P. domestica* са подручја Румуније идентификовали катехин, епикатехин, рутин, нарингин и кверцетин. У плодовима *P. pseudocerasus* су идентификовани флавоноиди сличне хемијске структуре са кето групом на С4 позицији у С прстену: астрагалин, цинарозид, кверцетин, рутин и витексин (Dong и сар., 2021). У екстрактима *P. spinosa* су идентификовани катехин, епикатехин-галат, епигалокатехин-галат, изорамнетин-рутинозид, кемферол и кверцетин гликозиди, апигенин, лутеолин, рутин, мирицетин, даидзеин (Veličković и сар., 2014; Baltas и сар., 2017; Dikić и сар., 2018; Porović и сар., 2020). Blando и сар. (2016) су идентификовали рутин и кверцетин-3-О-глукозид у плодовима *P. mahaleb*.

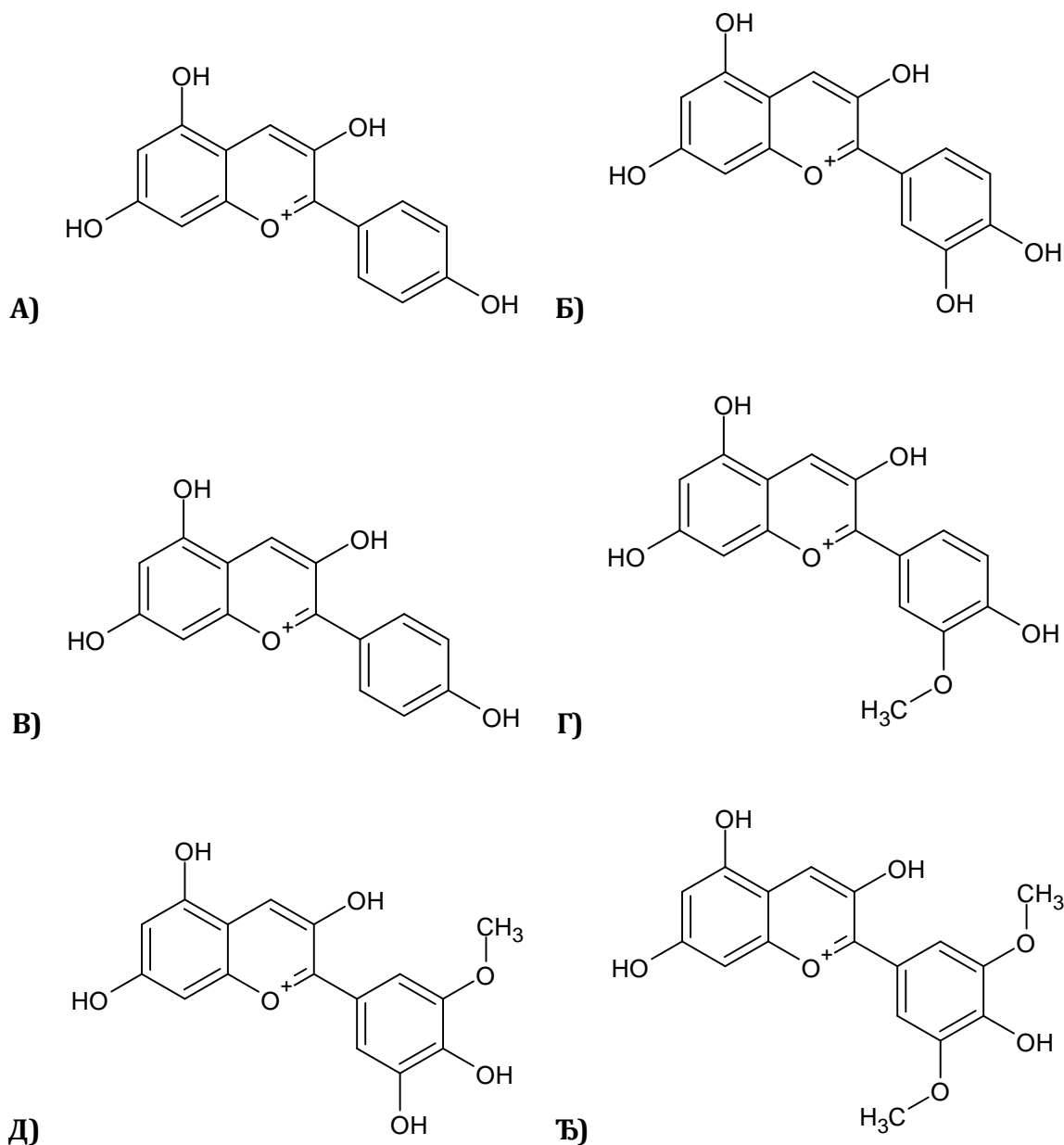
У различитим врстама рода *Rubus* су пронађени следећи флавоноиди: кемферол-гликозид (*R. adenotrichos*), кемферол-3-глукуронид (*R. articus*, *R. glaucus*), катехин (*R. articus*, *R. chamaemorus*, *R. fruticosus*), епикатехин (*R. adenotrichos*, *R. articus*, *R. chamaemorus*, *R. coreanus*, *R. fruticosus*, *R. glaucus*), кверцетин (*R. fruticosus*, *R. occidentalis*), кверцетин-гликозид (*R. adenotrichos*, *R. glaucus*), кверцетин-3-глукуроно-деоксихексозид (*R. articus*), кверцетин-3-глукуронид (*R. articus*, *R. chamaemorus*, *R. glaucus*), кверцетин-3-рутинозид (*R. fruticosus*), изорамнетин-3-глукуронид (*R. articus*) и многи други (Lee и сар., 2012). У екстрактима плодова, листова и цветова *R. discolor* је утврђено присуство рутина, апигенина, мирицетина, нарингина и нарингенина (Keser и сар., 2015).

1.4.4. Антоцијанидини

Антоцијанидини настају од флаванона и у основи су деривати флавијум-катјона (Pervaiz и сар., 2017; Hidalgo и Almajano, 2017). На основном угљеничном скелету се јављају бројни супституенти, тако да у С прстену у положају 3 сви антоцијанидини имају хидроксилну групу, док су С5 и С7 у прстену А и С3', С4' и С5' у прстену В често супституисани хидрокси и метокси групом (Veličković, 2013). У природи је до сада идентификовано око 17 антоцијанидина, од којих је свега 6 заступљено у храни биљног порекла (Hidalgo и Almajano, 2017). То су пеларгонидин, цијанидин, делфинидин, пеонидин, петунидин и малвидин који се сматрају основним антоцијанидинима (Lee, 2005; Crozier и сар., 2006; Hidalgo и Almajano, 2017) (**Слика 12**). Прва три антоцијанидина из наведеног низа поседују хидрокси групу у В прстену, док је код друга три она метилована (Veličković, 2013).

Антоцијанидини се у природи најчешће јављају у облику гликозида при чему се формирају антоцијани (Tsao, 2010; Hidalgo и Almajano, 2017). Назив антоцијан потиче

од грчких речи *anthos*⁸ и *kyáneos*⁹. То су хидросолубилни биљни пигменти који листовима, цветовима и плодовима дају црвену, плаву и љубичасту боју (Tsao, 2010; Lattanzio, 2013; Hidalgo и Almajano, 2017; Durazzo и сар., 2019).



Слика 12. Структурна формула антоцијанидина: **А)** пеларгонидин; **Б)** цијанидин; **В)** делфинидин; **Г)** пеонидин; **Д)** петунидин; **Ђ)** малвидин.

Антоцијани су углавном *O*-гликозиди, а као супституенти се јављају моносахариди (глукоза, рамноза, галактоза, арабиноза и ксилоза), али и ди- и три-сахариди (рутиноза и софороза) (Kähkönen и сар., 2003). Хидроксилне групе шећера могу бити ацетиловане фенолкарбонским киселинама што додатно доприноси разноврсности ових једињења (Kovačević, 2002; Crozier и сар., 2006).

Хидроксилација, метилација и гликозилација антоцијанидина мењају електронску густину молекула чиме се смањује или повећава стабилност молекула,

⁸ Цвет

⁹ Плава

што доводи до промене боје. Тако се с порастом броја хидроксилних група смањује стабилност, а боја мења у плаву, док пораст метокси група води већој стабилности и промени боје у црвену (Brouillard и сар., 1989). На стабилност антоцијана утичу бројни фактори, као што су ензими, концентрација кисеоника, аскорбинска киселина, сумпор диоксид (SO₂), метални јони и шећери, а посебно физички фактори, рН и температура (Kovačević, 2002.; Veličković, 2013). Због тога је боја ћелијског сока у ком су растворени антоцијани јако променљива у зависности од спољашњих фактора, али и тренутног физиолошког стања ћелије (Kovačević, 2002; Lattanzio, 2013).

До сада је изоловано преко 500 антоцијана (Brouillard и Delaporte, 1977; Tsao, 2010). То је широко распрострањена група биљних пигмената, нарочито у групи скривеносеменица. Најчешће се налазе растворени у вакуолама биљних ћелија, дајући боју одговарајућем органу. Састав антоцијана је карактеристичан за дату врсту, па се због тога користе и у хемотаксономији (Veličković, 2013). Слично флавоноидима, антоцијани имају вишеструке улоге у биљном организму, укључујући заштитну (од предатора, патогена, штетних спољашњих фактора). С обзиром да је реч о биљним пигментима, имају важну улогу као атрактанти чиме доприносе полинацији и дисеминацији.

Антоцијани испољавају бројна лековита својства, због чега су од давнина коришћени за припремање традиционалних лекова и као додаци исхрани. Примењују се у лечењу хипертензије, пирексије, болести јетре, дизентерије, дијареје, инфекција уринарног тракта, камена у бурењу, али и за побољшање вида и периферне циркулације (Kovačević, 2002; Veličković, 2013). Данас, антоцијани служе и као природни извори боје у прехранбеној, козметичкој и фармацеутској индустрији (Kovačević, 2002).

Досадашња истраживања су показала да исхрана богата антоцијанима биљног порекла има бројне позитивне ефекте на људски организам: смањује ризик од кардиоваскуларних болести, канцера и дијабетеса типа 2 (Durazzo и сар., 2019).

С обзиром да имају улогу биљних пигмената, антоцијани су у биљним врстама фамилије Rosaceae широко распрострањени. Најзаступљенији су гликозиди цијанидина и пеларгонидина, као што су цијанидин-3-глукозид, цијанидин-3-рутинозид, цијанидин-3-малонилглукозид, пеларгонидин-3-рутинозид, пеларгонидин-3-глукозид и други (Ogah и сар., 2014).

Martini и сар. (2017) су идентификовали 12 антоцијана у узорцима *P. avium*: цијанидин-3-глукозид, цијанидин-3-рутинозид, пеонидин-3-глукозид, пеонидин-3-рутинозид, пеларгонидин-3-рутинозид, пеларгонидин-3-глукозид, цијанидин-3-кумароил-диглукозид, цијанидин-3-О-самбубиозид, цијанидин-3-5-диглукозид, цијанидин-3-софорозид, цијанидин-3-О-арабинозид, малвидин-3-О-глукозид-ацеталдехид. Асего и сар. (2019) су у плодовима исте врсте пронашли цијанидин-3,5-О-дихексозид, цијанидин-3-О-глукозид, цијанидин-3-О-рутинозид и пеонидин-3-О-рутинозид. У узорцима *P. spinosa* су идентификовани гликозиди цијанидина и пеонидина (Veličković и сар., 2014; González-de-Peredo и сар., 2020; Popović и сар., 2020). Гликозиди цијанидина, попут цијанидин-3-ксилозилглукозида, цијанидин-3-ксилозилрутинозида, цијанидин-3-глукозида и цијанидин-3-рутинозида су пронађени у врсти *P. mahaleb* (Gerardi и сар., 2015).

Lee и сар. (2012), на основу свеобухватног прегледа литературних података, указују на присуство следећих антоцијана у врстама рода *Rubus*: цијанидин-3-глукозида (*R. acuminatus*, *R. adenotrichos*, *R. arcticus*, *R. chamaemorus*, *R. glaucus*, *R. jamaicensis*, *R. racemosus*), цијанидин-3-рутинозида (*R. acuminatus*, *R. arcticus*, *R. chamaemorus*, *R. coreanus*, *R. glaucus*, *R. racemosus*), цијанидин-3-малонилглукозида (*R. adenotrichos*, *R.*

jamaicensis), цијанидин-3-самбубиозида (*R. glaucus*), пеларгонидин-3-рутинозида (*R. arcticus*), делфинидин-глукуронида (*R. coreanus*) и многих других углавном цијанидинских гликозида.

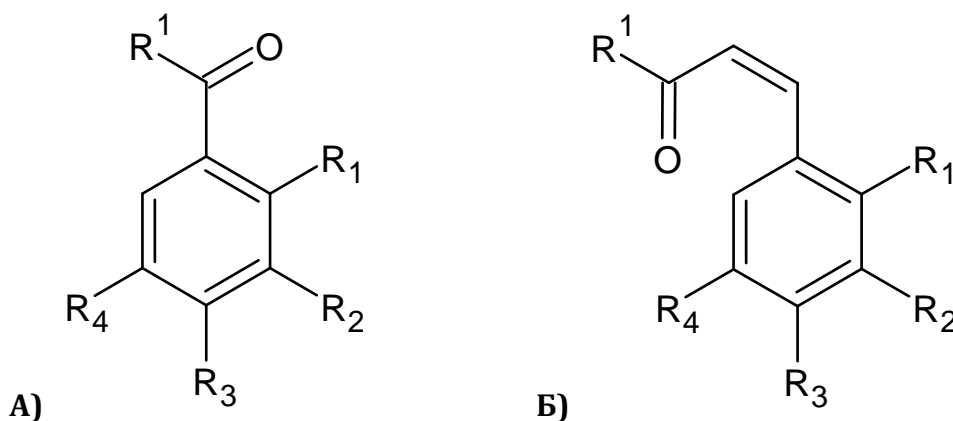
1.4.5. Фенолне киселине

Фенолне киселине су, поред флавоноида, највише проучавана група фенолних једињења и спадају у просте феноле. Одликује их ароматично фенолно језгро за које је везан бочни угљеников низ са карбоксилном групом (Dai и Mumper, 2010; Veličković, 2013; Tsao, 2010; Latanzio, 2013; Durazzo и сар., 2019). Шикимским биосинтетским путем настају бензоева и циметна фенолна киселина. Даљим трансформацијама бензоеве и циметне киселине настају њихови деривати од којих су најзначајнији хидрокси деривати, посебно полихидрокси деривати, јер испољавају јачу антиоксидантну активност у односу на монохидрокси фенолна једињења (Veličković, 2013).

Фенолне киселине имају ограничено распрострањење у биљном свету, где се најчешће срећу као слободне или у облику гликозида, естара или депсида (естри две фенолне киселине) (Kovačević, 2002).

Испољавају бројна фармаколошка дејства међу којима и антиинфламаторно, антиоксидантно и ензим-инхибиторно. Захваљујући томе што садрже гликозиде ових киселина, многе биљне дроге се користе у традиционалној медицини за лечење обољења јетре, а служе и као сировине за синтезу хепатопротективних лекова (Kovačević, 2002).

У зависности од дужине бочног угљеничног ланца могу се груписати у деривате бензоеве (C6-C1) и циметне киселине (C6-C3) (El Gharass и сар., 2009; Dai и Mumper, 2010; Tsao, 2010; Latanazzio, 2013; Hidalgo и Almaјano, 2017; Durazzo и сар., 2019) (Слика 13).



Слика 13. Структурне формуле деривата фенолних киселина: **А)** бензоеве киселине; **Б)** циметне киселине.

Најраспрострањенији деривати бензоеве киселине су: *p*-хидрокси-бензоева, ванилинска, синрингинска, гална и елагна киселина (Latanazzio, 2013; Hidalgo и Almaјano, 2017; Durazzo и сар., 2019). Хидрокси-бензоеве киселине су у биљном ткиву претежно присутне у облику коњугата са угљеним хидратима и органским киселинама, хидролизујућих танина, а могу се јавити и везане за ћелијски зид, у лигнинима (Latanazzio, 2013). Најзначајнија хидрокси-бензоева киселина је гална која је назив добила због тога што у виду естара улази у састав биљних гала, где чини и до 70%

састава укупних фенолних једињења (Crozier и сар., 2006). Захваљујући присуству три хидроксилне групе испољава изузетна антиоксидантна својства. Гална киселина је основна градивна јединица галотанина и елагитанина који су најзаступљенији у мангу и црвено обојеном воћу (јагодама, малинама и купинама) (Crozier и сар., 2006; El Gharass и сар., 2009; Latanazzio, 2013). Кондензацијом два молекула галне киселине настаје димер, елагна киселина. Елагна киселина има многобројне благотворне ефекте на људско здравље: снижава крвни притисак, смањује холестерол у крви, спречава појаву бора и друге (Roche и сар., 2017). Khadem и Marles (2010) наводе да је током последњих деценија потврђена биолошка активност још најмање 30-ак деривата хидрокси-бензојеве киселине природног порекла.

Деривати циметне киселине, фенилпропаноиди, су заступљенији од деривата хидрокси-бензојеве киселине и ту се убрајају хидрокси-циметна, *p*-кумаринска, кафена, ферулна и хлорогенска киселина (Crozier и сар., 2006; El Gharass и сар., 2009; Hidalgo и Almaјано, 2017; Durazzo и сар., 2019). Хидрокси-циметне киселине су у виду слободних једињења присутне углавном у обрађеној храни биљног порекла што је последица хемијске хидролизе (киселе или алкалне) или ензимске активности (El Gharras и сар., 2009; Tsao, 2010; Latanazzio, 2013). Насупрот слободним формама, много су чешћи коњугати хидрокси-циметне киселина са другим хидрокси-киселинама у виду естара који додатно могу бити и гликозиловани (Latanazzio, 2013;). Углавном формирају естре са хинском, шикимском и винском киселином. Најраспрострањенији је дериват хинске киселине са кафеном, 5-*O*-кафеоилхинска, односно хлорогенска киселина. Називом хлорогенске киселине су обухваћени и неки мање присутни деривати ове две киселине, као што су 3- и 4-*O*-кафеоилхинска киселина. Најбогатији извор хлорогенских киселина су незрела, зелена зрна кафе (*Coffea arabica*) и листови *Ilex paraguariensis* (парагвајски чај) (Crozier и сар., 2006; Latanazzio, 2013). Поред тога, у значајнијим количинама су присутни у поврћу и воћу, посебно боровници (*Vaccinium myrtillus*), кивију (*Actinidia deliciosa*), шљиви (*P. domestica*), трешњи (*P. avium*) и јабукама (*Mallus sp.*) (El Gharass и сар., 2009). Важно је истаћи да се у фенилпропаноиде поред хидрокси-циметних киселина, њихових естара и гликозида, такође убрајају и кумарини, хромони и халкони. То су изузетно важне групе С6-С3 једињења за чију биосинтезу су хидрокси-циметне киселине прекурсори.

Хидрокси-циметне киселине и њихови деривати су фармаколошки активне супстанце, чије биолошке активности привлаче доста пажње последњих година (Durazzo и сар., 2019).

Припадници фамилије Rosaceae обилују фенолним киселинама, као што су кафена, ферулна, синапинска, сиригинска, кумаринска, гална, ванилинска и многе друге (Ogah и сар., 2014).

Досадашњим истраживањима је потврђено присуство различитих фенолних киселина у биљним врстама рода *Prunus*, као што су хлорогенска, сиригинска, 3-хидрокси- и 2,3-диметоксибензојева, *o*- и *p*-кумаринска (Mocan и сар., 2018) из врсте *P. domestica*. Хидрокси-циметне киселине су у врстама овог рода идентификовали и други истраживачи (Martini и сар., 2017; Blando и Oomah, 2019). Radovanović и сар. (2013) су у плодовима *P. spinosa* пронашли кафену, сиригинску и кумаринску киселину. Присуство фенолних киселина у овој врсти, пре свега хлорогенских, потврдили су и други истраживачи (Veličković и сар., 2014; Dikić и сар., 2018; Popović и сар., 2020).

Schulz и сар. (2019) су доказали присуство различитих фенолних киселина у плодовима *R. ulmifolius*, укључујући кафене, *p*-кумаринске, 3,4-дихидрокси-бензојеве, ферулне, галне, салицилне, синапинске и сиригинске. Сличан састав фенолних

киселина су идентификовали и Zengin и сар. (2019) у екстрактима листова *R. ibericus* и *R. sanctus*. Из публикације Schulz и Chim (2019) може се уочити да су и *R. idaeus*, *R. ellipticus*, *R. niveus*, *R. occidentalis*, *R. fruticosus*, *R. adenotrichus* и *R. glaucus* богате фенолним киселинама, укључујући поред већ наведених и елагну, циметну, хлорогенску, ванилинску и друге.

1.4.6. Остали секундарни метаболити биљака из фамилије Rosaceae

1.4.6.1. Танини

Назив танин датира из 18. века и води порекло од француске речи *tanin* којом су означавања сва једињења биљног порекла коришћена за штављење коже (Latanazzio, 2013). Према најприхватљивијој дефиницији то су „фенолна једињења молекулске масе између 500 и 3.000 далтона (Da), растворљива у води, која поред реакција уобичајених за фенолна једињења, испољавају и специфична својства, као што су таложење алкалоида, желатина и других протеина“ (Santos-Buelga и Scalbert, 2000; Latanazzio, 2013).

Танини су јако заступљена група биљних полифенола. Њихова улога је преваходно заштита од хербивора јер таложе протеине из хране и тиме смањују њену искористљивост. Такође, танини штите биљке од патогених микроорганизама због својих антимицробних својстава. (Santos-Buelga и Scalbert, 2000; Veličković, 2013).

На основу хемијске природе танини се могу поделити на хидролизујуће танине, кондензоване танине (проантоцијанидине) и флоротанине (Santos-Buelga и Scalbert, 2000; Latanazzio, 2013).

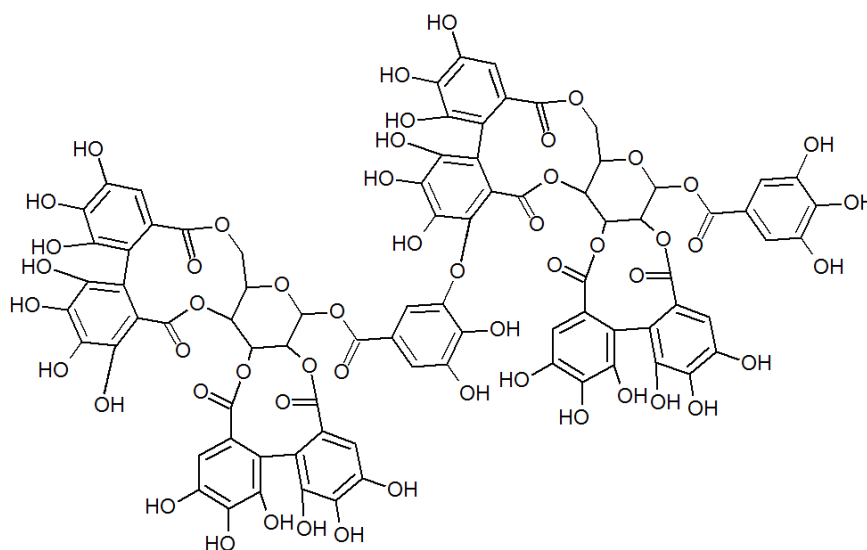
У фамилији Rosaceae заступљени су како хидролизујући, тако и кондензовани танини. Хидролизујући танини су присутни у форми елагитанина (сангвин Н6 (Слика 14), сангвин Н10, ламберцијанин С) и галотанина (бис-хидроксицифеноил-глукоза, галоил-ННДР-глукоза) (Ogah и сар., 2014). Од кондензованих танина јављају се процијанидин димери В1, В2, В3, В4, В5, В7 и процијанидин тримери С, С1 и ЕЕС (Ogah и сар., 2014).

1.4.6.2. Цијаногени гликозиди

Цијанхидрини су једињења која садрже нитрил групу и веома су нестабилна, због чега реагују са шећерима, те се у природи срећу у облику цијаногених гликозида. У изградњи цијаногених гликозида учествују аминокиселине фенилаланин, тирозин, леуцин, изолеуцин и валин, а од угљених хидрата глукоза или ценобиоза.

Цијаногени гликозиди се јављају у многим врстама фамилије Rosaceae, а посебно у врстама из рода *Prunus*. Најчешће се налазе у семенима и младим, зељастим деловима биљке, па се претпоставља да имају заштитну улогу од других организама, али и од штетног дејства цијанидног јона из саме биљке. У биљци се цијаногени гликозиди налазе у гликозилованом облику, међутим уколико дође до оштећења ткива биљке, из њих се ослобађа отрован гас, цијановодоник (Kovačević, 2002; Marin, 2003).

Цијанхидрини имају хемотаксономски значај, како на нижим, тако и на вишим нивоима класификације, а као посебно интересантан пример се издваја врста *P. amygdalus*, унутар које се могу издвојити два варијетета, *dulcis* (слатки бадем) и *amara* (горки бадем), управо на основу присутности цијаногених гликозида у последњој (Marin, 2003).



Слика 14. Структурна формула елагитанина сангвин Н6.

1.5. Антиоксидантна активност

1.5.1. Слободни радикали

Слободни радикали су јони, молекули или једињења која поседују макар један неспарени електрон у валентном нивоу електронског омотача. Стога су то изузетно нестабилне, краткоживеће и високореактивне хемијске врсте. У тежњи да постигну стабилну конфигурацију улазе у реакције са ниском специфичношћу према супстрату, при чему и сам супстрат претварају у слободни радикал и тиме покрећу низ ланчаних реакција. Како немају велику специфичност према супстрату, слободни радикали реагују и са молекулима ДНК, протеинима и липидима што доводи до дегенеративних промена у ћелији (Halliwell и сар., 1995; Pham-Huu и сар., 2008).

Према томе на ком атому у молекулу се налази неспарени електрон, слободни радикали се могу поделити у следеће групе:

1) реактивне врсте кисеоника (*ROS* – енгл. *Reactive Oxygen Species*):

- хидроксил-радикал ($\text{OH}\cdot$),
- супероксид анјон радикал ($\text{O}_2^{\cdot-}$),
- хидропероксил-радикал ($\text{HO}_2\cdot$),
- пероксил-радикал ($\text{ROO}\cdot$),
- алкоксил-радикал ($\text{RO}\cdot$),
- карбонатни радикал ($\text{CO}_3^{\cdot-}$),
- угљендиоксидни радикал ($\text{CO}_2^{\cdot-}$) и
- синглетни кисеоник ($^1\Sigma_g^1\text{O}_2$);

2) реактивне врсте азота (*RNS* – енгл. *Reactive Nitrogen Species*):

- азот-моноксидни радикал ($\text{NO}\cdot$),

- азот-диоксидни радикал (NO_2^\bullet) и
- нитратни радикал (NO_3^\bullet);

3) **реактивне врсте хлора** (*RCS* – енгл. *Reactive Chlorine Species*):

- атомски хлор (Cl^\bullet);

4) **реактивне врсте брома** (*RBS* – енгл. *Reactive Bromine Species*):

- атомски бром (Br^\bullet) и

5) **реактивне врсте сумпора** (*RSS* – енгл. *Reactive Sulphur Species*) (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Поред слободнорадикалских хемијских врста, постоје молекули који су такође изузетно реактивни, јер врло лако продукују слободне радикале, као што су: водоник пероксид (H_2O_2), хипохлорна киселина (HOCl), хипобромна киселина (HOBr), синглетни кисеоник ($^1\Delta_g \text{ } ^1\text{O}_2$), озон (O_3), органски пероксиди (ROOH), пероксинитрит (ONOO^-), пероксинитритна киселина (ONOOH), нитрил хлорид (NO_2Cl), хлорамини, хлор (Cl_2), бром (Br_2), бром хлорид (BrCl), хлор (IV) оксид (ClO_2), азотаста киселина (HNO_2), нитрозил катјон (NO^+), нитронијум катјон (NO_2^+), нитроксидни анјон (NO^-), азот (IV) оксид (N_2O_4), азот (III) оксид (N_2O_3), алкилпероксинитрити (RO_2ONO) (Halliwell и Gutteridge, 2015).

Реактивна слободнорадикалска и нерадикалска једињења настају под дејством разних ендогених и егзогених фактора. Реактивне кисеоничне и азотне врсте могу настати као продукти уобичајеног ћелијског метаболизма, али и под утицајем штетних спољашњих фактора као што су *UV* и јонизујуће зрачење, дувански дим, претерана употреба лекова, хемикалије, пестициди и др.

Организми су развили бројне механизме којима могу да редукују високо реактивне честице. Стога, те честице када су присутне у ниским концентрацијама, не представљају проблем за живи организам, већ омогућавају његово нормално функционисање. Међутим, уколико дође до поремећаја равнотеже у односу слободних радикала и антиоксидантних механизма, најчешће услед хиперпродукције слободних радикала или смањеног уноса антиоксидантних агенаса, настају бројне промене у структури значајних биомолекула (липида, протеина и ДНК) које доводе до старења и развоја болести (Halliwell и сар., 1995).

Слободни радикали су окидач неких од најзаступљенијих болести данашњице, попут канцера и дијабетеса. Многи истраживачи су указали на неоспорну улогу оксидативног стреса у канцерогенези која се највероватније манифестује модификацијом експресије гена било услед оштећења на ДНК молекулу или услед епигенетичких фактора који доводе до стимулације раста и пролиферације (Pourahmad и сар., 2016). Резултати различитих истраживања такође указују да су β -ћелије Лангерхансових острваца, услед слабо развијених механизма антиоксидантне заштите, посебно подложне утицају слободних радикала у условима хипергликемије. Слободни радикали доводе до продукције нових слободних радикала у митохондријама и ендоплазматичном ретикулуму β -ћелија, чиме се затвара круг који након неког времена резултира у немогућности ових ћелија да адекватно одговоре на повећану концентрацију глукозе у крви. Осим што доводи до настанка дијабетеса, оксидативни стрес утиче и на прогресију болести, јер удружен са хипергликемијом оштећује и друге ћелије и ткива, што резултира пре свега микро и макроваскуларним компликацијама (Cohen и сар., 2012; Burgos-Morón и сар., 2019; Oguntibeju, 2019). Стога су слободни радикали предмет многих истраживања у оквиру медицине и фармације. С друге

стране, требало би истаћи и њихову важност за прехранбену индустрију, због тога што су они често и узрочници кварења намирница (Halliwell и сар., 1995; Ковачевић, 2002).

1.5.2. Антиоксиданти

Упркос томе што је појам антиоксидант у фокусу истраживања, а самим тим и у употреби већ дужи низ година, није га једноставно дефинисати. Наиме, различите науке антиоксиданте проучавају са различитих аспеката, због чега користе и другачије критеријуме за дефинисање.

Данас је најчешће коришћена она коју је предложио Halliwell (2001), по којој је антиоксидант „било која супстанца која, када је присутна у ниским концентрацијама у поређењу са оксидабилним супстратом, може значајно да одложи или спречи оксидацију тог супстрата“. Појмом „оксидабилни супстрат“ обухваћени су сви биомолекули (угљени хидрати, протеини липиди и нуклеинске киселине), било да се налазе у живим системима или храни. Уопштеност ове дефиниције не дозвољава издвајање одређеног једињења као најбољег антиоксиданта, јер њихова способност и ефикасност зависи како од врсте супстрата чију оксидацију одлажу или спречавају, тако и од механизма хемијских процеса, а посредно и од средине у којој се ти процеси одигравају (Halliwell и сар., 1995).

Антиоксидантна равнотежа је заправо динамичка равнотежа која постоји између настанка слободних радикала и њиховог уклањања различитим антиоксидантним механизмима, чиме се омогућава адекватна антиоксидантна заштита ћелије, односно организма у целости. Антиоксидантна заштита се одвија на неколико нивоа, односно спречавањем настанка слободних радикала, затим њиховим уклањањем и репарирањем насталих оштећења на липидима, угљеним хидратима, протеинима и нуклеинским киселинама (Ђорђевић и сар., 2000).

Први ниво заштите од оксидативног стреса, спречавање настанка слободних радикала, се обезбеђује ангажовањем различитих ендогених ензимских антиоксиданата (супероксид дисмутаза, каталаза, глутатјон-пероксидаза, глутатјон-редуктаза и глутатјон-трансфераза). Међутим, када је повећана продукција слободних радикала, долази до поремећаја оксидативног статуса ћелије и нису довољни ендогени антиоксиданти да би се одржала равнотежа између настанка и уклањања слободних радикала. Стога, је неопходно да се унесу егзогени, неензимски антиоксиданти (витамин Е, С, албумини, полифеноли и сл.) из хране, пре свега биљног порекла, како би се обезбедила адекватна антиоксидантна заштита организма. Због тога, последњих деценија влада велико интересовање за антиоксидантима природног порекла, а посебно биљним секундарним метаболитима који испољавају ову активност (Ђорђевић и сар., 2000; Seyidoglu и Aydin, 2020).

1.5.3. Антиоксидантна активност биљака из фамилије Rosaceae

На основу досадашњих истраживања јасно је да су се многи представници фамилије Rosaceae показали као изузетно добри антиоксидантни агенси.

Антиоксидантни ефекат екстракта плодова *Crataegus pinnatifida*, *C. monogyna*, *C. laevigata* и *C. mexicana* су потврђени различитим *in vitro* спектрофотометријским методама. Аутори су овај ефекат приписивали синергизму између великог броја фенолних једињења које ове биљке садрже, али и синергизму фенолних са нефенолним

секундарним метаболитима попут каротеноида (Kirakosyan и сар., 2003; Jurikova и сар., 2012; Kostić и сар., 2012; Antonio и сар., 2015).

Према Chrubasik и сар. (2008), различити екстракти плодова *Rosa canina*, након отклањања витамина С којим је ова врста богата, испољавају изузетна антиоксидантна својства. Achuthan и сар. (2003) су испитивали антирадикалске способности различитих фракција цветова *R. damascena*, при чему се као најефикаснија показала ацетонска фракција. Аутори ове студије су сугерисали на потребу даљих истраживања хемијског састава ацетонске фракције како би се утврдило које компоненте су одговорне за њена антиоксидантна својства.

Плодови култивисаних и самониклих врста рода *Fragaria* су били предмет проучавања многих студија којима је доказан њихов антиоксидантни потенцијал. Јаче антиоксидантно дејство су испољили суви плодови у односу на свеже, као и самоникле биљке у односу на гајене што је у оба случаја објашњено већом концентрацијом фенолних једињења (Liberal и сар., 2014; Yildiz и сар., 2014; Dyduch-Siemńska и сар., 2015).

И екстракти листова и плодова многих биљака рода *Pyrus*, укључујући *P. communis*, *P. pyrifolia*, *P. elaeagnifolia* и *P. bretschneideri* су деловали антиоксидантно (Li X. и сар., 2012; Li X. и сар., 2014; Sroka и сар., 2014 и 2019; Lee и сар., 2015; Wang и сар., 2015; Erbil и сар., 2018).

Антиоксидантна својства екстраката листова *Malus domestica* растварачима различите поларности потврдили су Sowa и сар. (2016). Екстракт коре *M. toringoides* се путем β -каротен/линолеинска киселина, DPPH и FRAP колориметријских метода показао као добар антиоксидантни агенс што су аутори приписали пре свега протокатехинској киселини (Elansary и сар., 2020).

Екстракти 6 култивара *P. avium* су ефикасно неутралисали физиолошки значајне слободне радикале, попут супероксид анјон радикала и хидроксил радикала, при чему је култивар Duran Nero био најефикаснији (Martini и сар., 2017). У истом раду је процењена антиоксидантна активност и ABTS и FRAP тестом, а добијене вредности су варирале у опсегу од 533,1 до 3153,6 μmol еквивалената Trolox-а у 100 g свежих плодова (fw; енгл. *fresh weight*), односно 1322,6 и 6784,9 μmol Trolox/100 g fw, редом. За разлику од претходних тестова, у овим су најбоља антиоксидантна својства показали култивари Lapins и Moretta. Екстракти ове врсте су успешно „хватали“ DPPH слободне радикале и у раду Асего и сар. (2019) при чему је активност била дозно-зависна. Аутори су уочили да на испољена антиоксидантна својства утиче не само концентрација фенолних једињења, већ и квалитативни састав екстраката. Плодови *P. mahaleb* су показали значајну антиоксидантну активност коју су аутори објаснили високим садржајем укупних фенола и антоцијана (Blando и сар., 2018). Бројни истраживачи су указали на антиоксидантна својства различитих биљних органа *P. spinosa* која су објашњавали углавном високим садржајем полифенола (Veličković и сар., 2014; Pinacho и сар., 2015; Tahirović и сар., 2018; Stanković и сар., 2019; Popović и сар., 2020).

Muniyandi и сар. (2019) су изузетну антиоксидантну активност екстраката *R. niveus*, *R. ellipticus* и *R. fairholmianus* утврдили кроз четири *in vitro* методе и приписали је фенолним једињењима, танинима, флавоноидима и антоцијанима. Veličković и сар. (2019) су потврдили ефикасност екстраката *R. ideus* у неутралисању слободних DPPH радикала. Водени, метанолни и етил-ацетатни екстракти *R. ibericus* и *R. sanctus* су деловали антиоксидантно у раду Zengin и сар. (2019), а исти ефекат су показали и узорци плодова *R. ulmifolius* у различитим фазама зрелости (Schulz и сар., 2019). Samaniego и

сар. (2020) су такође указали на антиоксидантни потенцијал различитих еквадорских култивара *R. glaucus*.

1.6. Антимикробна активност

1.6.1. Микроорганизми

Микроорганизми представљају голим оком невидљиве живе организме који припадају различитим царствима (Ђukić и сар., 2010). Будући да су то најстарији становници Планете, који су настали пре око 3,6 милијарди година, присутни су у човековом непосредном окружењу од самог настанка људске врсте. Током историје многи патогени микроорганизми су узроковали појаву различитих инфективних болести које су неретко добијале епидемијске, па и пандемијске размере представљајући озбиљну претњу по опстанак људског рода. Истодобно, захваљујући микробиолошкој активности, човек је од давнина био у могућности да произведе хлеб, киселе млечне производе и алкохолне напитке попут вина и пива. Упркос томе, микроби су доста дуго за истраживаче представљали праву непознаницу услед постојања природне баријере између могућности чула вида да опажа предмете величине изнад 30 μm и димензија микроорганизама које су знатно мање од наведене вредности (већина данас познатих бактерија је величине од 2-5 μm) (Ђukić, и сар., 2010; Uzunović, 2016).

Развојем микроскопије омогућено је интензивније проучавање микроорганизама, а откриће патогена, узрочника различитих обољења усмерило је истраживања ка проналажењу антибиотика и антимикотика који би допринели смањењу њихове бројности и редукцији штетних ефеката. Тако се, након Другог светског рата, пеницилин ког је 1928. године Alexander Fleming изоловао из гљиве *Penicillium notatum* поново нашао у жижи интересовања када су фармаколог Howard Walter Florey и биохемичар Ernst Boris Chain указали на његову практичну примену. Откриће пеницилина омогућило је синтезу читавог спектра антибиотика који су били ефикасни против готово свих тада познатих бактерија (Ђukić, и сар., 2010; Uzunović, 2016).

Нажалост, употреба антимикробних агенаса донела је и нове изазове. Наиме, откривено је да синтетички антимикробни агенси имају бројне штетне ефекте на људски организам, доводе до преосетљивости и алергија, а дуготрајном употребом и до развоја антимикробне резистенције која представља један од највећих проблема с којим се суочава данашња медицина.

1.6.2. Антимикробна резистенција

Антимикробна резистенција је отпорност микроорганизама на дејство антибиотика и антимикотика и може бити примарна или урођена и секундарна или стечена. Примарна/урођена антимикробна резистенција постоји код појединих микроорганизама који су без обзира на то што претходно нису били под дејством одређеног антимикробног агенса на њега отпорни. Такав тип антимикробне резистенције се уобичајено јавља у природи. Проблем резистенције се у овом случају може једноставно превазићи применом друге групе антимикробних лекова чије се дејство манифестује другачијим молекуларним механизмима (Uzunović, 2016).

Насупрот примарној, секундарна антимикробна резистенција се јавља као адаптивни одговор након изложености дејству антимикробних терапеутика. Наиме,

након открића антибиотика и антимикотика, дошло је до њихове превелике употребе у ветеринарској и хуманој медицини, као и до њихове неадекватне примене. Последица тога је да су се појавили резистентни сојеви који су развили различите механизме којима успешно избегавају или елиминишу дејство антимикробних лекова и чији се гени брже шире у популацији у односу на осетљиве сојеве (Krstić, 2018).

За разлику од примарне, секундарна антимикробна резистенција представља велики проблем у данашњој медицини, јер до скоро ефикасни лекови немају више никаквог дејства на резистентни сој. То посебно долази до изражаја у болничким срединама где су ови сојеви чешћи, а број имунокомпромитованих пацијената, који су подложнији оваквим инфекцијама, већи. Од посебне важности су унакрсна и вишеструка секундарна антимикробна резистенција (Uzunović, 2016)..

Под унакрсном резистенцијом се подразумева отпорност микроорганизама на антимикробне агенсе који су хемијски слични, као што су аминокликозиди. До унакрсне резистенције може доћи и уколико се јави отпорност на антимикробне агенсе који упркос хемијском диверзитету своју активност испољавају истим молекуларним механизмима као у случају макролида и линкомицина (Uzunović, 2016).

Уколико се развије резистенција на антимикробне агенсе који нису хемијски сродни и чија активност се манифестује путем различитих молекуларних принципа, ради се о вишеструкој резистенцији. Неки од важнијих узрочника болничких инфекција су опортунистички мултирезистентни патогени, као што су метицилин резистентни сојеви *Staphylococcus aureus*, ванкомицин резистентни сојеви *Enterococcus*, мултирезистентни сојеви Грам негативних бактерија који продукују β -лактамазе широког спектра, мултирезистентне неферментативне G⁻ бактерије (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*), као и неке патогене гљиве (Uzunović, 2016; Krstić, 2018).

Услед појаве мултирезистентних сојева, чешће се посеже за антимикробним лековима друге или треће генерације, који поред тога што су скупљи имају израженије штетне ефекте на људски организам. Такође, продужава се дужина лечења и период хоспитализације, што оставља значајне последице на економију. Отуда се и јавља потреба за изналажењем нових антимикробних лекова из природних сировина, укључујући и оне биљног порекла, који би поред сузбијања инфекције благотворно деловали на целокупан организам и тиме побољшали квалитет живота пацијента (Krstić, 2018). Предност биљних препарата се огледа и у томе што представљају комплексне смеше активних састојака који своје дејство испољавају различитим молекуларним механизмима, често испољавајући и синергистички ефекат, док су тренутно доступни комерцијални антимикробни лекови сачињени углавном од једне фармаколошки активне супстанце на коју микроорганизми релативно лако и брзо развију антимикробну резистенцију.

С друге стране, биљке које се користе у исхрани, су посебно значајне, јер се осим у медицинске сврхе могу користити и у прехранбеној производњи као природни конзерванси, а уједно и као колоранти и коригенси укуса и текстуре различитих производа (Alvarado и сар., 2006).

1.6.3. Карактеристике тестираних бактерија

1.6.3.1. Грам позитивне бактерије

Bacillus cereus Frankland & Frankland

B. cereus је мезофилна, факултативно аеробна бактерија штапићастог облика пречника од 0,5 до 2,5 μm и дужине од 1,2 до 10 μm . *B. cereus* се најчешће јавља у прехранбеним производима који садрже скроб и протеине у којима, због изузетне отпорности спора, успева да опстане и након обраде. У повољним условима, ова бактерија лучи еметични токсин (цереулин) и ентеротоксине. *B. cereus* је један од најчешћих узрочника тровања храном код људи. Последице лучења токсина *B. cereus* се јављају у кратком временском периоду након конзумирања контаминираних хране и углавном исто тако брзо спонтано нестају, без већих последица. Ипак, треба истаћи да су познати и смртни исходи услед дејства еметичног и ентеротоксина (Ђukić и сар., 2010; Savić, 2015).

Micrococcus flavus Trevisan

M. flavus је непокретна, аеробна, хетеротрофна бактерија, сферичног облика пречника од 0,7 до 1,0 μm . Први пут је изолована са површине реактора којим су третиране отпадне воде богате нитроароматичним једињењима и анилином (Liu и сар., 2007). Присутна је на људској кожи, местима лучења жлезда, у млеку и млечним производима. Упркос томе што није патогена за човека и животиње, због сличности и сродности са патогеном *M. luteus*, често се користи у микробиолошким истраживањима (Breed и сар., 1957).

Staphylococcus aureus Rosenbach

S. aureus је факултативно анаеробна, сферична бактерија пречника 0,5-1,5 μm способна да ферментира велики број угљених хидрата (Ђukić и сар., 2010; Milaković, 2016). Продукује токсине, те може узроковати интоксикације и алиментарне токсинфекције. Такође, изазива бројне инфекције: фурункул, карбункул, целулитис, гнојне инфекције рана, синуситис, отитис медија, маститис код породиља, остеомијелитис, ендокардитис и запаљење плућа. Удружени ефекти инфекције и токсина индукују *dermatitis exfoliativa*, *pemfigus neonatorum*, *impetigo* и синдром токсичног шока. Према подацима *WHO* сваки човек бар једном оболи због дејства овог патогена (Krstić, 2018).

Listeria monocytogenes (Murray) Pirie

L. monocytogenes је факултативно анаеробна штапићаста бактерија која не продукује споре, а може да расте на температурама од -0,4°C до 50°C. Инфекције бактеријом *L. monocytogenes* изазивају листериозу. Листериозе могу довести до превременог порођаја, побачаја, као и до смрти новорођенчета, најчешће услед настанка респираторног дистреса и пнеумоније. Такође, код имунокомпромитованих особа листериоза се манифестује тежом клиничком сликом и неретко доводи до смрти. Иако се инфекције овом бактеријом јављају претежно спорадично, познати су случајеви када је контаминираним храном инфициран већи број особа (Farber и Peterkin, 1991).

1.6.3.2. Грам негативне бактерије

Enterobacter cloacae Jordan

E. cloacae је факултативно анаеробна бактерија штапићастиг изгледа широко распрострањена у природи. *E. cloacae* је такође саставни део микрофлоре анималног и хуманог дигестивног тракта. Патогености ове бактерије доприноси способност формирања биофилма и продукције више врста токсина (ентеротоксини, хемолизини и други). Ипак, механизми којима испољава патогеност још увек нису сасвим разјашњени. Последњих деценија *E. cloacae* представља велику опасност за здравствени систем, јер се издваја као чест узрок нозокомијалних инфекција, при чему се углавном изолују мултирезистентни сојеви који се успешно сузбијају тек антибиотцима четврте генерације (Davin-Regli, 2015).

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula

P. aeruginosa је штапићаста бактерија која не продукује споре, а оптимално расте на температури од 37°C. Патогени облици узрокују инфекције биљака, инсеката, животиња, али и људи. *P. aeruginosa* синтетише ендотоксин који изазива ексудацију и накупљање течности и егзотоксин А чије се дејство манифестује путем инхибиције синтезе протеина. Претежно узрокује опортунистичке инфекције које могу и животно угрозити имунокомпромитоване особе. Узрочник је уринарних, очних и инфекција рана и опекотина, остеомијелитиса, а ретко и пнеумоније и сепсе (Krstić, 2018).

Salmonella Typhimurium (Loeffler) Castellani & Chalmers

S. Typhimurium поседује перитрихијалне флагеле помоћу којих се креће. Искључиво је патогени микроорганизам, који у спољашњој средини опстаје свега неколико сати, док се у води и намирницама може задржати и дужи временски период. Управо због тога до инфекције најчешће долази услед конзумирања контаминираних воде и хране, а може се преносити и интерхумано фекално-оралним путем, па су болести изазване овим патогеном означене као „болести прљавих руку“. Узрокује салмонелозе које се манифестују на различите начине. Најчешће су инфекције изазване контаминираним храном, које углавном пролазе без већих компликација, самим тим и без примене антибиотске терапије. Међутим, салмонелозе могу изазвати и клицоноштво, фокалне инфекције у плућима, костима и можданим овојницама, гастроентеритисе и септикемије (Krstić, 2018).

Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers

E. coli, је једна од најбоље проучених бактерија. То је факултативно анаеробна штапићаста бактерија која не продукује споре и може да се креће помоћу перитриха. Широко је распрострањена у природи, а саставни је део и нормалног цревног микробиома кичмењака, због чега се користи као један од индикатора фекалне контаминације воде за пиће. Узрочник је дијареје, инфекција уринарног тракта, менингитиса новорођенчади и сепсе (Krstić, 2018).

1.6.4. Карактеристике тестираних микромицета

Aspergillus sp.

Врсте рода *Aspergillus* и *Penicillium* су познатије као плесни и заједно се сврставају у класу Ascomycetes. Аспергилуси су широко распрострањени у природи где имају важну улогу у минерализацији различитих органских супстанци. Многе врсте изоловане из земљишта имају антибиотичке ефекте (Ђukić и сар., 2010). У последње време постоји веће интересовање за ове микрогљиве, јер многе имају токсични, алергијски и патогени ефекат на људе. Иако нису облигатни анимални и хумани патогени, многе врсте изазвају опортунистичке инфекције (Fomicheva и сар., 2006).

Aspergillus fumigatus Fresenius

A. fumigatus је сапрофитна микрогљива распрострањена у земљишту и органском отпаду. Има изузетно важну улогу у кружењу угљеника и азота у природи. Због изузетно ситних димензија, конидије могу доспети у плућне алвеоле, одакле најчешће буду ефикасно уклоњене урођеним механизмима имуног система. Међутим, код особа слабијег имуног одговора узрокују аспергилозе које могу имати фатални исход. Последњих 30-ак година, због пораста броја имунокомпромитованих пацијената и појаве јаким имуносупресивних лекова, аспергилозе представљају све већи проблем (Latgé, 1999).

Aspergillus versicolor (Vuill) Tiraboschi

A. versicolor је сапрофитска микрогљива широког ареала, те се уобичајено среће у земљишту на свим географским ширинама између северног и јужног поларног круга. Узрочник је секундарних хуманих аспергилоза (Klich, 1993; Fomicheva и сар., 2006).

Aspergillus ochraceus Wilhelm

A. ochraceus код људи најчешће изазива инфекције скалпа и ноктију. Поред тога, продукује охратоксин А који се може наћи у најразличитијим пољопривредним производима укључујући житарице, суво воће, вино и кафу. Охратоксин А је термички стабилно једињење које на експерименталне животиње делује токсично и канцерогено (Christensen, 1982; Bui-Klimke и Wu, 2015).

Aspergillus niger van Tiseghem

A. niger је космополитска врста, која расте у земљишту, компосту и другим органским материјалима, превасходно биљног порекла. Синтетише различите ванћелијске продукте међу којима су лимунска киселина и пектиназе због чега има широку примену у прехранбеној индустрији. Међутим, због тога што продукује различите хидролитичке и оксидативне ензиме често узрокује велике штете на различитим биљним културама. Упркос томе што је од стране *The US Food and Drug Administration* означена као GRAS (енгл. *Generally Recognized As Safe*) ова гљива синтетише микотоксине који мењају органолептичка својства намирница и штетно делују на јетру, бубреге, мишиће, кожу, респираторне органе, нервни, дигестивни и генитални систем (Gautam и сар., 2011.; Schuster и сар., 2002).

Penicillium sp.

Готово половина плесни припада роду *Penicillium*. Представници овог рода су чести узрочници кварења намирница. Велики број врста је у стању да синтетише ензиме, антибиотике и друга једињења због чега има примену у различитим индустријским производним процесима, прехранбеној индустрији и фармацији. Из врста *P. notatum* и *P. chrysogenum* је изолован пеницилин, један од најважнијих антибиотика данашњице (Ђukić и сар., 2010).

Penicillium funiculosum Thom

P. funiculosum је једна од најважнијих микрогљива које продукују читав комплекс ензима одговорних за биоразградњу полисахарида, пре свега целулозе због чега је доста експлоатисана у индустрији (Karboune и сар., 2008). Упркос томе, ова микрогљива узрокује велике економске губитке, јер захваљујући способности синтезе целулаза утиче на пропадање различитих пољопривредних производа (Adejuwon и сар., 2009; Sarmah и Sarma, 2012).

Penicillium ochrochloron Biourge

P. ochrochloron поред тога што синтетише различите ензиме има способност екстраховања метала, пре свега бакра, због чега се користи за пречишћавање отпадних вода насталих у текстилној индустрији (Shedbalkar и сар., 2008). Такође, доводи до оштећења различитих материјала, пре свега пластике и текстила (Muntañola-Cvetković, 1990).

Penicillium verrucosum var. cyclopium Dierckx

P. verrucosum var. *cyclopium* уобичајено расте сапрофитски на житарицама. Продукује различите микотоксине који испољавају неуротоксичне, хепатотоксичне, нефротоксичне и канцерогене ефекте. Постоје докази који указују да у земљама са хладнијом и умереноконтиненталном климом доводи до нефропатије код птица и свиња (Barnes и сар., 1977; Сabañes и сар., 2010). У студији коју су спровели Barnes и сар., 1977., сугерисано је да је охратоксин изолован из *P. verrucosum* var. *cyclopium* могући узрочник ендемске нефропатије на подручју Балкана.

Trichoderma sp.

Род *Trichoderma* се такође убраја у класу Ascomycetes. То је заправо анаморфни облик, док је телеоморфни облик *Hypocrea*. Гљиве образују беле, жуте или зелене колоније. Добро подносе неповољне услове што им омогућава космополитско распрострањење. Јављају се најчешће у земљишту, као сапрофити биљног материјала, али и ендифити биљака (Rasić, 2017).

Trichoderma viride Pers. ex Fr.

T. viride/*Hypocrea rufa* је једна од најбоље проучених гљива из земљишта. Продукује велики број литичких ензима и антибиотика, па се користи за сузбијање биљних патогена у земљишту. Приписује јој се и инсектицидно и антифунгално дејство на фитопатогене гљиве (Lieckfeldt и сар., 1999). *T. viride* је ретко патогена гљива, али

код особа ослабљеног имунитета може изазвати опортунистичке инфекције (De Miguel и сар., 2005).

1.6.5. Антимикробна активност биљака фамилије Rosaceae

Антимикробна својства је показао етанолни екстракт *Crataegus oxyacantha* заустављајући раст неких патогених бактерија *Salmonella abony* NCTC6017, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027 и микромицете *Candida albicans* ATCC10231 (Kostić и сар., 2012).

У раду Yi и сар. (2007), 80% метанолни екстракти плодова *Rosa nutkana*, *R. pisocarpa* и *R. woodsii* су деловали бактерицидно на грам позитивне бактерије *Staphylococcus aureus* (укључујући и метицилин резистентне сојеве), *Enterococcus faecalis* и *Bacillus subtilis*, али су ефекти на грам негативне бактерије изостали. Екстракти наведених врста су у истом раду зауставили раст патогене кваснице *C. albicans* у чему је посебно ефикасан био екстракт *R. nutkana*. Екстракт изданка *R. nutkana* је испољио антибактеријска и антивирална својства и у експериментима McCutcheon и сар., (1992, 1994 и 1995), при чему су његовим дејством посебно биле погођене бактерија *E. coli* и говећи вирус *Corona*. Антивирусно дејство биљака и њихових секундарних метаболита, укључујући и представнике фамилије Rosaceae, је у фокусу истраживања, од избијања пандемије 2020. изазване вирусом SARS-CoV-2 (енгл. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), због изузетне потребе да се што пре пронађе ефикасни лек за сузбијање болести COVID-19 (енгл. *coronavirus disease 2019*). Резултати експеримената спроведених током 2020. и 2021. указују да многе биљке, за које је документовано да поседују антивирусно дејство на друге вирусе, потенцијално могу бити ефикасне и против SARS-CoV-2, али да су потребна опсежнија истраживања (Orhan и Deniz, 2020; Galanakis и сар., 2021; Patel и сар., 2021; Sytar и сар., 2021). Нека од тих истраживања су већ ушла у клиничку фазу испитивања, попут студије Patel и сар. (2021) у којој је доказана ефикасност декокта припремљеног од смеше више лековитих биљака, укључујући *Prunus armeniaca* Linne var. *ansu* Maximowicz, *Prunus mandshurica* Koehne var. *glabra* Nakai, у лечењу оболелих од COVID-19.

У раду El-Mesallamy и сар. (2013), метанолни и водени екстракти *Fragaria × ananassa* су деловали антимикробно на тестиране патогене микроорганизме при чему су најсензибилније међу бактеријама биле *S. typhi*, *Klebsiella* sp. и *S. aureus*, а међу гљивама *Aspergillus niger* и *Fusarium oxysporum*.

Екстракти листова *Pyrus communis* су инхибирали раст *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC 25212, *E. coli* ATCC25922, *B. subtilis* ATCC6633, *P. aeruginosa* ATCC27853, *Helicobacter pylori*, као и клиничких сојева *S. aureus* MRSA K326 и *E. coli* ESBL295 (Sroka и сар., 2019).

У раду Sowa и сарадника (2016), екстракти листова *Malus domestica* су деловали антимикробно на *S. aureus* ATCC25923, *E. faecalis* ATCC29212 и *C. glabrata* ATCC90030, при чему је најефикаснији био етил-ацетатни екстракт.

Sahan и сар. (2011) су проучавали антифунгално дејство екстраката листова *P. laurocerasus* на *A. chevalieri*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. parasiticus*, *Fusarium oxysporum*, *Mucor* spp., *Penicillium commune*, *P. islandicum*, *P. roqueforti*, *P. solitum*, *P. verrucosum*, *Rhizopus oligosporus* и *R. stolonifer* диск дифузионом и микродилуционом методом и установили да на антимикробна својства утиче како концентрација примењеног екстракта, тако и његов квалитативни састав. Међу испитиваним микромицетама најрезистентија је била *P. verrucosum*, док је *F. oxysporum* била

најсензитивнија. Екстракт коре *P. avium* је испољио најбоља антимикуробна својства међу екстрактима 10 различитих врста умереноконтиненталног климата, што је приписано дихидровогониу (Abedini и сар., 2020). Özçelik и сар. (2012) су указали на антибактеријску и антикандидијалну активност метанолних и *n*-хексанских екстраката цветова, листова, изданака, целих и делова плодова и семена *P. mahaleb*. Такође, више истраживача је потврдило антимикуробно дејство различитих биљних органа *P. spinosa* (Kumarasamy и сар., 2004; Radovanović и сар., 2013; Veličković и сар., 2014; Gegiu и сар., 2015).

Veljković и сар. (2019) су испитивали антибактеријска својства метанолних екстраката *R. idaeus* на *Sarcina lutea*, *B. subtilis* и *E. coli* и установили да се она могу приписати флавоноидима и антоцијанима. Исти аутори су сугерисали да се традиционална употреба листова ове врсте у регулисању цревне флоре може сматрати оправданом. Staszowska-Karkut и Materska (2020) су указали и на антибактеријско дејство ове врсте на *S. aureus*, *S. enterica* и *Listeria monocytogenes*. Екстракти плодова *R. ulmifolius* су деловали бактериостатички на Грам негативне бактерије *E. coli*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* и Грам позитивне *E. faecalis*, *L. monocytogenes* и *S. aureus* (укључујући и MRSA) (Da Silva и сар., 2019). У истој публикацији, презентована је и антикандидијална активност екстраката ове врсте.

1.7. Антитуморска активност

1.7.1. Канцер и канцерогенеза

Деценијама уназад, број оболелих од канцера непрекидно расте. Подаци *International Agency for Research of Cancer* показују да је само током 2018. године број новооболелих од канцера достигао 18.078.957, а број умрлих 9.555.027 (Wild и сар., 2020).

Ипак, канцер није нова болест. Напротив, канцер костију и дојке први пут су описани још у Старом Египту пре више од 3.500 година, а сам назив потиче од грчке речи *karkinos*¹⁰ коју је први пут употребио још Хипократ у 5. в. п. н. е. (Sudhakar, 2009).

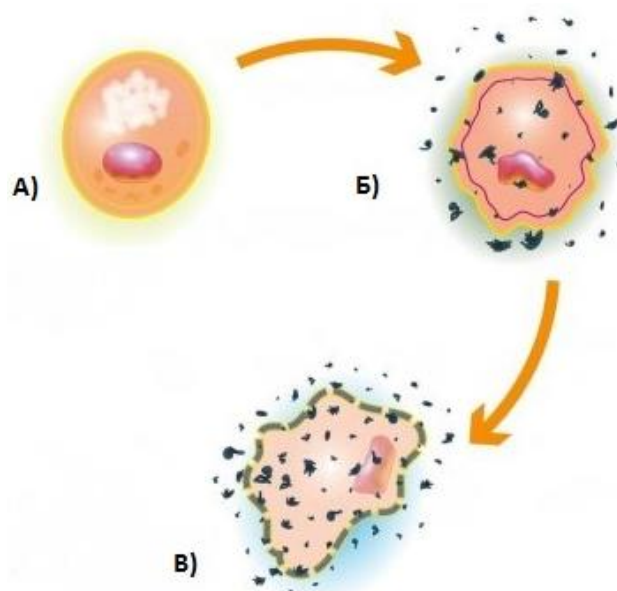
Канцером је означен читав скуп болести до којих долази уколико ћелије било ког дела организма почну неконтролисано да се умножавају, а канцерогенезом сам процес настанка овог обољења (Rakoff-Nahoum, 2006; Sudhakar, 2009).

Канцерогенеза је комплексан, вишестепени процес који се може грубо окарактерисати постојањем три фазе: иницијацијом, пропагацијом и прогресијом (Klaunig и Kamendulis, 2004; Рајовић и сар., 2006; Rakoff-Nahoum, 2006). Током фазе иницијације долази до иреверзибилних промена у генетичком материјалу физиолошки нормалне ћелије. Различити су фактори који утичу на почетак канцерогенезе. Некада су оштећења на ДНК молекулу наследна и тада се ради о урођеном канцеру. Међутим, неупоредиво чешће су индукована оксидативним стресом насталим услед излагања штетном јонизујућем зрачењу (физички фактори) или канцерогеним агенсима (хемијски фактори) (Ђукић, 2008; Sudhakar, 2009) (Слика 15).

Канцерогене супстанце, у зависности од молекуларних механизма којима узрокују почетак канцерогенезе, се могу груписати у генотоксичне и негенотоксичне (епигенетичке). Генотоксични агенси нарушавају структуру молекула ДНК што за последицу има настанак мутација, делеција и хромозомских аберација (Klaunig и

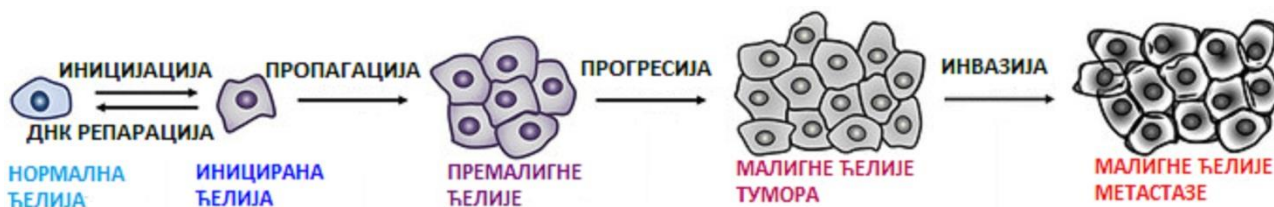
¹⁰ Рак

Kamendulis, 2004; Рајовић и сар., 2006; Rakoff-Nahoum, 2006; Sudhakar, 2009). За разлику од генотоксичних, епигенетички канцерогени не оштећују непосредно молекулу ДНК, већ различитим молекуларним механизмима мењају експресију генетичких информација записаних у овом молекулу. Без обзира на разлике у механизмима деловања и генотоксични и епигенетички канцерогени делују пре свега на активацију онкогена и деактивацију тумор супресивних гена, чиме онемогућавају нормално одвијање ћелијског циклуса (Klaunig и Kamendulis, 2004).



Слика 15. Промене на ћелији изазване дејством слободних радикала: **А)** ћелија у физиолошки нормалном стању; **Б)** ћелија нападнута слободним радикалима; **В)** ћелија у стању оксидативног стреса услед дејства слободних радикала.

Физиолошки нормална ћелија располаже бројним механизмима репарације којима може ефикасно да уклони оштећења на ДНК молекулу. Међутим, уколико до тога не дође, промена у наследном материјалу се кроз ћелијску деобу фиксира и тиме се завршава фаза иницијације (Klaunig и Kamendulis, 2004; Sudhakar, 2009; Rakoff-Nahoum, 2006) (Слика 16).



Слика 16. Шематски приказ трансформације здраве ћелије у малигну током фаза канцерогенезе: иницијације, пропације и прогресије (преузето са изменама од Siddiqi и сар., 2015).

Следи фаза промоције током које активирани онкогени узрокују неконтролисани раст инициране ћелије, док деактивирани тумор супресорски гени омогућавају таквој ћелији пролиферацију и/или спречавају апоптозу. Фаза промоције је реверзибилна, јер је за њено одвијање неопходан константан стимулус. Ипак, уколико

до уклањања стимулуса промоције не дође, настаје преканцерогена промена и наставља се процес канцерогенезе (Klaunig и Kamendulis, 2004; Rakoff-Nahoum, 2006; Sudhakar, 2009) (**Слика 16**).

Последња етапа у еволуцији канцерогенезе је прогресија током које се наставља оштећивање молекула ДНК чиме се преканцерогена лезија иреверзибилним процесом трансформише у канцерогену. Како ћелије и даље настављају да пролиферишу при чему изостаје апоптоза, може доћи и до њихове миграције крвотоком до удаљених ткива и органа чиме настају метастазе. Метастазирање уобичајено резултира смртним исходом (Klaunig и Kamendulis, 2004; Rakoff-Nahoum, 2006; Sudhakar, 2009) (**Слика 16**). Малигне ћелије, чијим настанком се завршава процес канцерогенезе, одликују се читавим скупом заједничких особина независним од ткива у ком је малигнитет настао. Специфичности фенотипа малигне ћелије се огледају у способности пролиферације независне од егзогенних стимулаторних сигнала, неосетљивости на антипролиферативне сигнале, избегавању апоптозе, неограниченом репликативном потенцијалу, индукцији ангиогенезе и инвазији околних ткива и метастазирању (Rakoff-Nahoum, 2006). То значи да је малигна ћелија, услед генетичких модификација насталих током канцерогенезе, стекла својеврсну аутономију у односу на остатак ткива у чијем се саставу налази. Та аутономија се огледа у расту ћелије који је независан од екстерних, а с друге стране индукован продукцијом унутарћелијских сигналних молекула. Такође, физиолошки нормалне ћелије се митотички деле до достизања одређеног броја ћелијске популације, након чега наступа стање означено као сенесценца. Чак иако се стање сенесценце превазиђе деактивацијом тумор супресорских гена, одговарајућим молекуларним механизмима се спречава даља пролиферација. Међутим, код малигнућелија одсуство оваквих механизма омогућава неограничену пролиферацију. Још један изузетно важан предуслов канцерогенезе је смањена инциденца апоптотичке ћелијске смрти или њено потпуно одсуство (Hanahan и Weinberg, 2000).

Апоптоза је начин ћелијске смрти индукован од стране саме ћелије која није више потребна или је пак превише оштећена. Назив је изведен од грчке речи *apoptosis*¹¹ и први пут је употребљен 1972. године у раду Kerr-а, Wyllie-а и Currie како би се описао специфичан облик ћелијске смрти. Апоптоза је генетички контролисан, активан и енергетски захтеван процес који се често означава као програмирана ћелијска смрт (енгл. *Programmed Cell Death*). Уколико је ћелија изложена снажном дејству агенаса, наступиће некроза, која се традиционално сматра пасивним, неконтролисаним процесом. Међутим, новија истраживања указују да је и некроза у одређеним случајевима генетички контролисан процес (Galluzzi и Kroemer, 2008). Разлика између апоптозе и некрозе се огледа и у томе што након ћелијске смрти индуковане апоптозом, готово неприметни остаци ћелије брзо бивају уклоњени макрофагима и другим фагоцитозним ћелијама, док у случају некрозе долази до пуцања ћелије и ослобађања ћелијског садржаја у међућелијски простор што резултира инфламацијом. Када се покрену механизми ћелијске смрти није предефинисано да ли ће се завршити апоптозом или некрозом, на шта утиче више фактора, између осталог, и да ли се ћелија налази у култури или у ткиву. Међутим, ћелија која је активирала апоптотичке механизме ће умрети програмираном ћелијском смрти, односно кроз контролисану каскаду догађаја (Hanahan и Weinberg, 2011; Ђорђевић и сар., 2008).

Такође, важно је истаћи да наведене промене у фенотипским карактеристикама малигне ћелије нису довољне за настанак малигнитета, већ је потребно и ангажовање

¹¹ Опадање

околних здравих ткива, пре свега ради побољшања васкуларизације чиме би се интензивирао доток кисеоника у метаболички изузетно активне ћелије тумора, а касније омогућила и инвазија и метастазирање других ткива (Rakoff-Nahoum, 2006).

Иако број оболелих од канцера непрекидно расте, инциденца већине малигнух обољења се може редуковати променом животних навика, а стопа смртности превентивним прегледима који доприносе откривању болести у ранијим фазама када је позитивни исход лечења извеснији (Sudhakar, 2009).

1.7.2. Савремени приступ лечењу малигнух болести

Дуго је владало убеђење да су малигне болести неизлечиве. Такав став је произлазио пре свега из непознавања етиологије и немогућности да се уоче манифестације малигнитета у раним фазама. Такође, не треба занемарити да је овоме у великој мери допринела и чињеница да су се након хируршког одстрањивања тумори често поново јављали. Због свега наведеног у давна времена се највише пажње посвећивало палијативи. Међутим, још у античко доба примењивало се и хируршко одстрањивање површинских тумора (Sudhakar, 2009).

Методе које се користе тренутно у третману малигнух болести могу се груписати у неколико категорија: хирургија, радиотерапија и хемиотерапија, хормонска терапија и имунотерапија.

Хируршке методе су најстарије методе које се примењују у третирању малигнух обољења, а развој нових софистициранијих технологија је омогућио да се одрже у употреби до данас. Томе је пре свега допринело усавршавање и примена различитих уређаја у визуелизацији унутрашњих органа, што је следствено омогућило примену мање инвазивних хируршких захвата помоћу ласера, криохирургије итд. (Sudhakar, 2009).

Недуго након открића, крајем XIX века, X-зраци су почели да се користе у дијагностиковању и лечењу канцера. Већ почетком наредног века установљено је да X-зраци такође узрокују појаву малигнух болести. Данас се за елиминацију малигнух ћелија уместо X-зрака користи терапија протонским снопом. Такође, зрачење се примењује након хируршке интервенције, како би се отклониле евентуално заостале ћелије у околном ткиву, али и у виду гама ножа који се претежно користи у лечењу можданих тумора (Sudhakar, 2009).

Хемиотерапија се у лечењу малигнух болести користи од почетка XX века. Тада је немачки хемичар Paul Ehrlich овим појмом дефинисао употребу хемијских једињења у лечењу, пре свега инфективних болести, али и канцера (DeVita и Chu, 2008). Међутим, све до 60-их и 70-их година прошлог века, није било довољно убедљивих доказа да је хемиотерапија ефикасан начин лечења малигнух болести. Тек након што је хемиотерапијом постигнут успех у лечењу дечије леукемије и Хоџкиновог лимфома у узнапредовалом стадијуму, овој области је посвећена већа пажња. Данас се хемиотерапија примењује у лечењу Хоџкиновог и не-Хоџкиновог лимфома, акутног лимфобластома, акутне мијелоидне леукемије, ембрионалног рабдомиосаркома и других малигнух обољења (DeVita и Chu, 2008). Хемиотерапија се често користи и удружено са другим методама и то је такозвана *adjuvant*¹² хемиотерапија. Важно је истаћи да су неки од пионирских лекова коришћених у хемиотерапији изоловани из биљака, као што је алкалоид винкрестин из *Vinca rosea*. Такође, због тога што

¹² Назив изведен из латинске речи *adjuvans* (помоћник, помагач, помоћни учитељ).

синтетички хемиотерапеутици често имају нежељена дејства тежи се њиховој замени природним једињењима биљног порекла (DeVita и Chu, 2008; Gullett и сар., 2010).

Хормонска терапија се заснива на употреби хормонских аналога првенствено у лечењу тумора простате и дојке (Sudhakar, 2009). Многи секундарни метаболити биљног порекла поседују сличну хемијску структуру као хумани хормони, што их чини добрим кандидатима за употребу у овом виду лечења.

Имунотерапија је новија метода у третману малигнух обољења, која се према Националном онколошком институту Сједињених Америчких Држава (енгл. *National Cancer Institute, USA*) дефинише као „вид терапије који користи супстанце да стимулише или сузбије имуни одговор тела како би се организам изборио са канцером, инфекцијом и другим болестима“. Један вид имунотерапије се базира на употреби природних једињења способних да активирају урођени имуни одговор који организам уобичајено користи како би контролисао развој малигнитета (Sudhakar, 2009).

1.7.3. Улога биљних продуката у профилакси малигнух обољења

Последњих деценија постоји тенденција пораста новооболелих и умрлих од малигнух болести. У прилог томе говори и чињеница да су малигне болести на првом или другом месту у чак 134 од 183 државе по броју смртних исхода. Лечење малигнух обољења је дуготрајно и скупо, због чега су евидентне социјалне разлике у инциденци и стопи смртности. С друге стране, већина малигнух болести се може успешно превенирати променом животних навика. То је био узрок због ког су се лидери светских земаља, на заседању скупштине Уједињених нација 2018. године, сагласили да ће предузети одговарајуће мере у циљу превенирања малигнух обољења и других незаразних болести (Wild и сар., 2020).

Литературни подаци показују да секундарни метаболити биљака имају значајну улогу у превенцији и лечењу малигнух болести. Тако је утврђено да *Camellia sinensis*, која је у широкој употреби у виду црног и зеленог чаја, ефикасно делује на превенцију тумора простате, дојке и једњака. Такође, побољшава дејство антиканцерогених лекова. Антитуморска својства *C. sinensis* се приписују катехинима, пре свега епигалокатехин-3-галату, који испољава изузетно дејство у свим фазама канцерогенезе (Gullett и сар., 2010).

Једна од најзначајнијих азијских врста из фамилије Zingiberaceae је свакако *Curcuma longa* (куркума) из које се изолује куркумин. Иако је већ хиљадама година због своје лековитости интегративни део Ајурведе, тек 80-их година прошлог века су утврђена њена антиканцерогена својства. Куркумин спречава иницијалну фазу канцерогенезе, успорава фазу промоције и прогресије и индукује апоптозу малигну трансформисаних ћелија. Такође, испољава синергистичко дејство са фармаколошки активним секундарним метаболитима других биљака, као што су катехини зеленог чаја, алкалоиди винке и други антиканцерогени агенси (Gullett и сар., 2010).

Резвератрол и његов хидроксиловани аналог, пицеатанол испољавају антитуморско дејство на туморе гастроинтестиналног система, простате, плућа и меких ткива (Gullett и сар., 2010).

Ликопен из *Solanum lycopersicum* (парадајз), полифеноли *Punica granatum* (нар), изофлавоноиди *Glycine max* (соје) и елагна киселина из црвено обојеног воћа су само неки од антитуморских агенаса биљног порекла, због чега је њихова улога у профилакси малигнух обољења изузетна (Gullett и сар., 2010).

1.7.4. Антитуморска активност биљака фамилије Rosaceae

Досадашњим истраживањима је доказано антитуморско дејство екстраката врста рода *Rosa* (Nađpal, 2017). Осим екстраката испитиван је антитуморски потенцијал етарског уља врста рода *Rosa*. У раду Khatib и сар. (2013), етарско уље *R. damascena* је деловало двојако на малигну ћелијску линију МКН45 (тумор желуца). Наиме, веће концентрације хидросолубилне фазе етарског уља су поспешивале пролиферацију малигнућ ћелија, док је нерастворљиви део изазивао њихову апоптозу, због чега су аутори сугерисали да проучавању дејства *R. damascena* на малигне ћелије желуца треба посветити већу пажњу у будућим истраживањима.

Jurikova и сар. (2012) су указали на антитуморску активност плодова азијске врсте *Crataegus pinnatifida*. Екстракти листова *C. sinaica* су деловали на малигне ћелијске линије хепатоцелуларног карцинома (HEP-G2), карцинома колона (HCT-116) и дојке (MCF-7) (El-Hela и сар., 2017).

Листови *Fragaria × ananassa* су такође испољили цитотоксично дејство на малигне ћелијске линије јетре (HEPG2), дојке (MCF7) и колона (HCT116) у експериментима El-Mesallamy и сар. (2013).

Цитотоксични ефекти *Pyrus pashia* и *P. pyraster* на ћелије различитих тумора су публиковани у радовима Lia и сар. (2015) и Kundaković и сар. (2014), редоследом.

Екстракт коре *Malus toringoides* је индуковао апоптозу малигнућ ћелија у раду Elansary и сар. (2020), што су аутори објаснили присуством фенолних једињења, пре свега протокатехинске киселине.

Gomaа (2013) је проучавао антитуморско дејство екстраката воденог, метанолног и етанолног екстракта *Prunus armeniaca* према малигнућ хуманим ћелијским линијама дојке (MCF-7), колона (HCT-116) и хепатоцелуларног карцинома (HEP-G2). Резултати презентовани у овом раду указују да екстракти делују на дозно-зависни начин, при чему су за испољену антитуморску активност најзаслужнији флавоноиди. Етанолни екстракт корена *P. persica* је такође имао антитуморско дејство на хумани хепатоцелуларни карцином које је испољено кроз заустављање ћелијског циклуса и супресију миграције (Shen и сар., 2017). Концентровани екстракт *P. mahaleb* је деловао проапоптотски на МCF-7 ћелијску линију (Gerardi и сар., 2016), док су екстракти плодова *P. spinosa* показали антитуморско дејство у раду Karakas и сар. (2019) и Popović и сар. (2020).

Muniyandi и сар. (2019) су проучавали антитуморске ефекте плодова три биљне врсте рода *Rubus*, *R. niveus*, *R. ellipticus* и *R. fairholmianus*, и утврдили да њихови метанолни екстракти на дозно-зависни начин контролишу вијабилност ћелија хуманог рака колона (Caco-2) што су довели у везу са високим садржајем кемферола у овим узорцима. Veljković и сар. (2019) су испитивали антитуморска својства метанолних екстраката самониклих популација *R. idaeus* са простора Балкана према ћелијама хуманог колоректалног рака (HCT-116). Резултати које су презентовали ови истраживачи указују да се дејство испитиваних екстраката разликује, али и да је за поједине екстракте негативно корелирано са антиоксидантном активношћу. За разлику од претходних истраживача, у раду Zengin и сар. (2019). ни један екстракт *R. sanctus* и *R. ibericus* није показао активност према малигнућ ћелијама колона, осим метанолног екстракта листа.

1.8. Антидијабетична активност

1.8.1. Дијабетес мелитус (лат. *Diabetes mellitus*)

Дијабетес мелитус је назив за хетерогени скуп метаболичких поремећаја које одликује недовољна секреција или активност инсулина, због чега долази до појачане глуконеогенезе и гликогенолизе у јетри што узрокује хипергликемију (Poljičanin, 2012). Симптоми дијабетес мелитуса су описани пре више хиљада година, док је касније на основу њих изведен и назив болести. Наиме, термин дијабетес, потиче од грчке речи *διαβαίνω*¹³ коју је први пут употребио антички лекар Аретеј из Кападокије, још у II в. н. е., како би указао на једну од најистакнутијих манифестација болести, односно полиурију. Касније, у XVII веку, енглески лекар Thomas Willis, је називу дијабетес придодао латинску реч *mellitus*¹⁴ због специфичне слаткоће урина оболелих, за коју је тек 1815. г. хемичар Michael Chevreul утврдио да потиче од глукозе (Ahmed, 2002).

На појаву и ток болести утичу како генетички тако и средински фактори, тако да је на основу етиологије могуће разликовати неколико типова дијабетес мелитуса и то: дијабетес типа 1, дијабетес типа 2, други специфични типови дијабетеса и гестациски дијабетес (Poljičanin, 2012).

Дијабетес типа 1 је заступљен код свега 5% до 10% оболелих, са израженом тенденцијом пораста током последњих година. У суштини до развоја болести долази услед аутоимуне деструкције β -ћелија Лангерхансових острваца у панкреасу што уобичајено узрокује потпуни недостатак инсулина. Ретко, дијабетес типа 1 није индукован аутоимуном одговором, већ неким, до сада неутврђеним, генетичким узроцима и најчешће се јавља код пацијената азијског или афричког порекла. Дијабетес типа 1 је генетички условљен углавном путем HLA комплекса, а у мањој мери и других генетичких локуса означених као IDDM (енгл. *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*). Ипак, поред генетичких предиспозиција, за настанак болести је неопходно дејство једног или више срединских фактора који нису још увек са сигурношћу потврђени. Особе оболеле од дијабетеса типа 1 су склоне обољевању и од других аутоimunих поремећаја, као што су Гравесова болест, Хашимото тиреоидитис, Адисонова болест, витилиго, целијакија, аутоимуни хепатитис, пернициозна анемија и *myasthenia gravis* (Daneman, 2006).

Дијабетес типа 2 је најраспрострањенији облик ове болести и присутан је код чак 90% до 95% оболелих. За разлику од дијабетеса типа 1, код дијабетеса типа 2 не долази до аутоимуне деструкције β -ћелија и потпуног дефицита у инсулину, већ се јавља као последица поремећене секреторне функције β -ћелија или услед инсулинске неосетљивости рецептора периферних ткива. Када настане инсулинска резистенција, β -ћелије појачано луче инсулин како би се компензовала неосетљивост инсулинских рецептора и одржала хомеостаза. Дугорочне последице хиперинсулинемије су исцрпљивање β -ћелија, њихова дисфункција и коначно хипергликемија. Болест се развија постепено, без израженијих симптома у почетку, тако да дужи временски период бива недијагностикована. Дијабетес типа 2 предоминантно настаје услед старења, прекомерне тежине и недостатка физичке активности. Такође, генетички фактори имају важну улогу у етиологији болести, међутим због њихове комплексности нису сасвим разјашњени (Mucalo, 2014; *American Diabetes Assosiation* (ADA), 2014).

Други специфични облици дијабетеса се јављају код мање од 2% оболелих и узроковани су генетичким поремећајем рада β -ћелија панкреаса и/или инсулинског

¹³ Пролазак кроз; протицање;

¹⁴ Слатко попут меда.

деловања, болестима егзокриног дела панкреаса, болестима ендокриног система, лековима или хемикалијама, инфекцијама, неуобичајеним аутоимуним обољењима и различитим генетичким поремећајима (ADA, 2014).

Гестацијским дијабетесом су обухваћени сви поремећаји у концентрацији глукозе који су се први пут појавили или су први пут препознати током трудноће. Гестацијски дијабетес у највећем броју случајева нестаје након порођаја, али треба истаћи да уколико се не дијагностикује и не третира правовремено може имати озбиљне компликације и по мајку и по новорођенче. Такође, пацијенти са гестацијским дијабетесом имају веће шансе да касније током живота оболе од дијабетеса типа 2 (ADA, 2014).

Хронична хипергликемија узрокује оштећења других органа, услед чега оболеле од дијабетеса прати низ коморбидитета као што су ретинопатија, нефропатија, неуропатија, кардиоваскуларне болести, микро и макроваскуларни поремећаји (ADA, 2014).

1.8.2. Савремени приступ лечењу дијабетеса

Иако су сматрали да је неизлечива болест, још антички лекари су увидели да промена режима исхране продужава и побољшава живот оболелих. Оваква пракса се наставила све до открића инсулина.

Крајем XIX века утврђено је да ћелије Лангерхансових острваца луче секрет који регулише метаболизам угљених хидрата, а почетком XX века је изоловано активно једињење овог секрета и названо инсулин што на латинском значи острво. Убрзо су почели експерименти који би омогућили употребу инсулина у терапији дијабетеса, међутим због избијања Првог светског рата до клиничке примене је дошло тек 1921. г. (Ahmed, 2002).

Увођењем инсулина у клиничку праксу коначно је и пацијентима зависним од инсулина пружена прилика да се лече и избегну смртни исход који је до тада био неминован. Развијен је читав спектар лекова који за циљ имају да смање концентрацију глукозе у крви и спрече веће флукуације што дужи временски период, чиме би се избегао настанак озбиљних коморбидитета, који прате пре свега дијабетес типа 2, као што су микро и макроваскуларни поремећаји (Daneman, 2006; ADA, 2014; Khan и сар., 2014).

Лекови који се користе у лечењу дијабетеса се могу применити *per os*¹⁵ или парентерално. Неки од најзначајнијих лекова који се примењују орално делују путем гастроентералног система, као што су инхибитори α -глукозидазе, лекови који успоравају пражњење желуца и утичу на лучење жучних киселина. Ту се такође убрајају и лекови који своју активност испољавају на нивоу бубрега поспешујући глицеролизу или на нивоу централног нервног система где утичу на смањење потребе за уносом глукозе путем хране. Парентерално се примењују различите форме инсулина које имају за циљ, не само да одрже концентрацију глукозе у одговарајућем уском опсегу, већ и да омогуће комфорнији живот оболелима, те су тако дизајнирани инсулини са пролонгираном дејством, инсулини који се активирају тек када порасте ниво глукозе у крви, итд. (Khan и сар., 2014).

Међутим, многи од наведених лекова се још увек налазе у фази развоја или клиничких испитивања, док за оне који су у употреби још увек не постоје подаци о

¹⁵ Примена лекова оралним путем

дугорочним нежељеним дејствима. Оно што је сада извесно јесте да многи од њих испољавају штетне споредне ефекте, посебно након вишегодишње употребе. Такође, због хетерогености етиологије обољења постоји тенденција за индивидуализованим приступом лечењу (Khan и сар., 2014).

1.8.3. Улога биљних продуката у профилакси дијабетеса

Према подацима *International Diabetes Federation* у 2019. г. је број оболелих од дијабетеса достигао 463 милиона, а исте године је забележено 4,2 милиона смртних случајева. Према прогнозама наведене организације тенденција пораста броја оболелих ће се наставити и у будућности.

Дијабетес је хронична прогресивна болест, тако да иако се благовремено и адекватно лечи, стање пацијената се временом погоршава. Ипак, већина пацијената болује од дијабетеса типа 2 који се може успешно превенирати или се пак његове штетне последице по целокупан организам могу ублажити или пролонгирати променом начина живљења, пре свега режима исхране и физичком активношћу (Mucalo, 2014).

С друге стране многе биљке се хиљадама година уназад користе у народној медицини за лечење дијабетеса. Имајући у виду ток болести, као и економски аспект дугогодишњег лечења није изненађујуће што интересовање за лековитим биљкама које поседују антидијабетична својства последњих година расте.

Литературни подаци указују да су се многе традиционално коришћене биљне врсте или из њих изолована једињења показале у лабораторијским условима као добри антидијабетични агенси. Тако је метанолни екстракт листа *Chatarantus roseus* био ефикаснији у редуковању концентрације глукозе у крви од комерцијалних лекова. Из *Caesalpinia digyna* изоловано је фармаколошки активно једињење, бергенин, које испољава изузетна антидијабетична својства (Arumugam и сар., 2013). Такође, многе биљке кинеске и индијске традиционалне медицине су се показале као значајни антидијабетични агенси, као што је нпр. *Eugenia jambolana*, познатија као индијска купина, која се користила још у Ајурведи, а чија ефикасност је потврђена и експерименталним моделима и клиничким студијама, али и многе друге врсте укључујући *Gymnema sylvestre*, *Momordica charantia*, *Morus alba*, *Stephania tetrandra*, *Trigonella foenum-graecum*, *Coptis chinensis*, *Rehmania glutinosa*, *Astragalus membranaceus...* (Wang и сар., 2013).

1.8.4. Антидијабетична активност биљака из фамилије Rosaceae

Доступни литературни подаци указују да се многе врсте ове фамилије користе у народној медицини за регулисање дијабетеса, што је за неке потврђено и експериментално, укључујући врсте рода *Rosa* (Chrubasik и сар., 2008).

У истраживању Da Silva Pinto и коаутора (2010) екстракти плодова *Fragaria × ananassa* су успешно инхибирали хидролизујуће ензиме угљених хидрата, α -амилазу и α -глукозидазу, што су касније потврдили и Mandave и сар. (2013).

Плодови *Pyrus communis* су показали антидијабетичне ефекте у експериментима Wang и сар. (2015), а аутори су сугерисали да се они вероватно одвијају путем инхибиције α -глукозидазе идентификованим полифенолним једињењима као што су хлорогенска, ванилинска, ферулна киселина и рутин.

Поред наведеног, листови *Malus toringoides* су деловали хипогликемијски на експерименталне животиње у истраживању које су спровели Li D. и коаутори (2014) за шта су биле одговорне пре свега флавоноидне компоненте.

Екстракти плодова култивара *Prunus domestica* су успешно инхибирали различите ензиме, укључујући α -амилазу и α -глукозидазу (Mocan и сар., 2018). У овом раду, екстракти свих култивара су били значајно ефикаснији у инхибицији α -глукозидазе у односу на α -амилазу. Изданци, листови и цветови *P. avium* су показали антидијабетична својства у раду Jesus и сар. (2020). Посебно ефикасним су се показали инфуз изданка и воденоетанолни екстракти изданка, листа и цвета за које су добијене најниже IC₅₀ вредности (3,18, 7,67, 15,61 и 59,83 $\mu\text{g/mL}$, редом). Важно је истаћи да су сви испитивани узорци у овом раду, осим инфуза цветова, поседовали боља антидијабетична својства у односу на позитивну контролу, акарбозу (IC₅₀ 296,83 $\mu\text{g/mL}$). Слично као и у претходном раду, екстракти су јаче инхибиторно дејство испољили на α -глукозидазу. Поједини аутори су указали и на антидијабетични потенцијал плодова *P. spinosa* (Podsedek и сар., 2014; Popović и сар., 2020).

Spínola и сар. (2019) су проучавали антидијабетична својства листова и плодова *Rubus grandifolius*, португалске ендемичне врсте и установили да су екстракти наведене врсте моћни инхибитори α - и β -глукозидазе, док је њихов ефекат на α -амилазу окарактерисан као умерен. На основу добијених резултата аутори су сугерисали на значај употребе *R. grandifolius* у раним фазама дијабетеса типа 2. Водени, етанолни и етил-ацетатни екстракти *R. sanctus* и *R. ibericus* су инхибирали различите ензиме укључујући ацетилхолин- и бутирилхолин- хидролазу, тирозиназу и хидролазе угљених хидрата, α -амилазу и α -глукозидазу, што су аутори приписали фитоједињењима нефенолне природе (Zengin и сар., 2019). Насупрот томе, Tian и сар. (2021) су доказали обећавајућа антидијабетична својства флавоноида из плодова *R. corchorifolius*.

ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. Циљеви истраживања

Имајући у виду презентоване литературне податке, као објекат истраживања ове докторске дисертације су одабране до сада недовољно проучене самоникле биљне врсте из фамилије Rosaceae: *Prunus mahaleb*, *P. spinosa*, *Rubus discolor* и *R. serpens*.

Циљ истраживања докторске дисертације је било испитивање хемијског састава и биолошких активности екстраката листова и плодова наведених врста, али и успостављање корелација између садржаја секундарних метаболита и испољених биолошких ефеката ради употпуњавања досадашњих сазнања и њихове могуће примене у прехранбеној, фармацеутској и козметичкој индустрији.

Како би се реализовао наведени циљ докторске дисертације, дефинисани су следећи задаци:

- екстракција листова и плодова растварачима опадајуће поларности (вода, етанол и ацетон) методом ултразвучне екстракције,
- квантитативна спектрофотометријска анализа хемијског састава екстраката (одређивање укупне количине фенола, флавоноида и антоцијана),
- квалитативна анализа фенолних киселина и антоцијана LC-MS/MS техником,
- испитивање антиоксидантне активности екстраката *in vitro* спектрофотометријским методама (DPPH, ABTS, FRAP, TRC и β -каротен/линолна киселина тестовима),
- одређивање антибактеријске и антифунгалне активности микродилуционом методом,
- испитивање цитотоксичности екстраката према различитим туморским ћелијским линијама човека (HeLa, MDA-MB-453 и K562) и поређење истог ефекта према здравим контролним ћелијама (MRC-5),
- селекција најефективнијих екстраката у циљу детаљнијег испитивања антитуморског потенцијала, у смислу утврђивања типа ћелијске смрти коју индукују селектовани екстракти и испитивања инхибиције раста туморских HeLa ћелија у некој од фаза ћелијског циклуса, у циљу добијања увида у механизам њиховог дејства,
- утврђивање антидијабетичне активности *in vitro* спектрофотометријским методама путем инхибиције ензима повезаних са метаболизмом угљених хидрата, α -амилазе и α -глукозидазе,
- испитивање корелација између хемијског састава екстраката и биолошких активности,
- упоређивање резултата добијених у наведеним тестовима за испитивање биолошких активности са резултатима за комерцијално доступне антиоксиданте и лекове,
- одабир екстраката са најбољим резултатима биолошких активности који би се могли употребити за истраживања усмерена на изоловање активних компоненти и испитивање њихових апликативних потенцијала.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. Материјал и методе

3.1. Материјал

3.1.1. Биљни материјал

Листови и плодови врста *Prunus mahaleb* и *Prunus spinosa* прикупљени су током лета 2012., односно 2012. и 2015. године на локалитетима Вијенац и Брдине у Далмацији, а детерминацију биљног материјала је урадио професор др Петар Марин, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Биљни материјал врсте *Rubus discolor* је узоркован 2012. године на планини Цер, недалеко од села Чокешина, а *Rubus serpens* током 2012. и 2017. на планини Јастребац. Наведене врсте овог рода је детерминисао професор др Зоран Кривошеј, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици.

Листови су након прикупљања сушени на промаји у сеновитој просторији током две недеље.

Плодови свих врста су након сакупљања замрзнути и чувани на температури -18°C, све до употребе.

Направљени су ваучерски узорци за све наведене врсте и депоновани у Хербаријуму Ботаничке баште „Јевремовац“ (Табела 2).

Табела 2. Подаци о ваучерима испитиваних биљних врста у Хербаријуму Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“ Биолошког факултета Универзитета у Београду.

Биљна врста	Ваучер	Датум	Локалитет	Фенофаза
<i>Prunus mahaleb</i> L.	БЕОУ;17481	25.07.2015.	Далмација (Вијенац), Р. Хрватска	Плодоношење
<i>Prunus spinosa</i> L.	БЕОУ;17482	23.07.2015.	Далмација (Брдине), Р. Хрватска	Плодоношење
<i>Rubus discolor</i> Weihe & Nees	БЕОУ;17081	11.08.2012.	Цер (Чокешина), Р. Србија	Плодоношење
<i>Rubus serpens</i> Weihe ex Lej & Court	БЕОУ;17085	август, 2012.	Јастребац, Р. Србија	Плодоношење

3.1.2. Микроорганизми

У циљу испитивања антимикуробних својстава екстраката употребљени су следећи микроорганизми:

➤ **бактерије:**

→ **Грам позитивне бактерије:**

- *Bacillus cereus* (клинички изолат),
- *Micrococcus flavus* ATCC 10240,
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и
- *Listeria monocytogenes* NCTC 7973;

→ **Грам негативне бактерије:**

- *Enterobacter cloacae* ATCC 35030,
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
- *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 и
- *Escherichia coli* ATCC 35210;

➤ **гљиве:**

→ **микромлицете:**

- *Aspergillus fumigatus* (хумани изолат),
- *Aspergillus versicolor* ATCC11730,
- *Aspergillus ochraceus* ATCC 12066,
- *Aspergillus niger* ATCC 6275,
- *Trichoderma viride* IAM 5061,
- *Penicillium funiculosum* ATCC 36839,
- *Penicillium ochrochloron* ATCC 9112 и
- *Penicillium verrucosum* var. *cyclospium* (изолат из хране).

3.1.3. Ћелијске линије

У циљу испитивања потенцијалне антитуморске активности екстраката коришћене су следеће малигне ћелијске линије човека:

- Hela (аденокарцином цервикса),
- MDA-MB-453 (канцер дојке) и
- K562 (мијелоидна леукемија).

Такође, испитан је и ефекат екстраката на здравој ћелијској линији MRC-5 (ембрионални фибробласти плућа човека).

3.1.4. Хранљиве подлоге (медијуми)

За гајење бактерија, гљива и ћелијских линија коришћени су следећи хранљиви медијуми:

➤ **Хранљиве подлоге за гајење бактерија:**

→ **Tryptic Soy Broth (TSB):**

- tryptic soy 30 g,
- дестилована вода 1000 mL.

➤ **Хранљиве подлоге за микрогљиве:**

→ **Malt Broth (MB):**

- екстракт слада 25 g,
- дестилована вода 500 mL.

➤ **Хранљиве подлоге за гајење ћелијских линија:**

→ Комплетни хранљиви медијум (RPMI 1640, pH 7,2) са додатком:

- 3 mM L-глутамин,
- 100 µg/mL стрептомицин,
- 100 IU/mL пеницилин,
- 10% говеђег феталног серума термички инактивисаног током 30 min на 56°C и
- 25 mM Hepes-a.

3.1.5. Хемикалије и реагенси

Хемикалије и реагенси коришћени приликом експерименталног рада су били најмање аналитичког степена чистоће (*pro analysis*).

Органски растварачи (метанол, етанол, ацетон, хлороформ, ацетонитрил) који су коришћени за екстракцију, експерименте и LC-MS/MS анализу, као и мравља киселина (CH₃OH) су били HPLC степена чистоће, а набављени су од VWR Chemicals (Lutterworth, Leicestershire, UK). Анхидровани натријум-карбонат (Na₂CO₃), калијум-ацетат (CH₃COOK), динатријум-хидроген-фосфат-додекахидрат (Na₂HPO₄ × 12H₂O) и натријум-хидроген-фосфат-дихидрат (NaH₂PO₄ × 2H₂O) су купљени од истог произвођача, док су глацијална сирћетна (CH₃COOH) и концентрована хлороводонична киселина (HCl) – Zorka Pharma (Шабац, Србија); натријум-ацетат-трихидрат (CH₃COONa × 3H₂O) и калијум-хлорид (KCl) – Centrohem (Стара Пазова, Србија); натријум-хлорид – Superlab (Београд, Србија); кверцетин-хидрат и 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин)-6-сулфонска киселина (ABTS) – TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Belgium); алуминијум-нитрат-нонахидрат (Al(NO₃)₃ × 9H₂O) и 2,4,6-трис(2-пиридил)-s-триазин (TPTZ) – Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland); калијум-перокси-дисулфат (K₂O₈S₂) и трихлорсирћетна киселина (CCl₃COOH) – ThermoFisher Scientific (New Jersey, US), а 1% раствор скроба – Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Germany). Следећи реагенси су купљени од Merck (Darmstadt, Germany): 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH), Folin-Ciocalteu-ов фенолни реагенс, β-каротен, линолна и гална киселина, Tween 40, Луголов раствор, α-амилаза из панкреаса свиње и α-глукозидаза тип I из пекарског квасца, 4-нитрофенил-α-D-глукопиранозид (PNPG), гвожђе(III)-хлорид-хексахидрат (FeCl₃ × 6H₂O), гвожђе(II)-

сулфат-хептахидрат ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$), калијум-хексацијаноферат(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), диметил-сулфоксид (DMSO), RPMI-1640, фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum*), Нерес и *L*-глутамин, као и стандарди који су коришћени за LC-MS/MS анализу, а били су HPLC степена чистоће.

Подлоге за гајење микроорганизама: Tryptic soy broth (TSB) и Malt broth (MA) су набављени од Института за вирусологију, вакцине и серуме „Торлак“ (Београд, Србија). Микроорганизми коришћени у експериментима су добијени из микотеке Миколошке лабораторије Института за Биолошка истраживања „Синиша Станковић“, док су ћелијске линије добијене од установе American Type Culture Collection (Manassas, VA, US).

Лекови који су употребљени као позитивна контрола: ампицилин – Merck (Darmstadt, Germany), кетоконазол – Zorka Pharma (Шабац, Србија) и glucobay – Bayer d. o. o. (Leverkusen, Germany).

3.2. Методе

3.2.1. Екстракција

Екстракти су добијени методом појединачне екстракције помоћу ултразвучног купатила. Коришћени су растварачи различите поларности да би се из биљног материјала екстраховале различите групе једињења.

Биљни материјал:

- *P. mahaleb* – листови; егзокарп и мезокарп плода;
- *P. spinosa* – листови; егзокарп и мезокарп плода;
- *R. discolor* – листови; плодови;
- *R. serpens* – листови; плодови;

Растварачи:

- дестилована вода,
- 96% етанол,
- ацетон.

Поступак:

У ерленмајере је одмерено по 10 g самлевених, сувих листова, а потом је додат одговарајући растварач (100 mL). Процес екстраховања је трајао 24 h, у мраку, на собној температури. Узорци су током првог и последњег сата смештени у ултразвучно водено купатило (Ultrasonic Cleaner; SONIC) и подвргнути дејству ултразвучних таласа, филтрирани кроз филтер папир (Whatman филтер папир бр. 1), након чега је уклоњен вишак растварача из супернатанта помоћу ротационог вакуум упаривача (Buchi rotavapor R-114).

Упаравање се одвијало на температурама које нису прелазиле 40°C, са изузетком водених екстраката када су достигале до 60°C.

Екстракција плодова се одвијала на истоветан начин, с тим што је смрзнути биљни материјал претходно мацериран одговарајућим растварачем у керамичком авану са тучком на собној температури, а узорци су током екстракције чувани у фрижидеру.

Добијени суви екстракти су обележени, смештени у стаклене вијале и ускладиштени у фрижидеру на температури од 4С° све до даље употребе. Приноси, на овај начин добијених сувих екстраката, су приказани у **Табели 3**.

Табела 3. Приноси индивидуалних ултразвучних екстракција листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* добијени екстракцијом растварачима различите поларности (водом, етанолом и ацетоном) изражени у процентима.

ВРСТА	ДЕО БИЉКЕ	РАСТВОРАЧ	ПРИНОС (%)
<i>Prunus mahaleb</i>			
лист		вода	19,7
		етанол	8,09
		ацетон	3,26
плод		вода	46,5
		етанол	25,7
		ацетон	5,32
<i>Prunus spinosa</i>			
лист		вода	13,6
		етанол	9,14
		ацетон	4,36
плод		вода	18,4
		етанол	11,1
		ацетон	9,40
<i>Rubus discolor</i>			
лист		вода	11,0
		етанол	3,77
		ацетон	1,92
плод		вода	15,6
		етанол	13,3
		ацетон	7,28
<i>Rubus serpens</i>			
лист		вода	5,68
		етанол	2,88
		ацетон	2,42
плод		вода	8,26
		етанол	5,46
		ацетон	6,96

3.2.2. Фитохемијска анализа екстраката (TPC, TFC, TAC, TMAC, LC-MS/MS)

3.2.2.1. Одређивање количине укупних фенола (TPC)

Укупан садржај фенола, TPC (енгл. *Total Phenolic Content*), у екстрактима је одређен помоћу Folin-Ciocalteu (FC) реагенса према методи коју су претходно описали Singleton и Rossi (1965), уз мање измене.

FC реагенс представља смешу фосфомолибденове и фосфоволфрамове киселине ($3\text{H}_2\text{O} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times 13\text{WO}_3 \times 5\text{MoO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ и $3\text{H}_2\text{O} \times \text{P}_2\text{O}_5 \times 14\text{WO}_3 \times 4\text{MoO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$). У циљу одређивања количине укупних фенола искоришћена је њихова способност да редукују

наведени комплекс, при чему се сами оксидују. Реакција се може пратити како по промени боје редукованог комплекса из жуте у тамноплаву, тако и по порасту апсорбанце.

Направљени су радни раствори од почетних раствора испитиваних узорка разблаживањем до концентрација 0,2 mg/mL (екстракти *R. discolor* и *R. serpens*), односно 0,5 mg/mL (екстракти *P. mahaleb* и *P. spinosa*).

У епрувете је сипано по 0,2 mL радних раствора испитиваних узорка, а затим додато по 1 mL FC реагенса. Слепа проба је садржала дестиловану воду уместо узорка. Добијена смеша је инкубирана у трајању од 6 минута. Епрувете су допуњене са по 0,8 mL 7,5% раствора натријум-карбоната (Na_2CO_3). Уследило је двосатно инкубирање у мраку, на собној температури уз повремено мешање садржаја како се не би развио талог. Апсорбанца је измерена на JENWAY 6306 UV/VIS спектрофотометру на таласној дужини од 740 nm.

Гална киселина је употребљена као референтно једињење за конструисање калибрационе криве (функција зависности апсорбанце од концентрације). У те сврхе су припремљени раствори галне киселине у дестилованој води чији се опсег концентрација кретао од 0,01 до 0,1 mg/mL.

Резултати су очитани са добијене калибрационе криве, $y = 7,0632x - 0,0159$, помножени са фактором разблажења и изражени кроз средњу вредност три мерења у mg еквивалената галне киселине, GAE (енгл. *Gallic Acid Equivalent*s) по g сувог екстракта (mg GAE/g).

3.2.2.2. Одређивање количине укупних флавоноида (TFC)

Количина укупних флавоноида, TFC (енгл. *Total Flavonoid Content*), у екстрактима, је одређена по процедури Park и сар. (1997), а која се заснива на особини флавоноида да са металима, посебно алуминијумом, граде стабилне киселе комплексе чији је максимум апсорпције на 415 nm.

За потребе овог експеримента у епрувете је сипано по 1 mL етанолног раствора екстракта концентрације 1 mg/mL. Затим је додавано по 4,1 mL 80% етанола ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), 0,1 mL 10% алуминијум-нитрата-нонахидрата ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9\text{H}_2\text{O}$) и 0,1 mL 1 M раствора калијум-ацетата (CH_3COOK). Након 40 минута инкубације на собној температури, мерена је апсорбанца на 415 nm у односу на 96% етанол.

Резултати су очитани са калибрационе криве, $y = 13,008x - 0,0199$, за чије конструисање је употребљен кверцетин и изражавани у mg еквивалената кверцетина, QE (енгл. *Quercetin Equivalent*s), по g сувог екстракта (mg QE/g). Приликом обраде резултата узет је у обзир и фактор разблажења. Сва мерења су рађена у трипликату.

3.2.2.3. Одређивање количине укупних антоцијана (TAC)

Количина укупних антоцијана у узорцима је одређена „pH single“ методом коју су описали Guisti и Wrolstad (2001). Метода је базирана на особини антоцијана да при промени pH средине реверзибилно мењају своју структуру услед чега долази до промене апсорпционог спектра што се огледа и у промени обојености. Квантитативно одређивање количине антоцијана се стога врши при pH 1 при чему се на тај начин квантификују како мономери антоцијана, тако и продукти њихове разградње, који

настају током времена под дејством различитих фактора, а који су често стабилнији од самих мономера антоцијана.

Од сувих екстраката припремљени су почетни раствори екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor*, *R. serpens* концентрације 20 mg/mL. По 0,5 mL почетног раствора је разблажено са 4,5 mL калијум-хлоридног пуфера (pH 1), а након 15 min је измерена апсорбанца на 520 nm и 700 nm (због корекције замућења). Екстракти код којих се јавио талог су филтрирани пре мерења.

Концентрација укупних антоцијана је израчуната помоћу формуле:

$$C_{\text{УК}} \text{ (mg/L)} = (A_{\text{УК}} \times M \times F \times 1000) / \epsilon \times l$$

где су: $A_{\text{УК}}$ апсорбанца укупних антоцијана у узорку која се одређује према формули $A_{\text{УК}} = (A_{500} - A_{700})_{\text{pH } 1,0}$; M молекулска маса цијанидин-3-глукозида (449,2 g/mol); F фактор разблажења; ϵ моларни коефицијент (26900 L/(mol × cm)), а l дељина кивете (1 cm). Добијени резултати су изражени у mg еквивалената цијанидин-3-глукозида по g сувог екстракта (mg СуЕ/g).

3.2.2.4. Одређивање количине укупних мономерних антоцијана (ТМАС)

Количина укупних мономерних антоцијана у узорцима је одређена „pH differential“ методом према Guisti и Wrolstad (2001). Протокол је заснован на особини мономерних антоцијана да се приликом промене pH вредности реверзибилно трансформишу, те су при pH 1 присутни у виду обојеног оксонијум јона, а при pH 4,5 прелазе у безбојни хемикетални облик.

Поступак је исти као код претходно описане методе, с тим што се читав поступак понавља при pH 4,5, а резултати израчунавају помоћу формуле:

$$C_{\text{МОН}} \text{ (mg/L)} = (A_{\text{МОН}} \times M \times F \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

$A_{\text{МОН}} = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 1,0} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH } 4,5}$. Резултати добијени на овај начин се такође изражавају путем доминантног антоцијана, односно цијанидин-3-глукозида.

3.2.2.5. Квантитативна LC-MS/MS анализа одабраних фенолних киселина

Садржај 11 фенолних киселина у воденим и етанолним екстрактима листова и плодова испитиваних врста је одређен LC-MS/MS методом у складу са Orčić и сар. (2014). Водени и етанолни екстракти су разблажени 50% метанолом, односно 80% етанолом, редом, до финалне концентрације 5 mg/mL. Тако припремљени узорци су анализирани помоћу *Agilent 1200 series* течног хроматографа куплованог са *Agilent series 6410B Triple-Quad* масеним детектором са електроспреј јонским извором (ESI) контролисаним путем *MassHunter ver. B.03.01.* софтвера. Аналити су раздвојени коришћењем *Zorbax Eclipse XDB-C18 50 mm × 4.6 mm × 1.8 μm (Agilent Technologies)* реверзно-фазне колоне. MS/MS оптимизовани параметри специфични за анализирана једињења су приказани у **Прилогу 1**. Површине добијених пикова су из хроматограма читаване помоћу *Agilent MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.06.01)* софтвера. Концентрације појединачних фенолних киселина су прочитане са калибрационих кривих одговарајућих стандарда у *Microsoft Excell-у*.

3.2.2.6. Семи-квантитативна LC-MS/MS анализа антоцијана

Идентификација и семи-квантитација антоцијана водених и етанолних екстраката плодова је урађена према LC-MS/MS методи развијеној у Лабораторији за испитивање природних ресурса фармаколошки и биолошки активних једињења (Нови Сад, Р. Србија). У те сврхе су припремљени раствори референтних стандарда (цијанидина, пеларгонидина, делфинидина и малвидина) концентрације од 2,5 µg/mL до 200 µg/mL који су послужили за конструисање калибрационих кривих. Екстракти су филтрирани кроз целулозне мембранске филтере (25 mm, 45 µm) и по 5 µL филтрата је инјектовано у систем, а затим анализирани реверзно-фазном LC-MS/MS техником помоћу *Agilent Technologies series 1260 HPLC 6460 Triple-Quad* масеног детектора контролисаног *Agilent Technologies MassHunter Workstation software – Data Acquisition* софтвером. За хроматографску сепарацију једињења употребљена је *Zorbax Eclipse XDB-C18* колона (150 mm × 4,6 mm × 5 µm) при температури од 30°C. Мобилна фаза се састојала од 0,1% раствора мравље киселине у дејонизованој води (А) и 0,1% раствора мравље киселине у ацетонитрилу (В) при чему је проток био 0,5 mL/min. Примењен је градијентни мод који је подразумевао следећи однос фаза: 0 min 5% В, 10 min 22% В, 35 min 42% В, 40-42 min 100% В и време ре-еквilibрације у трајању од 8 min. Елуиране компоненте су детектоване и идентификоване MS/MS детектором при следећим параметрима: гас за сушење (N₂) температуре 350°C, протока 9 L/min, притиска гаса небулајзера 30 psi, напона на капилари 4 kV, позитивног поларитета. Подаци су добијени у MS2Scan моду, при опсегу маса 100-1200 Da и напону фрагментатора од 135 V до 220 V. Апсорпциони спектри су истовремено снимани и на 520 nm и заједно са масеним спектрима су употребљени за идентификацију једињења. Површине пикова DAD хроматограма су одређене *Agilent MassHunter Workstation Software – Qualitative Analysis (ver. B.06.01)* софтвером. Калибрационе криве антоцијанидина су конструисане у Microsoft Excell софтверу и послужиле су за семи-квантитацију одговарајућих гликозида наведених антоцијанидина. Резултати су изражени у mg еквивалената агликона по g сувог екстракта.

3.2.3. Одређивање антиоксидантне активности (DPPH, ABTS, FRAP, TRC и β-каротен/линолна киселина тест)

Антиоксидантна активност екстраката листова и плодова испитиваних врста је тестирана кроз 5 *in vitro* спектрофотометријских протокола (DPPH, ABTS, FRAP, TRC и β-каротен/линолна киселина тест). Приказани резултати су добијени на основу три мерења и представљају њихову средњу вредност (*AV*; енгл. *Average*) ± стандардна девијација (*SD*; енгл. *Standard Deviation*). Познати антиоксиданти ВНА, ВНТ и L-аскорбинска киселина (витамин C), су употребљени за компарацију са антиоксидантном активношћу екстраката.

3.2.3.1. DPPH тест

Тест је заснован на оксидоредукционој реакцији антиоксиданата из биљног екстракта и DPPH слободних радикала (Blois, 1958).

У питању је колориметријска метода у којој се користи 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH•; C₁₈H₁₂N₅O₆, M=394,33) слободни радикал. DPPH слободни радикал поседује један неспарени делокализован електрон због чега не гради димере, па је на собној температури стабилан. Растварањем у метанолу развија тамно-љубичасту боју са максимумом апсорпције на 517 nm. У реакцији са антиоксидантима

DPPH слободни радикал се редукује при чему се боја раствора мења у жуту, а апсорбанца опада (Molyneux, 2004).

DPPH се раствара у метанолу како би се добио радни раствор концентрације 0,04 mg/mL и апсорбанце у опсегу од 0,9 до 1,1 на 517 nm таласне дужине. Овако припремљен раствор се чува у мраку на собној температури до тренутка употребе.

Од припремљених почетних раствора испитиваних екстраката концентрације 1 mg/mL припремају се раствори нижих концентрација разблаживањем у метанолу. Концентрације радних раствора су у укупној запремини (4 mL) вариране у опсегу од 8 до 20 µg/mL за екстракте листова, односно 10 до 100 µg/mL за екстракте плодова *R. discolor* и *R. serpens*. Радни раствори екстраката *P. mahaleb* и *P. spinosa* су били нешто виших концентрација које су се кретале од 10 до 100 µg/mL за листове и од 40 до 400 µg/mL за плодове.

У епрувете је сипано по 0,4 mL радног раствора узорка одговарајуће концентрације, а затим додато по 3,6 mL метанолног раствора DPPH. Уследила је полчасовна инкубација у мраку на собној температури. Апсорбанца је мерена на 517 nm у односу на контролу која је садржала исту количину метанола уместо узорка.

Ефикасност екстракта у неутралисању DPPH слободних радикала, RSC (енгл. *Radical Scavenging Capacity*), је израчуната према следећој формули и изражена у процентима (%):

$$RSC_{DPPH}\% = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100\%$$

где су A_c и A_s апсорбанце контроле и узорка.

Резултати су приказани као ефективне концентрације, EC_{50} (енгл. *Effective Concentration*), односно концентрације екстракта које концентрацију DPPH слободних радикала у раствору редукују за 50%. Вредности EC_{50} (mg/mL) се читавају са графичког приказа зависности $RSC_{DPPH}\%$ (y – оса) од концентрације екстракта (mg/mL) (x – оса).

3.2.3.2. ABTS тест

Способност антиоксиданата да „хватају“ слободне радикале је утврђена и ABTS тестом по Miller-у и Rice-Evans-у (1997), уз мање измене. Употребљен је 2,2-азино-бис(3-етлибензотиазолин)-6-сулфонска киселина (ABTS^{•+}; C₁₈H₂₄N₆O₆S₄, M=548,68) слободни радикал који се под дејством антиоксиданата редукује у ABTS, што се манифестује падом апсорбанце и обезбојавањем.

Пре почетка експеримента (12 до 16 часова раније) припремљен је ABTS раствор (3,84 mg/mL) у 2,46 mM раствору K₂S₂O₈ и тиме инициран настанак ABTS^{•+} слободних радикала. Припремљени шток ABTS раствора је чуван на собној температури у мраку до употребе. Потом је припремљен радни раствор ABTS^{•+} растварањем 1 mL шток раствора у 100-110 mL дестиловане воде, тако да апсорбанца добијеног раствора буде 0,7 ± 0,2.

Разблаживањем почетних раствора екстраката концентрације 1 mg/mL прављени су радни раствори различитих концентрација тако да у укупној запремини (4,1 mL) буду у опсегу: од 1,2 до 12 µg/mL - екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens*; од 5 до 24 µg/mL - раствори екстраката плодова *R. discolor*, *R. serpens* и листова *P. mahaleb* и *P. serpens*; од 24 до 122 µg/mL - раствори екстраката плодова *P. mahaleb* и *P. spinosa*.

По 100 µL радног раствора екстракта је сипано у епрувете, а затим је додато 4 mL радног раствора ABTS. Потом су епрувете инкубиране 30 min у воденом купатилу на

температури од 30°C. Апсорбанца је измерена на 734 nm, у односу на слепу пробу која је садржала дестиловану воду уместо узорка.

Аналогно DPPH методи, проценат смањења броја ABTS слободних радикала је израчунат из формуле:

$$RSC_{ABTS}\% = [(A_c - A_s)/A_c] \times 100\%$$

где A_c представља ознаку за апсорбанцу контроле, а A_s апсорбанцу узорка. Резултати су исказани путем вредности EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) која осликава зависност броја слободних радикала (%) и концентрације екстракта.

3.2.3.3. FRAP метод

FRAP (енгл. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) спектрофотометријски тест који су развили Benzie и Strain (1996) је првенствено био намењен мерењу антиоксидантног потенцијала крвне плазме. Касније је протокол прилагођен и као такав се примењује за утврђивање антиоксидантног потенцијала биљних екстраката (Alam и сар., 2013).

С обзиром да је у раду метод употребљен за испитивање антиоксидантних својстава узорака биљног порекла у наставку ће се применити и модификовани назив, енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP).

У методи се користи 2,4,6-трипиридил-*s*-триазин (TPTZ) који са Fe^{+3} јонима из гвожђе(III)-хлорида (FeCl_3) гради комплекс $[\text{Fe}^{+3}-(\text{TPTZ})_2]^{+3}$ са максимумом апсорпције на 593 nm. При ниским рН вредностима, антиоксиданти могу да редукују Fe^{+3} из овог комплекса у Fe^{+2} јоне, што доводи до пораста апсорбанце и промене боје у тамно-плаву (Alam и сар., 2013).

FRAP реагенс се користи увек свеж, припремљен пред сам почетак експеримента. То је заправо смеша која се добија мешањем 0,3 М ацетатног пуфера (рН 3,6), 10 mM раствора TPTZ-а у 40 mM воденом раствору HCl и 20 mM воденог раствора FeCl_3 у односу 10:1:1 (v/v/v).

У зависности од врсте узорка, у 1 mL FRAP реагенса додата је смеша (3 mL) одговарајуће количине дестиловане воде и почетног раствора екстракта концентрације 1 mg/mL и то: по 50 μL раствора екстракта листова *R. discolor* и *R. serpens*; 100 μL раствора екстракта плодова *R. discolor*, *R. serpens* и листова *P. mahaleb* и *P. spinosa*; 200 μL раствора екстракта листова *P. mahaleb* и *P. spinosa*. Уследило је 10 минута инкубације у воденом купатилу на 37°C, а затим мерење апсорбанце на 595 nm.

Резултати су добијени читавањем са калибрационе криве ($y = 0,0208x - 0,1259$) за чије конструисање је коришћен низ разблажења 1 mM воденог раствора $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Приказани су кроз $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ еквивалената по g сувог екстракта узорка ($\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$) при чему је узет у обзир и фактор разблажења.

3.2.3.4. TRC метод

TRC (енгл. *Total Reducing Capacity*) тест је базиран на способности антиоксиданата да формирају обојени комплекс са калијум-хексацијанофератом (III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) у присуству трихлорсирћетне киселине (CCl_3COOH) и гвожђе(III)-хлорида (FeCl_3) по протоколу који је описао Ouyazu (1986) уз незнатне измене, а резултати су представљени на начин који су описали Ferreira и сар. (2007). Реакција се може пратити по развијању пруско плаве боје с порастом концентрације екстракта, као и по порасту апсорбанце.

За сваки узорак је припремљено по пет разблажења од почетног раствора екстракта. Затим је 0,2 mL одговарајућег разблажења узорка инкубирано 20 минута на 50°C са смешом 0,5 mL 0,2 M фосфатног пуфера (pH 6,6) и 0,5 mL 1% калијум-хексацијаноферата (III) ($K_3Fe(CN)_6$). Потом је додато 0,5 mL 10% трихлорсирћетне киселине (CCl_3COOH). Садржај у епруветама је снажно измешан на Vortex-у уз додатак 1,7 mL дестиловане воде и 0,1 mL 0,1% гвожђе(III)-хлорида ($FeCl_3$). Након поновног мешања садржаја у епруветама на Vortex-у, уследила је полчасовна инкубација на собној температури и мерење апсорбанце на 700 nm.

Укупни редукциони потенцијал екстракта је изражен преко вредности EC_{50} ($\mu g/mL$), односно концентрације екстракта која узрокује пораст апсорбанце до вредности 0,5. Вредност EC_{50} је очитана са графика на ком је приказана зависност редукционе моћи (пораст апсорбанце) (y – оса) од концентрације екстракта (x – оса).

3.2.3.5. β -Каротен/линолна киселина тест

β -Каротен/линолна киселина тестом је одређена способност екстракта да спрече обезбојавање β -каротена, а изведен је на начин који су претходно описали Amin и сар. (2004) уз мање модификације.

Од почетних раствора екстракта (12 mg/mL (екстракти листова и плодова *P. mahaleb* и *P. spinosa*), 10 mg/mL (екстракти листова и плодова *R. discolor* и екстракти плодова *R. serpens*) и 5 mg/mL (екстракти листова *R. serpens*)) су припремљени радни раствори различитих концентрација у 70% етанолу. Радни раствор емулзије β -каротена и линолне киселине у оксигенисаној дестилованој води је припремљен непосредно пре експеримента. Најпре је направљена емулзија β -каротена и линолне киселине растварањем 4 mL шток раствора β -каротена у хлороформу (0,5 mg/mL) у емулзији линолне киселине и Tween-80. Емулзија је снажно промућкана, а потом упарена на ротационом вакуум упаривачу (на 40°C; 10 минута) како би се уклонио хлороформ. Добијена емулзија β -каротена и линолне киселине је растворена у 100 mL оксигенисане дестиловане воде чиме је добијен радни раствор који се може користити наредних неколико сати. У епрувете је сипано по 100 μL одговарајућег радног раствора екстракта и 2,5 mL радног раствора емулзије. Апсорбанца је очитана у нултом минуту на 470 nm и након једночасовне инкубације у воденом купатилу на температури од 50°C у односу на бланк (радни раствор емулзије без β -каротена). Слепа проба је садржала 70% етанол уместо екстракта.

Резултати су добијени помоћу следеће формуле:

$$RSC_{\beta\text{-каротен}}\% = [1 - ((A_{S0} - A_{S60}) / (A_C - A_{C60}))] \times 100\%$$

у којој A_C и A_{C60} представљају апсорбанце контроле, а A_{S0} и A_{S60} узорка пре и након инкубације редоследом. Исти су презентовани путем вредности EC_{50} (mg/mL), односно концентрације узорка која редукује концентрацију слободних радикала за 50% чиме се спречава обезбојавање радног раствора.

3.2.4. Одређивање антимикробне активности

3.2.4.1. Одређивање антибактеријске активности

Антибактеријска активност је испитивана микродилуционом методом како су описали Soković и сар. (2010) и Kostić и сар. (2017).

Почетни раствори екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* концентрације 100 mg/mL су припремљени у 30% етанолу.

Потом је од почетних раствора екстраката мешањем са TSB подлогом у микротитар плочама са 96 бунарића (Спектар, Чачак) прављена серија разблажења опсега концентрација од 0,09 до 45,4 mg/mL запремине по 100 μ L. У сваки од бунарића је додато по 10 μ L бактеријске суспензије финалне густине 1×10^5 CFU/mL. Уследила је 24-часовна инкубација са инокулумом на 37°C. Ради визуелизације бактерија у бунарићима, узорци су инкубирани додатних 30 минута са додатком 40 μ L воденог раствора 2-(4-јодофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-фенилтетразолијум хлорида (INT) концентрације 0,2 mg/mL. Присуство вијабилних бактерија у бунарићима је узроковало розе обојеност, док је њихово одсуство довело до обезбојавања садржаја бунарића.

Минималне инхибиторне концентрације, МИК (енгл. *Minimal Inhibitory Concentrations, MIC*), које представљају најниже концентрације екстраката које доводе до видљивог заустављања раста бактерија, су очитаване помоћу бинокуларне лупе.

Минималне бактерицидне концентрације, МБК (енгл. *Minimal Bactericidal Concentrations, MBC*), су дефинисане као најниже концентрације екстраката при којима нема видљивог раста бактерија, што указује на 99,5% смртности ових патогена, а очитане су након поновне инокулације 100 μ L течног медијума са 10 μ L садржаја из бунарића одговарајуће концентрације и додатне 24-часовне инкубације.

На свакој микротитрационој плочи последње три колоне су представљале контролу, бланк и негативну контролу, редом. Контрола је садржала подлогу и бактеријску суспензију, како би се потврдило да су коришћени патогени вијабилни; бланк само подлогу како би се утврдила њена стерилност; негативна контрола растварач у ком су тестирани екстракти растварани (30% етанол) уместо екстракта, како би се утврдило да он не испољава ефекте на патогене бактерије.

Синтетички антибиотик, ампицилин, је коришћен као позитивна контрола.

3.2.4.2. Одређивање антифунгалне активности

Антифунгална активност водених и етанолних екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* је такође одређена микродилуционом методом, као што су претходно описали Soković и сар. (2009) и Kostić и сар. (2017).

Аналогно одређивању антибактеријске активности, направљени су почетни раствори испитиваних екстраката концентрације 100 mg/mL у 30% етанолу. Затим у 96 систему микротитрационих плоча са равним дном су направљене серије разблажења опадајућих концентрација почетних раствора запремине 100 μ L у МВ. Сваки бунарић је инокулисан са одговарајућом запремином суспензије патогених гљива, тако да њихова концентрација по бунарићу буде 1×10^5 CFU/mL. Након 72 h инкубације на 28°C, одређене су МИК. Уследило је реинокулисање и додатних 72 h инкубације, након чега су одређене минималне фунгицидне концентрације, МФЦ (енгл. *Minimal Fungicidal Concentrations*), које представљају најниже концентрације испитиваних екстраката које

узрокују видљиво одсуство патогених микрогљива, односно доводе до 99,5% смртности истих.

Такође, на свакој микротитрационој плочи је урађена контрола раста микроорганизама, бланк и негативна контрола у последње три колоне. Позитивна контрола је био синтетички антимицотик, кетоконазол.

3.2.5. Одређивање антитуморске активности

3.2.5.1. Одређивање цитотоксичности МТТ тестом

Цитотоксичну активност неки агенс може испољити директно или индиректно. Директно цитотоксично дејство агенс испољава уколико узрокује ћелијску смрт апоптозом и/или некрозом, док индиректно испољава уколико узрокује њену репродуктивну смрт, при чему ћелија остаје жива, али се не умножава (антипролиферативна активност).

И директно и индиректно дејство се процењује на основу процента циљних ћелија, $S(\%)$ (енгл. *Survival*) у присуству испитиваног агенса у односу на контролне нетретиране ћелије и рачуна се према следећој формули:

$$S(\%) = (N_s/N_c) \times 100$$

где N_s представља број живих ћелија након третирања испитиваним агенсом, а N_c број живих ћелија у контролном узорку у ком су ћелије расле само у присуству хранљиве подлоге. Тестови којима се може проценити преживљавање ћелија су бројни, а према методологији се могу сврстати у директне методе које се базирају на бројању преживелих ћелија или колонија у узорку и индиректне које су засноване на колориметрији или мерењу интензитета уградње радионуклида у биомакромолекуле.

Цитотоксично дејство екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* испитивано је МТТ (енгл. *Methyl-Thiazol-Tetrazolium*) тестом на начин који је претходно описао Mosmann (1983), а према модификацијама које су увели Ohno и Abe (1991). Цитотоксични МТТ тест је колориметријски тест базиран на особини живих метаболички активних ћелија да путем митохондријалних дехидрогеназа редукују 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолијум-хлорид (МТТ), жуту тетразолијумску со, до формазана. Формазан је кристал љубичасте боје који се раствара у детерџенту, SDS-у (енгл. *Sodium Dodecyl Sulphate*), при чему формира раствор са максимумом апсорпције на 570 nm. Апсорбанца раствореног формазана је директно пропорционална броју живих ћелија.

Третман туморских и здравих ћелијских линија

Туморске ћелијске линије, HeLa (2.500 ћелија/100 μ L по бунарићу) и MDA-MB-453 (3.000 ћелија/100 μ L по бунарићу), као и здрава ћелијска линија, MRC-5 (5.000 ћелија/100 μ L по бунарићу) која је коришћена као позитивна контрола, су засејане у микротитар плоче са 96 отвора, 20 h пре додавања тестираних екстраката. За разлику од њих, K562 неадхерентне ћелије (5.000 ћелија/100 μ L по бунарићу) су засејане 2 h пре додавања екстраката. По истеку одговарајућег времена инкубације, у бунариће је додавано по 50 μ L испитиваних екстраката растворених у комплетном хранљивом медијуму како би се добило пет различитих разблажења опсега од 0,125 до 2 mg/mL. Бланк у овом тесту је био хранљиви медијум припремљен на исти начин и помешан са екстрактом одговарајуће концентрације, без ћелија, док је контрола садржала само

ћелије у хранљивом медијуму без екстраката. Уследила је 72-часовна инкубација на 37°C у ваздуху засићеном воденом паром и 5% CO₂.

Одређивање преживљавања ћелија

Процент преживљавања ћелија је одређен по истеку одговарајућег времена инкубације циљних ћелија у присуству испитиваних биљних екстраката додавањем по 10 µL МТТ (5 mg/mL) боје и додатном 4-сатном инкубацијом. Потом је сваки од бунарића допуњен са 100 µL SDS-а како би се растворили кристали насталог формазана. Апсорбанца добијеног раствора је мерена 24 h касније на 570 nm помоћу читача микротитрационих плоча (Multiskan EX Thermo LabSystems).

Процент преживљавања ћелија (S%) је израчунат путем следеће формуле:

$$S(\%) = (A_s/A_c) \times 100\%$$

где A_s представља апсорбанцу узорка са ћелијама третираним различитим концентрацијама испитиваних екстраката, док је A_c апсорбанца контроле, односно нетретираних ћелија, при чему је одузета апсорбанца одговарајуће следеће пробе.

Интензитет цитотоксичног дејства испитиваних екстраката је изражен путем IC₅₀ (mg/mL) (енгл. *inhibitory concentration 50*) вредности која је очитана помоћу графика зависности процента преживелих ћелија од концентрације испитиваног екстракта. Вредност IC₅₀ представља концентрацију екстракта која снижава преживљавање циљних ћелија на 50% у односу на контролни узорак и карактеристична је за свако једињење.

3.2.5.2. Одређивање проапоптотског ефекта

Морфолошка анализа ћелијске смрти

Проапоптотски ефекат одабраних екстраката је одређен морфолошким анализом ћелијске смрти флуоресцентним микроскопом при чему су морфолошке промене до којих долази након третмана екстрактима визуелизоване смешом акридин оранжа и етидијум бромид. Акридин оранж боја захваљујући пермеабилности ћелијске мембране улази у живе, али и ћелије у апоптози или некрози одакле емитује зелену флуоресценцију (уколико се веже за дволанчану DNK), односно црвену (уколико се веже за једноланчану DNK или RNK). За разлику од акридин оранжа, ћелијска мембрана је непермеабилна за етидијум бромид, те он улази само у мртве ћелије где интерагује искључиво са дволанчаним DNK молекулом емитујући наранџасту флуоресценцију.

У те сврхе HeLa ћелије (5 × 10⁴) су засејане на покривна микроскопска стакла у 2 mL комплетног хранљивог медијума и инкубиране 24 h. Потом је подлога у којој су ћелије расле замењена комплетним хранљивим медијумом у ком је био растворен одговарајући екстракт (концентрације 2 × IC₅₀ одређене после 72 h у МТТ тесту), а у контролној групи ћелија новим комплетним хранљивим медијумом. Уследила је додатна инкубација током следећих 24 h, након чега су ћелије бојене смешом DNK боја (15 µL), акридин оранжа и етидијум бромид (концентрације 3 µg/mL односно 10 µg/mL у PBS-у, редом) и посматране. Обојене ћелије су посматране флуоресцентним микроскопом употребом флуоресцин изотиоцијанат филтер сета и фотографисане. Кондензација хроматина и/или фрагментација једра су као типичне одлике апоптозних ћелија указивале на проапоптотски ефекат екстраката.

Annexin V-FITC/PI метода бојења

Тип ћелијске смрти HeLa ћелија након третмана екстрактима је одређен и Annexin V-FITC/Propidium iodide методом бојења пратећи упутства произвођача (Sigma Aldrich, USA).

У бунарићима микротитрационе плоче (са 6 отвора) су засејане циљне ћелије ($1,5 \times 10^5$ по отвору) 20 h пре третмана. Након додатка екстракта у концентрацији IC_{50} , ћелије су инкубиране додатних 24 h. По истеку времена инкубације, контролне (нетретиране ћелије) и третиране HeLa ћелије су скупљене трипсинизацијом, испране ледено хладним PBS-ом и ресуспендоване у 200 μ L медијума [10 mM HEPES/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM $CaCl_2$] у густини 1×10^6 ћелија/mL. Суспензији је одмах додат Annexin V-FITC/PI, након чега је нежно промешана на Vortex-у и инкубирана у мраку на собној температури наредних 15 min. Узорци су анализирани помоћу проточног цитометра *FACSCalibur* (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA) прикупљањем најмање 10^4 догађаја.

Удео вијабилних ћелија, ћелија у раној и касној апоптози и мртвих ћелија у целој популацији циљних ћелија је анализиран путем дијаграма конструисаних у *FlowJo™ Software for Windows* програму (Version 10.3 Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company; 2019).

3.2.5.3. Анализа расподеле ћелија по фазама ћелијског циклуса проточном цитометријом

Анализа промена у дистрибуцији HeLa ћелија по фазама ћелијског циклуса је урађена помоћу *FACSCalibur* (BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA) проточног цитометра према методи Ormerod (2000).

HeLa ћелије су засејана у 2 mL комплетног хранљивог медијума у микротитрационе плоче са 6 отвора у концентрацији 5×10^5 по бунарићу и инкубиране 20 h. Након тога је медијум уклоњен и замењен новим комплетним хранљивим медијумом (контролна група) односно комплетним хранљивим медијумом који је садржао екстракт у концентрацији једнакој двострукој вредности IC_{50} у МТТ тесту (72 h). Циљне ћелије су потом изложене континуираном дејству екстраката у трајању од 24 h односно 48 h. По истеку одговарајућег времена инкубације, контролне и третиране HeLa ћелије су прикупљене трипсинизацијом и испране ледено хладним PBS-ом, а потом фиксиране хладним 70% етанолом и чуване на температури од -20°C наредних 7 дана. Узорци HeLa ћелија су испрани PBS-ом, како би се уклонио вишак етанола, а затим инкубирани са 500 μ l смеше рибонуклеазе А (концентрације 200 μ g/mL) и пропиридијум-јодида (концентрације 20 μ g/mL) у PBS-у 30 min на 37°C . Пропиридијум-јодид је флуоресцентна боја која има способност везивања за ДНК интеркалацијом. Како се пропиридијум-јодид може везати и за RNK, неопходно је било третирати узорке рибонуклеазом А.

По истеку времена инкубације узорци су анализирани проточним цитометром опремљеним ваздушно хлађеним аргон-јонским ласером снаге 15 mW и таласне дужине 488 nm којим је ексцитован пропиридијум-јодид, а флуоресценца је детектована на FL2 каналу након проласка кроз 585/42-nm band pass филтер. FL2 модул за дискриминацију дублета (енгл. *doublet discrimination module - DDM*) којим је проточни цитометар такође био опремљен је омогућио да се из калкулације добијене на основу графичког приказа FL2-површине у односу на FL2-ширину сигнала искључе агрегати

ћелија и ћелијски отпад. Анализа расподеле ћелија по фазама ћелијског циклуса је начињена помоћу *ModFit LT* софтвера (Verity Software House, Toshan, ME, USA).

3.2.6. Одређивање антидијабетичне активности

3.2.6.1. Тест инхибиције α -амилазе (α -AIA)

Инхибиција α -амилазе воденим и етанолним екстрактима *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* је одређена Caraway-Somogyi јод/калијум-јодид методом према Zengin и сар. (2014), а резултати су израчунати по формули коју су предложили Podsedek и сар. (2014).

Почетни и радни раствори екстраката, раствор ензима и скроба су припремљени у 6 mM раствору NaCl у 0,1 M натријум-фосфатном пуферу (pH 6,8).

Од почетних раствора водених и етанолних екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* направљено је по 7 радних разблажења.

По 25 μ L радног раствора одговарајуће концентрације је преинкубирано са 50 μ L раствора α -амилазе (0,5 mg/mL) 15 минута на 37°C у микротитар плочи са равним дном, 96 систем. Потом се у бунариће додавало по 50 μ L 0,2% раствора скроба како би се иницирао почетак хидролизе. Микротитрационе плоче су инкубиране 20 минута на 37°C. У смешу је сипано по 25 μ L 1M хлороводоничне киселине како би се зауставила реакција. Потом је у све бунариће додавано 100 μ L Луголовог раствора што је довело до бојења недеградираног скроба у плаво. Апсорбанца је мерена на 630 nm.

Процент инхибиране амилазе је прерачунат помоћу формуле:

$$I_A(\%) = [(\Delta A_c - \Delta A_s) / \Delta A_c] \times 100\%$$

у којој ΔA_c представља разлику апсорбанци контроле без и са ензимом, а ΔA_s разлику апсорбанци узорка без и са ензимом. Контрола је садржала све реагенсе осим узорка.

Резултати су приказани путем IC_{50} (mg/mL) вредности очитаних са графика на ком је приказан процентуалан пораст инхибираног ензима у функцији концентрације екстракта. Као позитивна контрола је употребљен Glucobay (акарбоза)¹⁶, лек који се користи у лечењу дијабетеса типа 2.

3.2.6.2. Тест инхибиције α -глукозидазе (α -GIA)

Потенцијал биљних екстраката да инхибирају α -глукозидазу је процењен према методи коју су описали Wan и сар. (2013). Реакција је заснована на особини α -глукозидазе да хидролизује 4-нитрофенил- α -D-глукопиранозид (PNPG) на 4-нитрофенол и α -D-глукопиранозид. 4-нитрофенол је жуто обојено једињење са максимумом апсорпције на 405 nm.

Почетни раствори и радни раствори биљних екстраката, раствор ензима, PNPG-а и 0,2 M Na_2CO_3 су припремљени у 0,1 M натријум-фосфатном пуферу (pH 6,8). Од почетних раствора концентрације 5 mg/mL направљено је по 7 радних раствора.

У микротитар плочама са равним дном (96 систем) је помешано 120 μ L радног раствора одговарајуће концентрације и 20 μ L ензима (0,6U/mL) и преинкубирано 15 минута на 37°C. Потом је додато по 20 μ L PNPG-а који је коришћен као супстрат, како би

¹⁶ Glucobay је фабричко име лека, а акарбоза је генеричко.

се иницирала реакција. Смеша је инкубирана додатних 20 минута на 37°C. Додато је по 80 µL Na₂CO₃ како би се зауставила реакција, а затим је измерена апсорбанца на 405 nm.

Резултати су изражени помоћу вредности IC₅₀ (µg/mL) очитаних са графика зависности количине инхибираног ензима (%) од концентрације екстракта.

Наведени график је конструисан на основу следеће формуле:

$$I_G(\%) = [(\Delta A_c - \Delta A_s) / \Delta A_c] \times 100$$

при чему ΔA_c и ΔA_s представљају апсорбанце контроле и узорка умањене за одговарајуће слепе пробе, редом. Негативна контрола је садржала све реагенсе изузев узорка. Аналогно претходном тесту, Glucobay је коришћен као позитивна контрола.

3.2.7. Статистичка обрада резултата

Презентовани резултати су обрађени у *Microsoft Office Excell*-у на основу два/три мерења и изражени као њихова средња вредност ± стандардна девијација. Корелације су израчунате у истом програму и изражене путем Пирсонових коефицијената корелације, *r* (енгл. *Pearson's correlation coefficients*), а тумачени су према Taylor (1990).

Добијени резултати су анализирани Two-way ANOVA (Past318) праћеном Tukey *post-hoc* тестом ($p < 0,05$,) како би се утврдиле статистички значајне разлике између фитохемијског састава и антиоксидантне активности у зависности од биљног органа односно поларности растварача. One-way ANOVA (Past318) праћена Tukey *post-hoc* тестом ($p < 0,05$) је употребљена како би се издвојили екстракти чија се антиоксидантна активност није статистички значајно разликовала у односу на референтни стандард.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4. Резултати и дискусија

4.1. Фитохемијски састав екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens*

4.1.1. Садржај укупних фенола, флавоноида, антоцијана и мономера антоцијана

Садржаји укупних фенола, флавоноида и антоцијана у екстрактима испитиваних биљних врста су одређени помоћу спектрофотометра и изражени у милиграмима еквивалената одговарајућих стандарда. Резултати су приказани у **Табели 4.** и на **Сликама 17-20.**

Prunus mahaleb

На **Слици 17.** су приказане количине укупних фенола, флавоноида, антоцијана и њихових мономера у екстрактима листова и плодова *P. mahaleb*.

Концентрација фенола у екстрактима листова и плодова *P. mahaleb* се кретала од 26,8 до 92,6 mg GAE/g. Садржај укупних фенола је био двоструко већи у екстрактима листова међу којима су посебно богати овим једињењима били водени и ацетонски екстракт за које су добијене веома блиске вредности (92,6 mg GAE/g и 92,4 mg GAE/g, редом).

Количина флавоноидних једињења је вишеструко била већа у листовима у односу на плодове. Највећа концентрација флавоноида је детектована у ацетонском екстракту листа (102 mg QE/g), а најмања у етанолном екстракту плода (2,61 mg QE/g).

Антоцијани су квантификовани у свим екстрактима изузев етанолног екстракта листа при чему је највећа концентрација нађена у ацетонском екстракту листа (3,53 mg CyE/g), затим воденом екстракту плода (2,62 mg CyE/g), док су остали екстракти садржали знатно мање количине антоцијана.

Процентуални однос мономера антоцијана и укупних антоцијана у узорцима ове врсте указује да су антоцијани у већини екстраката били присутни у виду мономера.

Мономерни антоцијани су били присутни у ацетонском екстракту листа, али и у свим екстрактима плодова у којима је њихова количина варирала и опадала са поларношћу растварача (вода > етанол > ацетон).

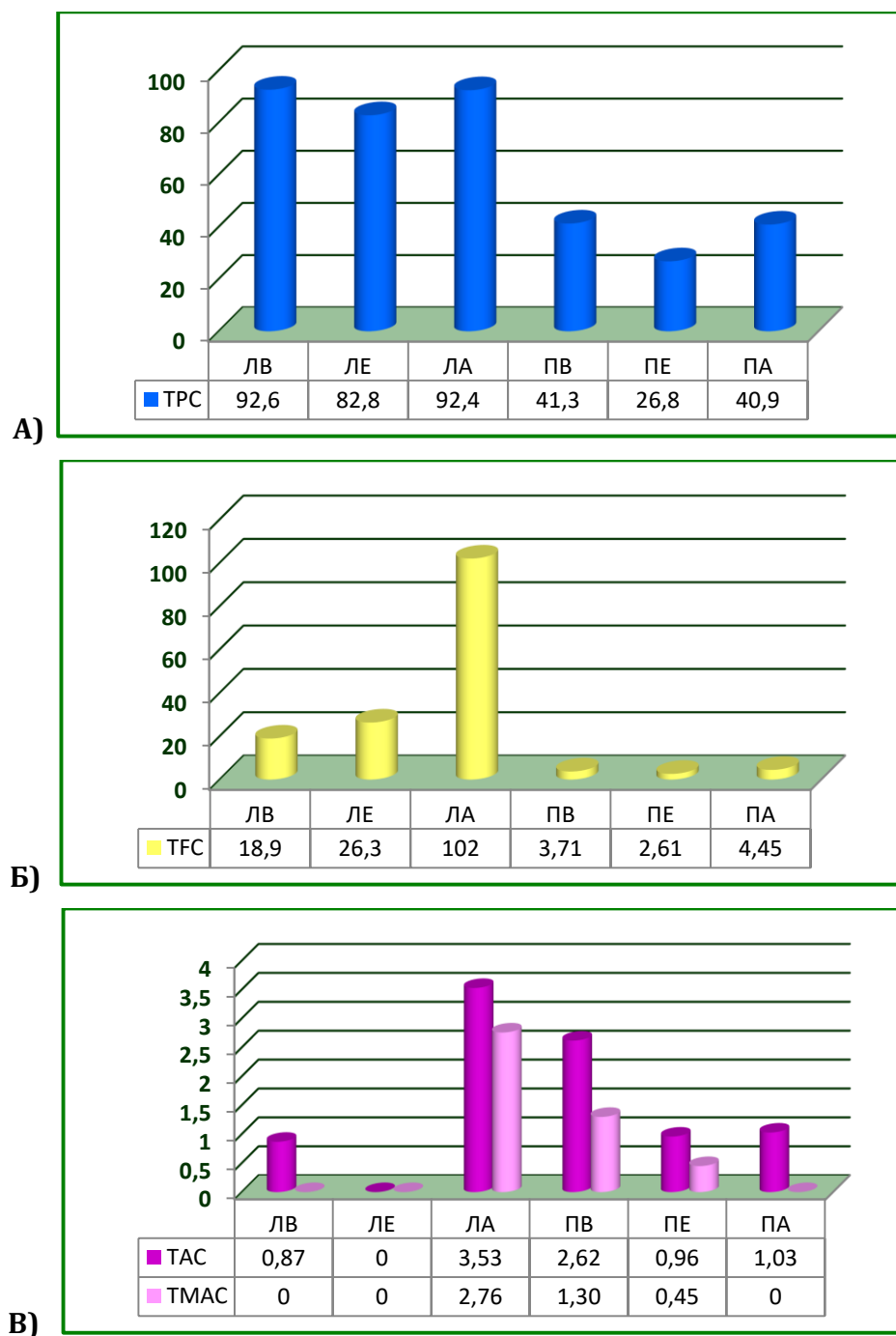
Prunus spinosa

Концентрације секундарних метаболита, фенола, флавоноида и антоцијана, у узорцима *P. spinosa* су презентоване помоћу хистограма приказаних на **Слици 18.**

Феноли и флавоноиди су у већим количинама пронађени у узорцима листова. Концентрације фенола су у екстрактима листова варирале у опсегу 117 до 181 mg GAE/g колико је измерено у ацетонском екстракту. Плодови *P. spinosa* су садржали између 20,0 и 26,8 mg GAE/g фенола.

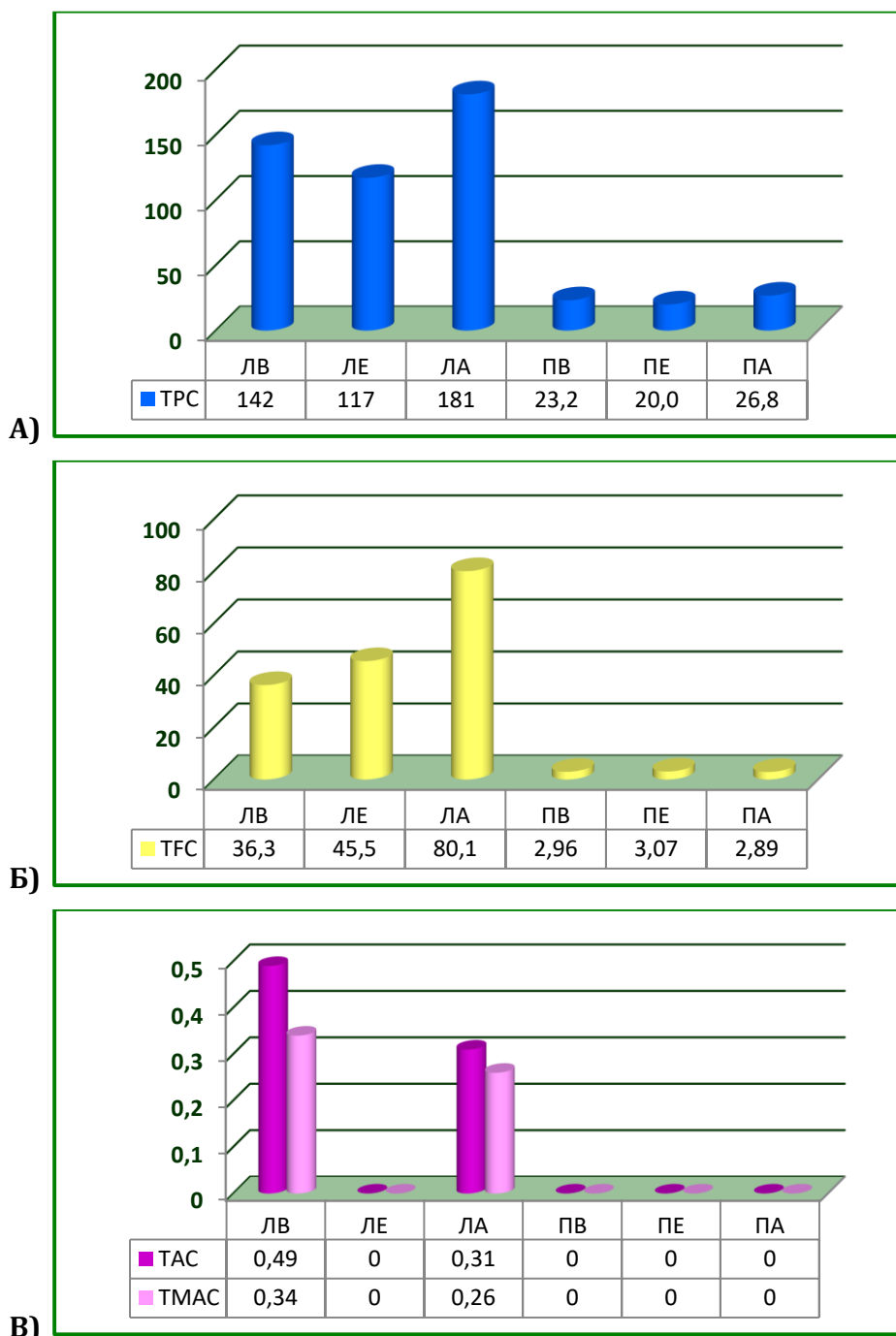
Укупна количина флавоноида се кретала од 2,89 mg QE/g у ацетонском екстракту плода до 80,1 mg QE/g у ацетонском екстракту листа.

Антоцијани и њихови мономери су пронађени једино у воденом и ацетонском екстракту листа (0,49 и 0,31 mg CyE/g) и то углавном у виду мономера.



ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; ТРС – укупан садржај фенолних једињења у mg еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g); ТФС – укупан садржај флавоноида у mg еквивалентима кверцетина по граму сувог екстракта (mg QE/g); ТАС – укупан садржај антоцијана у mg еквивалентима цијанидин-3-глукозида по граму сувог екстракта (mg CyE/g); ТМАС – укупан садржај мономера антоцијана у mg еквивалентима по граму сувог екстракта (mg CyE/g); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента ± стандардна девијација (SD);

Слика 17. Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Prunus mahaleb*.



ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; ТРС – укупан садржај фенолних једињења у mg еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g); ТФС – укупан садржај флавоноида у mg еквивалентима кверцетина по граму сувог екстракта (mg QE/g); ТАС – укупан садржај антоцијана у mg еквивалентима цијанидин-3-глукозида по граму сувог екстракта (mg CyE/g); ТМАС – укупан садржај мономера антоцијана у mg еквивалентима по граму сувог екстракта (mg CyE/g); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 18. Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима лислова и плодова *Prunus spinosa*.

Rubus discolor

Екстракти *R. discolor* су се показали као веома богати полифенолима, посебно екстракти листова (**Слика 19**).

Највећа концентрација фенола је утврђена у воденом екстракту листа (447 mg GAE/g), а најнижа у воденом екстракту плода (67,6 mg GAE/g). Садржај укупних фенола у екстрактима листова је благо опадао са смањењем поларности растварача. Насупрот томе у екстрактима плодова је бележен пораст концентрације фенола, тако да је највећа количина ових једињења измерена у ацетонском екстракту плода (187 mg GAE/g).

За разлику од укупне количине фенола, концентрација флавоноида је у екстрактима опадала са поларношћу растварача. Најсиромашнији флавоноидима је био водени екстракт плода (3,47 QE/g), док је најбогатији био ацетонски екстракт листа (45,4 QE/g).

Антоцијани су детектовани само у воденом екстракту листа (0,51 mg CyE/g), док их у етанолном и ацетонском екстракту није било. У екстрактима плодова концентрација антоцијана је варирала од 2,13 mg CyE/g у етанолном до 0,78 mg CyE/g у ацетонском екстракту, а њихових мономера од 0,14 до 1,71 mg CyE/g, редом.

Rubus serpens

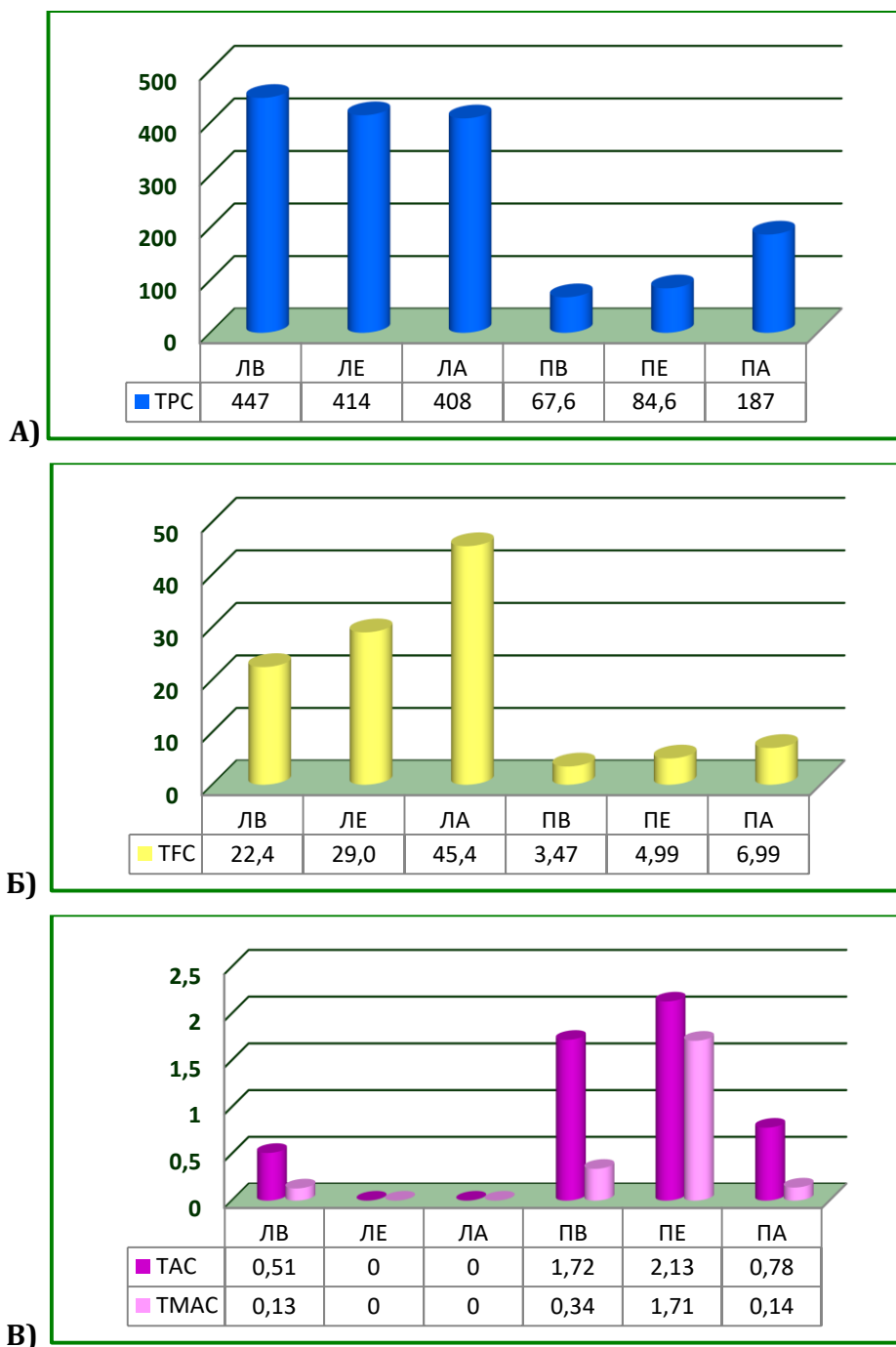
Резултати спектрофотометријских метода коришћених за одређивање укупног садржаја фенола, флавоноида и антоцијана у различитим екстрактима *R. serpens* су презентовани на **Слици 20**.

Феноли и флавоноиди су у већим количинама пронађени у екстрактима листова, а антоцијани у екстрактима плодова.

Концентрације фенола су у екстрактима листова варирали у распону од 277 до 338 mg GAE/g која је измерена у ацетонском екстракту. Количина фенола је у екстрактима плодова расла са опадањем поларности растварача, тако да је највећа количина забележена у ацетонском екстракту (106 mg GAE/g).

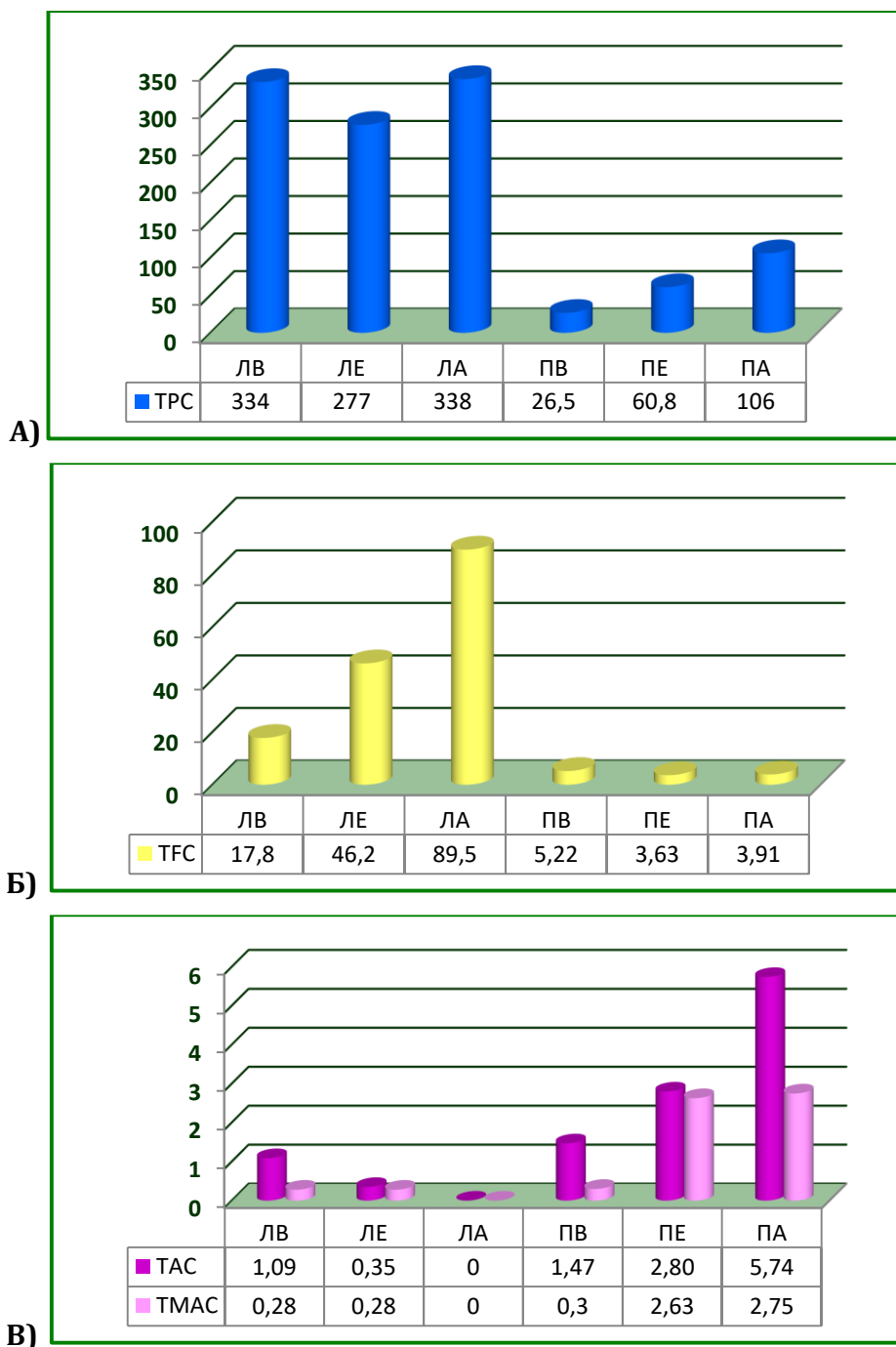
Количина флавоноида у екстрактима листова је била у распону од 17,8 до 89,5 mg QE/g и такође је зависила од поларности растварача: ацетонски > етанолни > водени екстракт. Флавоноиди су у екстрактима плодова били далеко мање заступљени (3,63 до 5,22 mg QE/g).

Упркос томе што је ацетонски екстракт листа био најбогатији фенолним и флавоноидним једињењима, присуство антоцијана у њему није утврђено. Укупни садржаји антоцијана у преосталим испитиваним екстрактима ове врсте указују да су антоцијани преобладавали у екстрактима плодова: ацетонски екстракт плода > етанолни екстракт плода > водени екстракт плода > водени екстракт листа > етанолни екстракт листа.



ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; ТРС – укупан садржај фенолних једињења у mg еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g); ТФС – укупан садржај флавоноида у mg еквивалентима кверцетина по граму сувог екстракта (mg QE/g); ТАС – укупан садржај антоцијана у mg еквивалентима цијанидин-3-глукозида по граму сувог екстракта (mg CyE/g); ТМАС – укупан садржај мономера антоцијана у mg еквивалентима по граму сувог екстракта (mg CyE/g); резултати су исказани као средња вредност (\bar{AV}) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 19. Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Rubus discolor*.



ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; ТРС – укупан садржај фенолних једињења у mg еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g); ТФС – укупан садржај флавоноида у mg еквивалентима кверцетина по граму сувог екстракта (mg QE/g); ТАС – укупан садржај антоцијана у mg еквивалентима цијанидин-3-глукозида по граму сувог екстракта (mg CyE/g); ТМАС – укупан садржај мономера антоцијана у mg еквивалентима по граму сувог екстракта (mg CyE/g); резултати су исказани као средња вредност (\bar{AV}) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 20. Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Rubus serpens*.

Врсте рода *Prunus* су већи садржај укупних фенола поседовале у екстрактима листова него у екстрактима плодова. Резултати мерења количине укупних фенола указују да су екстракти листова *P. spinosa* били богатији овим једињењима него одговарајући екстракти *P. mahaleb* (117-181 mg GAE/g vs. 82,8-92,6 mg GAE/g). Насупрот томе, екстракти плодова *P. mahaleb* су садржали двоструко веће концентрације него екстракти плодова *P. spinosa* у којима је измерено између 20,0 и 26,8 mg GAE/g. Концентрација флавоноида је била вишеструко већа у екстрактима листова *P. mahaleb* и *P. spinosa* (18,9-102 mg QE/g) у односу на екстракте плодова (2,61-4,45 mg QE/g). Одговарајући екстракти листова се нису међусобно значајно разликовали по концентрацији флавоноида. Аналогно екстрактима листова, и у екстрактима плодова ове две врсте су измерене блиске вредности количине флавоноида. Антоцијани и њихови мономери су детектовани у свим екстрактима *P. mahaleb* изузев етанолног екстракта листа (0,87-3,53 mg CyE/g), док су у *P. spinosa* нађени искључиво у воденом и ацетонском екстракту листа (0,49 и 0,31 mg CyE/g, редом).

Врсте рода *Rubus* су се одликовале већом количином фенола и флавоноида у екстрактима листова у односу на екстракте плодова. Феноли су у нешто вишим концентрацијама детектовани у екстрактима *R. discolor* у односу на одговарајуће екстракте *R. serpens*. За разлику од фенола и флавоноида, антоцијанима су били богатији екстракти плодова обе врсте у којима је њихова концентрација варирала од 0,35 до 5,74 CyE/g. Антоцијани нису пронађени у етанолном и ацетонском екстракту листа *R. discolor*, као ни у ацетонском екстракту листа *R. serpens*.

Укупан садржај фенола у екстрактима испитиваних биљних врста је варирао у интервалу од 20,0 у етанолном екстракту плода *P. spinosa* до 447 mg GAE/g у воденом екстракту листа *R. discolor* (Табела 4). Концентрација фенола је за све испитиване врсте била статистички значајно већа у екстрактима листова него у екстрактима плодова. Када су у питању флавоноиди исти образац је потврђен, с тим да је најмања количина ових једињења пронађена у етанолном екстракту плода *P. mahaleb*, 2,61 mg QE/g, а највећа, 102 mg QE/g, у ацетонском екстракту плода исте врсте. Насупрот фенолима и флавоноидима, присуство антоцијана и њихових мономера није утврђено у свим испитиваним екстрактима. У екстрактима у којима су пронађени, њихове концентрације су биле у опсегу од 0,31 до 5,74 mg CyE/g за антоцијане, односно од 0,13 до 2,76 mg CyE/g за мономере антоцијана. Такође, уочено је да се дистрибуција антоцијана у листовима и плодовима разликује у односу на феноле/флавоноиде у појединим екстрактима. Наиме, врсте рода *Prunus* су се одликовале нижим садржајем антоцијана у екстрактима плодова у односу на екстракте листова. Међутим, то није била ситуација са екстрактима врста рода *Rubus* које су биле уједно и богатије овом групом секундарних метаболита.

Табела 4. Резултати спектрофотометријске квантификације фенола, флавоноида и антоцијана у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens*.

ЕКСТРАКТ	САДРЖАЈИ УКУПНИХ			
	ФЕНОЛА mg GAE/g	ФЛАВОНОИДА mg QE/g	АНТОЦИЈАНА mg CyE/g	МОНОМЕРА АНТОЦИЈАНА mg CyE/g
<i>Prunus mahaleb</i>				
ЛВ	92,6±2,27 ^{ax*}	18,9±0,08 ^a	0,87±0,12	/
ЛЕ	82,8±0,82 ^a	26,3±1,45 ^{a,x}	/	/
ЛА	92,4±4,50 ^a	102±0,54 ^{a,y}	3,53±0,07	2,76±0,00
ПВ	41,3±0,98 ^{b,x}	3,71±0,55 ^b	2,62±0,05	1,30±0,09
ПЕ	26,8±1,63 ^b	2,61±0,13 ^{b,x}	0,96±0,01	0,45±0,00
ПА	40,9±0,60 ^b	4,45±0,28 ^{b,y}	1,03±0,05	/
<i>Prunus spinosa</i>				
ЛВ	142±6,62 ^a	36,3±0,71 ^a	0,49±0,02	0,34±0,05
ЛЕ	117±2,80 ^{a,x}	45,5±1,55 ^{a,x}	/	/
ЛА	181±2,40 ^{a,y}	80,1±0,00 ^{a,y}	0,31±0,02	0,26±0,05
ПВ	23,2±2,52 ^b	2,96±0,22 ^b	/	/
ПЕ	20,0±1,28 ^{b,x}	3,07±0,27 ^{b,x}	/	/
ПА	26,8±4,44 ^{b,y}	2,89±0,36 ^{b,y}	/	/
<i>Rubus discolor</i>				
ЛВ	447±6,01 ^a	22,4±0,44 ^{a,x}	0,51±0,09	0,13±0,00
ЛЕ	414±1,00 ^a	29,0±0,31 ^{a,y}	/	/
ЛА	408±27,0 ^{a,x}	45,4±1,74 ^{a,z}	/	/
ПВ	67,6±3,49 ^b	3,47±0,18 ^{b,x}	1,72±0,01	0,34±0,04
ПЕ	84,6±6,02 ^b	4,99±0,43 ^{b,y}	2,13±0,11	1,71±0,17
ПА	187±8,01 ^{b,x}	6,99±0,44 ^{y,z}	0,78±0,08	0,14±0,00
<i>Rubus serpens</i>				
ЛВ	334±4,01 ^a	17,8±0,60 ^{a,x}	1,09±0,04	0,28±0,04
ЛЕ	277±6,00 ^a	46,2±0,22 ^{a,y}	0,35±0,12	0,28±0,00
ЛА	338±3,01 ^{a,x}	89,5±2,28 ^{a,z}	/	/
ПВ	26,5±0,50 ^b	5,22±0,54 ^{b,x}	1,47±0,03	0,30±0,09
ПЕ	60,8±8,70 ^b	3,63±0,29 ^{b,y}	2,80±0,02	2,63±0,18
ПА	106±8,39 ^{b,x}	3,91±0,23 ^{b,z}	5,74±0,31	2,75±0,35

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; ТРС – укупан садржај фенолних једињења у mg еквивалентима галне киселине по граму сувог екстракта (mg GAE/g); ТФС – укупан садржај флавоноида у mg еквивалентима кверцетина по граму сувог екстракта (mg QE/g); ТАС – укупан садржај антоцијана у mg еквивалентима цијанидин-3-глукозида по граму сувог екстракта (mg CyE/g); ТМАС – укупан садржај мономера антоцијана у mg еквивалентима по граму сувог екстракта (mgCyE/g); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента ± стандардна девијација (SD); *за сваку испитивану биљну врсту у истој колони словима а и б су означене статистички значајне разлике између биљних органа, док су словима x, y, z означене статистички значајне разлике међу растварачима ($p < 0,05$, two-way ANOVA, Tukey post-hoc тест).

Литературни подаци о фитохемијском саставу *P. mahaleb* су прилично оскудни и односе се првенствено на испитивање плодова и семена ове врсте будући да се управо ти делови биљке употребљавају у традиционалној медицини и исхрани (Mariod и сар., 2010). Поменути аутори су констатовали да је растварач утицао како на количину екстрахованих компоненти, тако и на концентрацију фенолних једињења. Количина фенола у том раду је била између 53,1 и 72,9 mg GAE/g, што је у складу са резултатима добијеним у овој докторској дисертацији, при чему је највиша концентрација утврђена у етил-ацетатној фракцији, затим метанолном екстракту, воденој фракцији и најнижа у хексанској фракцији. Међутим, за разлику од овде приказаних резултата, наведени истраживачи су утврдили изузетно низак садржај фенолних једињења у воденој фракцији, што се може објаснити различитим начином припреме екстраката. У студији Mariod и сар. (2010) фенолне компоненте су најпре екстраховане метанолом након чега је из добијеног екстракта издвојена водена фракција.

Насупрот томе, Taghizadeh и сар. (2015) су испитали садржај укупних фенола у различитим генотиповима *P. mahaleb* и утврдили знатно ниже концентрације ових једињења од оних које су добијене у овом раду. Поменути аутори су испитивали култивисане генотипове *P. mahaleb*, а познато је да генотипови гајених јединки исте врсте садрже мање количине секундарних метаболита у односу на самоникле, јер су изложени мањим стресогеним факторима (Staszowska-Karkut и Materska., 2020; Yildiz и сар., 2014; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016). У истом раду, аутори су установили значајне разлике у количини фенолних једињења између испитиваних генотипова, што су приписали њиховој генетичкој разноликости.

Концентрација укупних фенола коју су утврдили други аутори (Oskoueian и сар., 2012; Blando и сар., 2016) у плодовима *P. mahaleb* са различитих локалитета је била слична овде презентованим вредностима.

Концентрација флавоноида различитих генотипова *P. mahaleb* је била највиша у екстрактима плодова (54,06 до 180,60 mg QE/g), потом екстрактима листова (6,90 до 22,81 mg QE/g), а најнижа у екстрактима коре (1,43 до 16,09 mg QE/g) (Taghizadeh и сар., 2015). Насупрот резултатима наведених аутора, резултати ове докторске дисертације указују на другачију дистрибуцију флавоноида између листа и плода, а која је у складу са резултатима других истраживача који се односе како на врсте рода *Prunus* (Karabegović и сар., 2014; Pinacho и сар., 2015; Veljković и сар., 2019), тако и на врсте других родова (Staszowska-Karkut и Materska., 2020).

Утицај поларности растварача коришћених за екстракцију на количину флавоноидних једињења је евидентан. Gerardi и сар. (2015) су показали да се смеша ацетона (36%) и воде (64%) показала као најефикаснија у екстраховању фенолних једињења. Иако се индивидуално употребљен ацетон у раду Gerardi и сар. (2015) није показао као најпогоднији екстрагенс, резултати ове докторске дисертације показују да је управо њиме екстрахована највећа количина флавоноида. Количина флавоноида у ацетонском екстракту је била већа чак и у односу на количину фенолних једињења, што се може објаснити тиме што су количине наведених група секундарних метаболита изражаване у еквивалентима различитих референтних једињења.

Добијене концентрације укупних антоцијана у екстрактима *P. mahaleb* су биле у сагласности за резултатима које су претходно објавили Ozturk и сар. (2014), док су Blando и сар. (2016), као и Taghizadeh и сар. (2015) пронашли значајно већу количину ових секундарних метаболита.

Међу врстама испитиваним у оквиру овог рада, најбоље је проучена *P. spinosa*, те и о њеном фитохемијском саставу постоји више података. Ипак, аналогно претходно

описаним резултатима за *P. mahaleb*, и подаци о *P. spinosa* се углавном односе на плодове ове биљне врсте.

Fraternale и сар. (2009) су испитивали фитохемијски састав и антиоксидантну активност свежег сока плодова *P. spinosa*. У том узорку је концентрација укупних фенола била 83,5 mg/g, а сличне вредности (83,40 mg GAE/g) су објавили и Barros и сар., (2010). Концентрација фенола приказана у овој докторској дисертацији је била готово три пута нижа у екстрактима плодова у поређењу са резултатима Barros и сар. (2010), на супрот екстрактима листова где је била двоструко виша.

С друге стране, Radovanović и сар. (2013) су утврдили знатно нижи садржај фенолних једињења у екстрактима плодова (7959,90 mg GAE/kg), као и Stanković и сар. (2019) (од 0,46 до 1,82 mg GAE/g).

У раду Pinacho и сар. (2015) садржај укупних фенола је био у екстрактима листова између 38,57 и 228,56 mg GAE/g, плодова 184,77 и 359,11 mg GAE/g, а у екстрактима изданака *P. spinosa* између 21,30 и 732,34 mg GAE/g. У наведеном раду су испитивани и екстракти добијени помоћу растварача различите поларности, при чему се као најуспешнији екстрагенс фенола показао етанол, затим вода, етил-ацетат, па дихлорометан, што је у супротности са овде презентованим резултатима. Међутим, многи други аутори (Tahirović и сар., 2018; Karakas и сар., 2019; Popović и сар., 2020) су добили вредности за количину укупних фенола блиске приложеним у овој докторској дисертацији.

Popović и сар. (2021) су у наставку својих истраживања публиковали резултате FC теста за 50% етанолни екстракт плода *P. spinosa* који подржавају овде приказане резултате. У наведеној публикацији вредност за садржај укупних фенола је била 26,36 mg GAE/g.

Укупан садржај флавоноида у плодовима *P. spinosa* је у раду Barros и сар., (2010) био 8,68 mg еквивалената катехина по г, односно двоструко виши у односу на приказане резултате у овом раду, али треба имати у виду да су резултати изражени путем еквивалената различитих референтних једињења. Флавоноиди су у вишим концентрацијама били присутни и у дихлорометанским, етил-ацетатним, етанолним и воденим екстрактима различитих биљних делова ове врсте (Pinacho и сар., 2015). У супротности са наведеним ауторима, Tahirović и сар. (2018) су објавили знатно ниже вредности количине укупних флавоноида у воденом, 50% и 80% етанолном и 50% и 80% метанолном екстракту плода (0,450 до 1,039 mg QE/g). С друге стране, у експериментима Stanković и сар. (2019) флавоноиди су у воденом, метанолном, 70% етанолном и пропилен-гликолном екстракту плода *P. spinosa* пронађени у концентрацијама (0,50 до 3,29 mg RE/g) које су блиске овде приказаним.

Иако су у експериментима обухваћеним овом студијом антоцијани квантификовани једино у листовима, други аутори су утврдили њихово присуство и у плодовима и то углавном у знатно већим концентрацијама.

Fraternale и сар. (2009) су у свежем соку плодова *P. spinosa* констатовали антоцијане у количини од 55,1 mg/g. Pinacho и сар. (2015) су у етанолном и воденом екстракту листова утврдили концентрацију антоцијана од 40,81, односно 41,50 mg/g, редом. У истом раду, количина антоцијана у воденом и етанолном екстракту плода је била четвороструко већа, док је у дихлорометанском и етил-ацетатном екстракту листова, плодова, као и у свим екстрактима изданака, количина ове групе фенолних једињења била готово занемарљива (<0,01 mg/g). Међутим, у радовима које су објавили

Tahirović и сар. (2018) и Stanković и сар. (2019) концентрација антоцијана у плодовима је одговарала овде приказаним концентрацијама одговарајућих екстраката.

Приложени резултати и наведени литературни подаци јасно указују да је до највећег одступања у односу на до сада публиковане резултате дошло у количини антоцијана. Будући да су антоцијани једна од најзаступљенијих група флавоноида, ова неусаглашеност се донекле одразила и на одступања у укупној количини флавоноида, а консеквентно и фенола.

С обзиром да плодови коришћени у овој докторској дисертацији нису прикупљени у пуној фази зрелости, као и да нису одмах употребљени за квантификацију антоцијана, већ су били ускладиштени у замрзивачу, то би било највероватније објашњење за описана одступања. Такође, дистрибуција антоцијана између листова и плодова у испитиваном узорку је прилично неуобичајена, али се може разумети уколико се узме у обзир начин на који је биљни материјал обрађен и ускладиштен пре експеримената. На то је сугерисао и Latanazzio (2013) у раду у ком антоцијане дефинише као „биљне пигменте чија количина може значајно варирати у зависности од фенофазе биљке, биљног органа, физиолошког стања биљне ћелије, али и бројних других фактора укључујући, пре свега рН и температуру“.

Фитохемијски профил *R. discolor* је недовољно истражен, док за *R. serpens* уопште не постоје литературни подаци. Стога ће резултати који су за наведене биљне врсте добијени у оквиру ове докторске дисертације бити заједно продискутовани и упоређени са сродним врстама.

Dujmović Purgar и сар. (2012) су проучавали више самониклих генотипова *R. discolor* и *R. idaeus*. У тој студији садржај укупних фенола се статистички значајно разликовао између ове две врсте, као и између различитих генотипова унутар врста. Концентрација фенола се у генотиповима *R. discolor* кретала између 381 и 585 mg/kg свежих плодова, док је у узорцима *R. idaeus* била између 354 и 483 mg/kg. Осим што су били богатији фенолним једињењима, узорци *R. discolor* су садржали и већу количину нефлавоноидних једињења. У поређењу са до тада публикованим радовима, аутори су установили да самоникли генотипови садрже већу концентрацију фенолних једињења у односу на култивисане врсте овог рода.

Keser и сар. (2015) су упоређивали фитохемијски састав и антиоксидатну активност водених и етанолних екстраката листова, цветова, незрелих и зрелих плодова *R. discolor*. Количина укупних фенола у поменутој студији је била у опсегу од 69,96 до 152,05 mg QE/g. Етанол се показао као ефикаснији екстрагенс фенолних једињења из свих узорака испитиваних у тој студији, што је у складу са резултатима ове докторске дисертације када су у питању екстракти плодова. У наведеном раду, најбогатији фенолним једињењима су били екстракти цветова, затим листова, а незнатно мања количина фенола утврђена је у екстрактима зрелих плодова. Екстракти незрелих плодова показали су се као најсиромашнији фенолним компонентама. Дистрибуција фенолних једињења у листовима и плодовима обе испитиване врсте у оквиру ове студије је у сагласности са наведеним подацима, с тим што је разлика између наведених биљних органа била израженија. Количина укупних фенола је била знатно већа, што се може објаснити тиме што су Keser и сар. (2015) употребили друга фенолна једињења (кверцетин и пирокатехол) за интерпретацију добијених резултата.

Muniyandi и сар. (2019) су испитивали фитохемијски састав, антиоксидантне и антиканцерогене активности екстраката плодова *R. niveus*, *R. ellipticus* и *R. fairholmianus*. Најнижи садржај фенола је утврђен у петрол-етарском екстракту *R. ellipticus* (9,46 mg GAE/g), а највиши у метанолном екстракту исте врсте (401,36 mg GAE/g). Генерално,

метанол се показао као најефикаснији екстрагенс фенола у тој студији, а следили су га етил-ацетат, врела вода и петрол-етар.

Резултати ове докторске дисертације имплицирају да је у екстракцији фенола из плодова такође најефикаснији био растварач умерене поларности (ацетон). Насупрот томе, ова једињења су из екстраката листова испитиваних врста рода *Rubus* најуспешније екстрахована поларнијим растварачем (водом).

У експерименталном раду ове дисертације је коришћен комплетан екстракт који осим фенолних једињења садржи и друга хидросолубилна једињења, пре свега угљене хидрате. Имајући у виду да је концентрација управо угљених хидрата знатно већа у плодовима, посебно зрелим, у односу на листове, може се претпоставити да је њихов удео у сувом екстракту плодова значајан чиме се могу објаснити добијени резултати. Singleton и сар. (1999) су такође указали да угљени хидрати уколико су присутни у концентрацијама већим од 0,1 g/mL могу ометати реакцију редукције FC реагенса, која је овде употребљена за одређивање количине укупних фенола.

Schulz и сар. (2019) су проучавали фитохемијски састав и антиоксидантну активност плодова *R. ulmifolius* у различитим фазама зрења. Аутори ове студије су утврдили да је количина фенола већа у потпуно зрелим плодовима (28,22 vs. 19,18 mg GAE/g).

Veljković и сар. (2019) су приказали састав екстраката листова и плодова *R. idaeus* узоркованих из 7 различитих самониклих популација ове врсте. Садржај укупних фенола се у екстрактима плодова кретао у опсегу од 24,29 и 38,71 mg GAE/g, док је у листовима био двоструко виши, односно између 59,68 и 96,83 mg GAE/g, што је у сладу са резултатима ове докторске дисертације.

У експериментима Zengin и сар. (2019) листови *R. ibericus* (21,57 до 152,55 mg GAE/g) су били незнанто богатији фенолима него листови *R. sanctus* (17,22 до 134,53 mg GAE/g). Аналогно резултатима добијеним у оквиру ове дисертације и у раду наведених аутора ефикасност екстракције је била директно пропорционална поларности растварача.

За разлику од Schulz и сар. (2019), Samaniego и сар. (2020) су утврдили да концентрација фенола у плодовима различитих варијетета *R. glaucus* опада током сазревања. Садржај укупних фенола се у култиварима ове врсте кретао од 31,59 mg GAE/g („Brazos“) до 81,10 mg GAE/g („Colombiana“). Те вредности су блиске овде презентованим резултатима за екстракте плодова.

Muniyandi и сар. (2019) су у екстрактима плодова три врсте, *R. niveus*, *R. ellipticus* и *R. fairholmianus* детектовали концентрацију флавоноида у опсегу од 31,53 до 215,00 mg еквивалената рутина по г. Показали су да количина ових једињења више варира у зависности од поларности растварача, него од анализиране биљне врсте. Аналогно фенолима и флавоноиди су из плодова најбоље екстраховани помоћу умерено поларних растварача, што је у складу са овде приложеним резултатима. Ипак, у наведеној публикацији је концентрација ових једињења била знатно виша, што је вероватно последица пре свега спољашњих фактора, будући да су биљке прикупљене у различитим климатским зонама, што су потврдили и други аутори (Schulz и Chim, 2019). Поред тога, треба имати у виду да је узорковање вероватно спроведено у различитим стадијумима зрелости плодова што значајно утиче на количину фитожедињења (Schulz и сар., 2019; Samaniego и сар., 2020).

Слично овде приказаним резултатима и Veljković и сар. (2019) су установили већу концентрацију флавоноида у екстрактима листова, него у екстрактима плодова *R. idaeus*.

Zengin и сар. (2019) су у екстрактима листова *R. ibericus* и *R. sanctus* детектовали флавоноиде у концентрацијама блиским овде презентованим за екстракте истог биљног органа.

Према бројним студијама, врсте рода *Rubus* обилују антоцијанима, па је то једна од најчешће проучаваних група фенолних једињења унутар овог рода (Schulz и Chim, 2019).

Узорци плодова *R. discolor* су поседовали четвороструко више концентрације антоцијана у односу на плодове *R. idaeus* у раду Dujmović Purgar и сар. (2012).

У плодовима *R. niveus*, *R. ellipticus* и *R. fairholmianus* антоцијани су квантификовани у концентрацијама између 0,08 и 4,09 mg/100 g (Muniyandi и сар., 2019). С обзиром да су за екстракцију користили раствараче различите поларности, аутори су утврдили да се највећа концентрација антоцијана добија екстракцијом метанолом, а затим водом, што иде у прилог овде презентованим резултатима.

Према Veljković и сар. (2019) количина антоцијана у узорцима *R. idaeus* је варијала од 0,31 до 4,73 µg/mL у екстрактима плодова, док је у екстрактима листова била од 4,43 до 9,00 µg/mL, што је у супротности са овде презентованим резултатима. С друге стране, у раду Samaniego и сар. (2020) концентрација антоцијана у непотпуно зрелим плодовима је била у опсегу 1,21 до 2,95 mg CyE/g, што је блиско вредностима добијеним у оквиру ове студије.

Количина антоцијана одређена у култиварима *R. glaucus* је била између 0,67 и 9,26 mg CyE/g и варијала је у зависности од стадијума зрелости плодова (Samaniego и сар., 2020). На основу резултата поменуте студије може се опазити да се концентрација антоцијана током сазревања плодова повећава, што је доказано и резултатима Schulz и сар., 2019. То би уједно било и највероватније објашњење за разлике у резултатима различитих истраживача.

Колориметријским методама су добијени подаци о садржају укупних фенола, флавоноида и антоцијана. Презентовани резултати су омогућили поређење количине одговарајућих група секундарних метаболита у растварачима различите поларности, као и поређење њихове дистрибуције у биљним органима (листовима и плодовима) исте врсте.

Ипак, употребљене методе имају своја ограничења, због чега је било неопходно да се екстракти *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* подвргну LC-MS/MS анализи како би се идентификовале и квантификовале биоактивне компоненте и тиме добио детаљнији увид у њихов фитохемијски састав.

4.1.2. LC-MS/MS анализа водених и етанолних екстраката

LC-MS/MS техника је коришћена како би се анализирао хемијски састав фенолних киселина и антоцијана у воденим и етанолним екстрактима испитиваних биљних врста. Критеријум селекције је био растварач који је коришћен приликом екстракције, односно његове физичке и хемијске особине и утицаји на живи свет и околинду, ради даљих испитивања биолошких активности и потенцијалне имплементације добијених резултата.

С обзиром на то да се испитиване биљке користе у људској исхрани у виду биљних чајева, сокова, сирупа и сл., а у традиционалној медицини у виду инфуза, декокта и тинктура, детаљније су испитани хемијски састав и биолошке активности водених и етанолних екстраката.

С друге стране наведене групе фитохемикалија су одабране на основу литературних података који недвосмислено указују на њихов широк дијапазон биолошких активности и истовремено на њихову изузетну заступљеност у испитиваним и њима сродним врстама (Schulz и Chim, 2019; Samaniego и сар., 2020). У оквиру овог рада испитивана је количина 11 фенолних киселина (*p*-хидрокси-бензооеве, протокатехинске, 2,5-дихидрокси-бензооеве, ванилинске, галне, циметне, *p*-кумаринске, *o*-кумаринске, кафене, ферулне и хлорогенске) и 5 антоцијана (цијанидин-глукозид, галактозида, пеларгонидин-гликозид/галактозида, цијанидин-арабинозида и два деривата цијанидина).

Prunus mahaleb

У узорцима *P. mahaleb* квантификовано је између 7 и 10 фенолних киселина и њихова концентрација је варијала од 171 до 351 $\mu\text{g/g}$ (Табела 5).

У екстрактима листова већи удео су имале хидрокси-циметне, а у екстрактима плодова хидрокси-бензооеве киселине. У екстрактима листова су се *p*- и *o*- изомери кумаринске киселине издвојили као доминантне компоненте, у воденом екстракту плода то су биле протокатехинска (111 $\mu\text{g/g}$) и гална (50 $\mu\text{g/g}$), док је у етанолном екстракту плода поред наведених хидрокси-бензооевих киселина у већој количини пронађена и *p*-кумаринска (134 $\mu\text{g/g}$). Хлорогенска киселина је била у свим узорцима присутна само у траговима, као и гална киселина у воденом екстракту листа и 2,5-дихидрокси-бензооева киселина у екстрактима плодова.

Антоцијани су у екстрактима плодова били присутни само у траговима.

Prunus spinosa

У екстрактима *P. spinosa* количина квантификованих киселина је била у опсегу од 75 до 483 $\mu\text{g/g}$, а идентификовано је укупно 9 фенолних једињења (Табела 6).

Хидрокси-циметне киселине су доминирале у узорцима листова, а хидрокси-бензооеве у узорцима плодова у којима је измерено 46 и 38 $\mu\text{g/g}$, у воденом и етанолном екстракту, редом.

У листовима *P. spinosa* су у највећим количинама идентификоване *p*-хидрокси-бензооева и гална киселина, међу хидрокси-бензооевим киселинама. У воденом екстракту листа су се уз *p*-хидрокси-бензооеву киселину (85 $\mu\text{g/g}$) хидрокси-циметне киселине, кафена (103 $\mu\text{g/g}$) и хлорогенска (83 $\mu\text{g/g}$), издвојиле као доминантне компоненте, а у етанолном екстракту листа *p*-кумаринска (82 $\mu\text{g/g}$).

У воденом екстракту плода најзаступљенија хидрокси-бензооева киселина је била протокатехинска (23 $\mu\text{g/g}$), а у етанолном ванилинска киселина (22 $\mu\text{g/g}$). Од хидрокси-циметних киселина, у већој концентрацији је детектована хлорогенска за коју су вредности у оба екстракта плода биле веома блиске (19 и 18 $\mu\text{g/g}$, водени и етанолни екстракт плода, редом).

Антоцијани нису детектовани у екстрактима плодова *P. spinosa* у количини која би омогућила квантификацију.

Табела 5. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова *Prunus mahaleb* LC-MS/MS методом.

Садржај фенолних једињења	Екстракт			
	ЛВ	ЛЕ	ПВ	ПЕ
Фенолне киселине ($\mu\text{g/g}$)				
Хидрокси-бензојеве киселине и деривати				
<i>p</i> -хидрокси-бензојева киселина	12	12	35	23
протокатехинска киселина	14	38	111	92
2,5-дихидрокси-бензојева киселина	7	4	<л.к.	<л.к.
ванилинска киселина	14	9	9	4
гална киселина	<л.к.	42	50	73
Садржај квантификованих хидрокси-бензојевих киселина	47	105	205	192
Хидрокси-циметне киселине и деривати				
циметна киселина	13	23	<л.к.	<л.к.
<i>p</i> -кумаринска киселина	42	57	3	134
<i>o</i> -кумаринска киселина	41	58	13	9
кафена киселина	24	24	10	16
ферулна киселина	4	4	<л.к.	<л.к.
хлорогенска киселина	< л.к.	<л.к.	<л.к.	<л.к.
Садржај квантификованих хидрокси-циметних киселина	124	166	26	159
Садржај квантификованих фенолних киселина ($\mu\text{g/g}$)	171	271	231	351
Антоцијани (mg/g)				
цијанидин-глукозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
пеларгонидин-гликозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-арабинозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-дериват 1	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-дериват 2	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
Садржај квантификованих антоцијана (mg/g)	/	/	/	/
Садржај квантификованих фенолних једињења (mg/g)	0,17	0,27	0,23	0,35
Број квантификованих једињења	9	10	7	7

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; л.к. – лимит квантитације (Orčić и сарадници, 2014); н.т. – није тестирано.

Табела 6. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова *Prunus spinosa* LC-MS/MS методом.

Садржај фенолних једињења	Екстракт			
	ЛВ	ЛЕ	ПВ	ПЕ
Фенолне киселине ($\mu\text{g/g}$)				
Хидрокси-бензојеве киселине и деривати				
<i>p</i> -хидрокси-бензојева киселина	85	58	5	4
протокатехинска киселина	26	44	23	12
2,5-дихидрокси-бензојева киселина	13	3	<л.к.	<л.к.
ванилинска киселина	33	16	18	22
гална киселина	57	59	<л.к.	<л.к.
Садржај квантификованих хидрокси-бензојевих киселина	214	180	46	38
Хидрокси-циметне киселине и деривати				
циметна киселина	7	<л.к.	<л.к.	3
<i>p</i> -кумаринска киселина	<л.к.	82	<л.к.	<л.к.
<i>o</i> -кумаринска киселина	<л.к.	<л.к.	<л.к.	<л.к.
кафена киселина	103	50	10	11
ферулна киселина	76	41	3	5
хлорогенска киселина	83	46	19	18
Садржај квантификованих хидрокси-циметних киселина	269	219	32	37
Садржај квантификованих фенолних киселина ($\mu\text{g/g}$)	483	399	78	75
Антоцијани (mg/g)				
цијанидин-глукозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
пеларгонидин-гликозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-арабинозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-дериват 1	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-дериват 2	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
Садржај квантификованих антоцијана (mg/g)	/	/	/	/
Садржај квантификованих фенолних једињења (mg/g)	0,48	0,40	0,08	0,08
Број квантификованих једињења	9	9	6	7

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; л.к. – лимит квантитације (Orčić и сарадници, 2014); н.т. – није тестирано;

Rubus discolor

Осим фенолних киселина у екстрактима ове врсте детектовано је и 4 антоцијана, односно између 10 и 12 фитоједињења укупно (**Табела 7**).

Садржај фенолних киселина је био већи у етанолном екстракту листа у односу на водени екстракт, док је код плодова било супротно. Доминантне фенолне киселине у листовима су биле хлорогенска (355 $\mu\text{g/g}$ и 316 $\mu\text{g/g}$ у етанолном односно воденом екстракту, редом) и кафена (331 и 267 $\mu\text{g/g}$, у етанолном и воденом екстракту, редом). Поред наведених хидрокси-циметних, у већој концентрацији је пронађена и гална киселина (264 и 127 $\mu\text{g/g}$, у етанолном и воденом екстракту, тим редоследом).

Гална киселина је доминирала и у воденом (155 $\mu\text{g/g}$) и етанолном (62 $\mu\text{g/g}$) узорку плода. У плодовима је у значајним количинама била присутна и протокатехинска киселина при чему је њена концентрација била троструко већа у воденом екстракту (146 vs. 44 $\mu\text{g/g}$).

Семиквантитацијом је потврђено присуство цијанидин-глукозида/галактозида, цијанидин-арабинозида и два деривата цијанидина. Садржај идентификованих антоцијана је био већи у етанолном екстракту плода (31,31 mg/g), него у воденом екстракту (7,45 mg/g). У оба екстракта доминантно једињење је био цијанидин-глукозид/галактозид, с тим што је његова количина у етанолном екстракту била готово 4 пута већа (26,80 у односу на 6,71 mg/g).

Rubus serpens

У екстрактима листова и плодова *R. serpens* детектовано је укупно 16 компоненти од којих су 3 компоненте биле у свим узорцима присутне у количинама испод лимита квантитације (**Табела 8**).

Етанолни екстракт листа је био богатији фенолним киселинама у односу на водени (1719 $\mu\text{g/g}$ vs. 548 $\mu\text{g/g}$). За разлику од екстраката листова, водени екстракт плода је садржао већу количину фенолних киселина од етанолног екстракта.

У воденом екстракту листа у највећој концентрацији су квантификоване гална (153 $\mu\text{g/g}$), хлорогенска (112 $\mu\text{g/g}$) и кафена (104 $\mu\text{g/g}$) киселина, у етанолном екстракту листа гална (507 $\mu\text{g/g}$), хлорогенска (444 $\mu\text{g/g}$) и протокатехинска (293 $\mu\text{g/g}$),

У екстрактима плодова доминантне фенолне киселине су биле гална, протокатехинска и *p*-хидрокси-бензојева киселина. Концентрације наведених фенолних киселина су биле знатно веће у воденом у односу на етанолни екстракт (189 vs. 51 $\mu\text{g/g}$, 145 vs. 49 $\mu\text{g/g}$ и 85 vs. 51 $\mu\text{g/g}$, респективно).

Антоцијани су у оба узорка пронађени у знатно већим количинама у односу на фенолне киселине. Посебно је етанолни екстракт плода био богат овим једињењима у ком је детектовано 5 антоцијана, од којих је најзаступљенији био цијанидин-глукозид/галактозид (21,12 mg/g), затим пеларгонидин-гликозид/галактозид (3,05 mg/g) и дериват цијанидина (0,49 mg/g) док су концентрације цијанидин-арабинозида и другог деривата цијанидина биле испод лимита квантитације. С друге стране, у воденом екстракту плода је квантификован само цијанидин-глукозид/галактозид (2,13 mg/g), док су преостали антоцијани били присутни у веома ниским концентрацијама што је онемогућило њихову квантификацију.

Табела 7. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова *Rubus discolor* LC-MS/MS методом.

Садржај фенолних једињења	Екстракт			
	ЛВ	ЛЕ	ПВ	ПЕ
Фенолне киселине ($\mu\text{g/g}$)				
Хидрокси-бензоеве киселине и деривати				
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	30	69	12	11
протокатехинска киселина	45	200	146	44
2,5-дихидрокси-бензоева киселина	44	77	<л.к.	<л.к.
ванилинска киселина	23	68	21	13
гална киселина	127	264	155	62
Садржај хидрокси-бензоєвих киселина	269	678	334	130
Хидрокси-циметне киселине и деривати				
циметна киселина	4	9	<л.к.	<л.к.
<i>p</i> -кумаринска киселина	66	81	6	6
<i>o</i> -кумаринска киселина	<л.к.	<л.к.	<л.к.	<л.к.
кафена киселина	267	331	13	15
ферулна киселина	17	21	9	9
хлорогенска киселина	316	355	5	н.д.
Садржај квантификованих хидрокси-циметних киселина	670	797	33	30
Садржај квантификованих фенолних киселина ($\mu\text{g/g}$)	939	1475	367	160
Антоцијани (mg/g)				
цијанидин-глукозид/галактозид	н.т.	н.т.	6,71 \pm 0,24	26,80 \pm 0,74
пеларгонидин-гликозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-арабинозид	н.т.	н.т.	0,29 \pm 0,05	3,49 \pm 0,35
цијанидин-дериват 1	н.т.	н.т.	0,23 \pm 0,00	0,41 \pm 0,05
цијанидин-дериват 2	н.т.	н.т.	0,22 \pm 0,01	0,61 \pm 0,05
Садржај квантификованих антоцијана (mg/g)	/	/	7,45	31,31
Садржај квантификованих фенолних једињења (mg/g)	0,94	1,48	7,82	31,47
Број квантификованих једињења	10	10	12	11

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; л.к. – лимит квантитације (Ogčić и сарадници, 2014); н.д. – није детектовано; н.т. – није тестирано.

Табела 8. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова *Rubus serpens* LC-MS/MS методом.

Садржај фенолних једињења	Екстракт			
	ЛВ	ЛЕ	ПВ	ПЕ
Фенолне киселине ($\mu\text{g/g}$)				
Хидрокси-бензојеве киселине и деривати				
<i>p</i> -хидрокси-бензојева киселина	15	56	85	51
протокатехинска киселина	17	293	145	49
2,5-дихидрокси-бензојева киселина	36	95	5	4
ванилинска киселина	31	82	29	9
гална киселина	153	507	189	51
Садржај квантификованих хидрокси-бензојевих киселина	252	1033	453	164
Хидрокси-циметне киселине и деривати				
циметна киселина	<л.к.	<л.к.	н.д.	14
<i>p</i> -кумаринска киселина	62	111	27	22
<i>o</i> -кумаринска киселина	<л.к.	<л.к.	<л.к.	<л.к.
кафена киселина	104	118	14	19
ферулна киселина	18	13	9	11
хлорогенска киселина	112	444	<л.к.	6
Садржај квантификованих хидрокси-циметних киселина	296	686	50	72
Садржај квантификованих фенолних киселина ($\mu\text{g/g}$)	548	1719	503	236
Антоцијани (mg/g)				
цијанидин-глукозид/галактозид	н.т.	н.т.	2,13 \pm 0,09	21,12 \pm 0,85
пеларгонидин-гликозид/галактозид	н.т.	н.т.	<л.к.	3,05 \pm 0,34
цијанидин-арабинозид	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
цијанидин-дериват 1	н.т.	н.т.	<л.к.	0,49 \pm 0,03
цијанидин-дериват 2	н.т.	н.т.	<л.к.	<л.к.
Садржај квантификованих антоцијана (mg/g)	/	/	2,13	24,66
Садржај квантификованих фенолних једињења (mg/g)	0,55	1,72	2,63	24,90
Број квантификованих једињења	9	9	9	13

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; л.к. – лимит квантитације (Ogčić и сарадници, 2014); н.д. – није детектовано; н.т. – није тестирано.

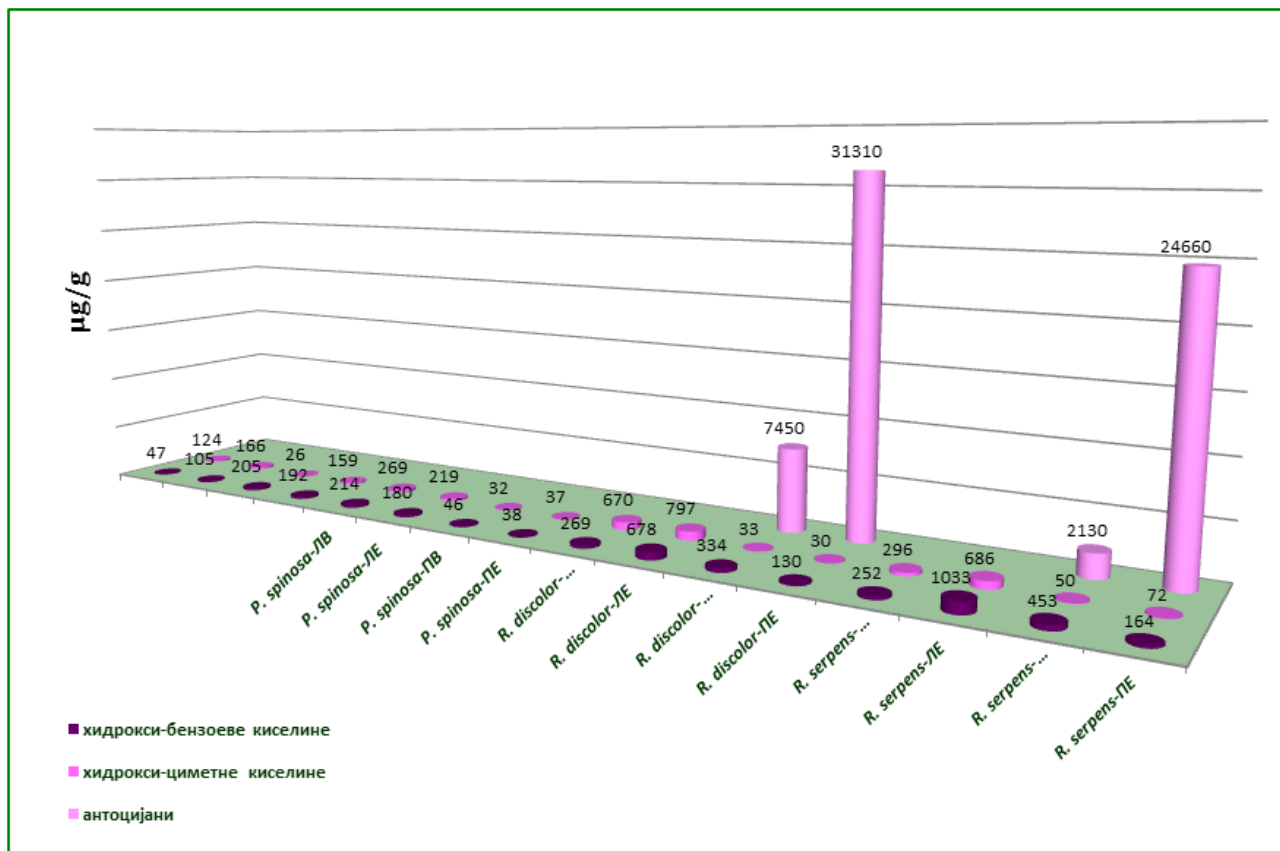
LC-MS/MS анализом водених и етанолних екстраката *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* је идентификовано укупно 11 фенолних киселина и семиквантификовано 5 антоцијана што је приказано на **Слици 21** и у **Табелама 5-8**.

Екстракти листова *P. mahaleb* су били оскуднији у фенолним киселинама у односу на екстракте *P. spinosa*. У екстрактима листова *P. mahaleb* хидрокси-бензојеве киселине су биле присутне у нижим концентрацијама (47 и 105 $\mu\text{g/g}$, у воденом и етанолном екстракту, редом), него у листовима *P. spinosa* (214 и 180 $\mu\text{g/g}$, у воденом и етанолном екстракту, редом). Насупрот листовима, екстракти плодова *P. mahaleb* су били вишеструко богатији овим једињењима у односу на плодове *P. spinosa* (205 и 192 $\mu\text{g/g}$ vs. 46 и 38 $\mu\text{g/g}$ за водени и етанолни екстракт, редом).

Слично као и за хидрокси-бензојеве киселине и хидрокси-циметне киселине су у већим количинама нађене у екстрактима листова и у воденом екстракту *P. spinosa*, него

у одговарајућим екстрактима *P. mahaleb*, док је у етанолном екстракту плода било обрнуто.

У екстрактима обе врсте антоцијани су детектовани само у траговима.



Слика 21. Упоредни приказ количине хидрокси-бензоєвих и хидрокси-циметних киселина и антоцијана одређених LC-MS/MS методом у воденим и етанолним екстрактима испитиваних врста.

Доминантне компоненте су се такође разликовале, тако да је хлорогенска киселина била једна од водећих фенолних киселина у воденом екстракту листа *P. spinosa*, док је у свим екстрактима *P. mahaleb* била присутна у траговима.

Екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens* су садржали већу количину фенолних једињења у односу на плодове. Етанолни екстракти листова су били богатији фенолним киселинама него водени у којима су ова једињења детектована у количини од 939 и 548 µg/g, редом. За разлику од екстраката листова, фенолне киселине су биле заступљеније у воденим екстрактима плодова (367 и 503 µg/g насупрот 160 и 236 µg/g, редом).

Екстракти обе врсте су били богатији хидрокси-бензоєвим киселинама у односу на хидрокси-циметне.

У свим екстрактима гална киселина се издвојила као једна од доминантних хидрокси-бензоєвих киселина. Хлорогенска и кафена киселина су се истакле као доминантне хидрокси-циметне киселине у екстрактима листова обе врсте.

Екстракти плодова *R. discolor* и *R. serpens* су садржали знатно веће концентрације антоцијана у односу на фенолне киселине при чему је цијанидин-глукозид/галактозид био доминантно једињење.

Збирне количине идентификованих фенолних киселина су варирале од 75 µg/g сувог екстракта у етанолном екстракту плода *P. spinosa* до 1719 µg/g у етанолном екстракту листа *R. serpens*.

На основу добијених резултата може се видети да су фенолне киселине квантификоване у већим количинама у екстрактима листова свих испитиваних врста изузев *P. mahaleb*.

Количина идентификованих хидрокси-бензоевих киселина је варирала од 38 µg/g у етанолном екстракту плода *P. spinosa* до 1033 µg/g у етанолном екстракту листа *R. serpens*. Унутар ове групе фитоједињења идентификоване и квантификоване су следеће компоненте: *p*-хидрокси-бензоева, протокатехинска, 2,5-дихидрокси-бензоева, ванилинска и гална киселина.

Насупрот количини идентификованих фенолних и хидрокси-бензоевих киселина, најсиромашнији хидрокси-циметним киселинама је био водени екстракт плода *P. mahaleb* (26 µg/g), док је најбогатији био етанолни екстракт листа *R. discolor* (797 µg/g).

Хемијски састав антоцијана је испитиван само у екстрактима плодова, јер су литературни подаци и обојеност овог биљног органа испитиваних врста указивали на високу концентрацију наведених пигмената у ћелијском соку. Насупрот очекивањима, фитоједињења антоцијанске природе су детектована искључиво у плодовима врста рода *Rubus* у концентрацијама довољним за квантификацију. Концентрација идентификованих антоцијана је у плодовима испитиваних купина била у опсегу од 2,13 до 31,31 mg/g и тиме вишеструко превазилазила концентрацију идентификованих фенолних киселина у истим узорцима.

Насупрот овде презентованим резултатима о присуству антоцијана у узорцима *P. mahaleb*, многи аутори су ова једињења пронашли у концентрацијама довољним за квантификацију. Тако су Ozturk и сар. (2014) користећи оптимизовани екстрактант утврдили присуство 2 деривата цијанидина. Присуство више различитих гликозида цијанидина (цијанидин-3-*O*-глукозида, цијанидин-3-*O*-рутинозида, цијанидин-3-*O*-самбубиозида, цијанидин-3-*O*-ксилозил-глукозида и цијанидин-3,5-диглукозида) су идентификовали и други аутори (Blando и сар., 2016, 2018; Gerardi и сар., 2015; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016, Popović и сар., 2021).

Ieri и сар. (2012), а касније и други истраживачи (Gerardi и сар., 2015; Popović и сар., 2021) су у сочном делу плода *P. mahaleb* утврдили присуство деривата *o*-кумаринске киселине, прекурсора кумарина, док су Mikulic-Petkovsek и сар. (2016) поред деривата кумаринске киселине пронашли и хексозиде кафене киселине.

Према доступним литературним подацима, састав фенолних киселина и антоцијана у екстрактима листова је по први пут анализиран у оквиру ове докторске дисертације. Такође, иако су Mariod и сар. (2010) утврдили присуство хидрокси-бензоевих киселина у семенима ове врсте, сада су по први пут ова једињења квантификована у листовима и плодовима и то *p*-хидрокси-бензоева, протокатехинска, 2,5-дихидрокси-бензоева, ванилинска и гална киселина.

Radovanović и сар. (2013) су проучавали хемијски састав плодова неколико самониклих врста укључујући и *P. spinosa* у којој су идентификовали 5 фенолних киселина, галну (150,21 mg/kg), *t*-кафтаринску (20,65 mg/kg), *t*-кутаринску (7,88 mg/kg), кафену (0,34 mg/kg) и сиригинску (48,14 mg/kg). У истом раду је идентификовано и 5 флавоноида из групе флавонола, процијанидин В2 (14,51 mg/kg), (+)-катехин (6,42

mg/kg), (-)-епикатехин (3,39 mg/kg), кверцетин-3-гликозид (32,02 mg/kg), рутин (13,86 mg/kg) и кверцетин (1,16 mg/kg).

Veličković и сар. (2014) су потврдили присуство неохлорогенске и кафење киселине, као и флавонола кверцетина и антоцијана цијанидин-3-*O*-глукозида и цијанидин-3-*O*-рутинозида у воденом, етанолно-воденом и етанолном екстракту плода ове врсте, при чему су разноликост и концентрација наведених фитоједињења били највећи у водено-етанолном екстракту.

У раду Pinacho и сар. (2015) етанолни екстракт изданак *P. spinosa* је био најбогатији фенолним једињењима. Том приликом аутори су идентификовали фенолне киселине (протокатехинску, галну и кафењу), кумарине (5-хидрокси-6-метокси-7-*O*- β -D-глукозил кумарин и 5-хидрокси-6-метокси-7-*O*- β -D-рамнозил кумарин), флавоноле (кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин, кемферол, кемферол-3,7-*O*-дирамнозид, кемферол-3-*O*-арабинозид-7-*O*-рамнозид, кемферол-3-*O*-арабинозид), флаван-3-оле ((-)-епигалокатехин, (+)-галокатехин, (-)-епикатехин, (+)-катехин, (-)-епиафзелехин, (+)-афзелехин) и њихове коњугате, као и проантоцијанидине типа А.

Рад Porović и сар. (2020) који је обухватао 15 генотипова ове врсте је доказао присуство хидрокси-циметних киселина (неохлорогенске, хлорогенске и *p*-кумаринске), али и антоцијана (цијанидин-3-глукозида, цијанидин-3-рутинозида, пеонидин-3-глукозида и пеонидин-3-рутинозида). Сличан састав су исти аутори потврдили у плодовима ове врсте и у публикацији која је уследила (Porović и сар., 2021).

Наведени литературни подаци су у сагласности са профилем фенолних киселина *P. mahaleb* и *P. spinosa* представљеним у овој дисертацији.

У плодовима *R. ulmifolius* Da Silva и сар. (2019) су идентификовали, између осталог, две фенолне киселине, кафењу и 4-*O*-кафеоилхинску киселину, као и више антоцијана. Количина фенолних киселина је била знатно нижа него количина антоцијана, при чему се цијанидин-3-*O*-глукозид (14,69 mg/g) издвојио као доминантно једињење, што је у складу са приказаним резултатима. Поред цијанидин-3-*O*-глукозида, аутори су пронашли у мањим количинама неколико других гликозида цијанидина, попут цијанидин-3-ди-хексозида (2,14 mg/g), цијанидин-3-*O*-ксилозида (2,62 mg/g), цијанидин-3-*O*-диоксаил-глукозида (2,04 mg/g), али и пеларгонидин-3-*O*-глукозида (2,234 mg/g). Слична концентрација пеларгонидин гликозида је утврђена и у оквиру ове дисертације у екстрактима плодова *R. discolor* и *R. serpens*.

Фитохемијски профил *R. ulmifolius* су проучавали и Schulz и сар. (2019) при чему су посебну пажњу усмерили на разлике у квалитативном и квантитативном саставу фенолних компоненти до којих долази током сазревања плодова. Према резултатима поменутих истраживача, концентрација неких фенолних киселина током сазревања опада, док се других повећава. Ипак количина укупних фенолних киселина је мања у потпуно зрелим плодовима, као и количина идентификованих фенолних једињења у осталом. Количина антоцијана презентована у студији ових аутора указује да се концентрација фенолних једињења ипак повећава током процеса зрења чему највише доприносе антоцијани, што су потврдили и други аутори (Samaniego и сар., 2020).

Поред наведеног, Schulz и сар. (2019) су у истом раду идентификовали 10 фенолних киселина, међу којима су најзаступљеније биле протокатехинска и гална киселина, што је у складу са резултатима ове докторске дисертације. У мањим количинама су идентификоване кафења, *p*-кумаринска, ферулна, салицилна,

синапинска и сиригинска киселина, док су *p*-аминобензоева, бензоева, хлорогенска и ванилинска биле присутне у траговима.

У листовима и плодовима *R. grandifolius* утврђен је сличан фитохемијски профил, као и код претходних аутора (Spínola и сар., 2019). У листовима ове врсте идентификован је димер 5-*O*-кафеоилхинске киселине, 3-*O*-кафеоилхинска киселина и хексозид ферулне киселине. Осим наведених компоненти, у листовима ове врсте Spínola и сар. (2019) су потврдили присуство салвјанолинске и кумаринске киселине, гликозида кафене киселине, деривата кафене и ферулне киселине. У плодовима су, поред фенолних киселина, пронађени и гликозиди цијанидина (цијанидин-*O*-хексозид, цијанидин-3-*O*-глукозид, цијанидин-*O*-пентозид и цијанидин-*O*-диоксалоил-глукозид). Слично претходно публикованим радовима, најзастуљенији је био цијанидин-3-*O*-глукозид.

Присуство гликозида цијанидина, попут цијанидин-3-*O*-глукозида, цијанидин-3-*O*-ксилозил-рутинозида и цијанидин-3-*O*-(6-малонил)-глукозида, су утврдили и Sánchez-Velázquez и сар. (2019) у плодовима *R. liebmannii* и *R. palmeri*.

Присуство фенолних киселина и антоцијана у различитим врстама рода *Rubus* су доказали и други аутори (Schulz и Chim, 2019; Zengin и сар., 2019; Liu и сар., 2020).

4.2. *In vitro* биолошка активност екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens*

4.2.1. Антиоксидантна активност и корелација са хемијским саставом

Антиоксидантна активност водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова испитиваних врста одређена је путем 5 различитих *in vitro* спектрофотометријских метода: DPPH, ABTS, FRAP, TRC и β -каротен/линолна киселина, а резултати су приказани у **Табели 9** и на **Сликама 22-25**.

У циљу утврђивања утицаја садржаја појединих група фенолних једињења, као и доминантних компоненти на антиоксидантна својства испитиваних екстраката установљене су одговарајуће корелације путем израчунавања Пирсонових коефицијената корелације (r) који су приказани у **Табелама 10-13**.

Табела 9. Резултати испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* добијени различитим *in vitro* спектрофотометријским методама.

Екстракт	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS EC ₅₀ (µg/mL)	FRAP µmol Fe ⁺² /g	TRC EC ₅₀ (mg/mL)	β-каротен/линолна киселина EC ₅₀ (mg/mL)
<i>Prunus mahaleb</i>					
ЛВ	95,1±1,28 ^{a,x*}	24,3±0,96 ^a	0,40±0,01 ^{a,x}	1,44±0,02 ^a	5,89±0,45 ^a
ЛЕ	81,8±1,74 ^a	26,2±0,36 ^{a,x}	0,39±0,02 ^a	0,73±0,00 ^{a,x}	4,72±0,86 ^{a,x}
ЛА	155±5,84 ^a	39,6±1,27 ^{a,y}	0,27±0,05 ^a	1,14±0,01 ^{a,y}	5,28±0,37 ^{a,y}
ПВ	160±0,44 ^{b,x}	67,6±0,62 ^b	0,14±0,00 ^{b,x}	2,07±0,05 ^b	8,19±1,41 ^b
ПЕ	450±3,13 ^b	159±10,1 ^{b,x}	0,01±0,00 ^b	5,39±0,00 ^{b,x}	15,0±1,33 ^{b,x}
ПА	340±13,8 ^b	105±3,81 ^{b,y}	0,13±0,01 ^b	4,33±0,01 ^{b,y}	4,46±0,74 ^{b,y}
<i>Prunus spinosa</i>					
ЛВ	65,8±1,11 ^a	21,0±0,92 ^a	0,52±0,01 ^{a,x}	1,42±0,00 ^{a,x}	4,46±0,25 ^{a,x}
ЛЕ	57,0±4,80 ^{a,x}	22,7±0,22 ^{a,x}	0,62±0,05 ^{a,y}	1,04±0,00 ^{a,y}	1,26±0,66 ^{a,A}
ЛА	44,6±1,26 ^{a,y}	16,1±0,34 ^{a,y}	0,80±0,00 ^{a,z}	0,63±0,02 ^{a,z}	2,69±0,65 ^a
ПВ	490±10,7 ^b	217±9,48 ^b	0,01±0,00 ^{b,x}	3,85±0,10 ^{b,x}	14,4±1,87 ^{b,x}
ПЕ	258±6,57 ^{b,x}	184±3,88 ^{b,x}	0,10±0,01 ^{b,y}	4,07±0,08 ^{b,y}	6,81±1,74 ^b
ПА	606±29,1 ^{b,y}	348±8,04 ^{b,y}	0,06±0,00 ^{b,z}	8,35±0,02 ^{b,z}	6,77±0,45 ^b
<i>Rubus discolor</i>					
ЛВ	15,8±0,13 ^{a,x,A**}	4,73±0,44 ^{a,x,A}	2,96±0,06 ^{a,x}	0,25±0,00 ^{a,x}	3,78±0,65 ^a
ЛЕ	15,5±0,36 ^{a,y,A}	7,76±0,02 ^{a,y,A}	1,91±0,06 ^a	0,45±0,00 ^{a,y}	2,08±0,34 ^{a,A}
ЛА	16,0±1,02 ^{a,z,A}	5,31±0,01 ^{a,z,A}	1,44±0,04 ^a	0,21±0,02 ^{a,z}	1,08±0,44 ^{a,x,A}
ПВ	179±4,31 ^{b,x}	68,1±0,01 ^{b,x}	0,12±0,00 ^{b,x}	0,96±0,02 ^{b,x}	6,00±0,26 ^b
ПЕ	163±1,03 ^{b,y}	41,4±1,02 ^{b,y}	0,26±0,01 ^b	1,37±0,02 ^{b,y}	3,11±0,77 ^b
ПА	57,0±0,36 ^{b,z}	17,9±1,19 ^{b,z}	0,75±0,01 ^b	0,47±0,00 ^{b,z}	4,90±0,52 ^{b,x}

Наставак Табеле 9.

Екстракт	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS EC ₅₀ (µg/mL)	FRAP µmol Fe ⁺² /g	TRC EC ₅₀ (mg/mL)	β-каротен/линолна киселина EC ₅₀ (mg/mL)
Rubus serpens					
ЛВ	10,3±0,25 ^{a,A}	4,03±0,29 ^{a,x,A}	3,69±0,01 ^{a,x}	0,11±0,00 ^a	0,69±0,06 ^{a,x,A}
ЛЕ	18,9±0,32 ^{a,A}	6,79±0,31 ^{a,y,A}	1,94±0,05 ^{a,y}	0,24±0,01 ^a	0,59±0,27 ^{a,y,A}
ЛА	20,1±0,39 ^{a,x,A}	10,6±0,94 ^{a,z,A}	2,14±0,01 ^{a,z}	0,18±0,00 ^{a,x}	0,38±0,09 ^{a,z,A}
ПВ	103±1,96 ^b	42,2±0,03 ^{b,x}	0,22±0,00 ^{b,x}	1,48±0,00 ^b	4,25±0,03 ^{b,x}
ПЕ	95,1±0,80 ^b	34,1±0,31 ^{b,y}	0,36±0,01 ^{b,y}	1,14±0,00 ^b	2,08±0,11 ^{b,y,A}
ПА	58,8±0,54 ^{b,x}	23,0±1,43 ^{b,z}	0,51±0,01 ^{b,z}	0,67±0,00 ^{b,x}	0,35±0,11 ^{b,z,A}
СТАНДАРДИ					
ВНА	5,43±0,02 ^A	н. т.	1,83±0,41	0,01±0,00	н. т.
ВНТ	н. т.	н. т.	н. т.	н. т.	0,02±0,00 ^A
L-аскорбинска киселина (витамин С)	3,74±0,12 ^A	2,27±0,10 ^A	6,30±0,22	0,01±0,00	н. т.

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; н. т. – није тестирано; EC₅₀ – ефективна концентрација (концентрација при којој долази до смањења концентрације слободних радикала за 50% у DPPH, ABTS и β-каротен/линолна киселина тесту, односно до пораста апсорбанце до 0,5 у TRC тесту); µmol Fe⁺²/g – резултати FRAP теста изражени у еквивалентима µmol Fe⁺² по граму сувог екстракта; резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента ± стандардна девијација (SD); *за сваку испитивану биљну врсту у истој колони словима а и б су означене статистички значајне разлике између биљних органа, док су словима x, y, z означене статистички значајне разлике међу растварачима ($p < 0,05$, two-way ANOVA, Tukey post-hoc тест); ** унутар сваке колоне истим великим словом су означени екстракти чије се дејство није статистички значајно разликовало у односу на референтни стандард ($p < 0,05$, one-way ANOVA, Tukey post-hoc тест).

Prunus mahaleb

Резултати антиоксидантне активности листова и плодова *P. mahaleb* су приказани на **Слици 22**.

У DPPH тесту добијене вредности EC₅₀ су варирале од 81,8 µg/mL за етанолни екстракт листа до 450 µg/mL за етанолни екстракт плода *P. mahaleb*. Најслабију активност у ABTS тесту је показао поново етанолни екстракт плода *P. mahaleb* (EC₅₀ 159 µg/mL), док је овога пута водени екстракт листа био најактивнији (EC₅₀ 24,3 µg/mL), а незнатно слабији је био етанолни екстракт листа (EC₅₀ 26,2 µg/mL).

Резултати FRAP теста, такође, упућују на најјачу редуccionу способност етанолног и воденог екстракта листа (0,39 и 0,40 µmol Fe⁺²/g, редом). Најбоља антиоксидантна својства етанолног екстракта листа су потврђена и TRC методом (EC₅₀ 0,73 mg/mL), али за разлику од претходних тестова, следио је ацетонски (EC₅₀ 1,14 mg/mL), па водени екстракт листа (EC₅₀ 1,44 mg/mL).

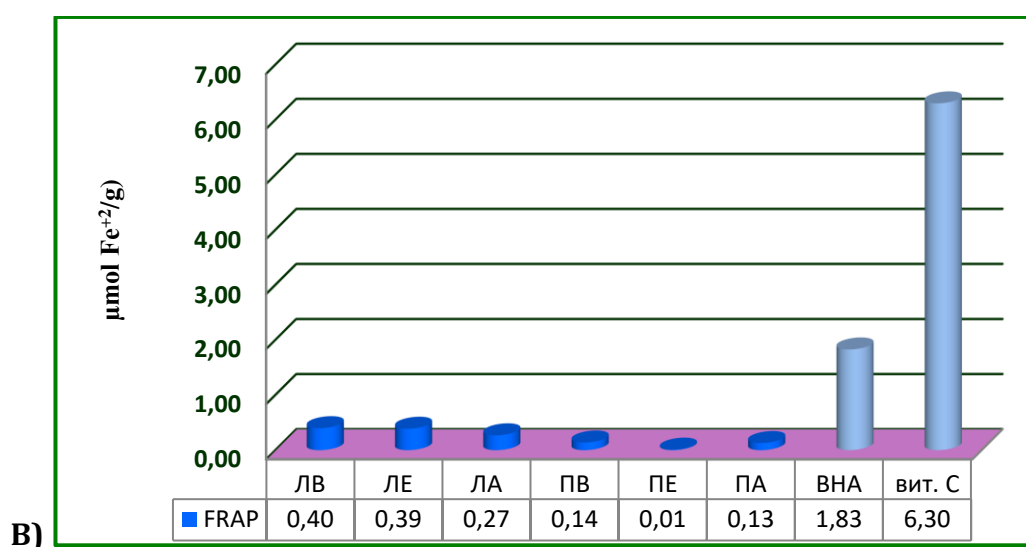
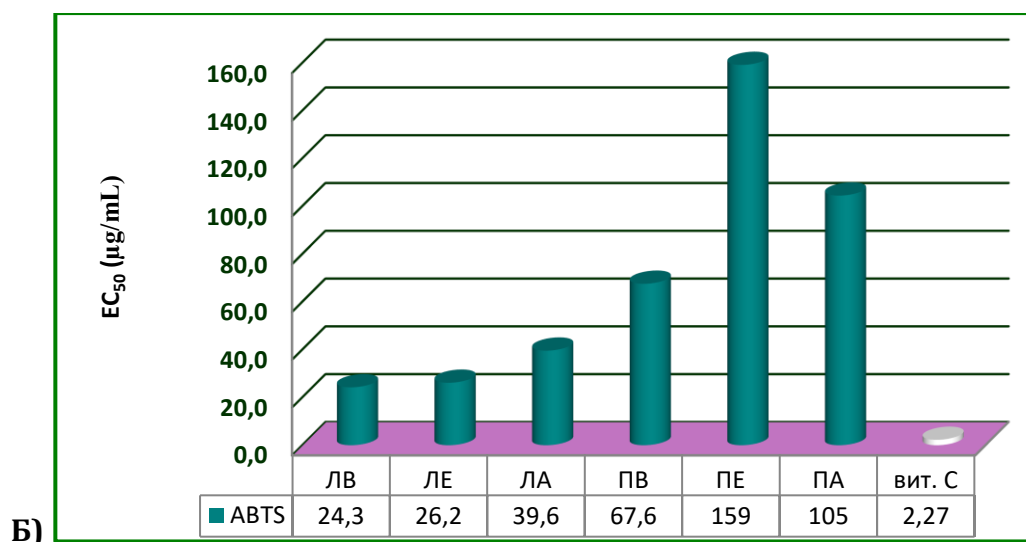
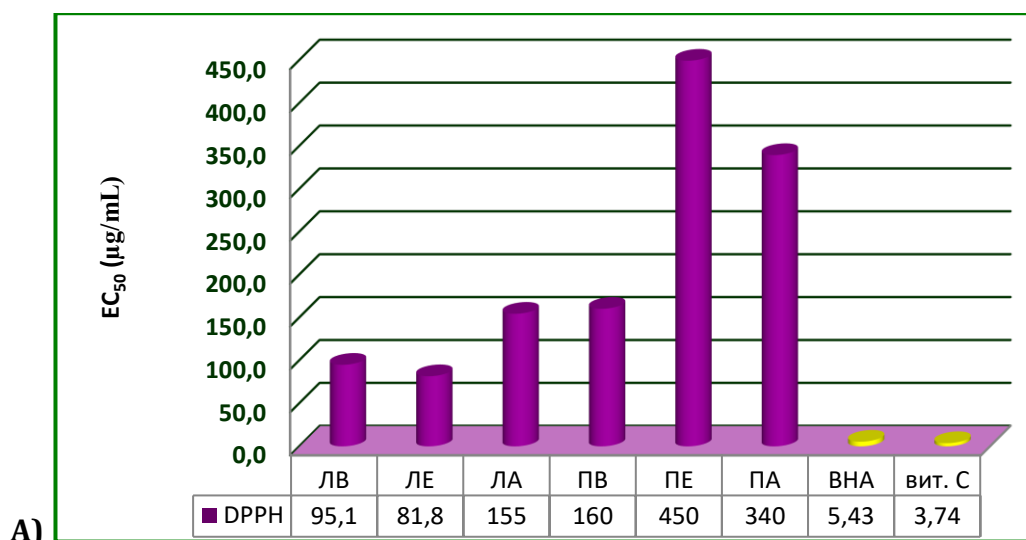
С друге стране, најнижа вредност EC₅₀ у β-каротен/линолна киселина тесту је установљена за ацетонски екстракт плода (EC₅₀ 4,46 mg/mL), а потом за етанолни екстракт листа (4,72 mg/mL).

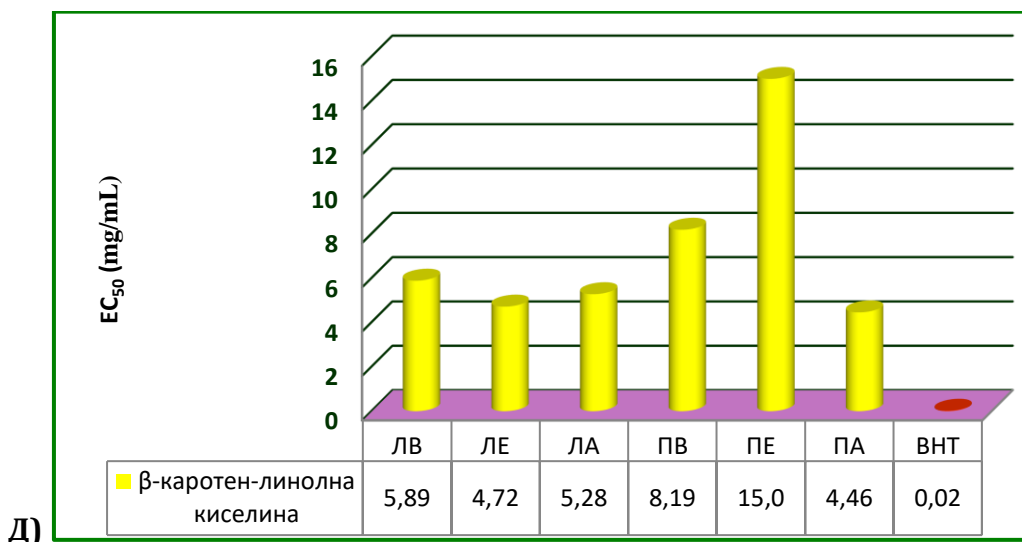
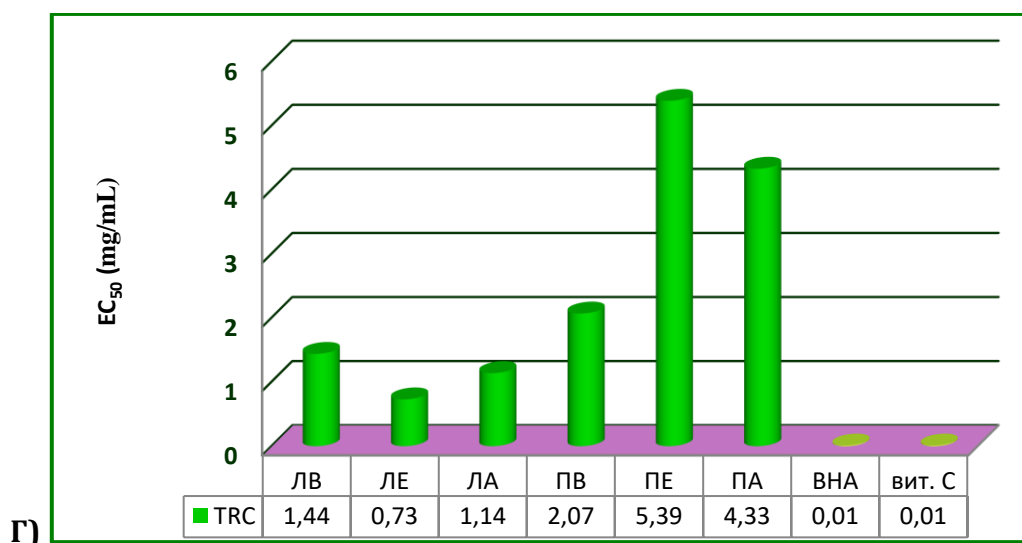
Етанолни екстракт плода је испољио најслабији антиоксидантни потенцијал у FRAP, TRC и β-каротен/линолна киселина тесту, што је у складу са резултатима за DPPH и ABTS тест.

Јака корелација је установљена између спектрофотометријски одређеног садржаја укупних фенола и DPPH, ABTS, TRC и FRAP методе, при чему треба истаћи да је она имала негативни предзнак за прве три методе (**Табела 10**).

Умерена до јака корелација је утврђена између садржаја квантификованих фенолних једињења, хидрокси-бензоевих и хидрокси-циметних киселина, као и доминантних фенолних киселина и антиоксидантне активности.

Резултати антиоксидантне активности добијени различитим тестовима су међусобно јако корелирали, изузев у случају TRC и β-каротен/линолна киселина методе чији коефицијент корелације је указивао на умерену корелацију (r 0,67).





ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; EC_{50} – ефективна концентрација (концентрација при којој долази до смањења концентрације слободних радикала за 50% у DPPH, ABTS и β-каротен/линолна киселина тесту, односно до пораста апсорбанце до 0,5 у TRC тесту); $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ – резултати FRAP testa изражени у еквивалентима $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ по граму сувог екстракта; резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 22. Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Prunus mahaleb* добијени DPPH (А), ABTS (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β-каротен/линолна киселина (Д) методом.

Табела 10. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *P. mahaleb*.

<i>r</i>	DPPH	ABTS	FRAP	TRC	β -каротен/ линолна киселина
Садржаји укупних (спектрофотометријски)					
фенола	-0,82 ^c	-0,90 ^c	0,93 ^c	-0,86 ^c	-0,65 ^b
флавоноида	-0,38 ^b	-0,47 ^b	0,37 ^b	-0,53 ^b	-0,37 ^b
антоцијана	-0,46 ^b	-0,43 ^b	0,14 ^a	-0,61 ^b	-0,28 ^a
мономерних антоцијана	-0,79 ^c	0,90 ^c	0,99 ^c	-0,90 ^c	-0,93 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)					
фенола	0,82 ^c	0,82 ^c	-0,70 ^c	0,75 ^c	0,76 ^c
хидрокси-бензоевих киселина	0,63 ^b	0,72 ^c	-0,90 ^c	0,61 ^b	0,67 ^b
хидрокси-циметних киселина	0,75 ^c	0,78 ^c	-0,71 ^c	0,68 ^b	0,70 ^c
Доминантна фитоедињења (LC-MS/MS)					
протокатехинска киселина	0,57 ^b	0,68 ^b	-0,88 ^c	0,57 ^b	0,63 ^b
гална киселина	0,99 ^c	1,00 ^c	-0,90 ^c	1,00 ^c	1,00 ^c
<i>p</i> -кумаринска киселина	0,81 ^c	0,74 ^c	-0,46 ^b	0,77 ^c	0,74 ^c
<i>o</i> -кумаринска киселина	-0,75 ^c	-0,80 ^c	0,93 ^c	-0,79 ^c	-0,82 ^c
Антиоксидантна активност					
β -каротен/линолна киселина	0,69 ^c	0,77 ^c	-0,71 ^c	0,67 ^b	1 ^c
TRC	0,98 ^c	0,97 ^c	-0,87 ^c	1 ^c	
FRAP	-0,89 ^c	-0,94 ^c	1 ^c		
ABTS	0,98 ^c	1 ^c			
DPPH	1 ^c				

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Prunus spinosa

Екстракти листова и плодова *Prunus spinosa* су презентовани на **Слици 23**.

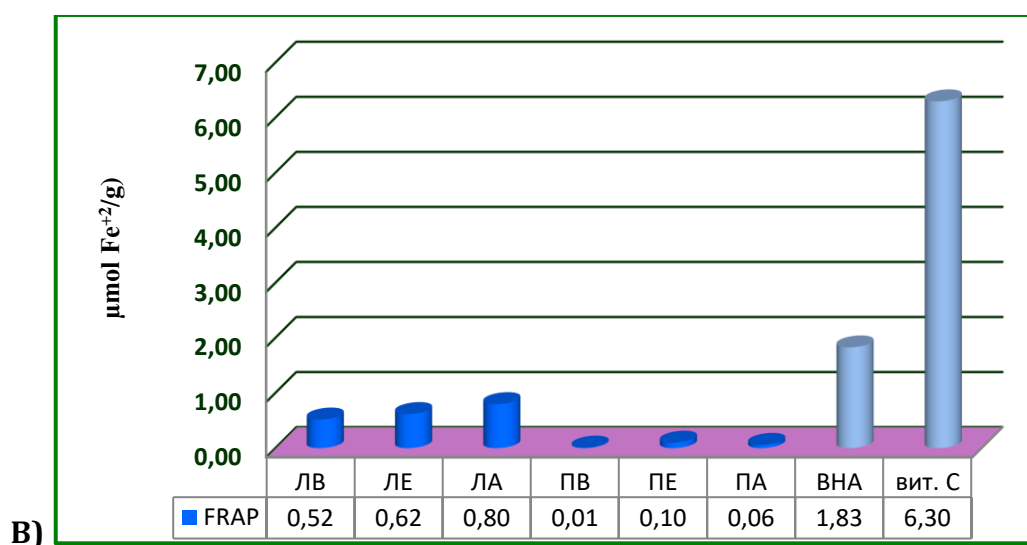
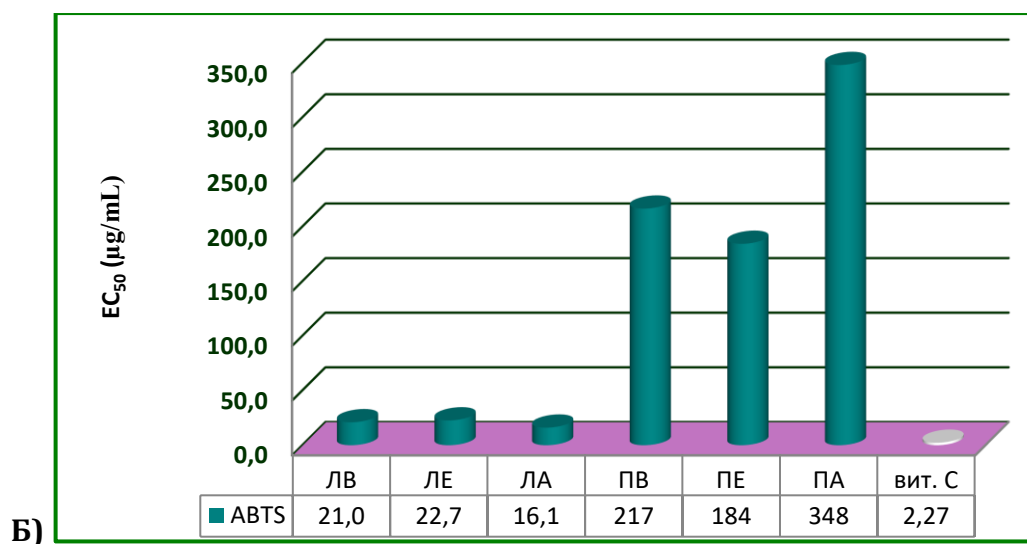
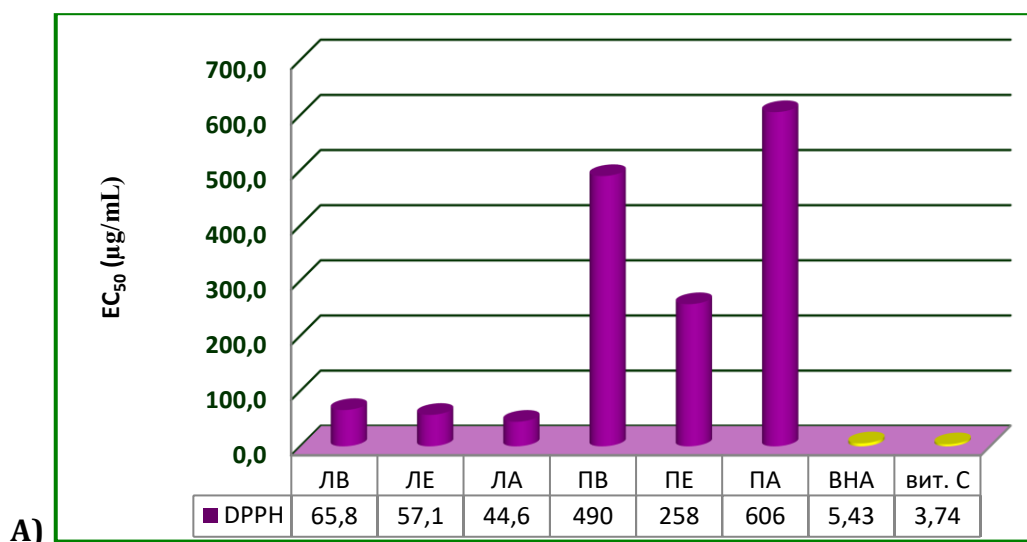
Најефикаснији у неутралисању DPPH и ABTS слободних радикала је био ацетонски екстракт листа (EC_{50} 44,57 и 16,1 $\mu\text{g/mL}$) који је истовремено показао и најјача редуциона својства FRAP (0,80 Fe^{+2}/g) и TRC методом (0,63 mg/mL).

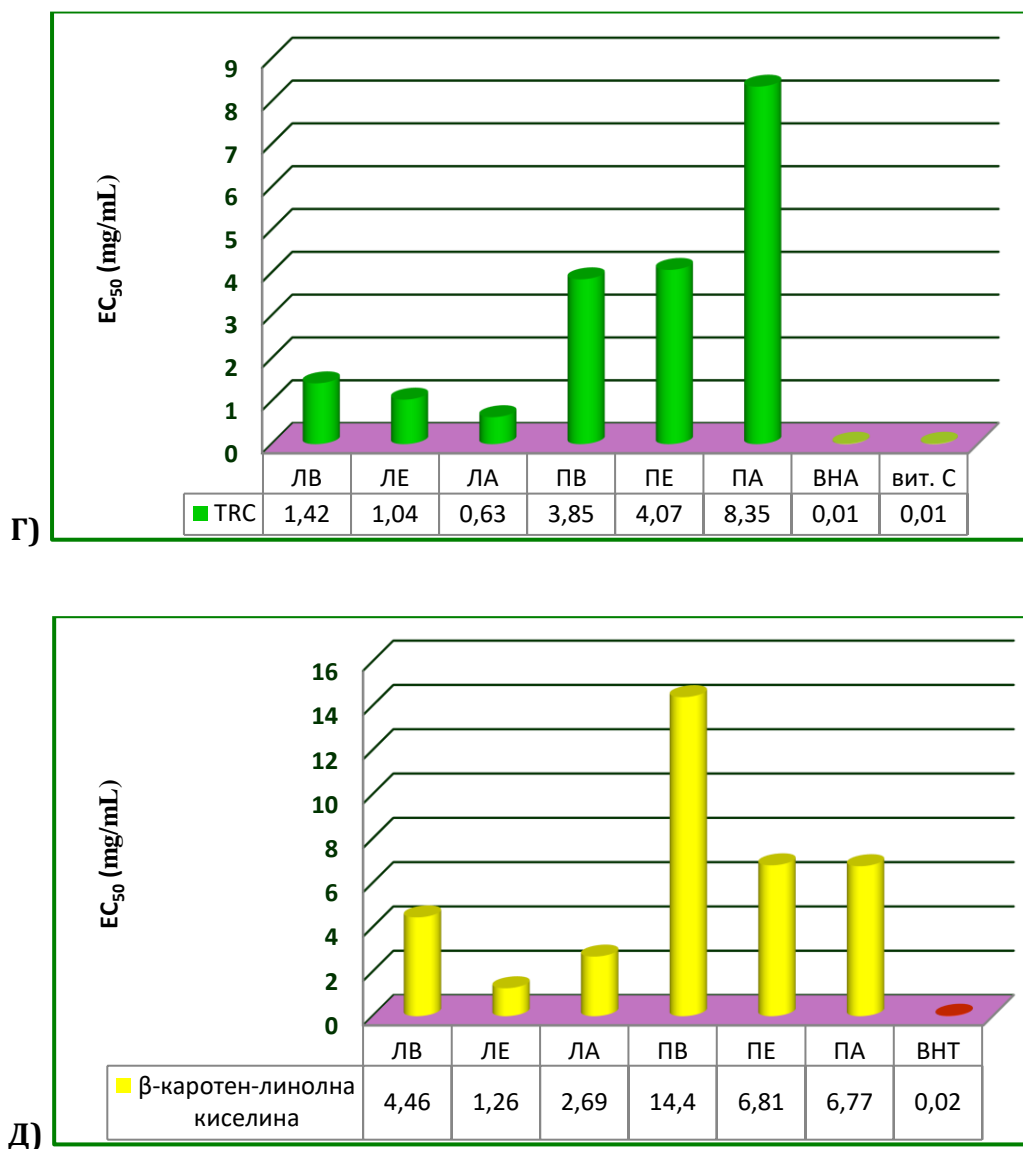
Насупрот претходним тестовима, најнижу EC_{50} вредност (1,26 mg/mL) у β -каротен/линолна киселина тесту је имао етанолни екстракт листа.

За разлику од ацетонског екстракта листа, ацетонски екстракт плода је имао највишу EC_{50} вредност у DPPH (606 $\mu\text{g/mL}$) и ABTS (348 $\mu\text{g/mL}$) методи.

Штавише, исти екстракт је испољио најслабија антиоксидантна својства у односу на свих шест екстраката *P. spinosa* у TRC тесту (8,35 mg/mL).

У преостала два протокола за процењивање антиоксидантне активности, FRAP и β -каротен/линолна киселина, најмању активност је показао водени екстракт плода са вредностима 0,01 Fe^{+2}/g , односно 14,4 mg/mL , редоследом.





ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; EC_{50} – ефективна концентрација (концентрација при којој долази до смањења концентрације слободних радикала за 50% у DPPH, ABTS и β-каротен/линолна киселина тесту, односно до пораста апсорбанце до 0,5 у TRC тесту); $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ – резултати FRAP testa изражени у еквивалентима $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ по граму сувог екстракта; резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 23. Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Prunus spinosa* добијени DPPH (А), ABTS (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β-каротен/линолна киселина (Д) методом.

Вредности Пирсонових коефицијената корелације израчунати за *P. spinosa* између садржаја укупних фенолних једињења, појединих група фенолних једињења и доминантних фенола са једне стране и антиоксидантне активности су указивали на изузетну корелираност (Табела 11).

Коефицијенти корелације су имали негативну вредност за све резултате добијене различитим антиоксидантним тестовима изузев FRAP методе.

Такође, јаке корелације су утврђене за резултате свих антиоксидантних метода међусобно, осим за однос β -каротен/линолна киселина теста и ABTS, односно TRC теста који су били умерено корелирани (r 0,62 и 0,47, редом).

Табела 11. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *P. spinosa*.

<i>r</i>	DPPH	ABTS	FRAP	TRC	β -каротен/ линолна киселина
Садржаји укупних (спектрофотометријски)					
фенола	-0,84 ^c	-0,87 ^c	0,97 ^c	-0,79 ^c	-0,71 ^c
флавоноида	-0,80 ^c	-0,82 ^c	0,97 ^c	-0,77 ^c	-0,71 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)					
фенола	-0,87 ^c	-0,98 ^c	0,95 ^c	-0,96 ^c	-0,75 ^c
хидрокси-бензоевих киселина	-0,85 ^c	-0,98 ^c	0,95 ^c	-0,97 ^c	-0,73 ^c
хидрокси-циметних киселина	-0,88 ^c	-0,98 ^c	0,95 ^c	-0,96 ^c	-0,76 ^c
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)					
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	-0,84 ^c	-0,95 ^c	0,95 ^c	-0,96 ^c	-0,76 ^c
кафена киселина	-0,76 ^c	-0,87 ^c	0,79 ^c	-0,82 ^c	-0,58 ^b
хлорогенска киселина	-0,75 ^c	-0,86 ^c	0,79 ^c	-0,82 ^c	-0,57 ^b
Антиоксидантна активност					
β -каротен/линолна киселина	0,74 ^c	0,62 ^b	-0,81 ^c	0,47 ^b	1 ^c
TRC	0,92 ^c	0,98 ^c	-0,81 ^c	1 ^c	
FRAP	-0,88 ^c	-0,89 ^c	1 ^c		
ABTS	0,97 ^c	1 ^c			
DPPH	1 ^c				

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Rubus discolor

Резултати антиоксидантне активности екстракта листова и плодова *R. discolor* су презентовани на **Слици 24**.

Вредности EC_{50} у DPPH и ABTS тесту су се кретале између 15,5 и 179 $\mu\text{g/mL}$, односно 4,73 и 68,1 $\mu\text{g/mL}$, редом. Притом је најслабији антиоксидант био водени екстракт плода, док су се као најбољи издвојили водени и етанолни екстракти листова.

Вредности за FRAP тест су биле у опсегу од 0,12 до 2,96 Fe^{+2}/g указујући да антиоксидантна активност екстракта расте на следећи начин: водени екстракт плода < етанолни екстракт плода < ацетонски екстракт плода < ацетонски екстракт листа < етанолни екстракт листа < водени екстракт листа.

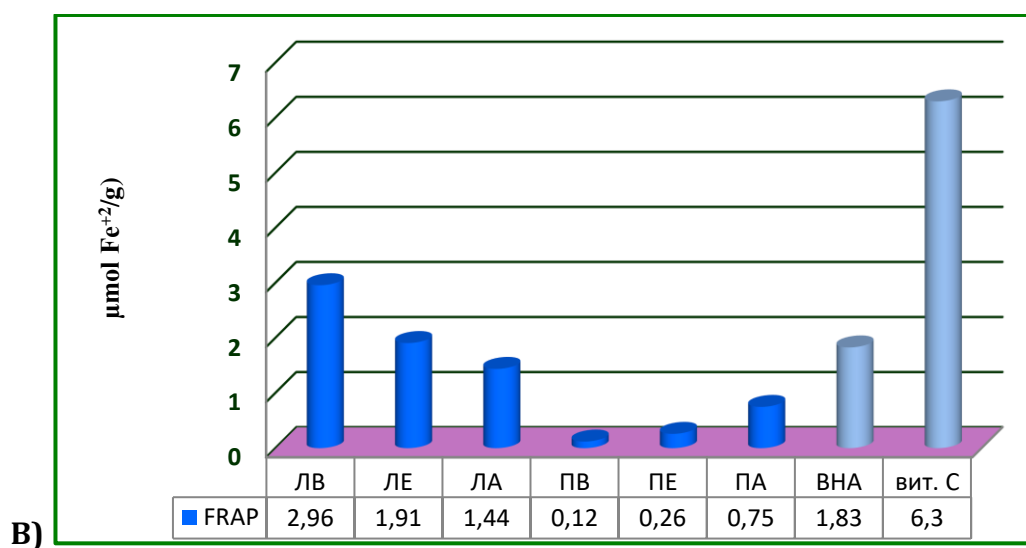
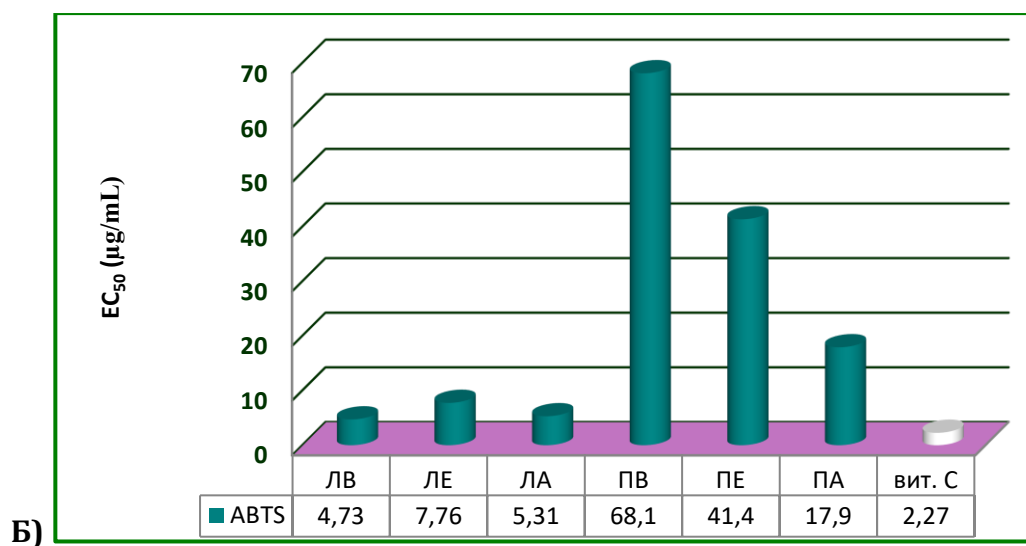
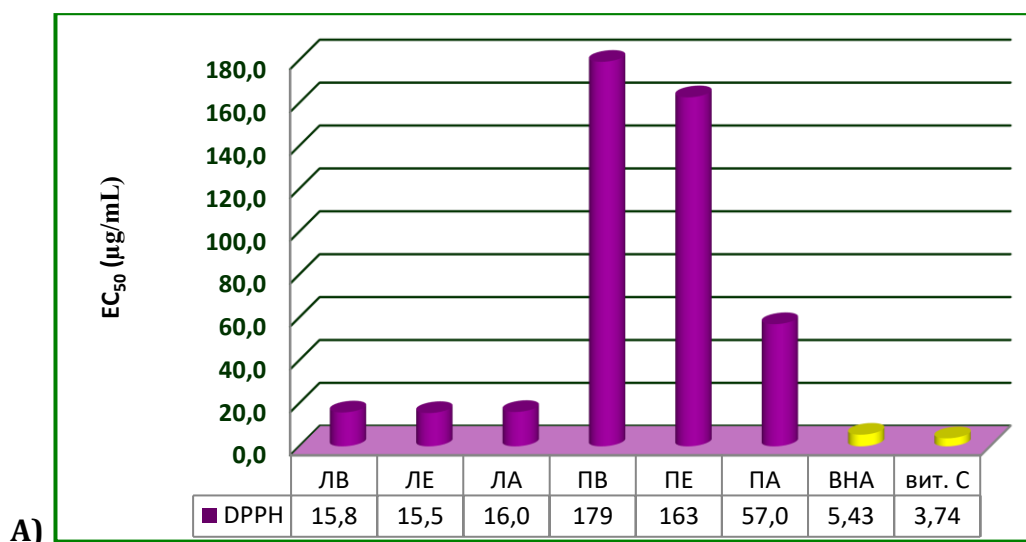
У TRC тесту најјачу антиоксидантну активност је показао ацетонски екстракт листа (0,21 mg/mL), а најслабију етанолни екстракт плода (1,37 mg/mL). Резултати добијени за β -каротен/линолна киселина тест такође указују на најбоља антиоксидантна својства ацетонског екстракта листа (1,08 mg/mL), при чему је водени екстракт плода био најслабији (6,00 mg/mL).

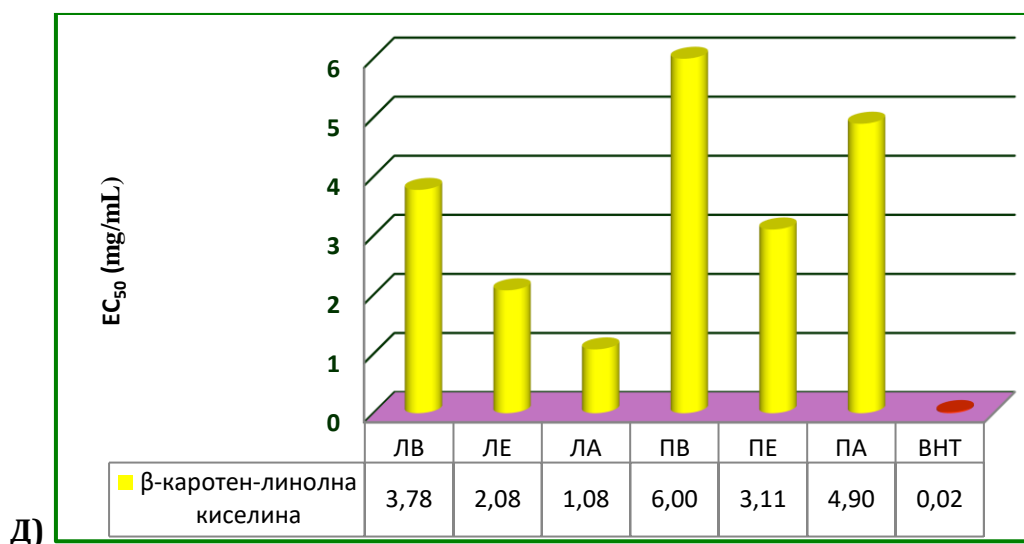
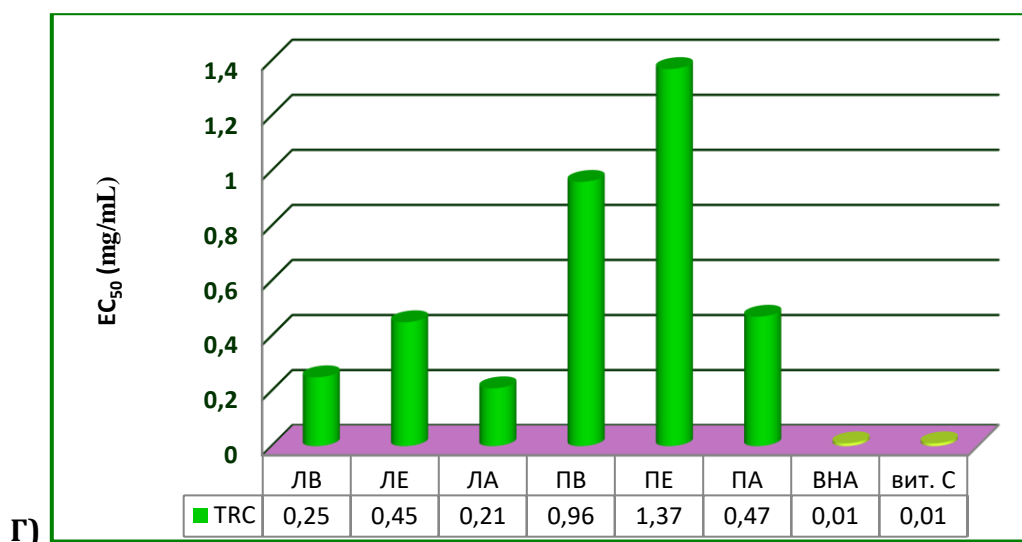
Спектрофотометријски одређени укупни садржаји фенола, флавоноида, антоцијана и њихових мономера су умерено до јако утицали на испољену антиоксидантну активност (**Табела 12**). Изузетак су представљале једино слабе корелације установљене између садржаја укупних антоцијана и ABTS теста (r 0,32), као и мономерних антоцијана и β -каротен/линолна киселина теста (r 0,06).

Концентрација квантификованих фенола је слабо корелирала са β -каротен/линолна киселина тестом (r -0,06), а концентрација хидрокси-бензоєвих киселина са FRAP методом (r 33). С друге стране, садржај квантификованих фенолних једињења, хидрокси-бензоєвих и хидрокси-циметних киселина је био умерено до јако корелиран са антиоксидантним методама у свим осталим случајевима.

Када су у питању доминантне фенолне компоненте, ниске вредности Пирсонових коефицијената су пронађене у односу протокатехинске киселине и резултата свих антиоксидантних метода, као и у односу гална киселина-FRAP и гална киселина- β -каротен/линолна киселина тест (r 0,34 и -0,29, респективно). Насупрот наведеном, преостале корелације између доминантних фенолних киселина и вредности антиоксидантних метода су биле умерене до јаке.

Резултати добијени различитим антиоксидантним методама су међусобно били умерено до јако корелирани.





ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; EC₅₀ – ефективна концентрација (концентрација при којој долази до смањења концентрације слободних радикала за 50% у DPPH, ABTS и β -каротен/линолна киселина тесту, односно до пораста апсорбанце до 0,5 у TRC тесту); $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ – резултати FRAP теста изражени у еквивалентима $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ по граму сувог екстракта; резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 24. Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Rubus discolor* добијени DPPH (А), ABTS (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β -каротен/линолна киселина (Д) методом.

Табела 12. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *R. discolor*.

<i>r</i>	DPPH	ABTS	FRAP	TRC	β -каротен/ линолна киселина
Садржаји укупних (спектрофотометријски)					
фенола	-0,94 ^c	-0,89 ^c	0,92 ^c	-0,86 ^c	-0,66 ^b
флавоноида	-0,78 ^c	-0,74 ^c	0,61 ^b	-0,73 ^c	-0,84 ^c
антоцијани	0,95 ^c	0,81 ^c	-0,79 ^c	0,99 ^c	0,06 ^a
мономерних антоцијана	0,60 ^b	0,32 ^a	-0,46 ^b	0,87 ^c	-0,62 ^b
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)					
фенола	0,69 ^c	0,44 ^b	-0,68 ^b	0,91 ^c	-0,06 ^a
hidрокси-бензоевих киселина	-0,57 ^b	-0,40 ^b	0,33 ^a	-0,56 ^b	-0,38 ^b
hidрокси-циметних киселина	-0,99 ^c	-0,92 ^c	0,90 ^c	-0,90 ^c	-0,61 ^b
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)					
протокатехинска киселина	-0,16 ^a	0,04 ^a	-0,08 ^a	-0,24 ^a	-0,08 ^a
гална киселина	-0,56 ^b	-0,36 ^b	0,34 ^a	-0,60 ^b	-0,29 ^a
кафена киселина	-0,98 ^c	-0,91 ^c	0,89 ^c	-0,89 ^c	-0,63 ^b
хлорогенска киселина	-0,99 ^c	-0,92 ^c	0,92 ^c	-0,92 ^c	-0,59 ^b
Антиоксидантна активност					
β -каротен/линолна киселина	0,59 ^b	0,68 ^c	0,41 ^b	0,36 ^b	1 ^c
TRC	0,92 ^c	0,80 ^c	0,76 ^c	1 ^c	
FRAP	-0,83 ^c	-0,80 ^c	1 ^c		
ABTS	0,96 ^c	1 ^c			
DPPH	1 ^c				

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Rubus serpens

Резултати антиоксидантне активности *R. serpens* су презентовани путем хистограма на **Слици 25**.

EC₅₀ вредности су варирале од 10,3 до 103 µg/mL у DPPH; од 4,03 до 42,2 µg/mL у ABTS и од 0,11 до 1,48 mg/mL у TRC при чему су најниже вредности установљене за водени екстракт листа.

Водени екстракт листа је испољио и најснажнији редукциони потенцијал (3,69 Fe²⁺/g) што указује да су резултати FRAP теста били у сагласности са DPPH, ABTS и TRC методом.

За разлику од претходних тестова, вредности EC₅₀ у β-каротен/линолна киселина тесту су биле између 0,35 и 4,25 mg/mL, а као најефикаснији антиоксидант се показао ацетонски екстракт плода.

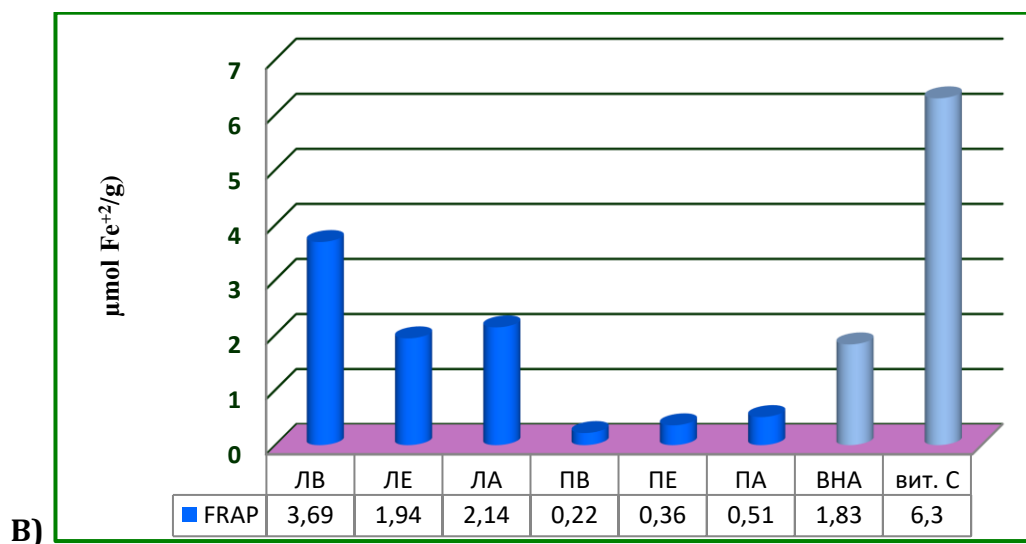
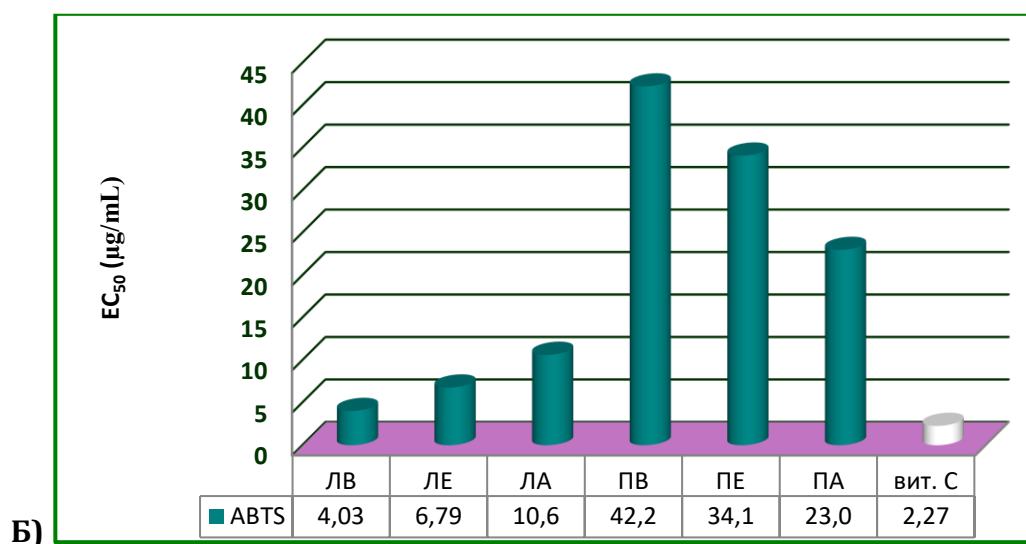
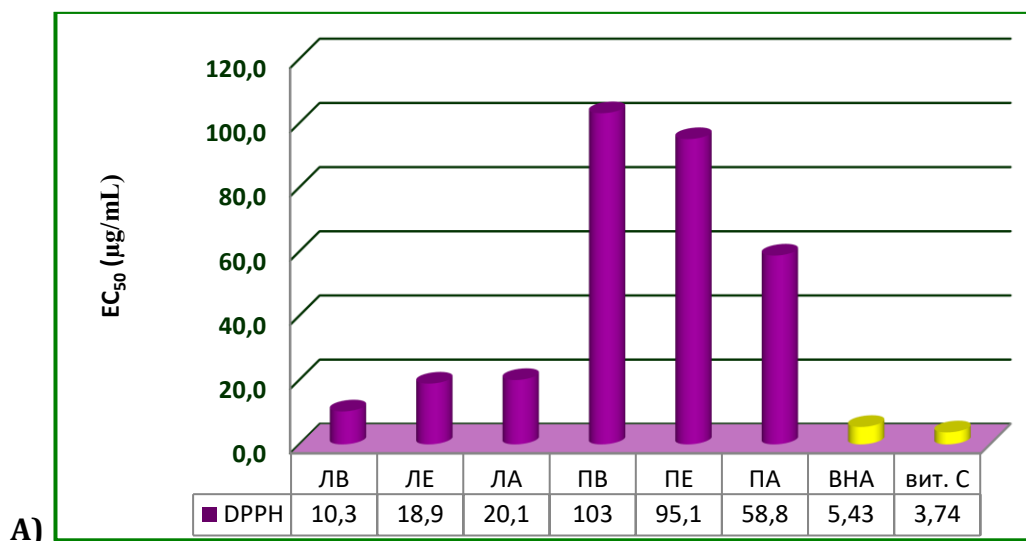
Екстракти листова и етанолни екстракт плода *P. mahaleb* су показали слабији антиоксидантни потенцијал у односу на одговарајуће екстракте *P. spinosa*. Насупрот томе, водени и ацетонски екстракт плода *P. mahaleb* су се истакли бољом антиоксидантном активношћу у свим тестовима него исти екстракти *P. spinosa*. Најефикаснији антиоксиданти међу екстрактима врсте *P. mahaleb* су били водени и етанолни екстракт листа, док је међу узорцима *P. spinosa* то био ацетонски екстракт листа.

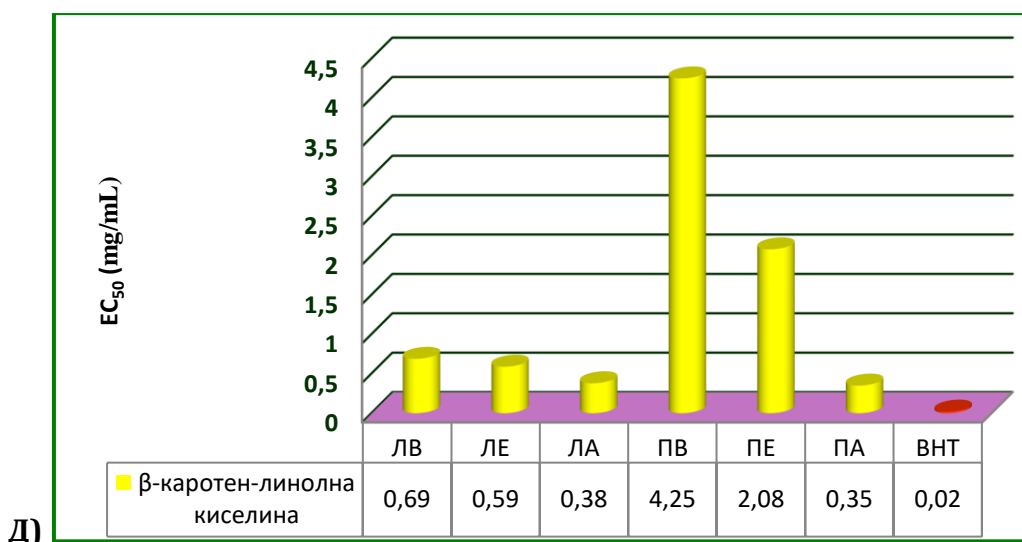
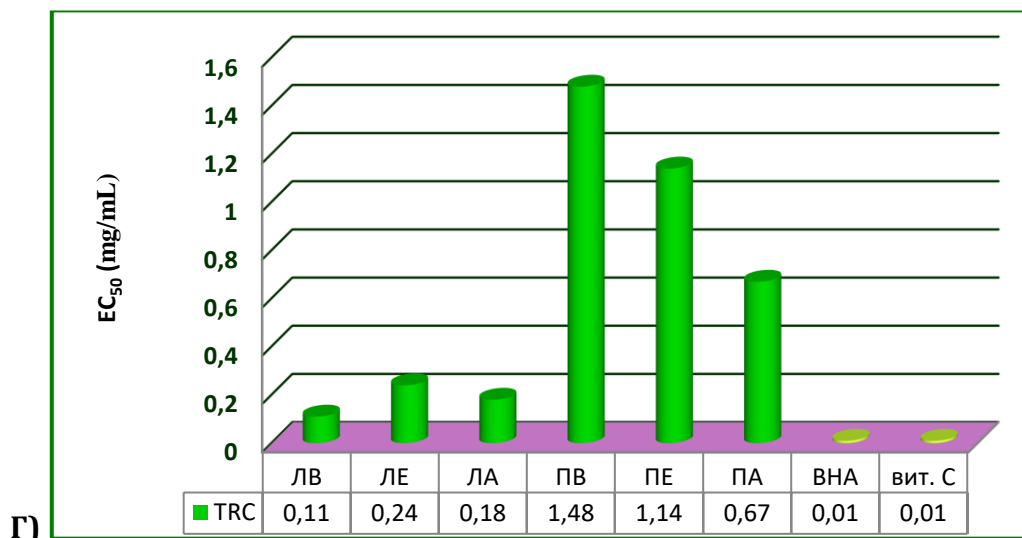
Екстракти листова и плодова *R. serpens* су се у свим тестовима углавном показали као ефикаснији антиоксидантни агенси у односу на одговарајуће екстракте *R. discolor*.

За разлику од спектрофотометријски одређеног укупног садржаја фенола и флавоноида који су умерено до јако били корелисани са свим употребљеним антиоксидантним методама, садржаји укупних антоцијана и њихових мономера су слабо до умерено утицали на антиоксидантну активност екстраката (**Табела 13**). Слабе до умерене корелације су такође установљене између количине квантификованих фенола и хидрокси-бензоевих киселина и антиоксидантне активности, док су хидрокси-циметне киселине снажно корелисале са DPPH ($r = -0,80$), ABTS ($r = -0,80$), TRC ($r = -0,78$) и β-каротен/линолна киселина тестом ($r = -0,75$), а умерено са FRAP методом ($r = 0,52$).

Слично резултатима добијеним за претходну врсту овог рода, ниске вредности Пирсонових коефицијената корелације су утврђени између протокатехинске киселине и свих антиоксидантних тестова. Слабе корелације су установљене и између галне и хлорогенске киселине са једне стране и вредности добијених за FRAP тест ($r = 0,22$ и $0,20$, редом). Насупрот томе, преостале доминантне фенолне киселине су биле умерено до јако корелисане са антиоксидантном активношћу екстраката листова и плодова ове врсте купине.

Високе вредности Пирсонових коефицијената корелације су добијене за релације међу антиоксидантним тестовима, изузев за релацију β-каротен/линолна киселина-FRAP тест ($r = -0,56$).





ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; EC_{50} – ефективна концентрација (концентрација при којој долази до смањења концентрације слободних радикала за 50% у DPPH, ABTS и β-каротен/линолна киселина тесту, односно до пораста апсорбанце до 0,5 у TRC тесту); $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$ – резултати FRAP теста изражени у еквивалентима $\mu\text{mol Fe}^{+2}$ по граму сувог екстракта; резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна експеримента \pm стандардна девијација (SD);

Слика 25. Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Rubus serpens* добијени DPPH (А), ABTS (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β-каротен/линолна киселина (Д) методом.

Табела 13. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *R. serpens*.

<i>r</i>	DPPH	ABTS	FRAP	TRC	β -каротен/ линолна киселина
Садржаји укупних (спектрофотометријски)					
Фенола	-0,97 ^c	-0,95 ^c	0,92 ^c	-0,95 ^c	-0,72 ^c
флавоноида	-0,64 ^b	-0,59 ^b	0,45 ^b	-0,64 ^b	-0,48 ^b
антоцијана	0,33 ^a	0,31 ^a	-0,51 ^b	0,22 ^a	-0,23 ^a
мономерних антоцијана	0,42 ^b	0,35 ^a	-0,56 ^b	0,27 ^a	-0,22 ^a
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)					
Фенола	0,57 ^b	0,48 ^b	-0,55 ^b	0,45 ^b	0,13 ^a
хидрокси-бензоевих киселина	-0,41 ^b	-0,38 ^b	0,07 ^a	-0,35 ^a	-0,28 ^a
хидрокси-циметних киселина	-0,80 ^c	-0,80 ^c	0,52 ^b	-0,78 ^c	-0,75 ^c
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)					
протокатехинска киселина	-0,18 ^a	-0,16 ^a	-0,17 ^a	-0,13 ^a	-0,09 ^a
гална киселина	-0,54 ^b	-0,51 ^b	0,22 ^a	-0,48 ^b	-0,40 ^b
кафена киселина	-0,98 ^c	-0,98 ^c	0,85 ^c	-0,99 ^c	-0,87 ^c
хлорогенска киселина	-0,62 ^b	-0,62 ^b	0,20 ^a	-0,60 ^b	-0,73 ^c
Антиоксидантна активност					
β -каротен/линолна киселина	0,81 ^c	0,81 ^c	-0,56 ^b	0,88 ^c	1 ^c
TRC	-0,99 ^c	-0,99 ^c	-0,85 ^c	1 ^c	
FRAP	0,89 ^c	0,89 ^c	1 ^c		
ABTS	0,99 ^c	1 ^c			
DPPH	1 ^c				

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Екстракти листова свих испитиваних врста су испољили статистички значајно боља антиоксидантна својства у односу на плодове и у DPPH и у ABTS тесту. Такође, може се уочити да су екстракти врста рода *Rubus* успешније неутралисали наведене слободне радикале у односу на екстракте врста рода *Prunus*. Ацетонски екстракт плода *P. spinosa* се показао као најслабији антиоксидант (EC₅₀ 606 $\mu\text{g/mL}$ и 348 $\mu\text{g/mL}$ у DPPH и ABTS тесту, редом).

С друге стране, екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens* су показали изузетна антиоксидантна својства у поређењу са референтним једињењем. Посебно се истакао водени екстракт листа *R. serpens* који је у оба теста имао најниже вредности EC₅₀ (10,3 $\mu\text{g/mL}$ у DPPH и 4,03 $\mu\text{g/mL}$ у ABTS тесту). За стандарде који су употребљени као позитивна контрола су добијене следеће вредности EC₅₀: DPPH – 3,74 $\mu\text{g/mL}$ и 5,43 $\mu\text{g/mL}$ за витамин С и ВНА, редом; ABTS – 2,27 $\mu\text{g/mL}$ за витамин С.

FRAP тестом је испитивана антиоксидантна активност екстраката путем редукције Fe⁺³ у Fe⁺² форму. Најбољу редукциону моћ је показао водени екстракт листа *R. serpens* (3,69 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$), насупрот етанолном екстракту плода *P. mahaleb* (0,01 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$) и воденом екстракту плода *P. spinosa* (0,01 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$). Када се упореди редукциона моћ екстраката различитих биљних врста и органа, уочава се исти поредак као и у претходним тестовима. Вредности за позитивну контролу, ВНА и L-аскорбинску киселину (витамин С), су биле 1,83 и 6,30 $\mu\text{mol Fe}^{+2}/\text{g}$, редом, што указује на већи антиоксидантни потенцијал појединих екстраката у односу на ВНА.

TRC је још један тест који је употребљен за евалуацију редукционе моћи испитиваних екстраката. Резултати су презентовани путем вредности EC₅₀ (mg/mL). Нижа вредност EC₅₀ указује на већу редукциону способност екстракта. Поново су се плодови показали као слабији антиоксиданти од листова, а добијене вредности EC₅₀ су

биле у опсегу од 0,11 mg/mL за водени екстракт листа *R. serpens* до 8,35 mg/mL за ацетонски екстракт плода *P. spinosa*. Слично претходним тестовима, ВНА и витамин С су употребљени као референтни антиоксиданти, а измерене вредности EC₅₀ су биле ниже у односу на тестиране екстракте.

Резултати β-каротен/линолна киселина теста, такође изражени путем вредности EC₅₀ су варирали у распону од 0,35 до 15,0 mg/mL. Референтни стандард, ВНТ, је испољио нижу вредност од свих испитиваних екстраката (0,02 mg/mL). И у овом тесту су екстракти плодова углавном били слабији антиоксиданти у односу на екстракте листове. За разлику од преостале четири методе, најбоља антиоксидантна својства у β-каротен/линолна киселина тесту је показао ацетонски екстракт плода *R. serpens*. Екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens*, као и етанолни и ацетонски екстракт плода *R. serpens* су у појединим тестовима испољили слично дејство као стандард.

Многи истраживачи су доказали антиоксидантна својства *P. mahaleb* која су објашњавана високим садржајем одређене групе фенолних једињења или укупне концентрације фенола (Oskoueian и сар., 2012; Ozturk и сар., 2014; Taghizadeh и сар., 2015; Gerardi и сар., 2015; Mikulic-Petkovsek и сар., 2016; Popović и сар., 2021).

Корелације установљене у овој студији између спектрофотометријски одређеног садржаја фенола, флавоноида, антоцијана с једне стране, и резултата антиоксидантне активности са друге, потврђују утицај концентрације ових група секундарних метаболита на антиоксидантна својства. Међутим, корелација између концентрације фенола, хидрокси-бензоевих и хидрокси-циметних киселина одређене LC-MS/MS методом и антиоксидантне активности су у супротности са наведеном тврдњом. Иако је LC-MS/MS метода прецизнија од протокола за евалуацију укупних садржаја, њом нису квантификована сва фенолна једињења присутна у узорку.

У раду Fraternali и сар. (2009) утврђена је значајна антиоксидантна активност свежег сока плодова *P. spinosa* која је објашњена присуством фенолних једињења, првенствено антоцијана.

Barros и сар. (2010) су потврдили антиоксидантно дејство екстракта плода ове врсте, али је оно било слабије у односу на екстракте плодова других врста које су испитиване у истом раду. Слично као и претходници, и Barros и сар. (2010) су антиоксидантну активност приписали фенолима и флавоноидима.

Radovanović и сар. (2013) су установили снажне корелације између укупних фенола и флавоноида са једне стране и антиоксидантне активности, одређене DPPH тестом, са друге стране. Осим тога, појединачне фенолне киселине су на исти начин корелирале са вредностима DPPH теста, што је подударно са резултатима ове докторске дисертације. До сличних резултата су дошли и други аутори (Pinacho и сар., 2015; Stanković и сар., 2019; Popović и сар., 2020, 2021).

Tahirović и сар. (2018) су сугерисали да осим садржаја укупних фенола/флавоноида на антиоксидантну активност значајно утиче избор екстрактанта, а у наведеној студији се у том смислу најбољим показао 50% етанол. Утицај поларности растварача на антиоксидантна својства екстракта цветова *P. spinosa* су потврдили Marchelак и сар. (2017).

Резултати истраживања Veličković и сар. (2014) указују на ниску корелираност антиоксидантних својстава *P. spinosa* и садржаја укупних фенола, на основу чега су аутори закључили да су за антиоксидантну активност ове врсте, осим фенола, одговорне и неке друге биоактивне компоненте, попут витамина (Veličković и сар., 2014). Ипак, у наведеном раду, садржај укупних флавоноида је снажно корелирао са

вредностима добијеним у DPPH тесту, што је у сагласности са овде презентованим резултатима за екстракте плодова.

Keser и сар. (2015) су процењивали антиоксидантна својства различитих биљних делова *R. discolor* помоћу разних *in vitro* протокола. Према резултатима ових аутора, водени и етанолни екстракти листова су ефикасније неутралисали DPPH и ABTS слободне радикале него екстракти незрелих и зрелих плодова. Поред тога, показали су и јачу редукциону моћ у TRC тесту, што је у сагласности са резултатима ове дисертације. Поред екстраката листова и екстракти цветова *R. discolor* су се показали као моћни антиоксидантни агенси. Према резултатима Keser и сар. (2015), екстракти листова и цветова ове врсте су у DPPH тесту били ефикаснији од стандардног антиоксиданта, ВНТ, а у ABTS тесту и од токоферола. У TRC методи, етанолни екстракт листа *R. discolor* је показао готово исту активност као токоферол, а водени екстракт цвета као ВНТ, при чему је био чак активнији од токоферола. Ипак, најбољим антиоксидантом, у студији поменутих аутора, се показао етанолни екстракт цвета који је у овом тесту био двоструко активнији од ВНА, више него троструко од ВНТ и четвороструко од токоферола.

Muniyandi и сар. (2019) су доказали антиоксидантна својства различитих екстраката плодова *R. ellipticus*, *R. niveus* и *R. fairholmianus*. Најбољу антиоксидантну активност у DPPH, ABTS и FRAP тесту показао је метанолни екстракт *R. ellipticus*, потом *R. niveus*, док су се екстракти *R. fairholmianus* показали као најслабији антиоксиданти. Референтна једињења, рутин и ВНТ, су испољила јачи антиоксидантни ефекат у DPPH и FRAP тесту, за разлику од ABTS теста. На основу корелационе анализе, аутори су антиоксидантна својства екстраката ове три врсте приписали фенолним једињењима, флавоноидима, антоцијанима и танинима.

Schulz и сар. (2019) су установили да се разлика у фитохемијском саставу *R. ulmifolius* одражава и на антиоксидантна својства. Наиме, количина фенолних једињења неантоцијанинске природе опада током сазревања, за разлику од количине антоцијана. С обзиром на то да су потпуно зрели плодови показали боља антиоксидантна својства, аутори су закључили да су за њих одговорни антоцијани. Такође, сугерисали су да би витамин С у значајној мери могао допринети показаној антиоксидантној активности будући да се његова концентрација повећава током сазревања.

Насупрот Schulz и сар. (2019), Samaniego и сар. (2020) су уочили да у култиварима *R. glaucus* долази до пада антиоксидантне активности, што су аутори проценили на основу резултата ABTS и FRAP теста. Према овим ауторима, до смањења антиоксидантне активности долази због смањења концентрације фенолних једињења.

Вредности EC_{50} у DPPH тесту су варирале од 110,17 до 199,18 $\mu\text{g/mL}$ и од 246,09 до 489,60 $\mu\text{g/mL}$ за екстракте листова и плодова *R. idaeus*, редоследом (Veljković и сар., 2019). Већа ефикасност екстраката листова у неутралисању DPPH слободних радикала презентована у поменутом раду је у сагласности са резултатима добијеним у оквиру ове студије.

Водени, метанолни и етил-ацетатни екстракти листова *R. ibericus* су у различитим методама показали боља антиоксидантна својства у односу на одговарајуће екстракте *R. sanctus* (Zengin и сар., 2019). Према резултатима тог истраживања, антиоксидантна активност у DPPH, ABTS и FRAP тесту расте са поларношћу растварача. Аутори ове студије су антиоксидантна својства *R. ibericus* и *R. sanctus* приписали фенолним једињењима.

Боља антиоксидантна активност *P. spinosa* у односу на *P. mahaleb* доказана у овој докторској дисертацији је у складу са претходно објављеним резултатима (Porović и сар., 2021). Слично је и када се упореде антиоксидантна својства врста ова два рода, односно бољу антиоксидантну активност врста рода *Rubus* у односу на врсте рода *Prunus* су доказали и други аутори (Jakobek и сар., 2009). У том раду је указано да антоцијани више доприносе антиоксидантној активности врста рода *Prunus* (93,8% vs. 90,6%), за разлику од флавонола, флаван-3-ола и фенолних киселина (6,2% vs. 9,4%).

У овој докторској дисертацији употребљене су методе које се одвијају различитим механизмима реакције. Антиоксиданти могу неутралисати АВТС и DPPH слободне радикале путем трансфера водониковог атома (енгл. НАТ; *Hydrogen Atom Transfer*) или путем трансфера електрона (енгл. ЕТ; *Electron Transfer*), док се у FRAP и TRC методи процењује њихова редуциона способност ЕТ, а у β -каротен/линолна киселина тесту неутрализација насталих пероксида НАТ механизмом (Huang и сар., 2005). На основу добијених корелација између употребљених антиоксидантних метода може се установити да екстракти *P. mahaleb*, *P. spinosa* и *R. discolor* своја антиоксидантна својства испољавају путем оба механизма, али ипак незнатно више ЕТ механизмом. За разлику од претходне три врсте, антиоксиданти из екстраката *R. serpens* делују првенствено НАТ механизмом.

Успостављене корелације између фитохемијског садржаја са једне стране и антиоксидантне активности са друге стране указују да и нека друга нефенолна једињења утичу на антиоксидантна својства. Осим тога, од изузетног значаја за антиоксидантну активност је и синергизам између појединих компоненти екстраката, на шта су сугерисали и други аутори (Benvenuti и сар., 2006; Schulz и Chim, 2019; Zengin и сар., 2019).

4.2.2. Антимикробна активност и корелација са хемијским саставом

Антимикробна активност екстраката на 8 бактерија (*Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli*) и 8 микрогљива (*Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum*, *P. ochrochloron*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*) је одређена микродилуционом методом, а резултати су изражени путем вредности МИК и МБЦ/МФЦ (mg/mL). Добијени резултати су тумачени према скали (Табела 14) која се може применити за процену антимикробне активности екстраката јестивих и медицинских биљака и њихових делова, на начин описан у раду Тамокоу и сар. (2017).

У циљу утврђивања утицаја фитохемијског састава на антимикробна својства екстраката, односно на вредности МИК, прерачунати су Пирсонови коефицијенти корелације између њих.

Табела 14. Скала за процену антимикробне активности екстраката јестивих и лековитих биљака.

МИК (mg/mL)	Антимикробна активност екстракта
< 0,10	изузетна
0,10 ≤ МИК ≤ 0,71	значајна
0,71 < МИК ≤ 2,84	умерена
> 2,84	слаба
> 10	нема активности

Преузето са изменама од Тамокоу и сар. (2017).

P. mahaleb

Антибактеријска активност различитих екстраката листова и плодова *P. mahaleb* је приказана у **Табели 15**.

Може се уочити да су испитивани екстракти инхибирали раст патогених G⁺ и G⁻ бактерија, при концентрацијама од 0,36 до 22,7 mg/mL, док су при концентрацијама од 0,71 до 45,4 mg/mL деловали бактерицидно. Испитивани екстракти су ефикасније деловали на G⁺ него на G⁻ бактерије.

Патогене бактерије су биле најосетљивије на дејство етанолног екстракта листа ове врсте, који је значајно антибактеријско дејство имао на G⁺ *B. cereus* и *M. flavus* (МИК/МБЦ 0,36/0,71 mg/mL) и G⁻ *P. aeruginosa* (МИК/МБЦ 0,71/1,42 mg/mL) и умерено дејство на преостале испитиване бактеријске сојеве.

Умерену активност је показао и водени екстракт листа на *E. cloacae* (МИК 2,84 mg/mL). Слабу антибактеријску активност су испољили водени екстракт листа на *B. cereus*, *M. flavus*, *S. Typhimurium* и етанолни екстракт плода на *B. cereus* и *E. cloacae*.

Тестиране бактерије су биле најотпорније на дејство етанолног екстракта плода који је слаб антибактеријски ефекат испољио само на *B. cereus* (МИК 5,68 mg/mL), док је био неделотворан на преостале патогене бактерије.

Вредности МИК и МФЦ екстраката *P. mahaleb* су варирале од 0,69 до 23,2 mg/mL, односно од 1,38 до 46,3 mg/mL (**Табела 16**).

Тестиране микромицете су биле најосетљивије на утицај воденог екстракта листа, док су најрезистентније биле на етанолни екстракт плода.

Умерени, односно значајни антифунгални ефекат су испољили етанолни и водени екстракт листа на *A. versicolor* (МИК/МФЦ 0,69/1,38 и 2,76/5,53 mg/mL, редом).

МИК/МФЦ вредности за водени екстракт листа за *Trichoderma viride* (2,87/5,73 mg/mL) су биле блиске граничној вредности за умерену активност. Испитивани екстракти су слабо инхибирали раст већине патогених микромицета и били су неактивни на *A. fumigatus*.

Садржаји укупних фенола, флавоноида и антоцијана су претежно умерено до јако корелирали са бактериостатичким концентрацијама (**Табела 17**). Слаба корелација је уочена једино између садржаја укупних фенола/флавоноида и вредности МИК за *L. monocytogenes*, док је између садржаја укупних антоцијана и вредности МИК за *B. cereus* и *P. aeruginosa* примећено потпуно одсуство корелације.

С друге стране, количина квантификованих фенолних једињења је снажно корелирала са дејством на *L. monocytogenes* (r 0,79), умерено са *S. aureus* (r 0,47) и *S. Typhimurium* (r 0,44), а слабо са свим осталим тестираним бактеријама. Концентрација квантификованих хидрокси-бензоених киселина је јако корелирала са бактериостатичким ефектима према *M. flavus* (r 0,73), *E. cloacae* (r 0,79), *S. Typhimurium* (r 0,88) и *E. coli*, (r 0,77), а умерено са бактериостатичким дејством на *S. aureus* (r 0,48). Између количине хидрокси-циметних киселина и вредности МИК за *L. monocytogenes* установљена је снажна негативна корелација (r -0,78), а умерена за вредности МИК за *S. aureus* и *S. Typhimurium* (r 0,38 и 0,47, редом).

Концентрација протокатехинске киселине у екстрактима *P. mahaleb* је јако позитивно корелирала са вредностима МИК за *M. flavus*, *E. cloacae*, *S. Typhimurium* и *E. coli*, док је количина галне киселине снажно позитивно корелирала са бактериостатичким концентрацијама за све патогене врсте бактерија, осим за *L.*

monocytogenes и *E. cloacae* са којима је слабо корелирала. За разлику од доминантних хидрокси-бензоевих киселина, доминантне хидрокси-циметне киселине су снажно негативно корелирале са појединим бактериостатичким концентрацијама: *p*-кумаринска са *L. monocytogenes* ($r -0,71$), а *o*-кумаринска са свим вредностима МИК за све тестиране бактерије изузев *L. monocytogenes* ($r -0,24$).

Између спектрофотометријски одређеног садржаја укупних фенола и фунгистатичких концентрација за врсте *A. versicolor*, *P. ochrochloron* и *P. verrucosum* var. *cyclopium* успостављене су велике вредности Пирсонових коефицијената корелације (Табела 18). Концентрација флавоноида је снажно корелирала са вредностима МИК за *A. versicolor* ($r -0,89$) и *P. verrucosum* var. *cyclopium* ($r -0,96$), а антоцијана са вредностима МИК за *A. ochraceus* ($r -1,00$) и *T. viride* ($r -1,00$).

Количина квантификованих фенолних једињења, хидрокси-бензоевих и хидрокси-циметних киселина је углавном умерено до јако позитивно корелирала са фунгистатичким концентрацијама за тестиране микромицете, осим за *T. viride* ($r -0,08$, $0,28$, $0,08$, редоследом).

Умерене до јаке корелације су утврђене између концентрације доминантних фенолних киселина и фунгистатичких концентрација екстракта за *A. versicolor* и *P. ochrochloron*. С друге стране, количине најзаступљенијих фенолних киселина су најслабије корелирале са вредностима МИК за *A. versicolor*.

Табела 15. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		ампицилин	
	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ
Тестиране бактерије										
Грам позитивне бактерије										
<i>Bacillus cereus</i> (клинички изолат)	5,68	11,4	0,36	0,71	5,68	11,4	5,68	11,4	0,17	0,20
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	5,68	11,4	0,36	0,71	11,4	22,7	11,4	22,7	0,13	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	11,4	22,7	1,42	2,84	11,4	22,7	22,7	45,4	0,10	0,20
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC7973	11,4	22,7	1,42	2,84	11,4	22,7	22,7	45,4	0,20	0,33
Грам негативне бактерије										
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC35030	2,84	5,68	1,42	2,84	11,4	22,7	5,68	11,4	0,17	0,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IBRSP001	11,4	22,7	0,71	1,42	11,4	22,7	11,4	22,7	0,40	0,67
<i>Salmonella Typhimurium</i> ATCC13311	5,68	11,4	1,42	2,84	22,7	45,4	22,7	45,4	0,13	0,20
<i>Escherichia coli</i> ATCC35210	11,4	22,7	2,84	5,68	22,7	45,4	22,7	45,4	0,18	0,27

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МБЦ – минималне бактерицидне концентрације (mg/mL); ампицилин – позитивна контрола/комерцијално доступан антибиотик.

Табела 16. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		кетоконазол	
	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ
Тестиране микромицете										
<i>Aspergillus fumigatus</i> (хумани изолат)	11,6	23,2	23,2	46,3	23,2	46,3	23,2	46,3	0,23	0,67
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC11730	2,76	5,53	0,69	1,38	11,1	22,1	22,1	44,2	0,20	0,47
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC12066	5,73	11,5	5,74	11,5	2,87	5,73	5,74	11,5	0,20	0,27
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	5,63	11,3	22,5	45,0	5,63	11,3	22,5	45,0	0,27	0,42
<i>Trichoderma viride</i> IAM5061	2,87	5,73	5,74	11,5	5,73	11,5	2,87	5,74	0,83	2,00
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC36839	5,68	11,4	5,68	11,4	5,68	11,4	5,68	11,4	0,23	0,67
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC9112	5,48	11,0	5,48	11,0	5,48	11,0	11,0	21,9	1,33	1,67
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclospium</i> (изолат хране)	5,58	11,2	5,58	11,2	11,2	22,3	11,2	22,3	0,27	0,40

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МФЦ – минималне фунгицидне концентрације (mg/mL); кетоконазол – позитивна контрола/комерцијално доступан антимиотик.

Табела 17. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*.

<i>r</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	-0,46 ^b	-0,84 ^c	-0,73 ^c	0,15 ^a	-0,70 ^c	-0,46 ^b	-0,94 ^c	-0,86 ^c
флавоноида	-0,77 ^c	-0,99 ^c	-0,83 ^c	-0,24 ^a	-0,82 ^c	-0,77 ^c	-0,99 ^c	-0,99 ^c
антоцијана	0	0,77 ^c	-0,46 ^b	0,46 ^b	0,96 ^c	0	-0,54 ^b	0,54 ^b
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	-0,13 ^a	0,26 ^a	0,47 ^b	0,79 ^c	0,04 ^a	-0,13 ^a	0,44 ^b	0,30 ^a
хидрокси-бензоевих киселина	0,29 ^a	0,73 ^c	0,48 ^b	-0,12 ^a	0,79 ^c	0,29 ^a	0,88 ^c	0,77 ^c
хидрокси-циметних киселина	-0,19 ^a	0,26 ^a	0,38 ^b	-0,78 ^c	0,12 ^a	-0,19 ^a	0,47 ^b	0,30 ^a
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	0,39 ^b	0,79 ^c	0,49 ^b	0,02 ^a	0,87 ^c	0,38 ^b	0,92 ^c	0,82 ^c
гална киселина	0,70 ^c	0,70 ^c	0,97 ^c	-0,15 ^a	0,17 ^a	0,70 ^c	0,70 ^c	0,70 ^c
<i>p</i> -кумаринска киселина	0,02 ^a	0,14 ^a	0,61 ^b	-0,71 ^c	-0,36 ^b	0,02 ^a	0,18 ^a	0,15 ^a
<i>o</i> -кумаринска киселина	-0,79 ^c	-0,99 ^c	-0,85 ^c	-0,24 ^a	-0,80 ^c	-0,79 ^c	-0,99 ^c	-1,00 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Табела 18. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*.

<i>r</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	-0,66 ^b	-0,93 ^c	0,41 ^b	-0,22 ^a	0,04 ^a	N/A	-0,72 ^c	-0,98 ^c
флавоноида	-0,35 ^a	-0,89 ^c	0,52 ^b	0,16 ^a	0,21 ^a	N/A	-0,59 ^b	-0,96 ^c
антоцијана	0,54 ^b	-0,04 ^a	-1,00 ^c	-0,46 ^b	1,00 ^c	0	-0,46 ^b	0,54 ^b
мономерних антоцијана	/	/	/	/	/	/	/	/
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	0,75 ^c	0,73 ^c	0,22 ^a	0,84 ^c	-0,08 ^a	N/A	0,84 ^c	0,54 ^b
хидрокси-бензоевих киселина	0,80 ^c	0,77 ^c	-0,60 ^b	0,17 ^a	0,27 ^a	N/A	0,49 ^b	0,95 ^c
хидрокси-циметних киселина	0,85 ^c	0,69 ^c	0,10 ^a	0,82 ^c	0,08 ^a	N/A	0,75 ^c	0,58 ^b
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	0,73 ^c	0,75 ^c	-0,69 ^c	0,03 ^a	0,27 ^a	N/A	0,42 ^b	0,96 ^c
гална киселина	N/A	0,97 ^c	0,27 ^a	0,27 ^a	-0,97 ^c	0	0,97 ^c	0,70 ^c
<i>p</i> -кумаринска киселина	0,21 ^a	0,62 ^b	0,68 ^c	0,77 ^c	-0,61 ^b	N/A	0,91 ^c	0,20 ^a
<i>o</i> -кумаринска киселина	-0,31 ^a	-0,90 ^c	0,49 ^b	0,16 ^a	0,26 ^a	N/A	-0,61 ^b	-0,95 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

P. spinosa

За анализиране екстракте *P. spinosa* добијене су вредности за МИК од 1,42 до 22,7 mg/mL и МБЦ од 2,84 до 45,4 mg/mL (**Табела 19**).

Испитивани екстракти су незнатно били ефикаснији против G⁻ него G⁺ бактерија. *B. cereus* и *E. cloacae*, са вредностима МИК/МБЦ 1,42/2,84 mg/mL и 2,84/5,68 mg/mL, редом, су биле најосетљивије међу G⁺ односно G⁻ бактеријама, посебно на етанолни екстракт листа. За разлику од наведених, преостале испитиване бактерије су биле резистентне на дејство екстракта листа.

Слабу антибактеријску активност су показали и преостали испитивани екстракти на исте патогене. Етанолни екстракт плода *P. spinosa* је испољио слабо антибактеријско дејство на све тестиране бактеријске сојеве. Тестиране бактерије су биле најотпорније на дејство воденог екстракта плода, који је слабо инхибирао раст искључиво *E. cloacae*.

Екстракти ове врсте су испољили слабо антифунгално дејство (**Табела 20**). МИК вредности су биле у опсегу од 2,74 до 23,2 mg/mL, док су се вредности МФЦ кретале од 5,48 до 46,3 mg/mL.

Екстракти плодова су се показали као слабији фунгистатици у односу на екстракте листова. Иако се водени екстракт плода одликовао неефикасношћу на претходно тестиране бактерије, показао је слабу делотворност на *T. viride* (МИК/МФЦ 2,87/5,73 mg/mL), *P. ochlochloron* (МИК/МФЦ 5,48/11,0 mg/mL) *P. funiculosum* (МИК/МФЦ 5,68/11,4 mg/mL) и *A. ochraceus* (МИК/МФЦ 5,73/11,5 mg/mL).

Микромицета *T. viride* је била најосетљивија на дејство екстраката ове врсте, при чему се поред воденог екстракта плода, посебно истакао и водени екстракт листа за који су добијене идентичне вредности МИК/МФЦ. Осим на *T. viride*, водени екстракт листа је дејство слично воденом екстракту плода испољио и на друге испитиване микромицете. Етанолни екстракт листа је показао умерено добру активност на *P. funiculosum* и *P. ochrochloron*, док је на исте сојеве етанолни екстракт плода имао слабо дејство.

Између садржаја укупних фенола одређеног спектрофотометријски и LC-MS/MS методом, флавоноида, хидрокси-бензоених и хидрокси-циметних киселина као и појединачних једињења у оквиру ових група секундарних метаболита с једне стране и бактериостатичких концентрација за *M. flavus*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* и *E. coli* с друге стране успостављене су јаке позитивне корелације (**Табела 21**). Позитивне корелације осредње јачине су утврђене између наведених категорија фитоједињења и вредности МИК за *B. cereus*, *E. cloacae* и *P. aeruginosa*, осим за следеће парове *E. cloacae/p*-хидрокси-бензоена ($r = -0,32$), *E. cloacae*/кафена ($r = -0,10$) и *E. cloacae*/хлорогенска киселина ($r = -0,10$), као и за *P. aeruginosa*/кафена ($r = 0,28$) и *P. aeruginosa*/хлорогенска киселина ($r = 0,28$).

Све категорије фитохемијског профила су јако позитивно корелирале са фунгистатичким концентрацијама за *A. fumigatus*, а негативно за *P. verrucosum* var. *cycloprum*, умерено негативно за *A. ochraceus* и слабо негативно за *T. viride* (**Табела 22**). Корелације осредње јачине су уочене између садржаја фенола/флавоноида, концентрације фенола/фенолних киселина добијене LC-MS/MS методом и инхибиторних концентрација за *A. versicolor*, *A. niger*, *P. funiculosum* и *P. ochrochloron*. С друге стране појединачне најзаступљеније фенолне киселине, *p*-хидрокси-бензоена, кафена и хлорогенска, су слабо корелирале са наведеним микрогљивама.

Табела 19. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		ампицилин	
	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ
Тестиране бактерије										
<i>Грам позитивне бактерије</i>										
<i>Bacillus cereus</i> (клинички изолат)	5,68	11,4	2,84	5,68	11,4	22,7	5,68	11,4	0,17	0,20
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	22,7	45,4	11,4	22,7	11,4	22,7	5,68	11,4	0,13	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	22,7	45,4	11,4	22,7	11,4	22,7	5,68	11,4	0,10	0,20
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC7973	22,7	45,4	11,4	22,7	11,4	22,7	5,68	11,4	0,20	0,33
<i>Грам негативне бактерије</i>										
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC35030	5,68	11,4	1,42	2,84	5,68	11,4	5,68	11,4	0,17	0,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IBRSP001	11,4	22,7	22,7	45,4	11,4	22,7	5,68	11,4	0,40	0,67
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC13311	22,7	45,4	22,7	45,4	11,4	22,7	5,68	11,4	0,13	0,20
<i>Escherichia coli</i> ATCC35210	22,7	45,4	22,7	45,4	11,4	22,7	5,68	11,4	0,18	0,27

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МБЦ – минималне бактерицидне концентрације (mg/mL); ампицилин – позитивна контрола/комерцијално доступан антибиотик.

Табела 20. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		кетоконазол	
	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ
Тестиране микромицете										
<i>Aspergillus fumigatus</i> (хумани изолат)	23,2	46,3	11,6	23,2	11,6	23,2	11,6	23,2	0,23	0,67
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC11730	11,1	22,1	22,1	44,2	11,1	22,1	11,1	22,1	0,20	0,47
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC12066	5,73	11,5	11,5	22,9	5,73	11,5	22,9	45,9	0,20	0,27
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	11,3	22,5	22,5	45,0	11,3	22,5	11,3	22,5	0,27	0,42
<i>Trichoderma viride</i> IAM5061	2,87	5,73	5,74	11,5	2,87	5,73	5,74	11,5	0,83	2,00
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC36839	5,68	11,4	2,84	5,68	5,68	11,4	5,68	11,4	0,23	0,67
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC9112	5,48	11,0	2,74	5,48	5,48	11,0	5,48	11,0	1,33	1,67
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (изолат хране)	5,58	11,2	11,2	22,3	11,2	22,3	11,2	22,3	0,27	0,40

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МФЦ – минималне фунгицидне концентрације (mg/mL); кетоконазол – позитивна контрола/комерцијално доступан антимиотик.

Табела 21. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa*.

<i>r</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Укупни садржаји (спектрофотометријски)								
фенола	-0,61 ^b	0,79 ^c	0,79 ^c	0,79 ^c	-0,43 ^b	0,58 ^b	0,95 ^c	0,95 ^c
флавоноида	-0,73 ^c	0,57 ^b	0,57 ^b	0,56 ^b	-0,71 ^c	0,79 ^c	0,95 ^c	0,95 ^c
Укупни садржаји (LC-MS/MS)								
фенола	-0,62 ^b	0,78 ^c	0,78 ^c	0,78 ^c	-0,44 ^b	0,58 ^b	0,95 ^c	0,95 ^c
хидрокси-бензоєвих киселина	-0,61 ^b	0,79 ^c	0,79 ^c	0,79 ^c	-0,44 ^b	0,59 ^b	0,96 ^c	0,96 ^c
хидрокси-циметних киселина	-0,64 ^b	0,78 ^c	0,78 ^c	0,78 ^c	-0,43 ^b	0,56 ^b	0,94 ^c	0,94 ^c
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)								
<i>p</i> -хидрокси-бензоєва киселина	-0,57 ^b	0,84 ^c	0,84 ^c	0,84 ^c	-0,32 ^a	0,49 ^b	0,93 ^c	0,93 ^c
кафена киселина	-0,44 ^b	0,92 ^c	0,92 ^c	0,92 ^c	-0,10 ^a	0,28 ^a	0,83 ^c	0,83 ^c
хлорогенска киселина	-0,43 ^b	0,92 ^c	0,92 ^c	0,92 ^c	-0,10 ^a	0,28 ^a	0,84 ^c	0,84 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Табела 22. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa*.

<i>r</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Укупни садржаји (спектрофотометријски)								
фенола	0,70 ^c	0,43 ^b	-0,47 ^b	0,43 ^b	-0,13 ^a	-0,43 ^b	-0,43 ^b	-0,70 ^c
флавоноида	0,43 ^b	0,71 ^c	-0,35 ^a	0,71 ^c	0,12 ^a	-0,71 ^b	-0,71 ^c	-0,43 ^b
Укупни садржаји (LC-MS/MS)								
фенола	0,70 ^c	0,44 ^b	-0,45 ^b	0,44 ^b	-0,12 ^a	-0,44 ^b	-0,44 ^b	-0,70 ^c
хидрокси-бензоевих киселина	0,70 ^c	0,44 ^b	-0,48 ^b	0,44 ^b	-0,13 ^a	-0,44 ^b	-0,44 ^b	-0,70 ^c
хидрокси-циметних киселина	0,70 ^c	0,43 ^b	-0,44 ^b	0,43 ^b	-0,10 ^a	-0,43 ^b	-0,43 ^b	-0,70 ^c
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)								
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	0,78 ^c	0,33 ^a	-0,48 ^b	0,33 ^a	-0,20 ^a	-0,33 ^a	-0,33 ^a	-0,78 ^c
кафена киселина	0,90 ^c	0,10 ^a	-0,49 ^b	0,10 ^a	-0,34 ^a	-0,10 ^a	-0,10 ^a	-0,90 ^c
хлорогенска киселина	0,90 ^c	0,10 ^a	-0,51 ^b	0,10 ^a	-0,36 ^a	-0,10 ^a	-0,10 ^a	-0,90 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

R. discolor

Измерене вредности за МИК и МБЦ за екстракте врсте *R. discolor* су приказане у **Табели 23**.

Екстракти листова су се показали као потентнији антибактеријски агенси у односу на плодове. Такође, ефективнији су били етанолни екстракти, него водени.

Међу тестираним бактеријама, дејством екстраката *R. discolor* су највише биле погођене *E. cloacae*, *S. Typhimurium* и *L. monocytogenes* на које су сви екстракти, са изузетком воденог екстракта плода, показали значајну до умерену активност. Значајну антибактеријску активност је испољио и водени екстракт листа на *B. cereus*, као и етанолни екстракт листа на *B. cereus*, *M. flavus* и *E. cloacae*.

Посебно јако антибактеријско дејство је показао етанолни екстракт листа на *B. cereus* за који су установљене бактериостатичке и бактерицидне концентрације (МИК/МБЦ 0,18/0,36 mg/mL) биле блиске вредностима за контролу (ампицилин) (МИК/МБЦ 0,17/0,20 mg/mL).

Водени екстракт листа је умерени бактериостатички ефекат, осим на поменуте бактерије, имао и на *S. aureus* и *P. aeruginosa*, етанолни екстракт листа на *S. aureus*, а етанолни екстракт плода на *M. flavus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*.

Грам негативна бактерија *E. coli* је била резистентна на дејство осталих екстраката ове врсте. Поред тога, све испитиване бактерије, осим *B. cereus* су биле отпорне на дејство воденог екстракта плода.

Резултати антифунгалне активности екстраката листова и плодова *R. discolor* указују на фунгистатички и фунгицидни ефекат при концентрацијама од 1,09 до 22,5 mg/mL и 2,17 до 45,0 mg/mL, респективно (**Табела 24**).

Умерено антифунгално дејство поседовао је водени екстракт листа на *A. niger* (МИК/МФЦ 1,40/2,82 mg/mL) и *A. versicolor* (МИК/МФЦ 2,76/5,53 mg/mL).

Водени екстракт плода је умерено фунгистатички деловао на све тестиране микромицете осим *A. fumigatus*, с посебном ефикасношћу на *A. versicolor* (МИК/МФЦ 1,38/2,76 mg/mL), *A. niger* (МИК/МФЦ 1,40/2,87 mg/mL), *A. ochraceus* (МИК/МФЦ 1,43/2,87 mg/mL) и *T. viride* (МИК/МФЦ 1,43/2,87 mg/mL).

Етанолни екстракт плода је највише ефекта имао на *A. niger* (МИК/МФЦ 1,09/2,17 mg/mL) и *A. ochraceus* (МИК/МФЦ 1,11/2,21 mg/mL), а поред поменутих микромицета с умереном делотворношћу је инхибирао и раст *A. versicolor*, *P. funiculosum* и *P. ochlochloron*.

На испитиване микромицете најснажније дејство је показао водени екстракт плода, а најслабије етанолни екстракт листа, што је у супротности са резултатима антибактеријске активности.

Пирсонови коефицијенти корелације презентовани у **Табели 25**. указују на углавном слабу до осредњу негативну повезаност садржаја укупних фенола/флавоноида/антоцијана и концентрација екстраката које су заустављале раст тестираних бактерија.

Јака корелација је утврђена у односу фенола/флавоноида/антоцијана и бактериостатичких концентрација за *B. cereus* (r -0,98, -0,98, 0,88, редоследом), флавоноида и вредности МИК за *E. cloacae* (r -0,69) и антоцијана/мономерних антоцијана и вредности МИК за *E. coli* (r -0,70, 1,00, респективно).

Концентрација фенолних једињења и хидрокси-бензоевих киселина су углавном слабо негативно корелирале са бактериостатичким концентрацијама тестираних бактерија, а хидрокси-циметне киселине претежно умерено негативно.

Такође, запажено је да концентрације доминантних хидрокси-бензоевих/хидрокси-циметних киселина остварују сличне корелације као и укупне концентрације квантификованих одговарајућих група фенолних киселина.

Појединачне категорије фитохемијског профила су јако корелирале са фунгистатичким концентрацијама за врсте рода *Aspergillus*, *P. funiculosum* и *P. ochrochloron*, умерено са *P. verrucosum* var. *cyclopium* и слабо негативно за *T. viride* (Табела 26).

Табела 23. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		ампицилин	
	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ
Тестиране бактерије										
<i>Грам позитивне бактерије</i>										
<i>Bacillus cereus</i> (клинички изолат)	0,71	1,42	0,18	0,36	5,68	11,4	4,38	8,77	0,17	0,20
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	5,68	11,4	0,71	1,42	22,7	45,4	2,50	2,50	0,13	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	2,84	5,68	2,84	5,68	22,7	45,4	4,38	8,77	0,10	0,20
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC7973	2,84	5,68	2,84	5,68	22,7	45,4	2,50	5,00	0,20	0,33
<i>Грам негативне бактерије</i>										
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC35030	1,42	2,84	0,71	1,42	11,4	22,7	2,19	4,38	0,17	0,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IBRSP001	2,84	5,68	5,68	11,4	11,4	22,7	2,50	5,00	0,40	0,67
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC13311	2,84	5,68	2,84	5,68	22,7	45,4	2,50	5,00	0,13	0,20
<i>Escherichia coli</i> ATCC35210	11,4	22,7	5,68	11,4	11,4	22,7	2,50	2,50	0,18	0,27

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МБЦ – минималне бактерицидне концентрације (mg/mL); ампицилин – позитивна контрола/комерцијално доступан антибиотик.

Табела 24. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		кетоконазол	
	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ
Тестиране микромицете										
<i>Aspergillus fumigatus</i> (хумани изолат)	5,79	11,6	11,6	23,2	2,89	5,79	4,47	8,94	0,23	0,67
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC11730	2,76	5,53	5,53	11,1	1,38	2,76	2,13	4,27	0,20	0,47
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC12066	2,87	5,73	11,5	22,9	1,43	2,87	1,11	2,21	0,20	0,27
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	1,40	2,82	22,5	45,0	1,40	2,82	1,09	2,17	0,27	0,42
<i>Trichoderma viride</i> IAM5061	2,87	5,73	5,74	11,5	1,43	2,87	11,3	22,5	0,83	2,00
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC36839	5,68	11,4	11,4	22,7	2,84	5,68	2,19	4,39	0,23	0,67
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC9112	5,48	11,0	5,48	11,0	2,74	5,48	2,12	4,23	1,33	1,67
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (изолат хране)	5,68	11,2	11,2	22,3	2,79	5,58	8,62	17,2	0,27	0,40

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МФЦ – минималне фунгицидне концентрације (mg/mL); кетоконазол – позитивна контрола/комерцијално доступан антимиотик.

Табела 25. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor*.

<i>r</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	-0,98 ^c	-0,55 ^b	-0,66 ^b	-0,59 ^b	-0,68 ^b	-0,42 ^b	-0,59 ^b	0,22 ^a
флавоноида	-0,98 ^c	-0,61 ^b	-0,66 ^b	-0,59 ^b	-0,69 ^c	-0,35 ^a	-0,59 ^b	0,05 ^a
антоцијана	0,88 ^c	0,13 ^a	0,34 ^a	0,26 ^a	0,34 ^a	0,24 ^a	0,26 ^a	-0,70 ^c
мономерних антоцијана	0,38 ^b	-0,52 ^b	-0,32 ^a	-0,40 ^b	-0,32 ^a	-0,42 ^b	-0,40 ^b	-0,99 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	0,59 ^b	-0,15 ^a	-0,05 ^a	-0,14 ^a	-0,08 ^a	-0,31 ^a	-0,14 ^a	-0,72 ^c
хидрокси-бензоєвих киселина	-0,57 ^b	-0,17 ^a	-0,10 ^a	-0,04 ^a	-0,17 ^a	0,29 ^a	-0,04 ^a	0,04 ^a
хидрокси-циметних киселина	-0,98 ^c	-0,56 ^b	-0,63 ^b	-0,56 ^b	-0,66 ^b	-0,33 ^a	-0,56 ^b	0,14 ^a
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	-0,16 ^a	0,16 ^a	0,28 ^a	0,33 ^a	0,22 ^a	0,63 ^b	0,33 ^a	0,05 ^a
гална киселина	-0,55 ^b	-0,09 ^a	-0,03 ^a	0,04 ^a	-0,09 ^a	0,36 ^b	0,04 ^a	0,14 ^a
кафена киселина	-0,98 ^c	-0,57 ^b	-0,63 ^b	-0,56 ^b	-0,66 ^b	-0,33 ^a	-0,56 ^b	0,12 ^a
хлорогенска киселина	-0,98 ^c	-0,54 ^b	-0,63 ^b	-0,55 ^b	-0,65 ^b	-0,34 ^a	-0,55 ^b	0,17 ^a

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Табела 26. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor*.

<i>r</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	0,73 ^c	0,72 ^c	0,65 ^b	0,53 ^b	-0,26 ^a	0,79 ^c	0,98 ^c	0,41 ^b
флавоноида	0,88 ^c	0,88 ^c	0,83 ^c	0,74 ^c	-0,16 ^a	0,92 ^c	0,96 ^c	0,58 ^b
антоцијана	-0,68 ^c	-0,68 ^c	-1,00 ^c	-0,70 ^c	0,60 ^b	-1,00 ^c	-1,00 ^c	0,25 ^a
мономерних антоцијана	-0,07 ^a	-0,07 ^a	-0,73 ^c	-0,99 ^c	0,97 ^c	-0,73 ^c	-0,73 ^c	0,80 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	-0,44 ^b	-0,44 ^b	-0,52 ^b	-0,43 ^b	0,82 ^c	-0,65 ^b	-0,83 ^c	0,13 ^a
хидрокси-бензоевих киселина	0,84 ^c	0,84 ^c	0,94 ^c	0,94 ^c	-0,30 ^a	0,92 ^c	0,64 ^b	0,47 ^b
хидрокси-циметних киселина	0,84 ^c	0,83 ^c	0,78 ^c	0,68 ^c	-0,24 ^a	0,89 ^c	0,98 ^c	0,51 ^b
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	0,57 ^b	0,58 ^b	0,74 ^c	0,79 ^c	-0,33 ^a	0,66 ^b	0,28 ^a	0,24 ^a
гална киселина	0,79 ^c	0,79 ^c	0,90 ^c	0,89 ^c	-0,40 ^b	0,89 ^c	0,65 ^b	0,37 ^b
кафена киселина	0,85 ^c	0,85 ^c	0,80 ^c	0,70 ^c	-0,22 ^a	0,91 ^c	0,98 ^c	0,53 ^b
хлорогенска киселина	0,81 ^c	0,80 ^c	0,75 ^c	0,65 ^b	-0,26 ^a	0,87 ^c	0,99 ^c	0,48 ^b

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

R. serpens

Испитивани екстракти врсте *R. serpens* су деловали на патогене бактерије заустављајући њихов раст при концентрацијама од 0,71 до 11,4 mg/mL, док су при концентрацијама од 1,42 до 22,7 mg/mL имали бактерицидни ефекат (**Табела 27**).

На основу приказаних резултата уочава се да није било значајнијих разлика у њиховом дејству на G⁺ и G⁻ бактерије. Такође, може се видети и да су се екстракти листова *R. serpens* показали као бољи антибактеријски агенси, него екстракти плодова.

Значајна антибактеријска својства су утврђена за водени и етанолни екстракт листа на Грам позитивну бактерију, *B. cereus* (МИК/МБЦ 0,71/1,42 mg/mL). Исти екстракти су испољили умерену активност на *M. flavus* и *P. aeruginosa*. Водени екстракт листа је умерено деловао и на *E. cloacae* (МИК/МБЦ 2,19/4,39 mg/mL), док је етанолни екстракт листа истим интензитетом инхибирао раст *S. aureus* (МИК/МБЦ 2,19/4,39 mg/mL) и *E. coli* (МИК/МБЦ 1,42/2,84 mg/mL). Водени екстракт плода је такође имао умерено бактериостатичко дејство на *B. cereus*, *M. flavus*, *E. cloacae* и *E. coli*.

Етанолни екстракт плода је с најмањом ефикасношћу заустављао раст тестираних бактерија, при чему је показао умерено антибактеријско дејство на *L. monocytogenes* и *E. cloacae*, а слабо на све остале тестиране бактерије осим на *M. flavus*, за коју је био неактиван.

Микродилуционом методом је установљено и фунгистатичко и фунгицидно дејство екстраката листова и плодова ове биљне врсте, а резултати су представљени у **Табели 28**.

Вредности МИК су варирале од 0,69 до 23,2 mg/mL, а МФЦ од 1,38 до 46,3 mg/mL. Најбољу антифунгалну активност је показао етанолни екстракт листа, што је у складу са резултатима антибактеријске активности. С друге стране, најмање ефикасним се показао водени екстракт плода.

Посебно значајном активношћу се издвојио водени екстракт листа на *A. versicolor* (МИК/МФЦ 0,69/1,38 mg/mL), етанолни екстракт листа умерено јаком активношћу на *P. ochrochloron* (1,37/2,74 mg/mL), *P. verrucosum* var. *cyclopium* (1,40/2,79 mg/mL), *P. funiculosum* (МИК/МФЦ 1,40/2,79 mg/mL) и *T. viride* (МИК/МФЦ 1,43/2,87 mg/mL), водени екстракт плода на *A. ochraceus* (МИК/МФЦ 1,43/2,87 mg/mL) и етанолни екстракт плода на *T. viride* (МИК/МФЦ 2,21/4,43 mg/mL).

Међу тестираним микромицетама, најотпорнијим на дејство екстраката су се показале *A. fumigatus*, *A. niger* и *P. verrucosum* var. *cyclopium*.

Концентрације екстраката *R. serpens* које су инхибирале раст тестираних патогених бактерија су углавном умерено до јако корелирале са фитохемијским саставом (**Табела 29**). Ниске вредности Пирсонових коефицијената су уочене између вредности МИК за *E. cloacae* и садржаја укупних фенола одређеног спектрофотометријски (r 0,3156) и путем LC-MS/MS методе (r -0,0447), као и концентрације мономерних антоцијана (r -0,0346). Ниска негативна корелација је постојала и између бактериостатичке концентрације за *P. aeruginosa* и протокатехинске киселине (r -0,3540). Слаба негативна корелација је такође успостављена између вредности МИК за *E. coli* и концентрације фенола (r -0,1378), као и кафеине киселине (r -0,3384). Насупрот наведеном, антифунгална активност је претежно слабо до умерено корелирала са појединим групама фитоеједињења, односно појединачним доминантним фитоеједињењима (**Табела 30**).

Табела 27. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. serpens* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		ампицилин	
	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ	МИК	МБЦ
Тестиране бактерије										
Грам позитивне бактерије										
<i>Bacillus cereus</i> (клинички изолат)	0,71	1,42	0,71	1,42	2,19	4,39	5,68	11,4	0,17	0,20
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC10240	2,19	4,39	1,42	2,84	2,19	4,39	11,4	22,7	0,13	0,15
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	4,39	8,77	2,19	4,39	4,39	8,77	5,68	11,4	0,10	0,20
<i>Listeria monocytogenes</i> NCTC7973	4,39	8,77	4,39	8,77	4,39	8,77	2,84	5,68	0,20	0,33
Грам негативне бактерије										
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC35030	2,19	4,39	4,39	8,77	2,19	4,39	2,84	5,68	0,17	0,20
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IBRSP001	2,19	4,39	2,19	4,39	4,39	8,77	5,68	11,4	0,40	0,67
<i>Salmonella</i> Typhimurium ATCC13311	4,39	8,77	4,39	8,77	4,39	8,77	5,68	11,4	0,13	0,20
<i>Escherichia coli</i> ATCC35210	4,39	8,77	1,42	2,84	2,19	4,39	5,68	11,4	0,18	0,27

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МБЦ – минималне бактерицидне концентрације (mg/mL); ампицилин – позитивна контрола/комерцијално доступан антибиотик.

Табела 28. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. serpens* добијени микродилуционом методом.

Екстракт/контрола	ЛВ		ЛЕ		ПВ		ПЕ		кетоконазол	
	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ	МИК	МФЦ
Тестиране микромицете										
<i>Aspergillus fumigatus</i> (хумани изолат)	11,6	23,2	11,6	23,2	23,2	46,3	8,94	17,9	0,23	0,67
<i>Aspergillus versicolor</i> ATCC11730	0,69	1,38	2,76	5,53	2,76	5,53	4,27	8,54	0,20	0,47
<i>Aspergillus ochraceus</i> ATCC12066	11,5	22,9	5,74	11,5	1,43	2,87	4,43	8,85	0,20	0,27
<i>Aspergillus niger</i> ATCC6275	22,5	45,0	5,63	11,3	11,3	22,5	4,35	8,69	0,27	0,42
<i>Trichoderma viride</i> IAM5061	2,87	5,74	1,43	2,87	22,9	45,9	2,21	4,43	0,83	2,00
<i>Penicillium funiculosum</i> ATCC36839	11,4	22,7	1,42	2,84	22,7	45,4	8,77	17,5	0,23	0,67
<i>Penicillium ochrochloron</i> ATCC9112	5,48	11,0	1,37	2,74	21,9	43,9	8,46	16,9	1,33	1,67
<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i> (изолат хране)	22,3	44,6	1,40	2,79	22,3	44,6	8,62	17,2	0,27	0,40

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ЛА – ацетонски екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; ПА – ацетонски екстракт плода; МИК – минималне инхибиторне концентрације (mg/mL); МФЦ – минималне фунгицидне концентрације (mg/mL).

Табела 29. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. serpens*.

<i>r</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	-0,73 ^c	-0,51 ^b	-0,56 ^b	0,49 ^b	0,32 ^a	-0,91 ^c	-0,49 ^b	-0,14 ^a
флавоноида	-0,66 ^b	-0,56 ^b	-0,94 ^c	0,49 ^b	0,85 ^c	-0,78 ^c	-0,49 ^b	-0,63 ^b
антоцијана	0,95 ^c	0,92 ^c	0,93 ^c	-0,89 ^c	-0,46 ^b	0,92 ^c	0,89 ^c	0,81 ^c
мономерних антоцијана	0,96 ^c	1,00 ^c	0,70 ^c	-1,00 ^c	-0,04 ^a	0,80 ^c	1,00 ^c	0,77 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	0,97 ^c	0,99 ^c	0,69 ^c	-1,00 ^c	-0,03 ^a	0,83 ^c	1,00 ^c	0,73 ^c
хидрокси-бензоевих киселина	-0,58 ^b	-0,59 ^b	-0,96 ^c	0,53 ^b	0,84 ^c	-0,56 ^b	-0,53 ^b	-0,87 ^c
хидрокси-циметних киселина	-0,65 ^b	-0,52 ^b	-0,91 ^c	0,46 ^b	0,84 ^c	-0,79 ^c	-0,46 ^b	-0,57 ^b
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	-0,41 ^b	-0,48 ^b	-0,87 ^c	0,41 ^b	0,82 ^c	-0,35 ^a	-0,41 ^b	-0,87 ^c
гална киселина	-0,66 ^b	-0,65 ^b	-0,99 ^c	0,59 ^b	0,83 ^c	-0,67 ^b	-0,59 ^b	-0,85 ^c
кафена киселина	-0,77 ^c	-0,74 ^c	-0,74 ^c	0,54 ^b	0,53 ^b	-0,94 ^c	-0,54 ^b	-0,34 ^a
хлорогенска киселина	-0,69 ^c	-1,99 ^c	-0,99 ^c	0,69 ^c	0,86 ^c	-0,69 ^c	-0,69 ^c	-1,00 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Табела 30. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. serpens*.

<i>r</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma viride</i>	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Penicillium ochrochloron</i>	<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>cyclopium</i>
Садржаји укупних (спектрофотометријски)								
фенола	-0,48 ^b	-0,74 ^c	0,88 ^c	0,52 ^b	-0,64 ^b	-0,59 ^b	-0,78 ^c	-0,12 ^a
флавоноида	-0,29 ^a	-0,24 ^a	0,29 ^a	-0,12 ^a	-0,47 ^b	-0,74 ^c	-0,71 ^c	-0,63 ^b
антоцијана	-0,16 ^a	0,61 ^b	-0,30 ^a	-0,28 ^a	0,05 ^a	0,28 ^a	0,34 ^a	0,12 ^a
мономерних антоцијана	-0,50 ^b	0,75 ^c	-0,22 ^a	-0,53 ^b	-0,32 ^a	-0,17 ^a	-0,06 ^a	-0,32 ^a
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)								
фенола	-0,46 ^b	0,79 ^c	-0,28 ^a	-0,57 ^b	-0,27 ^a	-0,14 ^a	-0,01 ^a	-0,33 ^a
хидрокси-бензоевих киселина	0,07 ^a	0 ^a	-0,16 ^a	-0,36 ^b	-0,09 ^a	-0,48 ^b	-0,34 ^a	-0,60 ^b
хидрокси-циметних киселина	-0,37 ^b	-0,27 ^a	0,36 ^b	-0,09 ^a	-0,54 ^b	-0,78 ^c	-0,76 ^c	-0,63 ^b
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)								
протокатехинска киселина	0,18 ^a	0,20 ^a	-0,39 ^b	-0,53 ^b	0,05 ^a	-0,38 ^b	-0,18 ^a	-0,63 ^b
гална киселина	-0,01 ^a	-0,13 ^a	-0,01 ^a	-0,24 ^a	-0,16 ^a	-0,53 ^b	-0,43 ^b	-0,57 ^b
кафена киселина	-0,44 ^b	-0,62 ^b	0,73 ^c	0,34 ^a	-0,61 ^b	-0,68 ^b	-0,80 ^c	-0,30 ^a
хлорогенска киселина	0,69 ^c	-0,14 ^a	-0,11 ^a	-0,22 ^a	-0,76 ^c	-0,88 ^c	0,98 ^c	-0,59 ^b

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Екстракти листова *P. mahaleb* су показали боље антибактеријско дејство у односу на екстракте *P. spinosa*. Екстракти листова *P. mahaleb* су деловали бактериостатички при нижим концентрацијама у односу на екстракте плодова (0,36-11,36 mg/mL vs. 5,68-22-73 mg/mL). Насупрот томе, екстракти плодова *P. spinosa* су испољили израженији бактериостатички ефекат него екстракти листова. Етанолни екстракти *P. mahaleb* и *P. spinosa* су деловали при нижим вредностима МИК/МБЦ у односу на екстракте плодова, при чему се посебно истакао етанолни екстракт листа *P. mahaleb* за који су измерене МИК/МБЦ варирале у распону од 0,36 до 2,84 mg/mL и од 0,71 до 5,68 mg/mL, редом. Екстракти *P. mahaleb* су испољили незнатно бољи антифунгални ефекат на тестиране микромицете, него екстракти *P. spinosa*.

Екстракти листова *R. discolor* су ефикасније инхибирали раст тестираних бактерија у односу на екстракте листова *R. serpens*. Снажнију активност су испољили етанолни екстракти листова за које су измерене вредности МИК биле између 0,18 и 5,68 mg/mL (*R. discolor*), односно 0,71 и 4,39 mg/mL (*R. serpens*). Када се упореде екстракти плодова ове две врсте, најбољи антибактеријски агенс је био етанолни екстракт *R. discolor*, а затим водени екстракт *R. serpens*, док је најслабију активност показао водени екстракт плода *R. discolor* на који је већина тестираних бактерија била резистентна. Насупрот резултатима антибактеријске активности, екстракти листова *R. serpens* су ефикасније заустављали раст тестираних микромицета, него екстракти листова *R. discolor*, док је за екстракте плодова ове две врсте примећен обрнут тренд. Посебно добром антифунгланом активношћу се истакао водени екстракт плода *R. discolor*, затим етанолни екстракт плода *R. discolor* и етанолни екстракт листа *R. serpens* у којима су МИК биле у опсегу од 1,38 до 2,89 mg/mL, од 1,09 до 11,26 mg/mL и од 1,37 до 11,57 mg/mL, редоследом.

Екстракти су деловали бактериостатички при концентрацијама које су се кретале у опсегу од 0,18 до 22,73 mg/mL, а бактерицидно при концентрацијама од 1,38 до 46,30 mg/mL. Вредности МИК и МБЦ за синтетички антибиотик, ампицилин, су износиле 0,10 до 0,40 mg/mL и од 0,20 до 0,67 mg/mL, респективно, указујући на претежно слабију активност екстраката. Из приложених резултата може се видети да су екстракти врста рода *Rubus* поседовали боље антибактеријске карактеристике у односу на испитиване врсте рода *Prunus*. Уколико се упореде бактериостатичке и бактерицидне концентрације водених и етанолних екстраката, уочава се да су оне биле ниже за етанолне екстракте свих испитиваних биљних врста, изузев за екстракте *R. serpens*. Такође, екстракти листова *P. mahaleb*, *R. discolor* и *R. serpens* су испољили јачу антибактеријску активност него плодови истих биљних врста, насупрот екстрактима *P. spinosa*.

Фунгистатичке и фунгицидне концентрације су биле у распону од 0,69 до 23,15 mg/mL и од 1,38 до 46,30 mg/mL, редом. Слично као и за антибактеријску активност, врсте рода *Rubus* су испољиле јаче антифунгално дејство него врсте рода *Prunus*. Вредности МИК/МФЦ за кетоконазол су биле ниже и кретале су се између 0,20 и 1,33 mg/mL и 0,27 и 2,00 mg/mL, респективно.

Слично као и за антиоксидантну активност *P. mahaleb*, антимикуробна својства ове врсте су ретко била предмет проучавања. Антибактеријски ефекат етанолног екстракта *P. mahaleb* на хумане изолате патогених бактерија проучавали су Seyyednejad и сар. (2008). У поменутом раду, екстракт *P. mahaleb* је са вишим концентрацијама инхибирао раст *B. anthracis* и *S. aureus*, док је на *B. licheniformis*, као и на Грам негативне бактерије *Brucella melitensis*, *E. coli* и *Proteus mirabilis* деловао и при нижим концентрацијама. *B. subtilis*, *B. pumilus*, *S. Typhimurium*, *Bordetella bronchiseptica* и *P. aeruginosa* су биле резистентне на дејство екстракта ове биљке. Екстракт *P. mahaleb* је

био ефективнији према Грам негативним бактеријама, међу којима је посебну осетљивост показала *P. mirabilis*, што је контрадикторно резултатима ове докторске дисертације, али и резултатима других истраживача (El-Astal и сар., 2005). Израженији антибактеријски ефекат на Грам позитивне у односу на Грам негативне бактерије се углавном објашњава постојањем ћелијског зида комплексније хемијске структуре код последњих, због чега је онемогућен улазак већих молекула (El-Astal и сар., 2005).

Özçelik и сар. (2012) су проучавали антимикуробна својства метанолних и *n*-хексанских екстраката различитих делова *P. mahaleb*. Потврђено је бактериостатичко дејство на *E. coli* и *P. mirabilis*, али и на друге Грам негативне бактерије (*P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*) при чему су ефикаснији били метанолни екстракти. Осетљивост су показале и Грам позитивна бактерија *S. aureus*, али и *B. subtilis* и *E. faecalis*.

Екстракт плода *P. mahaleb* није показао антибактеријско дејство на *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* PA14, *P. aeruginosa* PA01, *Agrobacterium tumefaciens*, *Chromobacterium violaceum*, *K. pneumoniae*, *Vibrio harveyi*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. megatorium* у експериментима које су спровели Вауганси и сар. (2013), за разлику од екстракта семена. Ипак, када су, у истом раду, ова два екстракта употребљена истовремено њихов антибактеријски ефекат је био јачи.

У оквиру ове докторске дисертације је посвећена већа пажња проучавању антифунгалног потенцијала плодова и листова *P. mahaleb*. Прегледом доступних литературних података нађене су информације о антифунгалном дејству ове биљне врсте на *Candida* sp. и *A. niger*.

У раду Özçelik и сар. (2012) метанолни и *n*-хексански екстракти цвета, цветне дршке, листа, сочног дела плода и семена су инхибирали раст *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* и *C. krusei* при чему су вредности МИК биле најниже за *C. albicans*. Према резултатима El-Nagerabi и сар. (2016), екстракт семена *P. mahaleb* је успешно инхибрирао раст плесни *A. niger*. Фунгистатичко дејство на исту врсту плесни су потврдили касније и Alzahrani и сар. (2020).

Kumarasamy и сар. (2004) су проучавали антибактеријско дејство метанолних и дихлорометанских екстраката семена *P. padus* и *P. spinosa* на 17 Грам позитивних и Грам негативних патогених бактерија. Метанолни екстракти обе врсте су показали боља антимикуробна својства, при чему је ефикаснији био метанолни екстракт семена *P. padus*. Метанолни екстракт *P. spinosa* је деловао бактериостатички на *Lactobacillus plantarum*, *S. aureus*, али и на *Citrobacter freundii*, при чему су вредности МИК износиле 5,0, 7,8 и 3,125 mg/mL. У овом раду су сви испитивани екстракти слабије деловали на тестиране бактерије у односу на антибиотик ципрофлоксацин (МИК су биле између $2,5 \times 10^{-5}$ и $2,5 \times 10^{-10}$ mg/mL).

Gündüz (2013) је проучавао дејство свежих и термички обрађених хомогенизованих плодова врсте *P. spinosa* на *Salmonella* spp. и доказао антибактеријски ефекат на ову врсту патогена, због чега су предложена опсежнија истраживања како би се добијени резултати могли применити у прехранбеној индустрији.

Детаљнија истраживања антибактеријских способности *P. spinosa* спровели су Radovanović и сар. (2013) који су испитивали дејство екстракта плодова ове врсте на по 6 Грам позитивних (*Clostridium perfringens*, *B. subtilis*, *L. innocua*, *S. aureus*, *Sarcina lutea* и *M. flavus*) и Грам негативних бактерија (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *Shigella sonnei*, *K. pneumoniae* и *P. vulgaris*) диск-дифузионом и микродилуционом методом. У наведеној публикацији резултати диск-дифузионе методе су указали да закишељени метанолни

екстракт плода *P. spinosa* инхибира раст свих тестираних бактерија изузев *K. pneumoniae*. Међутим, микродилуционом методом је доказана сензитивност и ове бактерије. Вредности МИК и МБЦ су се кретале у опсегу од 15,6 до 250 µg/mL, односно од 31,2 до 500 µg/mL, редом. Најосетљивије на дејство екстракта *P. spinosa* у овом раду су биле Грам позитивне бактерије *S. aureus* (МИК/МБЦ 15,6/125 µg/mL), *L. innocua* (МИК/МБЦ 31,2/31,2 µg/mL) и *S. lutea* (МИК/МБЦ 62,5/62,5 µg/mL).

Veličković и сар. (2014) су за разлику од Radovanović и сар. (2013) проучавали антибактеријска својства етанолног екстракта плода *P. spinosa* диск-дифузионом методом. У овој студији *B. subtilis* је била резистентна на дејство екстракта, насупрот осталим тестираним бактеријама (*S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. abony*). Резултате антибактеријске активности презентоване у наведеној студији, аутори су објаснили присуством фенолних једињења.

Слабо антибактеријско дејство плодова ове врсте су потврдили и други аутори (Gegiu и сар., 2015; Sabatini и сар., 2020), што је у сагласности са резултатима ове докторске дисертације. Штавише, Sabatini и сар. (2020) су уочили одсуство селективности у антибактеријском дејству екстракта између Грам негативних и Грам позитивних бактерија што иде у прилог овде презентованим резултатима.

Литературни подаци о антифунгалној активности *P. spinosa* су врло оскудни. Veličković и сар. (2014) су испитивали антифунгално дејство етанолног екстракта плода, а добијени резултати указују на осетљивост *C. albicans* и резистентност *A. niger*.

Насупрот резултатима Veličković и сар. (2014), Gegiu и сар. (2015) су установили одсуство фунгистатичког дејства на *C. albicans* истом методом.

Резултате Veličković и сар. (2014), односно слабо антифунгално дејство на *C. albicans* и готово одсуство истог на *A. niger* су недавно потврдили Sabatini и сар. (2020).

Корелације приказане у оквиру ове студије указују да се антимикуробна својства ове врсте пре могу објаснити синергистичким дејством биокомпоненти екстракта, него заступљеношћу фенола, што су сугерисали и други аутори (Sabatini и сар., 2020)

Антимикуробна активност листова *P. spinosa* је по први пут проучена у оквиру ове докторске дисертације, а презентовани резултати антибактеријске и антифунгалне активности указују да би будућа истраживања требало усмерити у правцу детаљнијег испитивања етанолног екстракта листа.

У недавној публикацији Gürbüz и сар. (2021) по први пут су приказани резултати антимикуробне активности листова *R. discolor*. Аутори су у том раду испитивали антибактеријско дејство водених и метанолних екстраката на по 4 Грам позитивне (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* и *S. pyogenes*) и Грам негативне бактерије (*Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*). Екстракти листова *R. discolor* су бактериостатичко дејство показали на све испитиване бактерије при чему су вредности МИК биле између 8 и 32 µg/mL. Међу Грам позитивним бактеријама најосетљивија је била *S. epidermidis*, како на дејство воденог тако и на дејство метанолног екстракта, док је међу Грам негативним бактеријама то била *P. aeruginosa* и то на дејство метанолног екстракта.

У раду Radovanović и сар. (2013) испитивано је дејство екстраката плодова *R. fruticosus* на 12 патогених бактерија. Тестиране су Грам позитивне бактерије, *Clostridium perfringens*, *B. subtilis*, *L. innocua*, *S. aureus*, *S. lutea* и *M. flavus*, као и Грам негативне, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. enteritidis*, *Shigella sonnei*, *K. pneumoniae* и *P. vulgaris*. Све тестиране бактерије су биле осетљиве на дејство екстраката плодова *R. fruticosus* при чему су

бактериостатичке концентрације варирале од 62,5 до 500 µg/mL. У истом опсегу су се кретале и бактерицидне концентрације. Резултати ове докторске дисертације потврђују блиске вредности између бактериостатичких и бактерицидних концентрација када су у питању екстракти плодова *R. discolor*.

Екстракти плодова *R. ulmifolius* су инхибирали раст *E. coli*, *Morganella morganii* и *P. mirabilis*, док су били неделотворни на *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* (Da Silva и сар., 2019). Међу Грам позитивним бактеријама, тестираним у истом раду, осетљивост на дејство *R. ulmifolius* су показале *E. faecalis*, *L. monocytogenes* и *S. aureus* укључујући и метицилин резистентне сојеве. Упркос томе што нису установили бактерицидно дејство ове врсте на наведене патогене бактерије, аутори су указали на значај представљених резултата будући да су тестирани микроорганизми клинички изолати који се карактеришу мултирезистентношћу. Антибактеријску активност *R. ulmifolius* Da Silva и сар. (2019) су приписали фенолним једињењима.

Veljković и сар. (2019) су упоредили антибактеријска својства листова и плодова *R. idaeus* на *S. lutea*, *B. subtilis* и *E. coli* микродилуционом методом. Екстракти листова су деловали бактериостатички при концентрацијама између 2,5 и 20 mg/mL при чему је међу тестираним бактеријама најосетљивија била *E. coli*, док је најрезистентнија била *B. subtilis*. У истом раду, вредности МБЦ су варирале од 5 до 20 mg/mL. Грам позитивна бактерија *B. subtilis* се и овога пута показала као најотпорнија, док је, за разлику од листова, најосетљивија била *S. lutea*. Слично као и претходници, аутори су антибактеријска својства наведене врсте објаснили количином фенолних једињења, пре свега флавоноида и антоцијана.

Поред до сада наведених литературних података, антимикуробна својства различитих врста рода *Rubus* су потврдили и други аутори (Schulz и Chim, 2019), укључујући *R. idaeus* и *R. occidentalis* (Krauze-Baranowska и сар., 2014), *R. fruticosus* (Riaz и сар., 2011), *R. ulmifolius* (Најаји и сар., 2017), *R. crataegifolius* (Park и сар., 2020).

Аналогно антибактеријској активности и антифунгална активност *R. discolor* је по први пут проучена у оквиру студије коју су спровели Gürbüz и сар. (2021). Водени и метанолни екстракт листа *R. discolor* је у наведеној студији деловао фунгистатички на испитиване микромицете рода *Candida* при чему се највећом сензитивношћу одликовала *C. parapsilosis*, а највећом резистентношћу *C. krusei*.

Екстракти плодова *R. ulmifolius* су инхибирали раст *C. albicans* (Da Silva и сар., 2019).

Антимикуробна активност *R. serpens* је по први пут проучена у оквиру ове докторске дисертације, као и екстракти плодова *R. discolor*, што је од великог значаја имајући у виду све већу потребу за новим антимикуробним агенсима због појаве резистентних сојева микроорганизама.

Слично као и за врсте рода *Prunus* испитиване у оквиру ове докторске дисертације, ни за врсте рода *Rubus* се на основу представљених корелација не може са сигурношћу утврдити у којој мери и које фенолне компоненте имају највећи утицај на антимикуробна својства за шта је највероватније одговоран синергистички ефекат својствен за фенолна једињења што су потврдили и аутори претходних публикација (Mingo и сар., 2016; Da Silva и сар., 2019; Schulz и Chim, 2019).

Фенолна једињења могу антимикуробну активност остварити различитим молекуларним механизмима. Поједина фенолна једињења, попут епикатехин-галата се могу везати за липопротеинску мембрану и тиме довести до оштећења или промена у функционисању. Могуће је и да фенолна једињења интерагују са ДНК или ензимима

одговорним за мултирезистентност. Поред тога могу мењати пермеабилност ћелијске мембране патогена и тиме омогућити улазак антибиотика у ћелију (Da Silva и сар., 2019). То је од посебног значаја, јер се на тај начин може омогућити синтетичким лековима да делују при мањим дозама чиме се избегавају негативне нуспојаве.

4.2.3. Антитуморска активност и корелација са хемијским саставом

4.2.3.1. Цитотоксична активност екстраката и корелација са хемијским саставом

Цитотоксична активност водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* према хуманим малигним ћелијским линијама аденокарцинома цервикса (HeLa), мијелоидне леукемије (K562) и канцера дојке (MDA-MB-453) процењена је МТТ тестом. Осим тога, истим тестом је испитано цитотоксично дејство екстраката према ћелијској линији нормалних ембрионалних фибробласта плућа (MRC-5) (Табела 31).

Табела 31. Резултати испитивања цитотоксичности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* на малигне и контролну ћелијску линију МТТ методом.

Ћелијска линија	HeLa	K562	MDA-MB-453	MRC-5
IC ₅₀ (µg/mL)				
Екстракт				
<i>Prunus mahaleb</i>				
ЛВ	>2000	>2000	>2000	>2000
ЛЕ	>2000	>2000	>2000	>2000
ПВ	>2000	>2000	>2000	>2000
ПЕ	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>Prunus spinosa</i>				
ЛВ	>2000	>2000	>2000	>2000
ЛЕ	770±6	865±14	877±56	1244±62
ПВ	>2000	>2000	>2000	>2000
ПЕ	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>Rubus discolor</i>				
ЛВ	278±62	398±8	267±33	251±15
ЛЕ	331±23	292±9	316±8	284±7
ПВ	>2000	>2000	>2000	>2000
ПЕ	>2000	>2000	>2000	>2000
<i>Rubus serpens</i>				
ЛВ	244±32	328±16	237±17	262±23
ЛЕ	274±26	293±5	302±11	264±19
ПВ	1600±22	1465±56	1711±21	>2000
ПЕ	>2000	>2000	>2000	>2000

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; HeLa, K562 и MDA-MB-453 – хумане малигне ћелијске линије аденокарцинома цервикса, мијелоидне леукемије и канцера дојке; MRC-5 – контролна имунокомпетентна ћелијска линија хуманих ембрионалних фибробласта плућа; IC₅₀ – ефективна концентрација (концентрација испитиваних екстраката која редукује број циљних вијабилних ћелија за 50%); резултати су исказани као средња вредност (AV) два независна експеримента ± стандардна девијација (SD).

Из приложених резултата се уочава да су екстракти испитиваних врста рода *Rubus* показали јаче цитотоксично дејство у односу на врсте рода *Prunus*. Такође, може се запазити да су екстракти листова били ефективнији цитотоксични агенси, него екстракти плодова.

Вредности IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) за водене и етанолне екстракте листова и плодова *P. mahaleb* су биле изнад $2000 \mu\text{g}/\text{mL}$, како према малигним тако и према здравој ћелијској линији човека, због чега се наведени екстракти могу сматрати нецитотоксичним. Изостанак цитотоксичности су показали и екстракти врсте *P. spinosa*, при чему је једино одступање опажено за етанолни екстракт листа ове врсте који је показао ниску цитотоксичност према испитиваним ћелијским линијама.

Екстракти листова *R. discolor* су деловали цитотоксично према свим тестираним туморским ћелијским линијама. Притом се посебно ефикасно показао водени екстракт листа према HeLa и MDA-MB-453 ћелијским линијама (IC_{50} 278 и $267 \mu\text{g}/\text{mL}$, респективно). За разлику од екстраката листова, екстракти плодова ове врсте су се одликовали одсуством цитотоксичности.

Екстракти *R. serpens* су показали незнатно боља цитотоксична својства у односу на претходну врсту. Недостатак цитотоксичности је примећен једино за етанолни екстракт плода. Водени екстракт плода је испољио ниску цитотоксичност, а посебно добрим цитотоксичним својствима се издвојио водени екстракт листа према HeLa и MDA-MB-453 ћелијским линијама (IC_{50} 244 и $237 \mu\text{g}/\text{mL}$, респективно).

У циљу детаљнијег проучавања антитуморских својстава, одабрани су екстракти који су показали најбоља цитотоксична својства према тестираним малигним ћелијским линијама у МТТ тесту.

Ради утврђивања утицаја фитохемијског састава на антитуморску активност (IC_{50} вредности у МТТ тесту) урађена је корелациона анализа, а резултати су исказани путем Пирсонових коефицијената приказаних у **Табели 32**.

Између укупног садржаја фенола, флавоноида, антоцијана и њихових мономера са једне и цитотоксичних концентрација екстраката за HeLa, K562, MDA-MB-453 и MRC-5 ћелијске линије са друге стране установљене су углавном умерене до јаке корелације. Слабе корелације су успостављене једино у односу концентрације антоцијана и цитостатичких концентрација екстраката за K562 (r 0,0173) и MRC-5 (r 0,2423), као и у односу садржаја укупних мономера антоцијана и цитостатичких концентрација за MDA-MB-453.

Садржај фенола, хидрокси-бензоевих и хидрокси-циметних киселина одређен LC-MS/MS методом и IC_{50} вредности добијене у МТТ тесту су углавном биле негативно умерено корелиране.

Концентрације доминантних фенолних киселина и цитотоксичне концентрације су такође претежно умерено корелирале. Слаба корелација је установљена између концентрације протокатехинске киселине и IC_{50} вредности у МТТ тесту за HeLa (r -0,2837), MDA-MB-453 (r -0,2557) и MRC-5 (r -0,3385). *p*-Хидрокси-бензоева киселина је слабо корелирала са цитотоксичним концентрацијама за K562 и MRC-5, насупрот хлорогенској киселини која је са њима снажно корелирала.

Табела 32. Корелација између фитохемијског састава и антитуморске активности екстракта *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens*.

<i>r</i>	HeLa	K562	MDA-MB-453	MRC-5
Садржаји укупних (спектрофотометријски)				
фенола	-0,82 ^c	-0,79 ^c	-0,85 ^c	-0,86 ^c
флавоноида	0,59 ^b	0,48 ^b	0,63 ^b	0,57 ^b
антоцијана	-0,95 ^c	0,02 ^a	-0,94 ^c	0,24 ^a
мономерних антоцијана	-0,59 ^b	-0,94 ^c	0,04 ^a	1,00 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)				
фенола	-0,53 ^b	-0,68 ^b	-0,51 ^b	-0,59 ^b
хидрокси-бензоевих киселина	-0,41 ^b	-0,57 ^b	-0,38 ^b	-0,45 ^b
хидрокси-циметних киселина	-0,58 ^b	-0,69 ^c	-0,60 ^b	-0,67 ^c
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)				
<i>p</i>-хидрокси-бензоева киселина	0,42 ^b	0,20 ^a	0,42 ^b	0,33 ^a
протокатехинска киселина	-0,28 ^a	-0,46 ^b	-0,26 ^a	-0,34 ^a
гална киселина	-0,50 ^b	-0,62 ^b	-0,45 ^b	-0,51 ^b
кафена киселина	-0,48 ^b	-0,55 ^b	-0,53 ^b	-0,57 ^b
хлорогенска киселина	-0,63 ^b	-0,72 ^c	-0,62 ^b	-0,69 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

4.2.3.2. Селективност цитотоксичног дејства екстракта испитиваних врста

Ради утврђивања потенцијалног селективног антитуморског дејства водених и етанолних екстракта *R. discolor* и *R. serpens*, који су се у МТТ тесту показали као најбољи цитотоксични агенси, посматрано је да ли постоји разлика у дејству екстракта према малигним и здравим ћелијама. Наведене разлике су исказане путем коефицијента селективности (SI) који су приказани у **Табели 33**.

Вредности коефицијента селективности су се кретале у опсегу од 0,63 до 1,11, а највише вредности су забележене када је у питању разлика у дејству воденог екстракта листа *R. serpens* према HeLa и MDA-MB-453 у односу на дејство према контролној ћелијској линији, MRC-5 (SI 1,08 и 1,11, редом).

Табела 33. Резултати селективности антитуморског дејства екстракта листова *R. discolor* и *R. serpens* презентовани путем коефицијента селективности (SI).

SI	IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ HeLa	IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ K562	IC ₅₀ MRC-5/IC ₅₀ MDA-MB-453
Екстракт			
<i>Rubus discolor</i>			
ЛВ	0,90	0,63	0,94
ЛЕ	0,86	0,97	0,90
<i>Rubus serpens</i>			
ЛВ	1,08	0,80	1,11
ЛЕ	0,96	0,90	0,87

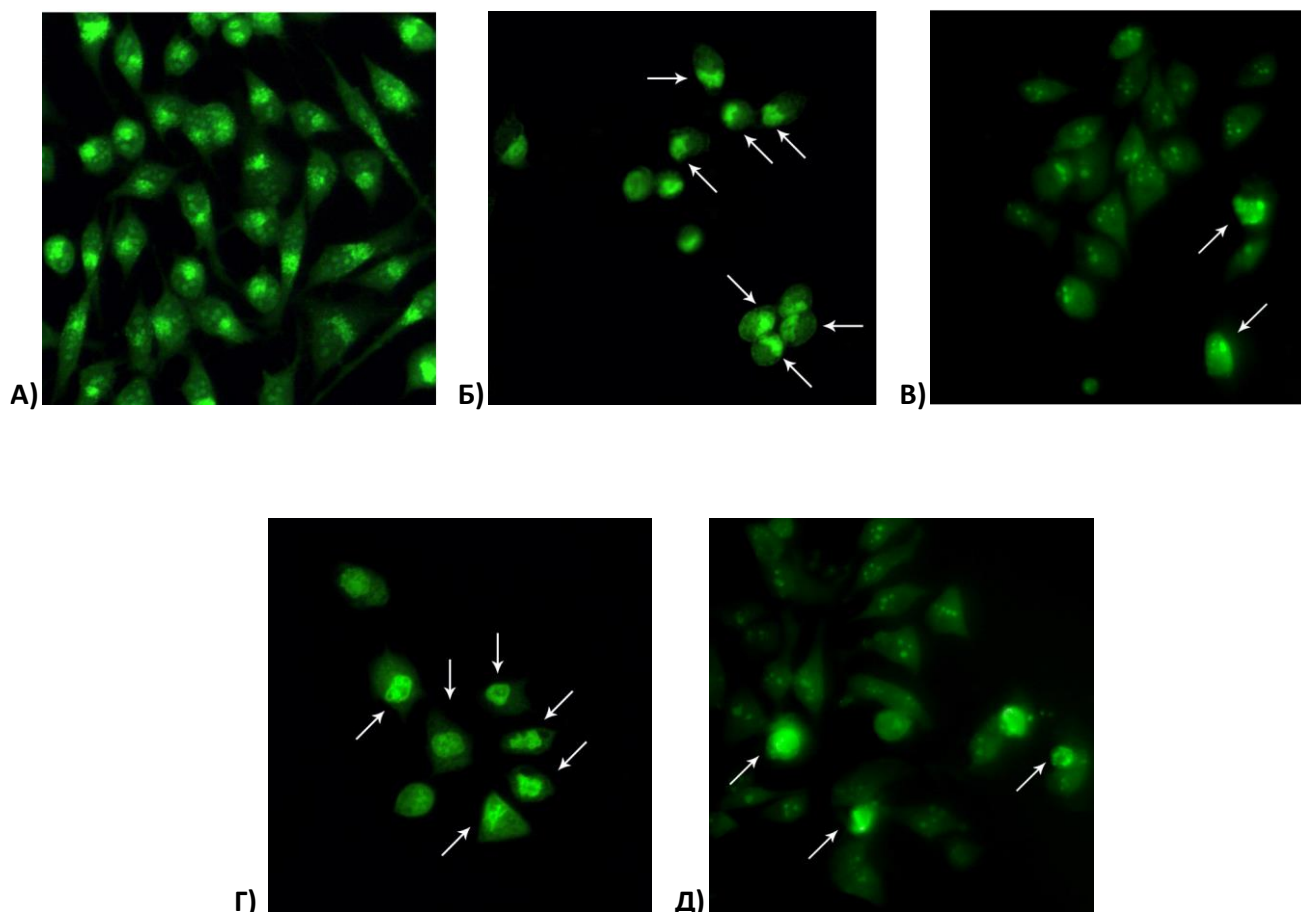
ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; SI – коефицијент селективности испитиваних екстракта као однос EC₅₀ вредности добијених МТТ тестом за MRC-5 и одговарајућу туморску ћелијску линију.

4.2.3.3. Одређивање проапоптотског ефекта одабраних екстраката према HeLa ћелијама

Морфолошка анализа ћелијске смрти

Морфолошка анализа ћелијске смрти HeLa ћелија након 24-часовног третмана воденим и етанолним екстрактима листова *R. discolor* и *R. serpens* (при концентрацијама једнаким двоструким IC₅₀ вредностима за 72 h инкубације у МТТ тесту) је урађена флуоресцентним микроскопом како би се одредио њихов проапоптотски ефекат. У циљу визуелизације цитоморфолошких промена индукованих дејством екстраката, HeLa ћелије су претходно обојене смешом акридин оранж/етијидијум бромид.

На основу фотомикрографија приказаних на **Слици 26.** могу се уочити HeLa ћелије у које је ушла акридин-оранж боја и везала се за дволанчану DNK што је довело до настанка зелене флуоресценције. С обзиром да етијидијум-бромид боја није ушла у ћелије (не опажа се наранџаста обојеност), можемо закључити да су ћелије још увек живе. Ипак, морфологија зелено обојеног DNK молекула у HeLa ћелијама указује да је у ћелијама третираним екстрактима дошло до кондензовања хроматина што је типична одлика апоптозе.



Слика 26. Фотомикрографије индукције апоптозе у HeLa ћелијама без третмана - контрола (А) и након 24-часовног третмана воденим (Б) и етанолним (В) екстрактом листа *R. discolor* и воденим (Г) и етанолним (Д) екстрактом листа *R. serpens*.

Одређивање типа ћелијске смрти Annexin V-FITC/PI методом бојења

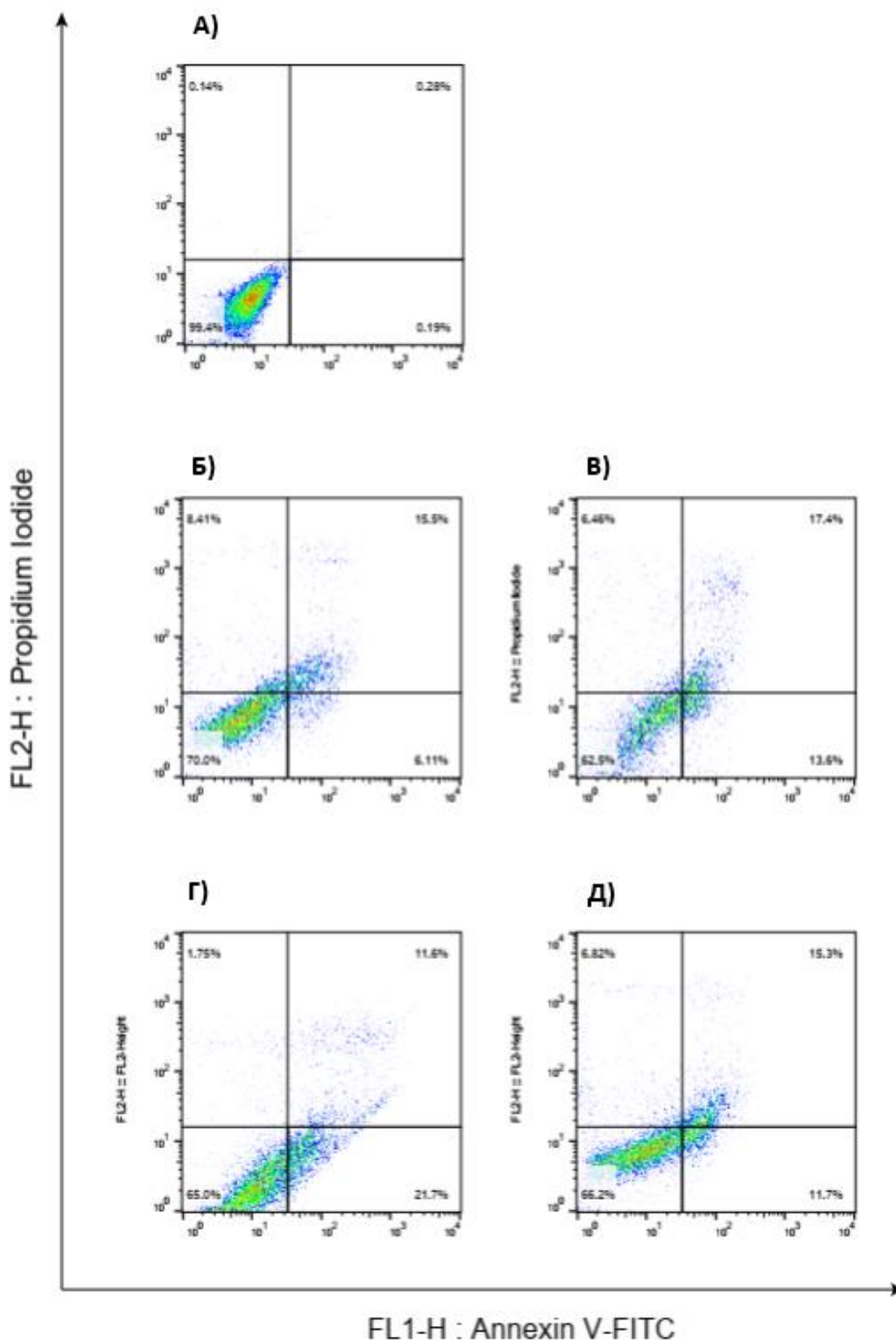
У циљу испитивања проапоптотског ефекта водених и етанолних екстраката листова *R. discolor* и *R. serpens* одређен је тип ћелијске смрти HeLa ћелија након третмана екстрактима. У те сврхе је употребљена Annexin V-FITC/PI метода којом је одређен проценат вијабилних, рано и касно апоптотичних и некротичних HeLa ћелија, а добијени резултати су приказани у **Табели 34.** и на **Слици 27.**

Табела 34. Резултати анализе вијабилности и типа ћелијске смрти HeLa ћелија на основу морфолошких промена индукованих деловањем испитиваних екстраката листова *R. discolor* и *R. serpens* добијени Annexin V-FITC/PI методом бојења.

	В	РА	КА	Н
	%			
Екстракт/контрола				
<i>Rubus discolor</i>				
ЛВ	62,5	13,6	17,4	6,46
ЛЕ	70,0	6,11	15,5	8,41
<i>Rubus serpens</i>				
ЛВ	66,2	11,7	15,3	6,82
ЛЕ	65,0	21,7	11,6	1,75
контрола	99,4	0,19	0,28	0,14

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; В – вијабилне ћелије; РА – ћелије у раној апоптози; КА – ћелије у касној апоптози; Н – некротичне ћелије;

Приложени резултати указују да се проценат вијабилних HeLa ћелија након третмана одабраним екстрактима (при концентрацијама једнаким двоструким IC₅₀ вредностима за 72 h инкубације у МТТ тесту) смањило у корист процента ћелија у раној/касној апоптози и некрози у односу на контролу (нетретиране HeLa ћелије). Етанолни екстракт листа је изазвао рану апоптозу код 6,11%, касну апоптозу код 15,5% и некрозу код 8,41% HeLa ћелија и тиме се показао као најслабији проапоптотски агенс. С друге стране, водени екстракт исте врсте је индуковао рану апоптозу код 13,6%, касну апоптозу код 17,4% и некрозу код 6,46% HeLa ћелија. Незнатно бољи проапоптотски ефекат је показао и водени екстракт листа *R. serpens* у односу на етанолни.



Слика 27. Дијаграм вијабилних, рано/касно апоптотичних и некротичних HeLa ћелија одређен Annexin V-FITC/PI методом бојења у контролној групи (ћелије без третмана) (А), након дејства етанолног (Б) и воденог (В) екстракта листа *R. discolor* и етанолног (Г) и воденог (Д) екстракта листа *R. serpens*.

4.2.3.4. Анализа промена у дистрибуцији фаза ћелијског циклуса

У циљу одређивања механизма деловања одабраних екстраката на HeLa ћелије анализирана је промена у њиховој дистрибуцији по фазама ћелијског циклуса након 24 h (Табела 35) и 48 h (Табела 36) континуираног деловања екстраката (при концентрацијама једнаким двоструким IC₅₀ вредностима за 72 h инкубације у МТТ тесту).

Сви екстракти су утицали на пораст броја subG1 и G1 HeLa ћелија након 24-часовног дејства екстракта у односу на контролну групу (нетретирани HeLa ћелије). У том смислу су незнатно били ефикаснији екстракти врсте *R. discolor*. Овакав тренд у расподели HeLa ћелија је примећен и након 48-часовног третмана, али са израженијом разликом у односу на контролну групу. Такође, важно је истаћи да су у овом случају екстракти листова *R. serpens* показали бољу активност.

Табела 35. Резултати дистрибуције HeLa ћелија по фазама ћелијског циклуса након 24 h континуираног деловања екстраката листова *R. discolor* и *R. serpens*.

Фаза ћелијског циклуса	subG1	G1	S	G2M
500 µg/mL* - 24 h				
Екстракт/контрола				
<i>Rubus discolor</i>				
ЛВ	2,4	56,5	17,1	25,4
ЛЕ	3,2	56,9	14,8	25,1
<i>Rubus serpens</i>				
ЛВ	4,0	50,9	20,7	24,9
ЛЕ	3,2	61,5	12,6	24,9
контрола	1,65	44,9	26,7	28,9

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; *концентрација која одговара двострукој IC₅₀ вредности добијеној МТТ тестом након 72-часовне инкубације у присуству испитиваних екстраката.

Табела 36. Резултати дистрибуције HeLa ћелија по фазама ћелијског циклуса након 48 h континуираног деловања екстраката листова *R. discolor* и *R. serpens*.

Фаза ћелијског циклуса	subG1	G1	S	G2M
500 µg/mL* - 48 h				
Екстракт/контрола				
<i>Rubus discolor</i>				
ЛВ	10,3	58,0	13,2	20,1
ЛЕ	10,1	59,5	13,1	18,7
<i>Rubus serpens</i>				
ЛВ	6,6	61,1	14,4	17,0
ЛЕ	6,1	63,8	13,1	16,8
контрола	1,4	55,0	16,2	27,9

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; *концентрација која одговара двострукој IC₅₀ вредности добијеној МТТ тестом након 72-часовне инкубације у присуству испитиваних екстраката.

Прегледом литературе је пронађено неколико радова у којима је пажња усмерена на проучавање антитуморске активности *P. mahaleb* (Gerardi и сар., 2016; Popović и сар., 2021; Dashtizadeh и сар., 2021).

Gerardi и сар. (2016) су указали на антипролиферативни потенцијал концентрованог екстракта плода *P. mahaleb*. Наведени аутори су испитивали дејство екстракта према хуманим малигним ћелијама канцера дојке (MCF-7) и установили да екстракт при концентрацијама између 0,9 и 14,4 mg/mL показује занемарљиво цитотоксично и антипролиферативно дејство. Међутим, при знатно вишим концентрацијама (18,4 mg/mL), екстракт значајно смањује број вијабилних ћелија, што указује на његов антипролиферативни ефекат.

Слабу антитуморску активност екстракта плода *P. mahaleb* према ћелијама хуманог канцера колона (HT29) су недавно доказали и Popović и сар. (2021) који су, слично претходним ауторима, користили знатно веће концентрације (52,70 mg/mL) од оних које су коришћене у овде презентованим експериментима (2 mg/mL).

Упркос томе што горе наведени резултати наизглед нису обећавајући, Gerardi и сар. (2016) су успели да докажу да екстракти ове врсте поседују проапоптотски ефекат према MCF-7 ћелијској линији који се огледа у репарирању међућелијских комуникација између туморских ћелија. Имајући у виду да је један од узрока неконтролисаног раста и пролиферације туморских ћелија управо прекид међућелијских комуникација због чега до њих не допиру сигнални молекули околних ћелија, наведено откриће може бити од круцијалног значаја за даља истраживања механизма деловања екстракта *P. mahaleb*.

Поред тога, Popović и сар. (2021) су доказали способност екстракта ове врсте да инхибира хуману дипептитил пептидазу III, hDPP III (енгл. *human dipeptidyl peptidase III*), ензим који учествује у канцерогенези, али чија улога у овом процесу још увек није у потпуности расветљена (Kumar и сар., 2016).

Иако је на основу изложеног јасно да *P. mahaleb* не поседује посебно значајну антитуморску активност *per se*, не треба одустати од даљих истраживања антитуморског потенцијала ове врсте. У прилог овој тврдњи иду и резултати недавно публикованог рада Dashtizadeh и сар. (2021) који су синтетисали наночестице бакра помоћу екстракта различитих делова *P. mahaleb*, а затим испитивали њихову биоактивност. Аутори су на основу добијених резултата закључили да добијене наночестице испољавају изузетна антитуморска својства због чега су сугерисали употребу *P. mahaleb* екстракта за фитосинтезу наночестица које би се примењивале у лечењу првенствено канцера, али и других болести. Осим тога, фитосинтеза је окарактерисана као једноставна, економски исплатива и „зелена“ метода, што би обезбедило додатну предност наночестицама синтетисаним на овај начин (Dashtizadeh и сар., 2021).

Антитуморску активност *P. spinosa* су презентовали Guimarães и сар. (2014) који су упоредили антитуморско дејство екстракта богатог антоцијанима насупрот екстракту богатом другим фенолним једињењима према пет туморских ћелијских линија, канцера дојке (MCF-7), колона (HCT-15), цервикса (HeLa), неситноћелијског канцера плућа (NCI-H460) и хепатоцелуларног канцера (HepG2). Екстракт који је садржао антоцијане није показао антитуморско дејство према ћелијама канцера дојке, док су оба екстракта имала антипролиферативни ефекат према преосталим туморским ћелијским линијама. Јаче антитуморско дејство је показао екстракт богат фенолним једињењима, на основу чега су аутори антитуморска својства ове врсте приписали фенолним киселинама и флавоноима.

Метанолни екстракт плода *P. spinosa* је при вишим концентрацијама (20 mg/mL) показао антитуморско дејство према неколико хуманих малигнух ћелија мозга (LN-229, U-87 и T98G), док није имао ефекта на хумане малигне ћелије панкреаса (PANC-1 и ASPC-1) (Karakas и сар., 2019).

Будући да нису успели да објасне корелацију фитохемијског састава и антитуморског дејства, аутори ове публикације су предложили детаљније проучавање фенолног састава.

Екстракт цвета *P. spinosa* је деловао цитотоксично према малигним и здравим анималним ћелијама јетре на дозно-зависни начин у раду Murati и сар. (2019a), при чему је коефицијент селективности био мањи од 1. Аутори су утврдили прооксидативни ефекат испитиваног екстракта, који је био израженији у малигним, него у здравим ћелијама. Ипак, супротно очекивањима, није установљен проапоптотски ефекат, већ некроза малигнух ћелија, што су аутори објаснили присуством цијаногених гликозида у овој врсти. У наставку истраживања, иста група научника (Murati и сар., 2019b) је потврдила цитотоксични ефекат *P. spinosa* према хуманим малигним ћелијама јетре, највероватније услед прооксидативног ефекта. Одсуство антитуморског дејства *P. spinosa* су потврдили неки аутори (Meschini и сар., 2017; Condello и сар., 2019), док су други указали на значајно антитуморско дејство (Porović и сар., 2020, 2021).

Приликом поређења резултата различитих истраживача треба имати у виду да нису коришћени исти биљни органи, растварачи, као ни малигне ћелијске линије. Оно што додатно компликује компарацију је и различито тумачење резултата од стране различитих аутора. Тако су Porović и сар. (2020 и 2021) указали на јаку антитуморску активност, при чему су вредности IC₅₀ биле између 4,79 и 28,48 mg/mL, односно 6,84 mg/mL, редом што је неупоредиво више од концентрација које су тестиране у експериментима ове докторске дисертације. Аутори су употребу тако високих концентрација оправдали одсуством цитотоксичности на здраву хуману ћелијску линију колона Сасо-2. С друге стране, Murati и сар. (2019b) су установили цитотоксични ефекат екстракта *P. spinosa* према имунокомпетентним хуманим ћелијама јетре при концентрацијама које су се кретале у опсегу од 50 до 200 µg/mL.

Такође, аналогно претходно описаној врсти, у истраживањима неких аутора екстракт *P. spinosa* самостално није деловао антипролиферативно, међутим у комбинацији са хранљивим активирајућим комплексом сачињеним од аминокиселина, витамина и минералних соли је значајно смањио проценат вијабилних ћелија хуманог колоректалног канцера (HCT116), колоректалног аденокарцинома (SW480), канцера цервикса (HeLa), бронхоалвеоларног аденокарцинома (A549) и анималних ћелија интестиналног епитела (IEC-6) (Meschini и сар., 2017). На основу резултата ове студије креиран је суплемент означен као *Tringo M* састављен из горе наведених састојака, а чију је антитуморску активност иста група истраживача детаљније наставила да испитује у *in vitro* и *in vivo* условима (Condello и сар., 2019). С обзиром да је показано да *Tringo M* нема штетних ефеката, одобрена је његова употреба као суплемента у људској исхрани, пре свега особа оболелих од канцера колона (Condello и сар., 2019).

Презентовани литературни подаци су генерално у сагласности са резултатима антитуморског ефекта екстракта *P. spinosa* приказаним у овој докторској дисертацији. Ипак, важно је истаћи да су у оквиру ове студије по први пут са тог аспекта проучавани екстракти листова, при чему се водени екстракт листа показао најбоље. Имајући у виду да је антитуморско дејство ове врсте недовољно истражено, као и да су прелиминарни резултати неких истраживача већ резултовали применом, оправдано је очекивати

значајнија открића у будућности, па би у том правцу требало усмерити следећа истраживања.

Према доступним литературним подацима, антитуморска својства *R. discolor* и *R. serpens* нису претходно истраживана. Међутим, све је више истраживача који се баве проучавањем антитуморског потенцијала традиционално коришћених врста овог рода.

George и сар. (2014) су испитивали антитуморско дејство екстракта корена *R. fairholmianus* према ћелијама хуманог колоректалног канцера (Caco-2) и утврдили да ацетонски екстракт корена ове биљке испољава цитотоксични ефекат према Caco-2 ћелијама на дозно-зависни начин. Уочено је и да након третмана Caco-2 ћелија екстрактом *R. fairholmianus* долази до појачане активности каспазе 3/7 која индукује апоптозу.

У наставку истраживања аутори су указали и на цитотоксично дејство исте врсте према малигним хуманим ћелијама дојке посредством активације циљних каспаза и индукције апоптозе (George и сар., 2017).

Kim и сар. (2016) су утврдили проапоптотски ефекат екстракта *R. coreanus* према хуманим туморским ћелијама оваријума резистентним на хемиотерапеутике (NCI/ADR/RES). У наведеном раду екстракт *R. coreanus*, као и из њега изолована једињења, су индуковали апоптозу малигних ћелија путем активације каспаза 8, 9 и 3. Кверцетин и елагна киселина би могли бити одговорни за антитуморску активност ове врсте, будући да су показали исто дејство као екстракт (Kim и сар., 2016).

Екстракти *R. idaeus* су деловали цитотоксично према ћелијама хуманог колоректалног канцера (HCT-116). Екстракти листова који су показали најбоље антитуморско дејство су садржали и највећу количину антоцијана и танина (Veljković и сар., 2019).

Листови *R. rosifolius* су индуковали апоптозу туморских ћелија јетре (HepG2/C3A) највероватније путем оштећења DNK молекула (Quadros и сар., 2020).

Према приказаним резултатима МТТ теста, екстракти листова врста рода *Rubus* су имали најјаче цитотоксично дејство те су одабрани за даље анализе потенцијалне антитуморске активности. Даљим тестовима је установљено да екстракти повећавају удео апоптотичних subG1 HeLa ћелија. Морфолошким анализом ћелијске смрти установљено је да екстракти испољавају проапоптотски ефекат, што је потврђено и Annexin V-FITC/PI методом бојења. Како је и проценат ћелија у раној апоптози увећан у односу на контролни узорак, може се претпоставити да екстракти ипак смањују вијабилност циљних ћелија индуковањем апоптозе, што су сугерисали и други аутори (George и сар., 2014).

Имајући у виду да је број оболелих од канцера у сталном порасту, да су конвенционални хемиотерапеутици скуп и недовољно ефикасни, са штетним пропратним ефектима, јер често не делују цитотоксично само на туморске, већ и на здраве ћелије чиме трајно оштећују ткива и органе и нарушавају њихову функцију, јасно је да је потреба за новим антитуморским агенсима велика. Полифеноли којима се углавном приписује антитуморска активност, углавном цитотоксично дејство испољавају селективно, тако да не оштећују здраве ћелије. Осим тога, често испољавају синергистичко дејство са званичним лековима, због чега они постају ефикасни и у мањим дозама, па се смањује штетни ефекат по здрава ткива и органе (George и сар., 2014, 2017; Meschini и сар., 2017; Condello и сар., 2019; Murati и сар., 2019а,б).

4.2.4. Антидијабетична активност и корелација са хемијским саставом

Потенцијална антидијабетична активност водених и етанолних екстраката је процењена на основу способности екстраката да инхибирају α -амилазу и α -глукозидазу који учествују у разградњи угљених хидрата, а добијени резултати су приказани путем IC_{50} вредности у поређењу са позитивном контролом (Glucobay®).

Како би се утврдио утицај фитохемијског профила испитиваних екстраката на њихова антидијабетична својства урађена је корелациона анализа.

P. mahaleb

Резултати испитивања потенцијалне антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката *P. mahaleb* су приказани у **Табели 37**.

Екстракти су α -амилазу инхибирали при концентрацијама које су варирале у распону од 12,8 mg/mL за етанолни екстракт листа до 57,3 mg/mL за водени екстракт листа.

У инхибицији α -глукозидазе најуспешнији је био поново етанолни екстракт листа за који је измерена вредност IC_{50} била нижа и у односу на позитивну контролу (16,1 μ g/mL vs. 233 μ g/mL). Најслабије инхибиторне способности на α -глукозидазу је показао водени екстракт плода (IC_{50} 2216 mg/mL).

Табела 37. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*.

	α -AIA	α -GIA
	IC_{50} (mg/mL)	IC_{50} (μ g/mL)
Екстракт/контрола		
ЛВ	57,3 \pm 1,96	2075 \pm 51,8
ЛЕ	12,8 \pm 0,23	16,1 \pm 2,73
ПВ	36,1 \pm 0,73	2216 \pm 53,8
ПЕ	40,2 \pm 1,66	1513 \pm 150
Glucobay	0,20 \pm 0,01	233 \pm 34,4

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; α -AIA – инхибиција α -амилаза ензима; α -GIA – инхибиција α -глукозидаза ензима; IC_{50} – инхибиторна концентрација (концентрација екстракта која узрокује пораст концентрације инхибираног ензима за 50%); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна мерења \pm стандардна девијација (SD).

Садржај укупних фенола, флавоноида и антоцијана у воденим и етанолним узорцима је слабо до умерено корелирао са вредностима IC_{50} добијеним за оба теста (**Табела 38**).

Јака негативна корелација је установљена између садржаја антоцијана и способности екстракта да инхибирају α -амилазу.

Количина квантификованих фенолних једињења и хидрокси-циметних киселина су биле у умерено негативној корелацији са инхибиторном активношћу за оба ензима, за разлику од хидрокси-бензоевих киселина које су биле у слабој корелацији.

Од доминантних фенолних једињења, једино је гална киселина била јако позитивно корелирана са антидијабетичном активношћу одређеном путем инхибиције α -амилазе.

Табела 38. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. mahaleb*.

<i>r</i>	α -AIA	α -GIA
Садржаји укупних (спектрофотометријски)		
Фенола	-0,01 ^a	-0,30 ^a
флавоноида	-0,36 ^a	-0,66 ^b
антоцијана	-0,68 ^c	0,62 ^b
мономерних антоцијана	/	/
Садржаји квантифицираних (LC-MS/MS)		
Фенола	-0,42 ^b	-0,38 ^b
хидрокси-бензојевих киселина	-0,23 ^a	0,20 ^a
хидрокси-циметних киселина	-0,52 ^b	-0,41 ^b
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)		
протокатехинска киселина	-0,13 ^a	0,32 ^a
гална киселина	0,79 ^c	0,44 ^b
<i>p</i>-кумаринска киселина	0 ^a	-0,28 ^a
<i>o</i>-кумаринска киселина	-0,40 ^b	-0,68 ^b

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

P. spinosa

Етанолни екстракти *P. spinosa* су јаче инхибирали оба ензима (Табела 39). Вредности IC₅₀ за α -амилазу су се кретале у опсегу од 10,9 mg/mL за етанолни екстракт листа до 390 mg/mL за водени екстракт плода.

Етанолни екстракт листа се показао и као најпотентнији инхибитор α -глукозидазе (IC₅₀ 29,9 μ g/mL), док је најслабију инхибиторну моћ испољио водени екстракт листа (IC₅₀ 2950 μ g/mL).

Табела 39. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa*.

	α -AIA	α -GIA
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (μ g/mL)
Екстракт/контрола		
ЛВ	82,0 \pm 2,45	2950 \pm 1,54
ЛЕ	10,9 \pm 0,12	29,9 \pm 6,79
ПВ	390 \pm 56,45	216 \pm 13,7
ПЕ	13,4 \pm 0,50	83,2 \pm 4,13
Glucobay	0,20 \pm 0,01	233 \pm 34,4

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; α -AIA – инхибиција α -амилаза ензима; α -GIA – инхибиција α -глукозидаза ензима; IC₅₀ – инхибиторна концентрација (концентрација екстракта која узрокује пораст концентрације инхибираног ензима за 50%); резултати су исказани као средња вредност (*AV*) три независна мерења \pm стандардна девијација (*SD*);

Фитохемијски састав водених и етанолних екстраката *P. spinosa* је углавном умерено корелирао са антидијабетичном активношћу (Табела 40). Притом су вредности Пирсонових коефицијената за корелацију са инхибицијом α -амилазе имале

негативан предзнак, насупрот њиховим вредностима за корелацију са инхибицијом α -глукозидазе. Јаке корелације су установљене једино између *p*-хидрокси-бензоеве/кафене/хлорогенске киселине и вредности IC₅₀ за α -глукозидаза ензим.

Табела 40. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *P. spinosa*.

<i>r</i>	α -AIA	α -GIA
Укупни садржаји (спектрофотометријски)		
фенола	-0,44 ^b	0,68 ^b
флавоноида	-0,52 ^b	0,39 ^b
Укупни садржаји (LC-MS/MS)		
фенола	-0,46 ^b	0,67 ^b
хидрокси-бензоевих киселина	-0,44 ^b	0,68 ^b
хидрокси-циметних киселина	-0,48 ^b	0,68 ^b
Доминантна фитоједињења (LC-MS/MS)		
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	-0,42 ^b	0,75 ^c
кафена киселина	-0,36 ^b	0,89 ^c
хлорогенска киселина	-0,34 ^a	0,89 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a|*r*| ≤ 0,35 слаба корелација; ^b0,36 ≤ |*r*| ≤ 0,67 умерена корелација; ^c0,68 ≤ |*r*| ≤ 1 јака корелација; (Taylor, 1990).

R. discolor

Екстракти *R. discolor* су снажније инхибирани α -глукозидазу, него α -амилазу (Табела 41). Вредности IC₅₀ за инхибицију α -амилазе су варирале од 13,5 до 276 mg/mL, за етанолни екстракт листа и водени екстракт плода, редом. Екстракти листа су јаче дејство испољили на α -амилазу, него екстракти плодова.

Табела 41. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor*.

	α -AIA	α -GIA
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (μ g/mL)
Екстракт/контрола		
ЛВ	85,8±6,43	2,13±0,14
ЛЕ	13,5±0,57	1,35±0,01
ПВ	276±1,35	44,5±6,66
ПЕ	65,2±0,65	80,7±3,97
Glucobay	0,20±0,01	233±34,4

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; α -AIA – инхибиција α -амилаза ензима; α -GIA – инхибиција α -глукозидаза ензима; IC₅₀ – инхибиторна концентрација (концентрација екстракта која узрокује пораст концентрације инхибираног ензима за 50%); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна мерења ± стандардна девијација (SD);

Сви екстракти *R. discolor* су испољили изузетни ефекат на α -глукозидазу инхибирајући га јачим интензитетом него позитивна контрола. Посебно добром активношћу се и у овом тесту одликовао етанолни екстракт листа (IC₅₀ 1,35 μ g/mL), а следио га је водени екстракт листа (IC₅₀ 2,13 μ g/mL). Насупрот томе, етанолни екстракт плода је имао најслабије дејство на α -глукозидазу (IC₅₀ 80,72 μ g/mL).

Концентрације одговарајућих фитоједињења, односно група фитоједињења су углавном слабо до умерено корелирале са антидијабетичном активношћу одређеном путем инхибиције α -амилазе, док су снажно корелирале са инхибицијом α -глюкозидазе (Табела 42).

Табела 42. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. discolor*.

<i>r</i>	α -AIA	α -GIA
Садржаји укупних (спектрофотометријски)		
фенола	-0,62 ^b	-0,90 ^c
флавоноида	-0,68 ^c	-0,88 ^c
антоцијана	0,19 ^a	0,97 ^c
мономерних антоцијана	-0,47 ^b	0,90 ^c
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)		
фенола	-0,06 ^a	0,94 ^c
хидрокси-бензоєвих киселина	-0,28 ^a	-0,70 ^c
хидрокси-циметних киселина	-0,63 ^b	-0,92 ^c
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)		
протокатехинска киселина	0,07 ^a	-0,40 ^b
гална киселина	-0,20 ^a	-0,73 ^c
кафена киселина	-0,64 ^b	-0,91 ^c
хлорогенска киселина	-0,62 ^b	-0,92 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

R. serpens

Екстракти листова *R. serpens* су успешније инхибирали и α -амилазу и α -глюкозидазу. Притом су вредности IC₅₀ за α -глюкозидазу биле неупоредиво ниже од вредности добијених за позитивну контролу (Табела 43). Вредности IC₅₀ за α -амилазу су варирале од 6,85 до 134 mg/mL, а за α -глюкозидазу од 2,07 до 18,9 μ g/mL. Етанолни екстракт листа је у оба теста испољио најјачи антидијабетични ефекат за разлику од воденог екстракта плода.

Табела 43. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова *R. serpens*.

	α -AIA	α -GIA
	IC ₅₀ (mg/mL)	IC ₅₀ (μ g/mL)
Екстракт/контрола		
ЛВ	106 \pm 4,57	3,23 \pm 0,32
ЛЕ	6,85 \pm 0,68	2,07 \pm 0,09
ПВ	134 \pm 1,35	18,9 \pm 1,91
ПЕ	38,8 \pm 1,95	11,2 \pm 1,19
Glucobay	0,20 \pm 0,01	233 \pm 34,4

ЛВ – водени екстракт листа; ЛЕ – етанолни екстракт листа; ПВ – водени екстракт плода; ПЕ – етанолни екстракт плода; α -AIA – инхибиција α -амилаза ензима; α -GIA – инхибиција α -глюкозидаза ензима; IC₅₀ – инхибиторна концентрација (концентрација екстракта која узрокује пораст концентрације инхибираног ензима за 50%); резултати су исказани као средња вредност (AV) три независна мерења \pm стандардна девијација (SD);

Слично као и код претходно описане врсте, вредности Пирсонових коефицијената корелације указују на јачи утицај фитохемијског састава на способност инхибиције α -глукозидаза него α -амилаза ензима (Табела 44).

Табела 44. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова *R. serpens*.

<i>r</i>	α -AIA	α -GIA
Садржаји укупних (спектрофотометријски)		
фенола	-0,24 ^a	-0,93 ^c
флавоноида	-0,62 ^b	-0,76 ^c
антоцијана	0,09 ^a	0,53 ^b
мономерних антоцијана	-0,36 ^b	0,21 ^a
Садржаји квантификованих (LC-MS/MS)		
фенола	-0,36 ^b	0,26 ^a
хидрокси-бензоєвих киселина	-0,51 ^b	-0,38 ^b
хидрокси-циметних киселина	-0,64 ^b	-0,81 ^c
Доминантне фенолне киселине (LC-MS/MS)		
протокатехинска киселина	-0,50 ^b	-0,17 ^a
гална киселина	-0,50 ^b	-0,49 ^b
кафена киселина	-0,39 ^b	-0,93 ^c
хлорогенска киселина	-0,57 ^b	-0,77 ^c

r – Пирсонов коефицијент корелације; ^a $|r| \leq 0,35$ слаба корелација; ^b $0,36 \leq |r| \leq 0,67$ умерена корелација; ^c $0,68 \leq |r| \leq 1$ јака корелација; (Taylor, 1990).

Сви испитивани екстракти су испољили антидијабетични ефекат при чему су се екстракти врста рода *Rubus* показали као јачи антидијабетични агенси у оба теста у односу на екстракте врста рода *Prunus*.

Најбоља антидијабетична својства у оба теста је испољио етанолни екстракт листа, при чему су етанолни екстракти *R. discolor* и *R. serpens* били значајно ефикаснији у инхибицији α -глукозидазе и од контроле.

Инхибиторне концентрације за α -амилаза тест су биле у опсегу од 6,85 mg/mL за етанолни екстракт листа *R. serpens* до 390 mg/mL за водени екстракт плода *P. spinosa*. У инхибицији α -глукозидазе је најефикаснији био етанолни екстракт листа *R. discolor* (IC₅₀ 1,35 μ g/mL), а најслабији водени екстракт листа *P. spinosa* (IC₅₀ 2950 μ g/mL).

Потенцијалну антидијабетичну активност етанолног екстракта плода *P. mahaleb* путем инхибиције ензима α -амилазе и α -глукозидазе по први пут су испитали Роровић и сар. (2021). Активност коју је овај екстракт испољио у инхибицији α -амилазе је готово идентична активности приказаној у овој докторској дисертацији (43,95 vs. 40,2 mg/mL). Вредности IC₅₀ за α -глукозидазу су биле незнатно ниже у публикацији наведених аутора (0,96 vs 1,52 mg/mL). У том раду, екстракт *P. mahaleb* је ефикасније инхибирао α -глукозидазу, него референтно једињење (акарбозу) што је у складу са овде приложеним резултатима. Аутори су установили значајну корелацију између фенолног садржаја и ензим-инхибиторне активности, али су закључили да фенолна једињења ипак различитим механизмима делују на тестиране ензиме.

На основу корелација презентованих у овој докторској дисертацији може се уочити да фенолна једињења у значајној мери доприносе антидијабетичној активности ове врсте, при чему се као посебно значајна истиче *o*-кумаринска киселина.

Важно је истаћи да резултати антидијабетичне активности листова *P. mahaleb* до сада нису публиковани, а да се управо етанолни екстракт листа ове врсте показао као потенцијално најбољи антидијабетични агенс, чему у будућим истраживањима треба посветити више пажње.

Врста *P. spinosa* је, такође, недовољно истражена са аспекта потенцијалне антидијабетичне активности, упркос вишевековној традиционалној употреби у лечењу дијабетеса.

У раду Роровић и сар. (2020), екстракти плодова 15 различитих генотипова ове врсте су снажно инхибирали хидролизујуће ензиме угљених хидрата, α -амилазу и α -глукозидазу. Установљено је да су се генотипови међусобно статистички значајно разликовали у испољеној ензим-инхибиторној активности за оба ензима. Важно је истаћи да су сви испитивани екстракти у овој студији били ефективнији у инхибирању α -глукозидазе у односу на позитивну контролу, акарбозу (IC_{50} 3,73 mg/mL), што је у складу са резултатима ове докторске дисертације. Вредности IC_{50} за инхибицију α -амилазе су се кретале од 0,85 до 73,26 mg/mL, док су за инхибицију α -глукозидазе биле између 0,29 и 1,34 mg/mL. На основу установљених корелација, аутори су утврдили да је способности екстракта да инхибира α -амилазу највише допринела количина фенолних једињења, што је у сагласности са приложеним резултатима, док је за инхибицију глукозидазе најзаслужнији био кверцетин-3-глукозид.

Роровић и сар. (2021) су истраживањима која су уследила, потврдили добијене резултате, при чему се екстракт плода *P. spinosa* издвојио као потенцијално најефикаснији антидијабетични агенс, међу 15 врста истог рода.

Ниже вредности IC_{50} за оба ензима и следствено јаче антидијабетично дејство *P. spinosa* су презентовали Темиз и сар. (2021), али се оно може објаснити тиме што је екстракт осим плодова садржао и листове, при чему је као екстрагенс коришћен 75% етанол.

У оквиру ове докторске дисертације по први пут је одређено потенцијално антидијабетично дејство екстраката листова, при чему је евалуиран и утицај поларности растварача на испољено дејство екстраката различитих биљних органа. Добијени резултати указују да је одабир растварача од изузетне важности будући да су етанолни екстракти показали значајно бољу активност у односу на водене екстракте. Такође, екстракти листова су ефикасније инхибирали ензиме, него екстракти плодова, што може бити смерница за будућа истраживања.

Упркос томе што се многе врсте рода *Rubus* користе у традиционалној медицини за лечење дијабетеса, *R. discolor* и *R. serpens* до сада нису проучаване са тог аспекта. Међутим, током последње две деценије све је већи број истраживања усмерених на испитивање антидијабетичних активности биљака укључујући и врсте овог рода.

Тако је истраживањем Salehi и сар. (2013) било обухваћено 10 биљних врста које се у иранској народној медицини употребљавају у лечењу дијабетеса. Потенцијално антидијабетично дејство испитиваних врста у тој студији је процењено на основу способности метанолних, етил-ацетатних, хлороформских, дихлорометанских и *n*-хексанских екстраката да инхибирају α -амилазу и α -глукозидазу. Утврђено је да се метанолни екстракти карактеришу бољом антидијабетичном активношћу у односу на друге раствараче. Метанолни екстракти су инхибирали α -амилазу при концентрацијама између 36,2 и 97,5 μ g/mL, а α -глукозидазу при концентрацијама у опсегу од 0,3 до 93,2 μ g/mL. Екстракт листа *R. fruticosus* се издвојио изузетно јаком инхибиторном активношћу α -глукозидазе у односу на екстракте других испитиваних

врста, али и на референтно једињење, акарбозу. Екстракт *R. fruticosus* је умереном активношћу инхибирао α -амилазу. Антидијабетична активност демонстрирана у том истраживању је била снажно корелирана са садржајем укупних фенола.

Листови *R. caesius* су снажно инхибиторно дејство на α -глукозидазу и умерено на α -амилазу показали и у раду Grochowski и сар. (2019), што је у сагласности са резултатима ове докторске дисертације. Етил-ацетатна фракција је била посебно ефикасна у инхибицији α -глукозидазе, док је диетил-етарска успешније деловала на α -амилазу.

Spínola и сар. (2019) су проучавали антидијабетичне ефекте листова и плодова *R. grandifolius* и утврдили да екстракти знатно јаче инхибирају α -глукозидазу изоловану из квасца, него ону изоловану из сисара, што је последица разлика у структури каталитичког дела ензима (Shai и сар., 2011). Упркос различитостима између ова два ензима, добијени резултати за та два модела су снажно позитивно корелирали. Екстракти листова *R. grandifolius* су се показали као потенцијално бољи антидијабетични агенси што подржава резултате презентоване у овој докторској дисертацији. Такође, као и аутори претходних публикација, Spínola и сар. (2019) су доказали јаче инхибиторно дејство на α -глукозидазу, него на α -амилазу.

Liu и сар. (2020) су указали на антидијабетични потенцијал *R. suavissimus* док су Tian и сар. (2021) исто потврдили за *R. corchorifolius*.

Поједини аутори су сугерисали да су за инхибицију α -глукозидазе одговорне хидрокси-циметне киселине и антоцијани, пре свега цијанидин-3-глукозид. Цијанидин-3-глукозид је доминантно једињење у врстама овог рода и аутори су указали да ово једињење успешно инхибира α -глукозидазу сличним механизмом као и акарбоза, односно компетитивно се везује за активно место ензима и тиме онемогућава хидролизу угљених хидрата (Spínola и сар., 2019). Насупрот наведеном, поједини аутори су установили значајну антидијабетичну активност плодова биљака рода *Rubus* који нису били богати антоцијанима и на основу тога утврдили да нису искључиво ова једињења одговорна за испољену активност (Grussu и сар., 2011).

Корелације успостављене између фенолног профила испитиваних врста и антидијабетичне активности указују да фенолна једињења имају утицаја на испољено дејство. Ипак, на антидијабетичну активност можда већи утицај имају појединачна једињења и њихов синергистички ефекат него количина укупних секундарних метаболита, што су сугерисали и други аутори (Cheplick и сар., 2007).

Антидијабетична активност коју су показале испитиване врсте у оквиру ове докторске дисертације је од изузетног значаја, јер се може применити у превенирању и контроли дијабетеса типа 2. Наиме, велика је потреба за антидијабетичним агенсима, посебно оним који испољавају умерено дејство на α -амилазу и јако на α -глукозидазу, као што је презентовано у овој докторској дисертацији. Снажно инхибиторно дејство које испољавају синтетички агенси када је у питању α -амилаза није пожељно, јер узрокује ферментацију несварених полисахарида у колону што доводи до дијареје, абдоминалних болова, надимања и других гастроинтестиналних проблема (Cheplick и сар., 2007; Sarkar и сар., 2016; Uysal и сар., 2019). Осим тога, за нека фенолна једињења, попут цијанидин-3-глукозида који је доминантно фенолно једињење у испитиваним врстама рода *Rubus* је доказано да делују синергистички са комерцијалним лековима због чега се може кориговати доза неопходна да би се дијабетес контролисао. Тиме се консеквентно смањују и наведени нежељени ефекти, али и токсично дејство на јетру (Sancho и Pastore, 2012).

ЗАКЉУЧЦИ

5. Закључци

На основу резултата представљених у оквиру ове докторске дисертације изведени су следећи закључци:

➤ Врсте *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* обилују секундарним метаболитима из групе фенолних једињења. Количина фенолних једињења у екстрактима наведених врста се статистички значајно разликује у зависности од поларности екстрактанта и биљног органа из ког су изолована.

➤ Екстракти листова се одликују статистички значајно већом концентрацијом фенолних и флавоноидних једињења у односу на плодове. Антоцијани су заступљенији у екстрактима листова врста *P. mahaleb* и *P. spinosa*, док је у екстрактима плодова *R. discolor* и *R. serpens* констатована већа количина ових једињења.

➤ У свим екстрактима листова *P. mahaleb*, *P. spinosa* и *R. discolor*, као и воденом екстракту листа *R. serpens* су заступљеније хидрокси-циметне киселине, за разлику од етанолног екстракта листа *R. serpens* и екстракта плодова где су доминирале хидрокси-бензоеве фенолне киселине.

➤ У екстрактима листова *P. mahaleb* доминантне фенолне киселине су *p*- и *o*-кумаринска киселина, а у плодовима протокатехинска и гална. У воденом екстракту листа *P. spinosa*, као доминантне компоненте су констатоване кафена и хлорогенска, док је у етанолном то била *p*-кумаринска киселина. Међу хидрокси-циметним киселинама, у наведеним екстрактима доминирају *p*-хидрокси-бензоева и гална киселина. У екстрактима листова *R. discolor* и *R. serpens* доминантне фенолне киселине су хлорогенска, кафена и гална, а у екстрактима плодова протокатехинска и гална киселина.

➤ Екстракти плодова *R. discolor* и *R. serpens* су богати антоцијанима. Антоцијани су у обе врсте присутни у значајно већим концентрацијама у односу на фенолне киселине, при чему се као доминантно једињење издвојио цијанидин-глукозид/галактозид.

➤ Екстракти *R. discolor* и *R. serpens* су показали бољу антиоксидантну активност у односу на врсте рода *Prunus*, при чему су се посебно истакли екстракти листова, нарочито екстракти листова *R. serpens*.

➤ Корелације између резултата антиоксидантних тестова указују да екстракти *P. mahaleb*, *P. spinosa* и *R. discolor* антиоксидантну активност испољавају путем трансфера електрона и/или водониковог атома, док екстракти *R. serpens* антиоксидантна својства испољавају углавном путем трансфера водониковог атома.

➤ Екстракти врста рода *Rubus* су успешније деловали на патогене бактерије него екстракти врста рода *Prunus*. Екстракти листова *P. mahaleb*, *R. discolor* и *R. serpens* су испољили ефикасније бактериостатичко и бактерицидно дејство на већину тестираних патогених бактерија, него екстракти плодова истих врста. Значајно антифунгално дејство су испољили етанолни екстракт листа *P. spinosa* и водени екстракт листа *R. serpens* на *Aspergillus versicolor*. Екстракти плодова *R. discolor* и етанолни екстракт листа *R. serpens* су умерено фунгистатичко и фунгицидно дејство имали на већину тестираних микромицета.

➤ Екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens* су испољили антитуморску активност услед чега су одабрани за детаљније анализе како би се стекао потпунији

увид у механизам њиховог деловања. Утврђено је да екстракти на HeLa ћелијама изазивају морфолошке промене карактеристичне за апоптозу, као и да повећавају удео HeLa ћелија у G1 фази ћелијског циклуса на рачун оних у S и G2M фази.

➤ Етанолни екстракти свих врста су ефикасно инхибирани α -амилазу и α -глукозидазу. Врсте рода *Rubus* су показале јачу антидијабетичну активност, посебно етанолни екстракти листова *R. discolor* и *R. serpens*, који су значајно успешније инхибирани α -глукозидазу у односу на позитивну контролу. Сви екстракти су јачи инхибиторни утицај остварили на α -глукозидазу него на α -амилазу, што је од посебне важности будући да су тренутна истраживања усмерена на синтезу антидијабетичних агенаса са наведеним карактеристикама, јер је установљено да значајно побољшавају квалитет живота оболелих.

➤ Добијене корелације указују да квалитативни и квантитативни хемијски састав утиче на испољене биолошке активности. Поред тога синергистички ефекат фенолних компоненти вероватно има великог утицаја на биолошке активности испитиваних екстраката.

➤ До сада, *P. mahaleb*, *P. spinosa* и *R. discolor* нису довољно, док *R. serpens* уопште није истражена са аспекта хемијског састава и биолошких активности, те презентовани резултати у значајној мери обогаћују и проширују постојећа сазнања и оправдавају традиционалну употребу ових биљака у лечењу болести чији је настанак и развој уско повезан са оксидативним стресом (канцер и дијабетес).

➤ Наредна истраживања би требало усмерити на детаљније испитивање хемијског састава, пре свега *R. discolor* и *R. serpens*, са посебним фокусом на екстракте листова ових врста. Требало би одредити у којој фенофази је најбоље узорковати биљни материјал, као и оптимизовати услове екстракције како би се добио најбољи принос фенолних једињења, а затим детаљније проучити молекуларне механизме којима екстракти испољавају антиоксидантно, а потом и антитуморско и антидијабетично дејство што би за циљ имало имплементацију добијених резултата у прехранбеној и фармацеутској индустрији. Таква истраживања ће бити од посебног значаја у пост-ковид-19 ери, јер је, због пандемије, глобално повећана свест како о важности превенције и јачању имунитета, тако и о потреби за новим фармаколошки активним једињењима природног порекла. У томе би важну улогу могле имати и биљке испитиване у оквиру ове докторске дисертације и из њих изоловани секундарни метаболити, нарочито ако се има у виду да су испољиле значајно инхибиторно дејство на хидролитичке ензиме угљених хидрата, будући да инфекција вирусом SARS-CoV-2 може изазвати теже симптоме и компликације код оболелих од дијабетеса, а такође и појаву ове болести као последицу COVID-19.

6. Литература

- ABEDINI, A., COLIN, M., HUBERT, J., CHARPENTIER, E., ANGELIS, A., BOUNASRI, H., BERTAUX, B., KOTLAND, A., NUZILLARD, J.-M., RENAULT, J.-H., & GANGLOFF, S. C. (2020). Abundant extractable metabolites from temperate tree barks: The specific antimicrobial activity of *Prunus avium* extracts. *Antibiotics*, 9(3): 111.
- ACERO, N., GRADILLAS, A., BELTRAN, M., GARCÍA, A. & MINGARRO MUÑOZ, D. (2019). Comparison of phenolic compounds profile and antioxidant properties of different cherry *Prunus avium* L.) varieties. *Food Chemistry*, 279: 260-271.
- ACHUTHAN, C. R., BABU, B. H., & PADIKKALA, J. (2003). Antioxidant and hepatoprotective effects of *Rosa damascena*. *Pharmaceutical biology*, 41(5): 357-361.
- ACOSTA-MONTOYA, Ó., VAILLANT, F., COZZANO, S., MERTZ, C., PÉREZ, A. M., & CASTRO, M. V. (2010). Phenolic content and antioxidant capacity of tropical highland blackberry (*Rubus adenotrichus* Schldtl.) during three edible maturity stages. *Food Chemistry*, 119(4): 1497-1501.
- ADANSON, M. (1763). *Familles des plantes par M. Adanson...* chez Vincent.
- ADEJUWON, A. O., ONI, A. O., AJAYI, A. A., & OLUTIOLA, P. O. (2009). Cellulase activity in tomato fruits infected with *Penicillium funiculosum* Thom. *African Journal of Plant Science*, 3(5): 113-116.
- AHMED, A. M. (2002). History of diabetes mellitus. *Saudi medical journal*, 23(4):373-378.
- AKSOY-SAGIRLI, P., YILMAZ-OZDEN, T., OZSOY, N., CELIK, B. O., KULTUR, S., & MELIKOGLU, G. (2017). *In vitro* biological effects of *Crataegus microphylla* C. Koch. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 16(2): 189-196.
- ALAM, M. N., BRISTI, N. J., & RAFIQUZZAMAN, M. (2013). Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2): 143-152.
- ALARCÓN, R., PARDO-DE-SANTAYANA, M., PRIESTLEY, C., MORALES, R., & HEINRICH, M. (2015). Medicinal and local food plants in the south of Alava (Basque Country, Spain). *Journal of Ethnopharmacology*, 176: 207-224.
- ALICE, L. A., & CAMPBELL, C. S. (1999). Phylogeny of *Rubus* (Rosaceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 86(1): 81-97.
- ALTUNDAG, E., & OZTURK, M. (2011): Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Precedia Social and Behavioral Sciences* 19: 756-777. The 2nd International Geography Symposium GEOMED2010.
- ALVARADO, C., ÁLVAREZ, P., PUERTO, M., GAUSSERÈS, N., JIMÉNEZ, L., & DE LA FUENTE, M. (2006). Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice. *Nutrition*, 22(7-8): 767-777.
- ALZHRANI, K. K., ALZHRANI, S. K., ALREFAEI, F. H., ALJOHANI, A. M., ALJOHANI, H. B., ALMARWANI, G. S., & ALNAJJAR, A. M. (2020). An evaluation of some chemical and natural agents for their antifungal activities against *Aspergillus niger* as a contamination fungal in indoor environment. *Plant Archives*, 20(1): 1435-1438.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 37(Supplement 1), S81-S90.
- AMIN, I., ZAMALIAH, M. M., & FOONG, C. W. (2004). Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. *Food Chemistry*, 87: 581-586.
- ANTONIO, B. T. J., MARGARITA, C. R., & DANIEL, M. I. (2015). Biological properties and antioxidant activity of hawthorn *Crataegus mexicana*. *Journal of Pharmacogenomics & Pharmacoproteomics*, 6(4): 1.

- ARUMUGAM, G., MANJULA, P., & PAARI, N. (2013). A review: Anti diabetic medicinal plants used for *diabetes mellitus*. *Journal of Acute Disease*, 2(3), 196-200.
- BAEK, E. Y., LEE, S. M., EUN LEE, J., PARK, E., KIM, Y., JUNG, I. K., & KIM, J. H. (2013). Effect of *Rubus coreanus* Miquel on prostate tumour growth. *Journal of Functional Foods*, 5(3): 1478-1486.
- BALTAS, N., PAKYILDIZ, S., CAN, Z., DINCER, B., & KOLAYLI, S. (2017). Biochemical properties of partially purified polyphenol oxidase and phenolic compounds of *Prunus spinosa* L. subsp. *dasyphylla* as measured by HPLC-UV. *International journal of food properties*, 20(sup2), 1377-1391
- BARROS, L., OLIVEIRA, S., CARVALHO, A. M., & FERREIRA, I. C. (2010). *In vitro* antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 572-579.
- BAYRAMCI, N. S., ERDÖNMEZ, D., BUDAK, Y., & EĞRI, Ö. (2013). Antibacterial activity of ethanol extracts of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.) against some bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, (24): S113.
- BENTHAM, G., & HOOKER, J. D. (1865). *Genera plantarum: ad exemplaria imprimis in herbariis kewensibus servata, definita. Vol. Primum. Sistens dicotyledonum polypetalorum ordines LXXXIII: Ranunculaceas-Cornaceas*. Reeve.
- BENVENUTI, S., PELLATI, F., MELEGARI, M. A., & BERTELLI, D. (2006). Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. *Journal of food science*, 69(3): FCT164-FCT169.
- BENZIE, I. F., & STRAIN, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1): 70-76.
- BIJLSMA, R. J., & HAVEMAN, R. (2007). *Rubus canduliger*, a new regional species from the Netherlands, with notes on the range structure and dynamics of brambles (*Rubus*, Rosaceae). *Folia Geobotanica*, 42(3), 315-329.
- BLANDO, F., CALABRISO, N., BERLAND, H., MAIORANO, G., GERARDI, C., ANNUNZIATA CARLUCCIO, M., & ANDERSEN ØYVIND. (2018). Radical scavenging and anti-inflammatory activities of representative anthocyanin groupings from pigment-rich fruits and vegetables. *International Journal of Molecular Science*, 19: 169.
- BLANDO, F., & OOMAH, B. D. (2019). Sweet and sour cherries: Origin, distribution, nutritional composition and health benefits. *Trends in Food Science & Technology*, 86: 517-529.
- BLANDO, F., ALBANO, C., LIU, Y., NICOLETTI, I., CORRADINI, D., TOMMASI, N., GERARDI, C., MITA, G., & KITTS, D. D. (2016). Polyphenolic composition and antioxidant activity of the under-utilised *Prunus mahaleb* L. fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(8): 2641-2649.
- BLOIS, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617): 1199-1200.
- BORTIRI, E., OH, S. H., JIANG, J., BAGGETT, S., GRANGER, A., WEEKS, C., BUCKINGHAM, M., POTTER, D., & PARFITT, D. E. (2001). Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and the chloroplast *trnL-trnF* spacer DNA. *Systematic Botany*, 26(4): 797-807.
- BORZELLECA, J. F. (2000). Paracelsus: herald of modern toxicology. *Toxicological Sciences*, 53(1): 2-4.
- BOULAY N. (1864-1869). Ronces des Vosges. Rambervillers & St. Dié.
- BOURGAUD, F., GRAVOT, A., MILESI, S., & GONTIER, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5): 839-851.
- BREED, R. S., & MURRAY, E. (1957). GD, AND SMITH, N. R. *Bergey's manual of determinative bacteriology. 7th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.*

- BROUILLARD R. & DELAPORTE B. (1977). Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton-transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin-3-glucoside. *Journal of American Chemical Society*, 99: 8461-8468.
- BROUILLARD R., MAZZA G., SAAD Z., ALBRECHT- GARY A. M., CHEMINAT A. (1989): The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of American Chemical Society*, 111: 2604-2610.
- BUI-KLIMKE, T. R., & WU, F. (2015). Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(13): 1860-1869.
- BURGOS-MORÓN, E., ABAD-JIMÉNEZ, Z., MARTINEZ DE MARANON, A., IANNANTUONI, F., ESCRIBANO-LÓPEZ, I., LÓPEZ-DOMÈNECH, S., SALOM, C., JOVER, A., MORA, V., ROLDAN, I., SOLÁ, E., ROCHA, M., & VÍCTOR, V. M. (2019). Relationship between oxidative stress, ER stress, and inflammation in type 2 diabetes: the battle continues. *Journal of clinical medicine*, 8(9): 1385.
- CABAÑES, F. J., BRAGULAT, M. R., & CASTELLÀ, G. (2010). Ochratoxin A producing species in the genus *Penicillium*. *Toxins (Basel)*, 2(5): 1111-1120.
- CALVO, M. I. & CAVERO, R. Y. (2014). Medicinal plants used for cardiovascular diseases in Navarra and their validation from Official sources. *Journal of Ethnopharmacology*, 157: 268-273.
- CAVERO, R.Y., AKERRETA, S., & CALVO, M.I. (2011): Pharmaceutical ethnobotany in the Middle Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology*, 137: 844-855.
- CHEN, S. L., YU, H., LUO, H. M., WU, Q., LI, C. F., & STEINMETZ, A. (2016). Conservation and sustainable use of medicinal plants: problems, progress, and prospects. *Chinese medicine*, 11(1): 37.
- CHEPLICK, S., KWON, Y. I., BHOWMIK, P., & SHETTY, K. (2007). Clonal variation in raspberry fruit phenolics and relevance for diabetes and hypertension management. *Journal of Food Biochemistry*, 31(5): 656-679.
- CHRISTENSEN, M. (1982). The *Aspergillus ochraceus* group: two new species from western soils and a synoptic key. *Mycologia*, 74(2): 210-225.
- CHRUBASIK, C., ROUFOGALIS, B. D., MÜLLER-LADNER, U., & CHRUBASIK, S. (2008). A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(6): 725-733.
- COHEN, G., RIAHI, Y., & SASSON, S. (2012). Free radicals and metabolic disorders. *Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials*.
- CONDELLO, M., PELLEGRINI, E., SPUGNINI, E. P., BALDI, A., AMADIO, B., VINCENZI, B., OCCHIONERO, G., DELFINE, S., MASTRODONATO, F., & MESCHINI, S. (2019). Anticancer activity of "Trigno M", extract of *Prunus spinosa* drupes, against *in vitro* 3D and *in vivo* colon cancer models. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118: 109281.
- CONFORTI, F., MARRELLI, M., CARMELA, C., MENICHINI, F., VALENTINA, P., UZUNOV, D., GIANCARLO, A. S., DUEZ, P., & MENICHINI, F. (2011). Bioactive phytonutrients (omega fatty acids, tocopherols, polyphenols), *in vitro* inhibition of nitric oxide production and free radical scavenging activity of non-cultivated Mediterranean vegetables. *Food chemistry*, 129(4): 1413-1419.
- CROZIER, A., CLIFFORD, M. N., & ASHIHARA, H. (Eds.). (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. John Wiley & Sons.
- DA SILVA PINTO, M., DE CARVALHO, J. E., LAJOLO, F. M., GENOVESE, M. I., & SHETTY, K. (2010). Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch.) using *in vitro* models. *Journal of Medicinal Food*, 13(5): 1027-1035.

- DA SILVA, L. P., PEREIRA, E., PIRES, T. C., ALVES, M. J., PEREIRA, O. R., BARROS, L., & FERREIRA, I. C. (2019). *Rubus ulmifolius* Schott fruits: A detailed study of its nutritional, chemical and bioactive properties. *Food Research International*, 119: 34-43.
- DAI, J., & MUMPER, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15(10): 7313-7352.
- DANEMAN, D. (2006). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 367(9513): 847-858.
- DARIAS, V., BRAVO, L., RABANAL, R., SÁNCHEZ MATEO, C., GONZÁLES LUIS, R.M., HERNÁNDEZ PÉREZ, A.M. (1989): New contribution to the ethnopharmacological study of The Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 25: 77-92.
- DASHTIZADEH, Z., KASHI, F. J., & ASHRAFI, M. (2021). Phytosynthesis of copper nanoparticles using *Prunus mahaleb* L. and its biological activity. *Materials Today Communications*, 102456.
- DAVIN-REGLI, A. (2015). *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 6: 392.
- DE JUSSIEU, A. L. (1789). *Genera plantarum secundum ordines naturales disposita juxta methodum in horto regio parisiensi exaratam, anno 1774*. veuve Herissant.
- DE MIGUEL, D., GÓMEZ, P., GONZÁLEZ, R., GARCÍA-SUÁREZ, J., CUADROS, J. A., BAÑAS, M. H., ROMANYK, J., & BURGALETA, C. (2005). Nonfatal pulmonary *Trichoderma viride* infection in an adult patient with acute myeloid leukemia: report of one case and review of the literature. *Diagnostic Microbiology and infectious disease*, 53(1): 33-37.
- DEI CAS, L., PUGNI, F. & FICO, G. (2015): Tradition of use on medicinal species in Vulfurva (Sondrio, Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 163: 113-134.
- DELGADO-VARGAS, F., & PAREDES-LOPEZ, O. (2002). *Natural colorants for food and nutraceutical uses*. CRC press.
- DEVITA, V. T., & CHU, E. (2008). A history of cancer chemotherapy. *Cancer research*, 68(21): 8643-8653.
- DI NOVELLA, R., DI NOVELLA, N., DE MARTINO, L., MANCINI, E. & DE FEO, V. (2013). Traditional plant use in the National Park of Cilento and Vallo di Diano, Campania, Southern, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 145: 328-342.
- DIKIĆ D., BALTA, V., KMETIC, I., MURATI, T., ORSOLIC, N., DRAGOVIC UZELAC, V. & LANDEKA, I. (2018). UPLC/MS analysis of plasma bioavailability of 32 polyphenols in C57BL/6 mice treated with single acute dose (24 h) of flower extract of the blackthorn *Prunus spinosa* L. *Molecular and Experimental Biology in Medicine*, 2: 23-31.
- DOGAN, A., BULUT, G., SENKARDES, I., & TUZLACI, E. (2016). An ethnopharmacological analysis of Rosaceae taxa in Turkey. In *WEI International Academic Conference Proceedings. Boston. USA* (44-51).
- DONG, W., CHEN, D., CHEN, Z., SUN, H., & XU, Z. (2021). Antioxidant capacity differences between the major flavonoids in cherry (*Prunus pseudocerasus*) *in vitro* and *in vivo* models. *LWT*, 141: 110938.
- DOSSETT, M., LEE, J., & FINN, C. E. (2010). Variation in anthocyanins and total phenolics of black raspberry populations. *Journal of Functional Foods*, 2(4): 292-297.
- DUJMOVIĆ PURGAR, D., DURALIJA, B., VOĆA, S., VOKURKA, A., & ERCISLI, S. (2012). A comparison of fruit chemical characteristics of two wild grown *Rubus* species from different locations of Croatia. *Molecules*, 17(9): 10390-10398.
- DURAZZO, A., LUCARINI, M., SOUTO, E. B., CICALA, C., CAIAZZO, E., IZZO, A. A., NOVELLINO, E., & SANTINI, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- DYDUCH-SIEMIŃSKA, M., NAJDA, A., DYDUCH, J., GANTNER, M., & KLIMEK, K. (2015). The content of secondary metabolites and antioxidant activity of wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). *Journal of analytical methods in chemistry*, 2015.

- ĐORĐEVIĆ V. B., ĆOSIĆ B, VLAHOVIĆ P. (2008). MOLEKULSKI MEHANIZMI APOPTOZE. U M M ĐUKIĆ: *Oksidativni stres Kliničko-dijagnostički značaj*. Mono i Manjana. 39-55.
- ĐORĐEVIĆ, V. B., PAVLOVIĆ, D. D., & KOCIĆ, G. M. (2000). *Biohemija slobodnih radikala*. Medicinski fakultet.
- ĐUKIĆ, D. A., MANDIĆ, L. G., & STANOJKOVIĆ, A. B. 2010. *Praktikum iz mikrobiologije*. Budućnost, Novi Sad, 2010
- ĐUKIĆ, M. M. (2008). Oksidativna modifikacija proteina i DNK. U M. M. ĐUKIĆ: *Oksidativni stres Kliničko-dijagnostički značaj*. Mono i Manjana, 21-39.
- EL GHARRAS, H. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications—a review. *International journal of food science & technology*, 44(12): 2512-2518.
- ELANSARY, H. O., SZOPA, A., KUBICA, P., EL-ANSARY, D. O., EKIERT, H., & AL-MANA, F. A. (2020). *Malus baccata* var. *gracilis* and *Malus toringoides* bark polyphenol studies and antioxidant, antimicrobial and anticancer activities. *Processes*, 8(3): 283.
- EL-ASTAL, Z. Y., ASHOUR, A. E. R. A., & KERRIT, A. A. M. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts in Palestine. *Pakistan Journal of Medicinal Science*, 21 (2): 187-193.
- EL-HELA, A. A., ABDELHADY, N. M., GONAI, M. H., & BADR, K. A. (2017). Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of crude and green synthesized silver nanoparticles' extracts of *Crataegus sinaica* Boiss. leaves. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 45(1): 223-232.
- EL-MESALLAMY, A. M., HUSSEIN, S. A., GERBY, M. E., & ABD EL AZIM, M. H. (2013). Phenolic composition and biological activities of methanolic extract of strawberry leaves (*Fragaria ananassa*). *Natural Products: An Indian Journal*, 9: 251-265.
- EL-NAGERABI, S. A., AHMED, A. H., & ELSHAFIE, A. E. (2016). *In vitro* evaluation of selected plant extracts as biocontrol agents against black mold (*Aspergillus niger* Van Tieghem) of onion bulbs (*Allium cepa* L.). *Science and Technology*, 5(1): 147-152.
- ERBIL, N., MURATHAN, Z. T., ARSLAN, M., ILCIM, A., & SAYIN, B. (2018). Antimicrobial, antioxidant, and antimutagenic activities of five Turkish pear cultivars. *Erwerbs-Obstbau*, 60(3): 203-209.
- ERCISLI, S. (2007). Chemical composition of fruits in some rose (*Rosa* spp.) species. *Food chemistry*, 104(4): 1379-1384.
- EVANS, R. C., ALICE, L. A., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., & DICKINSON, T. A. (2000). The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility. *Molecular phylogenetics and evolution*, 17(3): 388-400.
- FARBER, J. M., & PETERKIN, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 55(3): 476-511.
- FERREIRA, I. C., BAPTISTA, P., VILAS-BOAS, M., & BARROS, L. (2007). Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food chemistry*, 100(4): 1511-1516.
- FOCKE W. O. (1894). Rosaceae. In: ENGLER A., PRANTL K., eds. Die Natürlichen Pflanzenfamilien, Vol. 3. Engelmann, Leipzig, Germany, pp.1-16
- FOCKE, W. O. (1877). *Synopsis Ruborum Germaniae*.
- FOMICHEVA, G. M., VASILENKO, O. V., & MARFENINA, O. E. (2006). Comparative morphological, ecological, and molecular studies of *Aspergillus versicolor* (Vuill.) Tiraboschi strains isolated from different ecotopes. *Microbiology*, 75(2), 186-191.
- FORESTER A. (1878). *Flora excursoria des Regierungseyirks Aachen*. Aachen.
- FRATERNALE, D., GIAMPERI, L., BUCCHINI, A., SESTILI, P., PAOLILLO, M., & RICCI, D. (2009). *Prunus spinosa* fresh fruit juice: antioxidant activity in cell-free and cellular systems. *Natural Product Communications*, 4(12): 1934578X0900401211.

- GALANAKIS, C. M., RIZOU, M., ALDAWOU, T. M., UCAK, I., & ROWAN, N. J. (2021). Innovations and technology disruptions in the food sector within the COVID-19 pandemic and post-lockdown era. *Trends in Food Science & Technology*, 110: 193-200.
- GALLUZZI, L., & KROEMER, G. (2008). Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell*, 135(7): 1161-1163.
- GAUTAM, A. K., SHARMA, S., AVASTHI, S., & BHADAURIA, R. (2011). Diversity, pathogenicity and toxicology of *A. niger*: an important spoilage fungi. *Research Journal of Microbiology*, 6(3): 270-280.
- GEGIU, G., BRANZA, A. D., BUCUR, L., GRIGORIAN, M., TACHE, T., & BADEA, V. (2015). Contributions to the antimicrobial and antifungal study of the aqueous extract of *Prunus spinosa* L. *Farmacia*, 63(2): 275-279.
- GENEVIER G. (1869): Essai monographique sur le Rubus du Bassin de la Loire. Mém. Soc. Acad. Maine. Loire 24: 1-346.
- GEORGE, B. P., ABRAHAMSE, H., & HEMMARAGALA, N. M. (2017). Phenolics from *Rubus fairholmianus* induces cytotoxicity and apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. *Chemico-biological interactions*, 275: 178-188.
- GEORGE, B. P., PARIMELAZHAGAN, T., & CHANDRAN, R. (2014). Anti-inflammatory and wound healing properties of *Rubus fairholmianus* Gard. root—An *in vivo* study. *Industrial Crops and Products*, 54: 216-225.
- GERARDI, C., FRASSINETTI, S., CALTAVUTURO, L., LEONE, A., LECCI, R., CALABRISO, N., ANNUNZIATA CARLUCCIO, M., BLANDO, F., & MITA, G. (2016). Anti-proliferative, anti-inflammatory and anti-mutagenic activities of a *Prunus mahaleb* L. anthocyanin-rich fruit extract. *Journal of Functional Foods*, 27: 537-548
- GERARDI, C., TOMMASI, N., ALBANO, C., BLANDO, F., RESCIO, L., PINTHUS, E., & MITA, G. (2015). *Prunus mahaleb* L. fruit extracts: a novel source for natural food pigments. *European Food Research and Technology*, 241(5): 683-695.
- GHORA, C., & PANIGRAHI, G. (1995). The family Rosaceae in India, vol. 2. *Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehra Dun, India*.
- GHORBANI, A., NAGHIBI, F., & MOSADEGH, M. (2006). Ethnobotany, ethnopharmacology and drug discovery.
- GOMAA, E. Z. (2013). *In vitro* antioxidant, antimicrobial, and antitumor activities of bitter almond and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Food Science and Biotechnology*, 22(2): 455-463.
- GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A. V., VÁZQUEZ-ESPINOSA, M., ESPADA-BELLIDO, E., FERREIRO-GONZÁLEZ, M., CARRERA, C., PALMA, M., ÁNGEL ÁLVAREZ, J., BARBERO, G. F. & AYUSO, J. (2020). Optimization of analytical ultrasound-assisted methods for the extraction of total phenolic compounds and anthocyanins from sloes (*Prunus spinosa* L.). *Agronomy*, 10(7): 966.
- GRAY, A. (1859). *Manual of the botany of the northern United States*. Ivison & Phinney.
- GROCHOWSKI, D. M., UYSAL, S., ZENGIN, G., & TOMCZYK, M. (2019). *In vitro* antioxidant and enzyme inhibitory properties of *Rubus caesius* L. *International journal of environmental health research*, 29(3): 237-245.
- GROH, H., & SENN, H. A. (1940). *Prunus* in eastern Canada. *Canadian Journal of Research*, 18(7), 318-346.
- GRUSSU, D., STEWART, D., & MCDUGALL, G. J. (2011). Berry polyphenols inhibit α -amylase *in vitro*: Identifying active components in rowanberry and raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6): 2324-2331.
- GUIMARÃES, R., BARROS, L., CALHELHA, R. C., CARVALHO, A. M., QUEIROZ, M. J. R., & FERREIRA, I. C. (2014). Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: a comparative study. *Plant Foods for Human Nutrition*, 69(1): 37-42.

- GUISTI M. M., & WROLSTAD R. E. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV visible spectroscopy. *Current protocols in food analytical chemistry*, 1: F1-2.
- GULLETT, N. P., AMIN, A. R., BAYRAKTAR, S., PEZZUTO, J. M., SHIN, D. M., KHURI, F. R., AGGARWAL BB., SURH Y-J & KUCUK, O. (2010, June). Cancer prevention with natural compounds. In *Seminars in oncology* (Vol. 37, No. 3, pp. 258-281). WB Saunders.
- GÜNDÜZ, G. T. (2013). Antimicrobial activity of sloe berry purees on *Salmonella* spp. *Food control*, 32(2), 354-358.
- GÜRBÜZ, İ., ÖZÇELİK, B., GÜNBATAN, T., AKKOL, E. K., ŞAHİNÖZ, M., & AKAYDIN, G. (2021). Antibacterial, antifungal and enzyme inhibitory effects of selected plants from Turkey. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 34(3).
- GUSTAFSSON, Ä. (1943). The Genesis of the European Blackberry.
- HAJAJI, S., JABRI, M. A., SIFAOU, I., LÓPEZ-ARENCEBIA, A., REYES-BATLLE, M., B'CHIR, F., VALLADARES, B., PINERO, J., LORENZO-MORALES, J., & AKKARI, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and *in vitro* ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental parasitology*, 183: 224-230.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1): 57-70.
- HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5): 646-674.
- HALLIWELL, B. (2001). Free Radicals and other reactive species in Disease. In: *Encyclopedia of life sciences*, National University of Singapore, Singapore.
- HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine 4th edition*. Oxford University Press Inc, New York, USA.
- HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA O. I. (1995). The Characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7): 61-617.
- HARBORNE, J. B. (1999). Classes and functions of secondary products from plants. *Chemicals from plants*, 1-25.
- HARRIS, R. E. (2019). *Epidemiology of chronic disease: global perspectives*. Jones & Bartlett Learning.
- HAVEMAN, R., & RONDE, I. D. (2013). The role of the Weberian Reform in European *Rubus* research and the taxonomy of locally distributed species—which species should we describe? *Nordic Journal of Botany*, 31(2): 145-150.
- HESLOP-HARRISON, Y. (1968). Genus *Rubus* L. In: TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., MOORE, D. M., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M., & WEBB, D. A. (Eds.), *Flora Europaea*, 2, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 7-25.
- HEYWOOD, V. H. (2007). *Flowering plants of the world*. Mayflower Book.
- HIDALGO, G. I., & ALMAJANO, M. P. (2017). Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. *Antioxidants*, 6(1): 7.
- HOLUB, J. (1997). Some considerations and thoughts on the pragmatic classification of apomictic *Rubus* taxa. *Osnabrück. Naturwiss. Mitt*, 23: 147-155.
- HUANG, D., OU, B., & PRIOR, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6): 1841-1856.
- HUANG, D., OU, B., & PRIOR, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6): 1841-1856.
- HUMMER, K. E. (2010). *Rubus* pharmacology: antiquity to the present. *HortScience*, 45(11): 1587-1591.
- HUMMER, K. E., & JANICK, J. (2009). Rosaceae: taxonomy, economic importance, genomics. In *Genetics and genomics of Rosaceae*. Springer, New York, NY, pp. 1-17.

- IDOLO, M., MOTTI, R., MAZZOLENI, S. (2010). Ethnobotanical and phytochemical knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise National Park (Italian Apennines). *Journal of Ethnopharmacology*, 127: 379 - 395.
- JAKOBEK, L., ŠERUGA, M., ŠERUGA, B., NOVAK, I., & MEDVIDOVIĆ-KOSANOVIĆ, M. (2009). Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *International journal of food science & technology*, 44(4): 860-868.
- JAMSHIDI-KIA, F., LORIGOOINI, Z., & AMINI-KHOEI, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of herbmed pharmacology*, 7(1): 1-7.
- JANICK, J. (2005). The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. *Plant breeding reviews*, 25: 255-320.
- JANIĆIJEVIĆ, H. S., KENIĆ, J., & ARSIĆ-KOMLJENIĆ, G. (2008). Antioksidantni potencijal biljke matočina (*Mellitis melisophyllum*). *Praxis Medica*, 36(3-4): 083-087.
- JESUS, F., GONÇALVES, A. C., ALVES, G., & SILVA, L. R. (2019). Exploring the phenolic profile, antioxidant, antidiabetic and anti-hemolytic potential of *Prunus avium* vegetal parts. *Food Research International*, 116: 600-610.
- JOUAD, H., MAGHRANI, M., & EDDOUKS, M. (2002). Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81(3): 351-356.
- JUDD, W. S., & OLMSTEAD, R. G. (2004). A survey of tricolpate (eudicot) phylogenetic relationships. *American Journal of Botany*, 91(10): 1627-1644.
- JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F., & DONOGHUE, M. J. (1999). Plant systematics: A phylogenetic approach. *Ecología mediterránea*, 25(2): 215
- JÚNIOR, J. O. C. S., COSTA, R. M. R., TEIXEIRA, F. M., & BARBOSA, W. L. R. (2011). Processing and quality control of herbal drugs and their derivatives. *Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas; Intech: Rijeka, Croatia*, 195-222.
- JURIKOVA, T., SOCHOR, J., ROP, O., MLCEK, J., BALLA, S., SZEKERES, L., ADAM, V., & KIZEK, R. (2012). Polyphenolic profile and biological activity of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) fruits. *Molecules*, 17(12): 14490-14509.
- KABERA, J. N., SEMANA, E., MUSSA, A. R., & HE, X. (2014). Plant secondary metabolites: Biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2: 377-392
- KÄHKÖNEN, M. P., & HEINONEN, M. (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3): 628-633.
- KARABEGOVIĆ I. T., STOJIČEVIĆ, S. S., VELIČKOVIĆ, D. T., TODOROVIĆ, Z. B., NIKOLIĆ, N. Č., LAZIĆ, M. L. (2014). The effect of different extraction techniques on the composition and antioxidant activity of cherry laurel (*Prunus laurocerasus*) leaf and fruit extract. *Industrial Crops and Products*. 54: 142-148.
- KARAKAS, N., EVREN OKUR, M., OZTURK, I., AYLA, S., ESRA KARADAG, A., & ÇIÇEK POLAT, D., (2019). Antioxidant activity of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) fruit extract and cytotoxic effects on various cancer cell lines. *Medeniyet Medical Journal*, 34(3): 297-304.
- KARBOUNE, S., GERAERT, P. A., & KERMASHA, S. (2008). Characterization of selected cellulolytic activities of multi-enzymatic complex system from *Penicillium funiculosum*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(3): 903-909.
- KESER, S., CELIK, S., TURKOGLU, S., YILMAZ, Ö. & TURKOGLU, I. (2015). Antioxidant properties of *Rubus discolor* L. extracts and protective effects of its flower extract against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in wistar rats. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12: 187-206.

- KHADEM, S., & MARLES, R. J. (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy-and polyhydroxybenzoic acids: Occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*, 15(11): 7985-8005.
- KHAN, H. (2014). Medicinal plants in light of history: recognized therapeutic modality. *Journal of evidence-based complementary & alternative medicine*, 19(3): 216-219.
- KHAN, M. Q., & SHINWARI, Z. K. (2016). The ethnomedicinal profile of family Rosaceae; a study on pakistani plants. *Pakistan Journal of Botany*, 48(2): 613-620.
- KHATIB, H., REZAEI-TAVIRANI, M., KESHEL, S. H., AZODI, M. Z., OMIDI, R., & BIGLARIAN, M. (2013). Flow cytometry analysis of *Rosa damascena* effects on gastric cancer cell line (MKN45). *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 6(suppl.): 30-6.
- KHODDAMI, A., WILKES, A. M., & ROBERTS, H. T. (2013). Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*, 18: 2328-2375.
- KIM, M. K., CHOI, H. S., CHO, S. G., SHIN, Y. C., & KO, S. G. (2016). *Rubus coreanus* Miquel extract causes apoptosis of doxorubicin-resistant NCI/ADR-RES ovarian cancer cells via JNK phosphorylation. *Molecular medicine reports*, 13(5): 4065-4072.
- KINSCHER (1909): Aliquot Rubi novi. *Repert. Spec. Nov. Regni Veg.* 7:78-82, 341-344.
- KIRAKOSYAN, A., SEYMOUR, E., KAUFMAN, P. B., WARBER, S., BOLLING, S., & CHANG, S. C. (2003). Antioxidant capacity of polyphenolic extracts from leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) subjected to drought and cold stress. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(14): 3973-3976.
- KLAUNIG, J. E., & KAMENDULIS, L. M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44: 239-267.
- KLICH, M. A. (1993). Morphological studies of *Aspergillus* section *Versicolores* and related species. *Mycologia*, 85(1): 100-107.
- KOEHNE B. A. E. (1893) *Deutsche Dendrologie*. Verlag von Ferdin and Enke, Stuttgart, Germany, pp. 302, 305, 310-313.
- KOEHNE, E. (1911). Die Gliederung von *Prunus* subgen. *Padus*. *Verhandlungen des botanischen Vereins der Provinz Brandenburg*. Berlin, 52: 101-108.
- KOMAROV, L. (1971). Rosaceae: Rosoideae, Amygdaloideae. *Flora of the USSR*, 10, pp. 1-512.
- KOSTIĆ, D. A., VELICKOVIĆ, J. M., MITIĆ, S. S., MITIĆ, M. N., & RANDELOVIĆ, S. S. (2012). Phenolic content, and antioxidant and antimicrobial activities of *Crataegus oxyacantha* L (Rosaceae) fruit extract from Southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1): 117-124.
- KOSTIĆ, M., SMILJKOVIĆ, M., PETROVIĆ, J., GLAMOČLIJA, J., BARROS, L., FERREIRA, I. C. F. R., ĆIRIĆ, A., & SOKOVIĆ, M. (2017). Chemical, nutritive composition and a wide range of bioactive properties of honey mushroom *Armillaria mellea* (Vahl: Fr.) Kummer. *Food & function*, 8(9): 3239-3249.
- KOVAČEVIĆ, N. (2002). *Osnovi farmakognozije*. Srpska školska knjiga, Beograd.
- KRAUZE-BARANOWSKA, M., MAJDAN, M., HAŁASA, R., GŁÓD, D., KULA, M., FECKA, I., & ORZEŁ, A. (2014). The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food & function*, 5(10): 2536-2541.
- KRSTIĆ, T. (2018). *Antimikrobno dejstvo ceđenih sokova i ekstraktata plodova odabranog voća porodice Rosaceae*. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Klinika medicina).
- KÜLTÜR, Ş. (2007). Medicinal plants used in Kırklareli province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2): 341-364.
- KUMAR, P., REITHOFER, V., REISINGER, M., WALLNER, S., PAVKOV-KELLER, T., MACHEROUX, P., & GRUBER, K. (2016). Substrate complexes of human dipeptidyl peptidase III reveal the mechanism of enzyme inhibition. *Scientific Reports*, 6(1): 23787.

- KUMARASAMY, Y., COX, P. J., JASPARS, M., NAHAR, L., & SARKER, S. D. (2004). Comparative studies on biological activities of *Prunus padus* and *P. spinosa*. *Fitoterapia*, 75(1): 77-80.
- KUNDAKOVIĆ, T., ĆIRIĆ, A., STANOJKOVIĆ, T., SOKOVIĆ, M., & KOVAČEVIĆ, N. (2014). Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Pyrus pyraeaster* Burgsd. and *Pyrus spinosa* Forssk.(Rosaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 8(6): 511-518.
- KUNTZE, O. (1867). Reform deutscher brombeeren..
- LATGÉ, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiology reviews*, 12(2): 310-350.
- LATTANAZZIO, V. (2013). Phenolic Compounds: Introduction 50.
- LEE, J., DOSSETT, M., & FINN, C. E. (2012). *Rubus* fruit phenolic research: The good, the bad, and the confusing. *Food Chemistry*, 130(4): 785-796.
- LEE, S. H., CHO, J. Y., JEONG, H. Y., KIM, D., CHO, S. Y., KIM, W. S., & MOON, J. H. (2015). Comparison of bioactive compound contents and *in vitro* and *ex vivo* antioxidative activities between peel and flesh of pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Food Science and Biotechnology*, 24(1): 207-216.
- LEE, S., & WEN, J. (2001). A phylogenetic analysis of *Prunus* and the Amygdales (Rosaceae) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 88(1): 150-160.
- LEONTI, M., CABRAS, S., WECKERLE, C. S., SOLINAS, M. N., & CASU, L. (2010). The causal dependence of present plant knowledge on herbals—contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). *Journal of Ethnopharmacology*, 130(2): 379-391.
- LI, D., PENG, C., XIE, X., MAO, Y., LI, M., CAO, Z., & FAN, D. (2014). Antidiabetic effect of flavonoids from *Malus toringoides* (Rehd.) Hughes leaves in diabetic mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 153(3): 561-567.
- LI, H., TSAO, R., & DENG, Z. (2012). Factors affecting the antioxidant potential and health benefits of plant foods. *Canadian journal of plant science*, 92(6): 1101-1111.
- LI, X., WANG, T., ZHOU, B., GAO, W., CAO, J., & HUANG, L. (2014). Chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory potential of peels and flesh from 10 different pear varieties (*Pyrus* spp.). *Food chemistry*, 152: 531-538.
- LI, X., ZHANG, J., GAO, W., & WANG, H. (2012). Study on chemical composition, anti-inflammatory and antimicrobial activities of extracts from Chinese pear fruit (*Pyrus bretschneideri* Rehd.). *Food and chemical toxicology*, 50(10): 3673-3679.
- LIA, Z. J., WAN, C. P., CAI, L., LI, S. Q., ZHENG, X., QI, Y., DONG, J-W., YIN, T-P., ZHOU, Z-X., TAN, N-H., & DING, Z. T. (2015). Terpenoids with cytotoxic activity from the branches and leaves of *Pyrus pashia*. *Phytochemistry Letters*, 13: 246-251.
- LIBERAL, J., FRANCISCO, V., COSTA, G., FIGUEIRINHA, A., AMARAL, M. T., MARQUES, C., GIRÃO, H., LOPES, M. C., CRUZ, M. T., & BATISTA, M. T. (2014). Bioactivity of *Fragaria vesca* leaves through inflammation, proteasome and autophagy modulation. *Journal of Ethnopharmacology*, 158: 113-122.
- LIECKFELDT, E., SAMUELS, G. J., NIRENBERG, H. I., & PETRINI, O. (1999). A morphological and molecular perspective of *Trichoderma viride*: is it one or two species? *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6): 2418-2428.
- LINNEAUS, C. (1753). *Species plantarum*, vol. 1. *Larentius Salvius: Stockholm, Sweden*.
- LIU, M., LI, X., LIU, Q., XIE, S., CHEN, M., WANG, L., FENG, Y., & CHEN, X. (2020). Comprehensive profiling of α -glucosidase inhibitors from the leaves of *Rubus suavissimus* using an off-line hyphenation of HSCCC, ultrafiltration HPLC-UV-MS and prep-HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 85: 103336.

- LIU, X. Y., WANG, B. J., JIANG, C. Y., & LIU, S. J. (2007). *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. *International journal of systematic and evolutionary Microbiology*, 57(1): 66-69.
- LOOS G.H. (2008): Pflanzengeographische Beiträge zur chorologischen, taxonomischen und naturschutzfachlichen Bewertung der Sippendiversität agamospermer (apomiktischer) Blütenpflanzenkomplexe: das Beispiel *Rubus* subgenus *Rubus* (Rosaceae) – PhD thesis, Ruhr-Univ., Bochum.
- LORIAUX, D. L. (2006). Diabetes and the ebers papyrus: 1552 BC. *The Endocrinologist*, 16(2): 55-56.
- MABBERLEY, D. J. (1997). *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press.
- MALIK, Z. A., BHAT, J. A., BALABHA, R., BUSSMANN, & BHATT, A. B. (2015). Ethnomedicinal plants traditionally used in health care practices by inhabitants of Western Himalaya. *Journal of Ethnopharmacology*, 172: 133-144.
- MAMEDOV, N. (2012). Medicinal plants studies: history, challenges and prospective. *Med Aromat Plants*, 1(8): e133.
- MANDAVE, P., RANI, S., KUVALEKAR, A., & RANJEKAR, P. (2013). Antiglycation, antioxidant and antidiabetic activity of mature strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits. *International Journal of Applied Biology Pharmaceutical*, 4: 168-177.
- MARCHELAK, A., OWCZAREK, A., MATCZAK, M., PAWLAK, A., KOLODZIEJCZYK-CZEPAS, J., NOWAK, P., & OLSZEWSKA, M. A. (2017). Bioactivity potential of *Prunus spinosa* L. flower extracts: Phytochemical profiling, cellular safety, pro-inflammatory enzymes inhibition and protective effects against oxidative stress in vitro. *Frontiers in pharmacology*, 8: 680.
- MARIN, P. D. (2003). *Biohemijaska i molekularna sistematika biljaka*. NNK International.
- MARIOD, A. A., IBRAHIM, R. M., ISMAIL, M., & ISMAIL, N. (2010). Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. *Food Chemistry*, 118(1): 120-127.
- MARTINI, S., CONTE, A., & TAGLIAZUCCHI, D. (2017). Phenolic compounds profile and antioxidant properties of six sweet cherry (*Prunus avium*) cultivars. *Food Research International*, 97: 15-26.
- MARTINI, S., D'ADDARIO, C., COLACEVICH, A., FOCARDI, S., BORGHINI, F., SANTUCCI, A., FIGURA, N., & ROSSI, C. (2009). Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. *International journal of antimicrobial agents*, 34(1): 50-59.
- MCCUTCHEON, A. R., ELLIS, S. M., HANCOCK, R. E. W., & TOWERS, G. H. N. (1992). Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(3): 213-223.
- MCCUTCHEON, A. R., ELLIS, S. M., HANCOCK, R. E. W., & TOWERS, G. H. N. (1994). Antifungal screening of medicinal plants of British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology*, 44(3): 157-169.
- MCCUTCHEON, A. R., ROBERTS, T. E., GIBBONS, E., ELLIS, S. M., BABIUK, L. A., HANCOCK, R. E. W., & TOWERS, G. H. N. (1995). Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 49(2): 101-110.
- MENKOVIĆ, N., ŠAVIKIN, K., TASIĆ, S., ZDUNIĆ, G., STEŠEVIĆ, D., MILOSAVLJEVIĆ, S., & VINCEK, D. (2011). Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants Prokletije Mountains (Montenegro). *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 97-107.
- MESCHINI, S., PELLEGRINI, E., CONDELLO, M., OCCHIONERO, G., DELFINE, S., CONDELLO, G., & MASTRODONATO, F. (2017). Cytotoxic and apoptotic activities of *Prunus spinosa* trigono ecotype extract on human cancer cells. *Molecules*, 22(9): 1578.

- MIKULIC-PETKOVSEK, M., STAMPAR, F., VEBERIC, R., & SIRCELJ, H. (2016). Wild *Prunus* fruit species as a rich source of bioactive compounds. *Journal of food science*, 81(8): C1928-C1937.
- MILAKOVIĆ, D. (2016). *Benefitni i patogeni mikroorganizmi u neobrađenom mlijeku*. (Doctoral dissertation, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek. Faculty of agriculture. Department for agroecology).
- MILLER, N. J., & RICE-EVANS, C. A. (1997). Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS^{•+} radical cation assay. *Free Radical Research*, 26(3): 195-199.
- MINGO, E., SILVAN, J. M., & MARTINEZ-RODRIGUEZ, A. J. (2016). Selective antibacterial effect on *Campylobacter* of a winemaking waste extract (WWE) as a source of active phenolic compounds. *LWT-Food Science and Technology*, 68: 418-424.
- MIRALDI, E., FERRI, S., & MOSTAGHIMI, V. (2001). Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2-3): 77-87.
- MOCAN, A., DIUZHEVA, A., CARRADORI, S., ANDRUCH, V., MASSAFRA, C., MOLDOVAN, C., SISEA, C., PETZER, J. P., PETZER, A., ZARA, S., MARCONI, G. D., ZENGIN, G., GRIŞAN, G., & LOCATELLI, M. (2018). Development of novel techniques to extract phenolic compounds from Romanian cultivars of *Prunus domestica* L. and their biological properties. *Food and Chemical Toxicology*, 119: 189-198.
- MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakar Journal of Science and Technology*, 26(2): 211-219.
- MORGAN, D. R., SOLTIS, D. E., & ROBERTSON, K. R. (1994). Systematic and evolutionary implications of rbcL sequence variation in Rosaceae. *American Journal of Botany*, 81(7): 890-903.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.
- MUCALO, I. (2014). *Dugoročni učinak ekstrakta američkog ginsenga (Panax quinquefolius L.) na regulaciju glikemije u bolesnika s tipom 2 šećerne bolesti* (Doctoral dissertation, University of Zagreb. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. Centre for applied pharmacy.).
- MÜLLER P.J. (1858). Beschreibung der in der Umgegend von Weissenburg am Rhein wildwachsenden Arten der Gattung Rubus, nach beobachtungen gemacht in den Jahren 1856 und 1857. *Flora* 41:129-140, 149-157, 163-174, 177-185.
- MÜLLER P.J. (1858). Versuch einer monographischen Darstellung der gallo-germanischen Arten der Gattung Rubus. *Jahresber. Pollichia* 16/17:74-298.
- MUNIYANDI, K., GEORGE, E., SATHYANARAYANAN, S., GEORGE, B. P., ABRAHAMSE, H., THAMBURAJ, S., & THANGARAJ, P. (2019). Phenolics, tannins, flavonoids and anthocyanins contents influenced antioxidant and anticancer activities of *Rubus* fruits from Western Ghats, India. *Food Science and Human Wellness*, 8: 73-81.
- MUNTAÑOLA-CVETKOVIĆ, M. (1990). *Opšta mikologija*. Naučna knjiga, Beograd.
- MURATI, T., MILETIĆ, M., KOLARIĆ, J., LOVRIĆ, V., KOVAČEVIĆ, D. B., PUTNIK, P., LANDEKA JURČEVIĆ, I., ĐIKIĆ, D., DRAGOVIĆ UZELAC, V., & KMETIČ, I. (2019b). Toxic activity of *Prunus spinosa* L. flower extract in hepatocarcinoma cells. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 70(4): 303-309.
- MURATI, T., MILETIĆ, M., ŠTEFANKO, A., JURČEVIĆ, I. L., GAROFULIĆ, I. E., DRAGOVIĆ-UZELAC, V., & KMETIČ, I. (2019a). Comparative assessment of *Prunus spinosa* L. flower extract in non-neoplastic hepatocytes and hepatoblastoma cells. *South African Journal of Botany*, 123: 36-42.
- NAĐPAL, J. (2017). *Fitohemijski skrining i biološka aktivnost ekstrakata i tradicionalnih proizvoda od plodova divljih ruža (Rosa L.; Rosaceae)*. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine).
- OGAH, O., WATKINS, C. S., UBI, B. E., & ORAGUZIE, N. C. (2014). Phenolic compounds in Rosaceae fruit and nut crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(39): 9369-9386.

- OGUNTIBEJU, O. O. (2019). Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links. *International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology*, 11(3): 45.
- OHNO, M., & ABE, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological methods*, 145(1-2): 199-203.
- 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, I. E., & DENIZ, F. S. S. (2020). Natural products as potential leads against coronaviruses: could they be encouraging structural models against SARS-CoV-2? *Natural products and bioprospecting*, 10(4): 171-186.
- ORMEROD, M.G. (2000). *Flow cytometry. A practical approach*. Oxford University Press
- OSKOUKIAN, A., HAGHIGHI, R. S., & EBRAHIMI, M. (2011). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid compounds in *Prunus mahaleb* L. seed. *Clinical Biochemistry*, 13(44): S343.
- OSKOUKIAN, A., HAGHIGHI, R. S., EBRAHIMI, M., & OSKOUKIAN, E. (2012). Bioactive compounds, antioxidant, tyrosinase inhibition, xanthine oxidase inhibition, anticholinesterase and anti inflammatory activities of *Prunus mahaleb* L. seed. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(2): 225-233.
- OSZMIANSKI, J., WOJDYLO, A., LAMER-ZARAWSKA, E., & SWIADER, K. (2007). Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chemistry*, 100(2): 579-583.
- OYAIZU, M. (1986). Antioxidative activities of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307-315.
- Özçelik, B. E. R. I. N., Koca, U., Kaya, D. A., & Şekeroğlu, N. A. Z. I. M. (2012). Evaluation of the *in vitro* bioactivities of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.). *Romanian Biotechnological Letters*, 17(6): 7863-7872.
- OZTURK, I., KARAMAN, S., BASLAR, M., CAM, M., CALISKAN, O., SAGDIC, O., & YALCIN, H. (2014). Aroma, sugar and anthocyanin profile of fruit and seed of mahlab (*Prunus mahaleb* L.): Optimization of bioactive compounds extraction by simplex lattice mixture design. *Food analytical methods*, 7(4): 761-773.
- PAJOVIĆ, S. B., SAIČIĆ, Z. S., PEJIĆ, S., KASAPOVIĆ, J., STOJILJKOVIĆ, V., & KANAZIR, D. T. (2006). Antioxidative biomarkers and cancerogenesis. *Jugoslovenska medicinska biohemija*, 25(4): 397-402.
- PANIZZI, L., CATALANO, S., MIARELLI, C., CIONI, P. L., & CAMPEOL, E. (2000). *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 14(7): 561-563.
- PARK, J. U., CHO, J. S., KIM, J. S., KIM, H. K., JO, Y. H., RAHMAN, M. A. A., & LEE, Y. I. (2020). Synergistic effect of *Rubus crataegifolius* and *Ulmus macrocarpa* against *Helicobacter pylori* clinical isolates and gastritis. *Frontiers in pharmacology*, 11.
- PARK, Y. K., KOO, M. H., IKEGAKI, M., & CONTADO, J. L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de biologia e tecnologia*.
- PAROJČIĆ, D., & STUPAR, D. (2003). Istorijski osvrt na lekovito bilje i njegovu upotrebu u farmakologiji. *Timočki medicinski glasnik*, 28(3-4): 101-109.
- PATWARDHAN, B. (2005). Ethnopharmacology and drug discovery. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1-2): 50-52.
- PATEL, B., SHARMA, S., NAIR, N., MAJEED, J., GOYAL, R. K., & DHOBI, M. (2021). Therapeutic opportunities of edible antiviral plants for COVID-19. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 476: 2345-2364.

- PERVAIZ, T., SONGTAO, J., FAGHIHI, F., HAIDER, M. S., & FANG, J. (2017). Naturally occurring Anthocyanin, structure, functions and biosynthetic pathway in fruit plants. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*, 5: 187.
- PHAM-HUY, L.A., HE, H., & PHAM-HUY, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal Biomedical Science*, 4(2): 89-96.
- PICCIRILLO, C., DEMIRAY, S., FERREIRA, A. S., PINTADO, M. E., & CASTRO, P. M. (2013). Chemical composition and antibacterial properties of stem and leaf extracts from Ginja cherry plant. *Industrial crops and products*, 43: 562-569.
- PIERONI, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(3): 235-273.
- PINACHO, R., CAVERO, R. Y., ASTIASARÁN, I., ANSORENA, D., & CALVO, M. I. (2015). Phenolic compounds of blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and influence of *in vitro* digestion on their antioxidant capacity. *Journal of Functional Foods*, 19: 49-62.
- PODSEDEK, A., MAJEWSKA, I., REDZY尼亚, M., SOSNOWSKA, D., & KOZIOŁKIEWICZ, M. (2014). *In vitro* inhibitory effect on digestive enzymes and antioxidant potential of commonly consumed fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20): 4610-4617.
- POLAT, R., & SATIL, F. (2012): An ethobotanical survey of medicinal plants in Erdemit Gulf (Balikesir – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139: 626-641.
- POLJIČANIN T. Epidemiologija i klasifikacija šećerne bolesti. In: VRCA BOTICA, M., PAVLIĆ-RENAR, I., editors. *Šećerna bolest u odraslih*. Zagreb: Školska knjiga d.d.; 2012. p. 2-7.
- POPOVIĆ, B. M., BLAGOJEVIĆ, B., KUCHARSKA, A. Z., AGIĆ, D., MAGAZIN, N., MILOVIĆ, M., & SERRA, A. T. (2021). Exploring fruits from genus *Prunus* as a source of potential pharmaceutical agents—*In vitro* and *in silico* study. *Food Chemistry*, 358: 129812.
- POPOVIĆ, B. M., BLAGOJEVIĆ, B., PAVLOVIĆ, R. Ž., MIĆIĆ, N., BIJELIĆ, S., BOGDANOVIĆ, B., MIŠAN, A., DUARTE, C. M. M., & SERRA, A. T. (2020). Comparison between polyphenol profile and bioactive response in blackthorn (*Prunus spinosa* L.) genotypes from north Serbia—from raw data to PCA analysis. *Food chemistry*, 302: 125373.
- POTTER, D., ERIKSSON, T., EVANS, R. C., OH, S., SMEDMARK, J. E. E., MORGAN, D. R., KERR, M., ROBERTSON, K. R., ARSENAULT, M., DICKINSON, T. A., & CAMPBELL, C. S. (2007). Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant systematics and evolution*, 266(1-2): 5-43.
- POTTER, D., GAO, F., BORTIRI, P. E., OH, S. H., & BAGGETT, S. (2002). Phylogenetic relationships in Rosaceae inferred from chloroplast *matK* and *trnL-trnF* nucleotide sequence data. *Plant Systematics and Evolution*, 231(1-4): 77-89.
- POURAHMAD, J., SALIMI, A., & SEYDI, E. (2016). Role of oxygen free radicals in cancer development and treatment. In *Free radicals and diseases*. IntechOpen.
- QUADROS, A. P. O. D., ALMEIDA, L. M., PETREANU, M., NIERO, R., ROSA, P. C. P., SAWAYA, A. C. H. F., MANTOVANI, M. S. O'NEILL DE MASCARENHAS GAIVÃO, I., & MAISTRO, E. L. (2020). Risk assessment via genotoxicity, metabolism, apoptosis, and cell growth effects in a HepG2/C3A cell line upon treatment with *Rubus rosifolius* (Rosaceae) leaves extract. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 83(13-14): 495-508.
- RACIĆ, G. M. (2017). *Ekološko-biohemijska proučavanja varijabilnosti autohtonih vrsta gljiva iz roda Trichoderma u različitim tipovima zemljišta*. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu).
- RADFORD, A. E., AHLES, H. E., & BELL, C. R. (2010). *Manual of the vascular flora of the Carolinas*. University of North Carolina Press.
- RADOVANOVIĆ, B. C., ANĐELKOVIĆ, S. M., RADOVANOVIĆ, A. B., & ANĐELKOVIĆ, M. Z. (2013). Antioxidant and antimicrobial activity of polyphenol extracts from wild berry fruits grown in southeast Serbia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(5): 813-819.

- RAHMAN, I. U., AFZAL, A., IQBAL, Z., IJAZ, F., ALI, N., SHAH, M., ULLAH, S., & BUSSMANN, R. W. (2019). Historical perspectives of ethnobotany. *Clinics in dermatology*, 37(4): 382-388.
- RAKOFF-NAHOUM, S. (2006). Cancer Issue: Why cancer and inflammation? *The Yale Journal of biology and medicine*, 79(3-4): 123.
- REHDER A (1940). Manual of Cultivated Trees and Shrubs Hardy in North America Exclusive of the Subtropical and Warmer temperate Regions. MacMillan, New York.
- REYES-CARMONA, J., YOUSEF, G. G., MARTÍNEZ-PENICHE, R. A., & LILA, M. A. (2005). Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of food science*, 70(7): s497-s503.
- REYNDERS, S., & SALESSES, G. (1989, July). Study of the genetic relationships within the subgenus Prunophora. Restriction maps of the ribosomal genes in *P. cerasifera* and *P. spinosa*. In *IV International Symposium on Plum and Prune Genetics, Breeding and Pomology* 283 (pp. 17-26).
- RIAZ, M., AHMAD, M., & RAHMAN, N. (2011). Antimicrobial screening offruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24): 5920-5924.
- ROCHE, A., ROSS, E., WALSH, N., O'DONNELL, K., WILLIAMS, A., KLAPP, M., FULLARD, N., & EDELSTEIN, S. (2017). Representative literature on the phytonutrients category: Phenolic acids. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 57(6), 1089–1096.
- ROSHAN, R., AHMED, S., & UL HASSAN, M. M. (2019). *Fragaria nubicola* (Rosaceae): A review of medicinal uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(4): 3390-3393.
- RUIZ-RODRÍGUEZ, B. M., DE ANCOS, B., SÁNCHEZ-MORENO, C., FERNÁNDEZ-RUIZ, V., DE CORTES SÁNCHEZ-MATA, M., CÁMARA, M., & TARDÍO, J. (2014). Wild blackthorn (*Prunus spinosa* L.) and hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) fruits as valuable sources of antioxidants. *Fruits*, 69(1): 61-73.
- SABATINI, L., FRATERNALE, D., DI GIACOMO, B., MARI, M., ALBERTINI, M. C., GORDILLO, B., ROCCHI, M. B. L., SISTI, D., COPPARI, S., SEMPRUCCI, F., GUIDI, L., & COLOMBA, M. (2020). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Prunus spinosa* L. fruit ethanol extract. *Journal of Functional Foods*, 67: 103885.
- SAHAN, Y. A. S. E. M. İ. N. (2011). Effect of *Prunus laurocerasus* L.(cherry laurel) leaf extracts on growth of bread spoilage fungi. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 17(1): 83-92.
- SALEHI, P., ASGHARI, B., ESMAEILI, M. A., DEHGHAN, H., & GHAZI, I. (2013). -Glucosidase and-amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *Journal of medicinal plants research*, 7(6): 257-266.
- SALMANIAN, S., SADEGHI MAHOONAK, A. R., ALAMI, M., & GHORBANI, M. (2014). Phenolic content, antiradical, antioxidant, and antibacterial properties of hawthorn (*Crataegus elbursensis*) seed and pulp extract. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16: 343-354.
- SAMANIEGO, I., BRITO, B., VIERA, W., CABRERA, A., LLERENA, W., KANNANGARA, T., VILCACUNDO, R., ANGÓS, I., & CARRILLO, W. (2020). Influence of the maturity stage on the phytochemical composition and the antioxidant activity of four Andean blackberry cultivars (*Rubus glaucus* Benth) from Ecuador. *Plants*, 9(8): 1027.
- SAMEEULLAH, M., GÜNDOĞDU, M., CANAN, İ., KARADENİZ, T., AASIM, M., & KHAWAR, K. M. (2018). Fruits of Rosaceae family as a source of anticancer compounds and molecular innovations. In *Anticancer Plants: Mechanisms and Molecular Interactions* (pp. 319-336). Springer, Singapore.
- SÁNCHEZ-VELÁZQUEZ, O. A., MONTES-ÁVILA, J., MILÁN-CARRILLO, J., REYES-MORENO, C., MORA-ROCHIN, S., & CUEVAS-RODRÍGUEZ, E. O. (2019). Characterization of tannins from two wild blackberries (*Rubus* spp) by LC-ESI-MS/MS, NMR and antioxidant capacity. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(3): 2265-2274.

- SANCHO, R. A. S., & PASTORE, G. M. (2012). Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, 46(1): 378-386.
- SANTOS-BUELGA C., & SCALBERT A. (2000). Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 80:1094-1117.
- SARGIN, S. A., SELVI, S., LÓPEZ, V. (2015): Ethnomedical plants of Sarigöl district (Manisa) Turkey. *Journal of Ethnopharmacology*, 171: 64-84.
- SARKAR, D., ORWAT, J., HURBURT, T., WOODS, F., PITTS, J. A., & SHETTY, K. (2016). Evaluation of phenolic bioactive-linked functionality of blackberry cultivars targeting dietary management of early stages type-2 diabetes using *in vitro* models. *Scientia Horticulturae*, 212: 193-202.
- SARMAH, P. S., & SARMA, T. C. (2012). Occurrence of aeromycoflora in the fruit markets of Goalpara district (Assam). *The Ecoscan*, 1: 299-302.
- SAVIĆ, D. (2016). *Fenotipske i genotipske karakterisike izolata bakterije bacillus cereus poreklom iz različitog materijala* (Doctoral dissertation, Univerzitet odbrane, Vojnomedicinska akademija – Medicinski fakultet).
- SCHULZ, M., & CHIM, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries. *Food Bioscience*, 31: 100438.
- SCHULZ, M., SERAGLIO, S. K. T., DELLA BETTA, F., NEHRING, P., VALESE, A. C., DAGUER, H., GONZANGA, L. V., COSTA, A. C. O., & FETT, R. (2019). Blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott): Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity in two edible stages. *Food Research International*, 122: 627-634.
- SCHUSTER, E., DUNN-COLEMAN, N., FRISVAD, J. C., & VAN DIJCK, P. W. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*—a review. *Applied Microbiology and biotechnology*, 59(4-5): 426-435.
- SEERAM, N. P., MOMIN, R. A., NAIR, M. G., BOURQUIN, L. D. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 8(5): 362-369.
- SEWELL, R. D., & RAFIEIAN-KOPAIEI, M. (2014). The history and ups and downs of herbal medicines usage. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 3: 1-3.
- SEYIDOGLU, N., & AYDIN, C. (2020). Stress, Natural Antioxidants and Future Perspectives. In *The Health Benefits of Foods-Current Knowledge and Further Development*. IntechOpen.
- SEYYEDNEJAD, S. M., MALEKI, S., DAMABI, N. M., & MOTAMEDI, H. (2008). Antibacterial activity of *Prunus mahaleb* and Parsley (*Petroselinum crispum*) against some pathogen. *Asian Journal of Biological Sciences*, 1(1): 51-55.
- SHAI, L. J., MAGANO, S. R., LEBELO, S. L., & MOGALE, A. M. (2011). Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(13): 2863-2867.
- SHEDBALKAR, U., DHANVE, R., & JADHAV, J. (2008). Biodegradation of triphenylmethane dye cotton blue by *Penicillium ochrochloron* MTCC 517. *Journal of Hazardous Materials*, 157(2-3): 472-479.
- SHEN, H., WANG, H., WANG, L., WANG, L., ZHU, M., MING, Y., ZHAO, S., FAN, J., & LAI, E. Y. (2017). Ethanol extract of root of *Prunus persica* inhibited the growth of liver cancer cell HepG2 by inducing cell cycle arrest and migration suppression. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017.
- SHI, S., LI, J., SUN, J., YU, J., & ZHOU, S. (2013). Phylogeny and Classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *Journal of integrative plant biology*, 55(11): 1069-1079.
- SHIN, J-S., CHO, E-J., CHOI, H-E., SEO, J-H., AN, H-J., PARK, H-J., CHO, Y-W., & LEE, K-T. (2014). Anti-inflammatory effect of a standardized triterpenoid-rich fraction isolated from *Rubus coreanus* on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-induced macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 158: 291-300.

- SHULZ, M., & CHIM, J. F. (2019). Nutritional and bioactive value of *Rubus* berries. *Food Bioscience*, 31: 100438.
- SINGLETON, V. L., & ROSSI, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3): 144-158.
- 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.
- SOKOVIĆ, M. D., VUKOJEVIĆ, J., MARIN, P. D., BRKIĆ, D. D., VAJS, V., & VAN GRIENSVEN, L. J. (2009). Chemical composition of essential oils of thymus and mentha species and their antifungal activities. *Molecules*, 14(1): 238-249.
- SOKOVIĆ, M., GLAMOČLIJA, J., MARIN, P. D., BRKIĆ, D., & VAN GRIENSVEN, L. J. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules*, 15(11): 7532-7546.
- SOWA, A., ZGÓRKA, G., SZYKUŁA, A., FRANICZEK, R., ŻBIKOWSKA, B., GAMIAN, A., & SROKA, Z. (2016). Analysis of polyphenolic compounds in extracts from leaves of some *Malus domestica* cultivars: Antiradical and antimicrobial analysis of these extracts. *BioMed Research International*, 2016.
- SPÍNOLA, V., PINTO, J., LLORENT-MARTÍNEZ, E. J., TOMÁS, H., & CASTILHO, P. C. (2019). Evaluation of *Rubus grandifolius* L. (wild blackberries) activities targeting management of type-2 diabetes and obesity using *in vitro* models. *Food and Chemical Toxicology*, 123: 443-452.
- SROKA, Z., ŻBIKOWSKA, B., JANICKI, K., FRANICZEK, R., KRZYŻANOWSKA, B., & DRYŚ, A. (2014). Antimicrobial and antiradical activity of extracts obtained from leaves of three species of the genus *Pyrus*. *Microbial Drug Resistance*, 20(4): 337-343.
- SROKA, Z., ZGÓRKA, G., ŻBIKOWSKA, B., SOWA, A., FRANICZEK, R., WYCHOWANIEC, K., & KRZYŻANOWSKA, B. (2019). High antimicrobial efficacy, antioxidant activity, and a novel approach to phytochemical analysis of bioactive polyphenols in extracts from leaves of *Pyrus communis* and *Pyrus pyrifolia* collected during one vegetative season. *Microbial Drug Resistance*, 25(4): 582-593.
- STANKOVIĆ, M. I., SAVIĆ, V. L., ŽIVKOVIĆ, J. V., TADIĆ, V. M., & ARSIĆ, I. A. (2019). Tyrosinase inhibitory and antioxidant activity of wild *Prunus spinosa* L. fruit extracts as natural source of bioactive compounds. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(3): 651-657.
- STASZOWSKA-KARKUT, M., & MATERSKA, M. (2020). Phenolic composition, mineral content, and beneficial bioactivities of leaf extracts from black currant (*Ribes nigrum* L.), raspberry (*Rubus idaeus*), and aronia (*Aronia melanocarpa*). *Nutrients*, 12(2): 463.
- SUDHAKAR, A. (2009). History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods. *Journal of cancer science & therapy*, 1(2): 1-4.
- SUDRE H. (1908-1913): *Rubi Europae*. Paris
- SYTAR, O., BRESTIC, M., HAJIHASHEMI, S., SKALICKY, M., KUBEŠ, J., LAMILLA-TAMAYO, L., IBRAHIMOVA, U., IBADULLAYEVA, S., & LANDI, M. (2021). COVID-19 prophylaxis efforts based on natural antiviral plant extracts and their compounds. *Molecules*, 26(3): 727.
- ŠARIĆ-KUNDALIĆ, B., DOBEŠ, C., KLATTE-ASSELMAYER, V., SAUKEL, J. (2011). Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 133: 1051-1076.
- ŠOLIĆ, I. (2016). *Pregled tradicionalnog sakupljanja, uzgoja i uporabe ljekovitog bilja na području grada Knina i okolice*. (Diplomski rad. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet).
- TAGHIZADEH, S. F., ASGHARZADEH, A., ASILI, J., SAHEBKAR, A., & SHAKERI, A. (2015). Evaluation of total phenolic content and antioxidant activity in ten selected mahaleb (*Prunus mahaleb* L.) genotypes. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 2(2): 187-197.

- TAHIROVIC, A., BASIC, N., & COPRA-JANICIJEVIC, A. (2018). Effect of solvents on phenolic compounds extraction and antioxidant activity of *Prunus spinosa* L. fruits. *Glasnik Hemičara i Tehnologa Bosne i Hercegovine*, 50: 19-24.
- TAMOKOU, J. D. D., MBAVENG, A. T., & KUETE, V. (2017). Antimicrobial activities of African medicinal spices and vegetables. In *Medicinal spices and vegetables from Africa* (pp. 207-237). Academic Press.
- TATIĆ, B., BLEČIĆ, V., VIDOVIĆ, V., ČUKOVIĆ, S., & VARAJIĆ, D. (1988). *Sistematika i filogenija viših biljaka*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- TAVARES, L., FIGUEIRA, I., MACEDO, D., MCDUGALL, G. J., LEITÃO, M. C., VIEIRA, H. L., STEWART, D., ALVES, P. M., FERREIRA, R. B., & SANTOS, C. N. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food chemistry*, 131(4): 1443-1452.
- TAYLOR, R. (1990). Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of diagnostic medical sonography*, 6(1): 35-39.
- TEMIZ, M. A., OKUMUS, E., YAMAN, T., & KELES, O. F. (2021). Mixture of leaf and flower extract of *Prunus spinosa* L. Alleviates hyperglycemia and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *South African Journal of Botany*, 141: 145-151.
- THE PLANT LIST. (2013). Version 1.1. Published on the internet. <http://theplantlist.org/>
- TIAN, J. L., SI, X., WANG, Y. H., GONG, E. S., XIE, X., ZHANG, Y., LI, B., & SHU, C. (2021). Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia. *Food Chemistry*, 341: 128149.
- TIAN, J. L., SI, X., WANG, Y. H., GONG, E. S., XIE, X., ZHANG, Y., LI, B., & SHU, C. (2021). Bioactive flavonoids from *Rubus corchorifolius* inhibit α -glucosidase and α -amylase to improve postprandial hyperglycemia. *Food Chemistry*, 341: 128149.
- TSAO R. (2010). Chemistry and Biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*, 2:1231-1246.
- UYSAL, A., OZER, O. Y., ZENGİN, G., STEFANUCCI, A., MOLLIKA, A., PICOT-ALLAIN, C. M. N., & MAHOMOODALLY, M. F. (2019). Multifunctional approaches to provide potential pharmacophores for the pharmacy shelf: *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt. *Computational biology and chemistry*, 78: 64-73.
- UZUNOVIĆ, S. (2016). *Novi pristup u kontroli mikroorganizama*. Univerzitet u Zenici. Zenica
- VELIČKOVIĆ, J. (2013): Hemijska analiza i antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih biljnih vrsta bogatih fenolnim jedinjenjima. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju)
- VELIČKOVIĆ, J. M., KOSTIĆ, D. A., STOJANOVIĆ, G. S., MITIĆ, S. S., MITIĆ, M. N., RANĐELOVIĆ, S. S., & ĐORĐEVIĆ, A. S. (2014). Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activity of the extracts from *Prunus spinosa* L. fruit. *Hemijaska industrija*, 68(3): 297-303.
- VELJKOVIĆ, B., ĐORĐEVIĆ, N., DOLIČANIN, Z., LIČINA, B., TOPUZOVIĆ, M., STANKOVIĆ, M., ZLATIĆ, N., & DAJIĆ-STEVAHOVIĆ, Z. (2019). Antioxidant and anticancer properties of leaf and fruit extracts of the wild raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 47(2): 359-367.
- WAN, L. S., MIN, Q. X., WANG, Y. L., YUE, Y. D., & CHEN, J. C. (2013). Xanthone glycoside constituents of *Swertia kouitchensis* with α -glucosidase inhibitory activity. *Journal of natural products*, 76(7): 1248-1253.
- WANG, T., LI, X., ZHOU, B., LI, H., ZENG, J., & GAO, W. (2015). Anti-diabetic activity in type 2 diabetic mice and α -glucosidase inhibitory, antioxidant and anti-inflammatory potential of chemically profiled pear peel and pulp extracts (*Pyrus* spp.). *Journal of Functional Foods*, 13: 276-288.
- WANG, Z., WANG, J., & CHAN, P. (2013). Treating type 2 diabetes mellitus with traditional Chinese and Indian medicinal herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013.

- WEBB, D.A. (1968). Genus *Prunus* L. In: TUTIN, T. G., HEYWOOD, V. H., BURGESS, N. A., MOORE, D. M., VALENTINE, D. H., WALTERS, S. M., & WEBB, D. A. (Eds.), *Flora Europaea*, 2, Cambridge University Press, Cambridge, pp. 77.
- WEBER, H. E. (1972). *Die Gattung Rubus L. (Rosaceae) im nordwestlichen Europa vom Nordwestdeutschen Tiefland bis Skandinavien mit besonderer Berücksichtigung Schleswig-Holsteins* (Vol. 7). J. Cramer.
- WEBER, H. E. (1996). Former and modern taxonomic treatment of the apomictic rubus complex. *Folia Geobotanica*, 31(3), 373-380.
- WEIHE K.E., NEES VON ESENBECK C.G. (1822-1827): „*Rubi Germanici*“ Elberfeldae.
- WILD, C. P., WEIDERPASS, E., & STEWART, B. W. (2020). World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. *World Cancer Reports*. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
- WILLETT, W. C., KOPLAN, J. P., NUGENT, R., DUSENBURY, C., PUSKA, P., & GAZIANO, T. A. (2006). Prevention of chronic disease by means of diet and lifestyle changes. In *Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd edition*. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank.
- WILLIS, J. C. 1985. *A dictionary of the flowering plants and ferns, 8th ed.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- YEŞİLADA, E., SEZİK, E., HONDA, G., TAKAISHI, Y., TAKEDA, Y., & TANAKA, T. (1999). Traditional medicine in Turkey IX: Folk medicine in north-west Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(3): 195-210.
- YI, O., JOVEL, E. M., TOWERS, G. N., WAHBE, T. R., & CHO, D. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 58(3): 178-189.
- YILDIZ, H., ERCISLI, S., HEGEDUS, A., AKBULUT, M. U. S. T. A. F. A., TOPDAS, E. F., & ALIMAN, J. (2014). Bioactive content and antioxidant characteristics of wild (*Fragaria vesca* L.) and cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits from Turkey. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87.
- YILDIZ, H., ERCISLI, S., HEGEDUS, A., AKBULUT, M., TOPDAS, E. F., & ALIMAN, J. (2014). Bioactive content and antioxidant characteristics of wild (*Fragaria vesca* L.) and cultivated strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) fruits from Turkey. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 87(1): 274-278.
- YILMAZ, K. U., ERCİŞLİ, S., ASMA, B. M., DOĞAN, Y., & KAFKAS, S. (2009). Genetic relatedness in *Prunus* genus revealed by inter-simple sequence repeat markers. *HortScience*, 44(2): 293-297.
- YÜ, T., LU, L., KU, T., LI, C., & CHEN, S. (1986). Rosaceae (3), Amygdaloideae. *Flora Reipublicae Popularis Sinicae*, vol. 38.
- ZENGIN, G., FERRANTE, C., SENKARDES, I., GEVRENOVA, R., ZHELEVA-DIMITROVA, D., MENGHINI, L., ORLANDO, G., RECINELLA, L., CHIAVAROLI, A., LEONE, S., BRUNETTI, L., PICOT-ALLAIN, C. M. N., RENGASAMY, K. R. R. & MAHOMOODALLY, M. F. (2019). Multidirectional biological investigation and phytochemical profile of *Rubus sanctus* and *Rubus ibericus*. *Food and Chemical Toxicology*, 127: 237-250.
- ZENGIN, G., SARIKURKCU, C., AKTUMSEK, A., CEYLAN, R., & CEYLAN, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in Alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53: 244-251.
- ZLATKOVIĆ, B. K., BOGOSAVLJEVIĆ, S. S., RADIVOJEVIĆ, A. R., & PAVLOVIĆ, M. A. (2014). Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *Journal of Ethnopharmacology*, 151: 704-713.
- ŽIŽAK, Ž. S. (2012). *Antitumorski efekat steroidnih tetraoksana na maligno transformisane ćelijske linije čoveka*. (Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet).

- ГАЈИЋ, М., ЈОВАНОВИЋ Б, ВУКИЋЕВИЋ Е & ТАТИЋ Б (1972). Фамилија Rosaceae Juss. У: ЈОСИФОВИЋ, М., СТЈЕПАНОВИЋ, Л., ЈАНКОВИЋ, М. М., ГАЈИЋ, М., КОЈИЋ, М., & ДИКЛИЋ, Н. (Ед.), *Флора С. Р. Србије*. САНУ, Београд стр. 10-11.
- ЈОВАНОВИЋ, Б. (1972). Род *Prunus* L. У: ЈОСИФОВИЋ, М., СТЈЕПАНОВИЋ, Л., ЈАНКОВИЋ, М. М., ГАЈИЋ, М., КОЈИЋ, М., & ДИКЛИЋ, Н. (Ед.), *Флора С. Р. Србије*. САНУ, Београд стр. 179.
- ТАТИЋ, Б. (1972). Род *Rubus* L. У: ЈОСИФОВИЋ, М., СТЈЕПАНОВИЋ, Л., ЈАНКОВИЋ, М. М., ГАЈИЋ, М., КОЈИЋ, М., & ДИКЛИЋ, Н. (Ед.), *Флора С. Р. Србије*. САНУ, Београд стр. 16.

Укупно 344 литературна навода

Прилог 1

LC-MS/MS оптимизовани параметри специфични за анализирана референтна једињења.

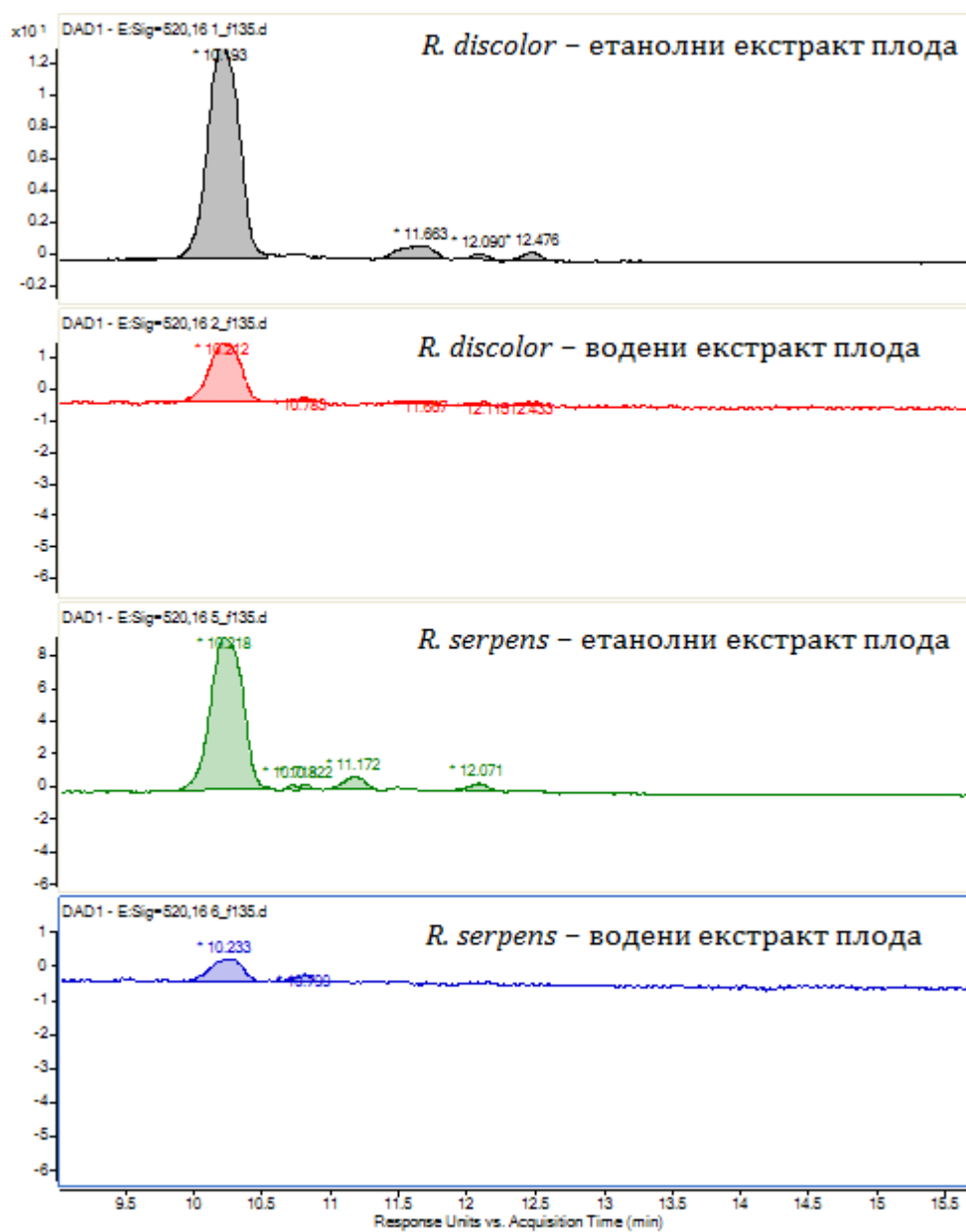
Референтно једињење	t_R (min)	Јон прекурсор m/z	Јон производ m/z	V_f (V)	V_c (V)
<i>p</i> -хидрокси-бензоева киселина	2,20	137	93	80	10
протокатехинска киселина	1,62	153	109	105	9
2,5-дихидрокси-бензоева киселина	2,06	153	109	100	9
ванилинска киселина	2,45	167	108	100	15
гална киселина	1,28	169	125	90	10
циметна киселина	7,28	147	103	100	5
<i>p</i> -кумаринска киселина	3,26	163	119	90	9
<i>o</i> -кумаринска киселина	4,90	163	119	100	5
кафена киселина	2,29	179	135	100	10
ферулна киселина	3,57	193	134	90	11
хлорогенска киселина	1,67	353	191	100	10

t_R – ретенционо време; V_f – напон фрагментора; V_c – колизиона енергија;

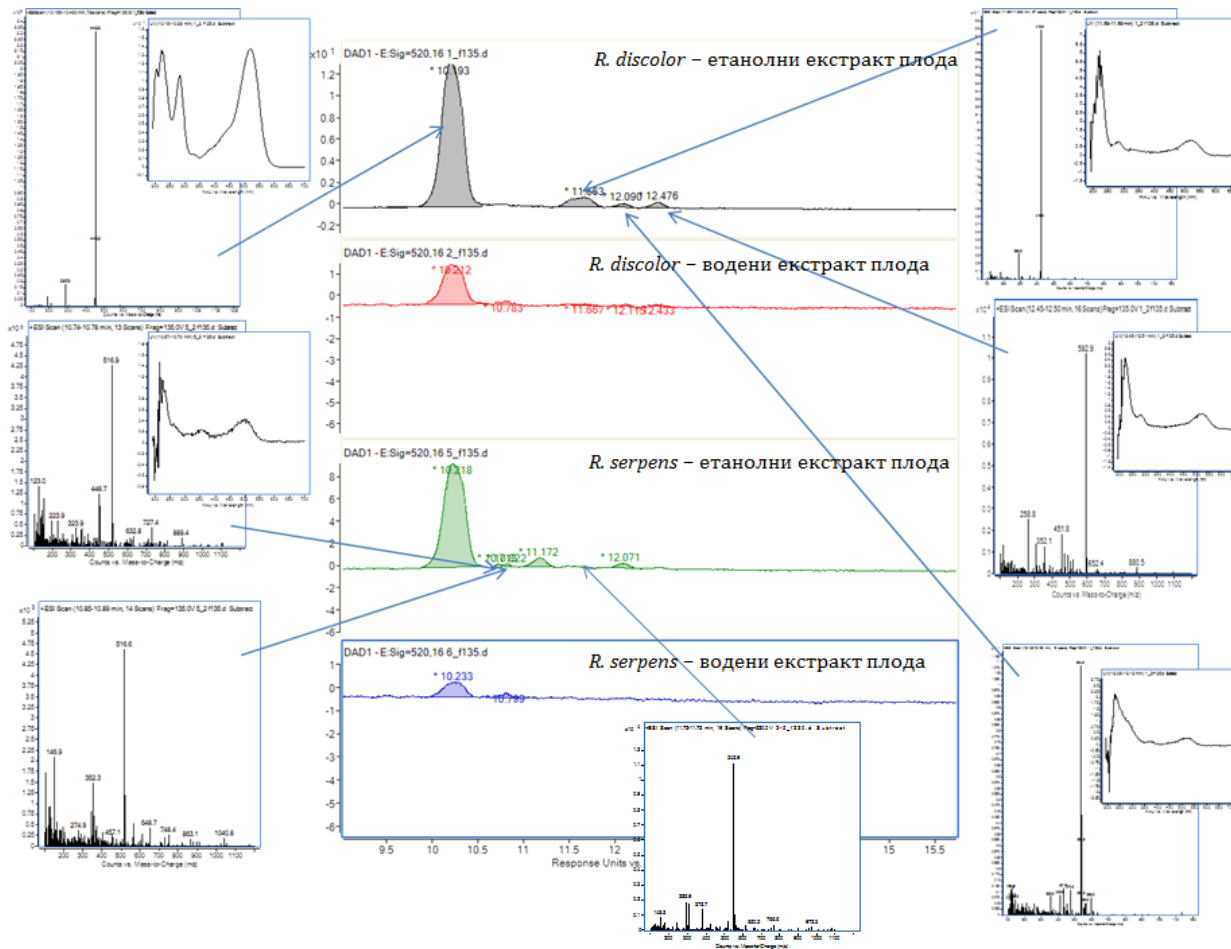
Прилог 2



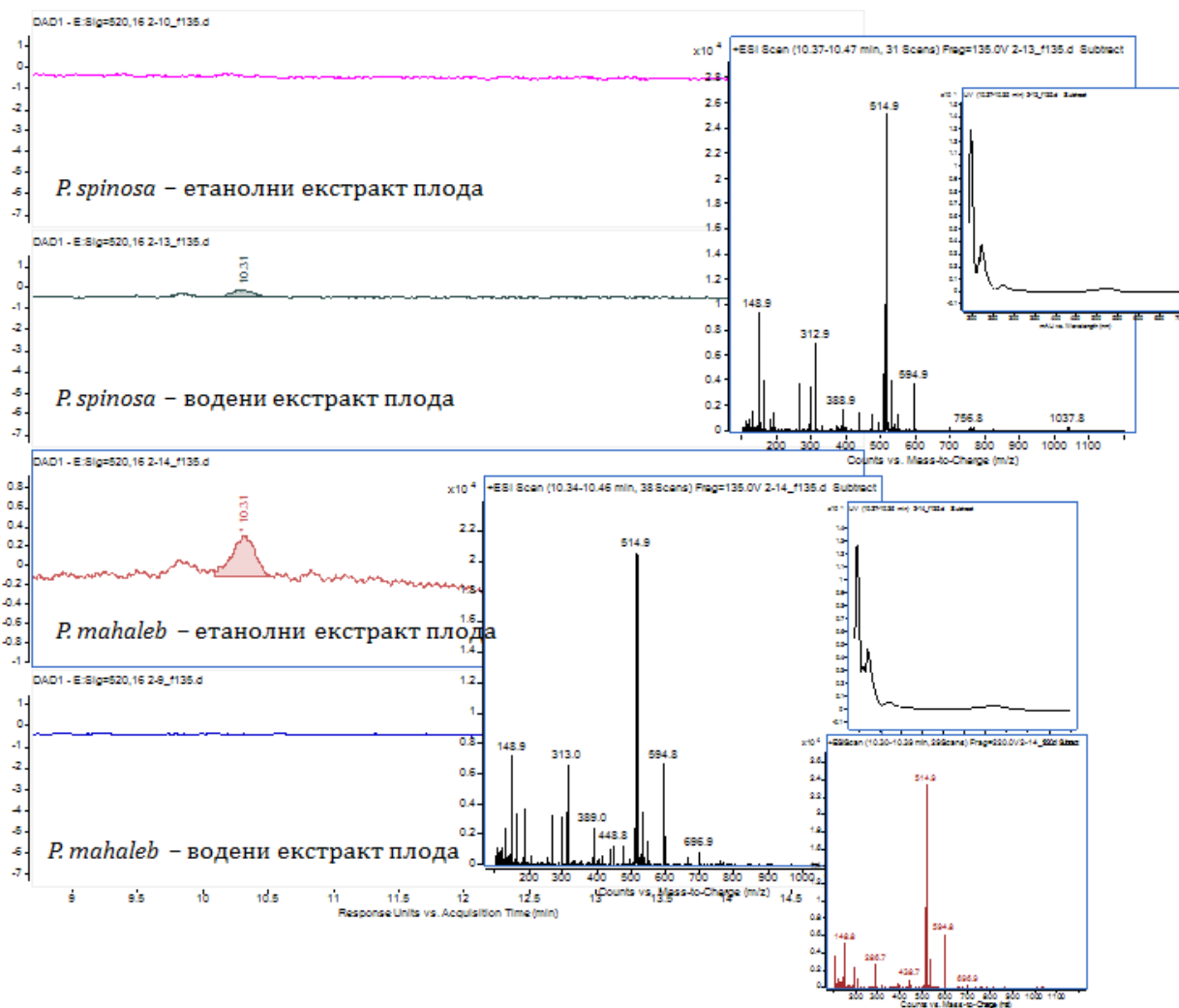
DAD хроматограми водених и етанолних екстраката плодова *P. mahaleb*, *P. spinosa*, *R. discolor* и *R. serpens* на 520 nm.



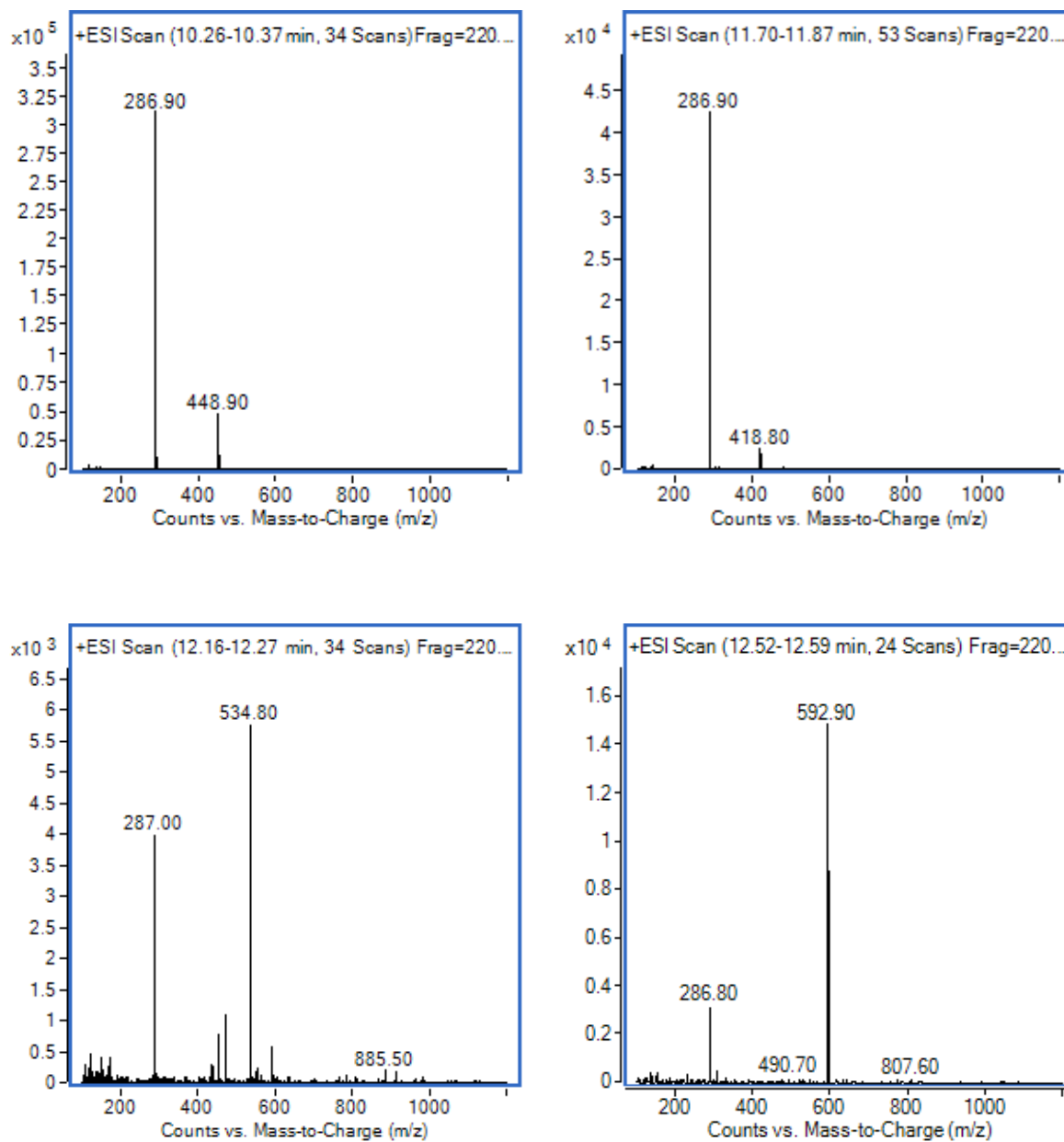
DAD Хроматограми водених и етанолних екстракта плодова *R. discolor* и *R. serpens*.



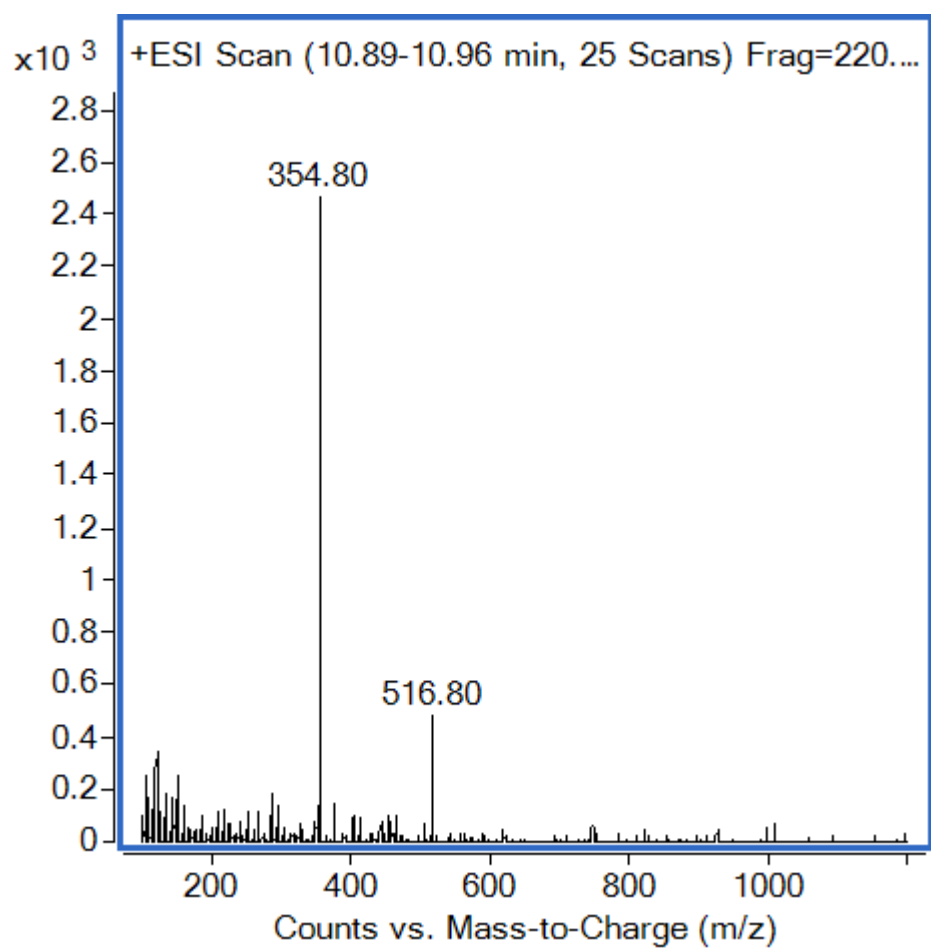
ESI(+) MS^1 и UV спектри детектовани у воденим и етанолним екстрактима плодова *R. discolor* и *R. serpens*.



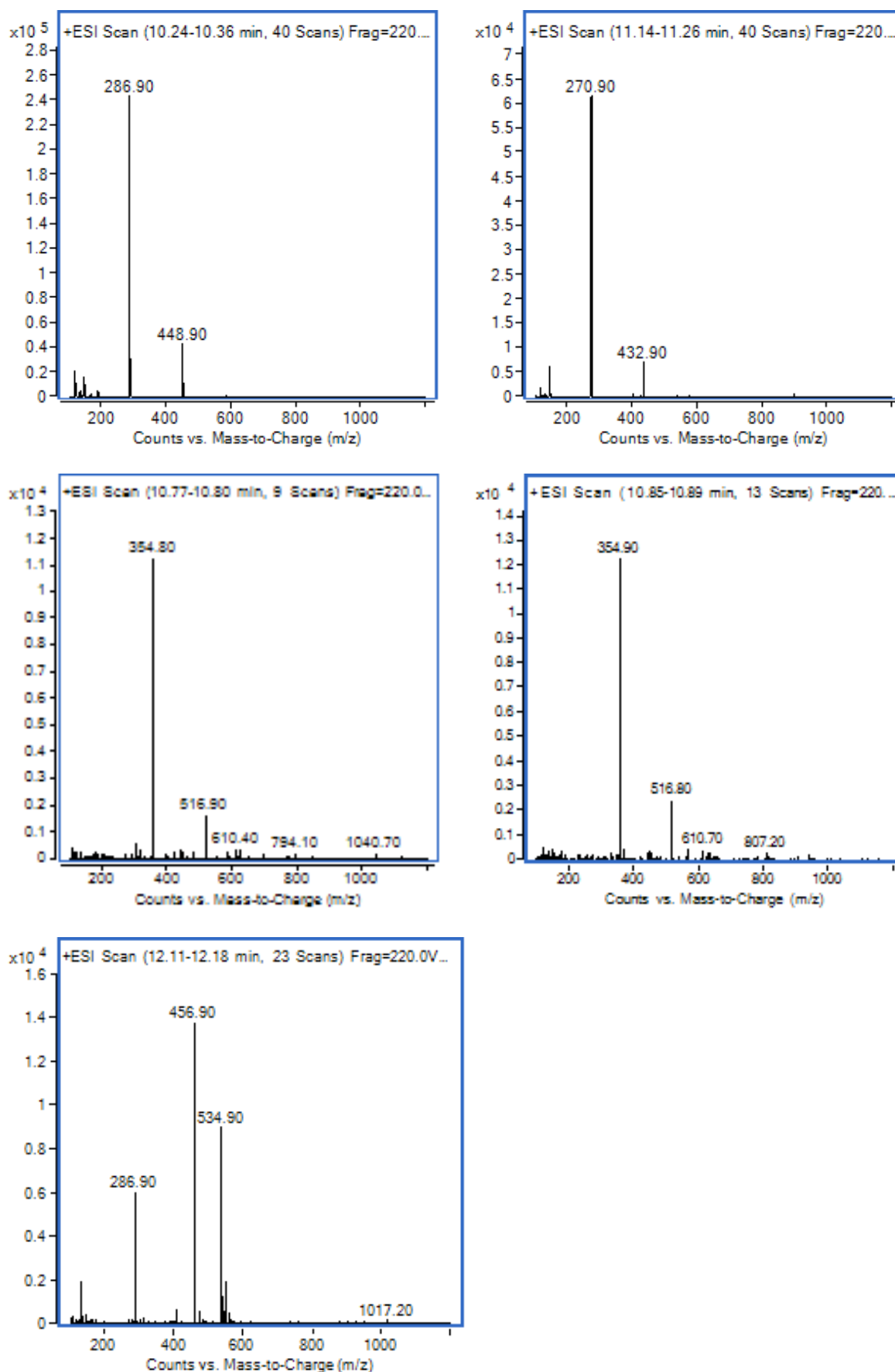
ESI(+) MS^1 и UV спектри детектовани у воденим и етанолним екстрактима плодова *P. mahaleb* и *P. spinosa*.



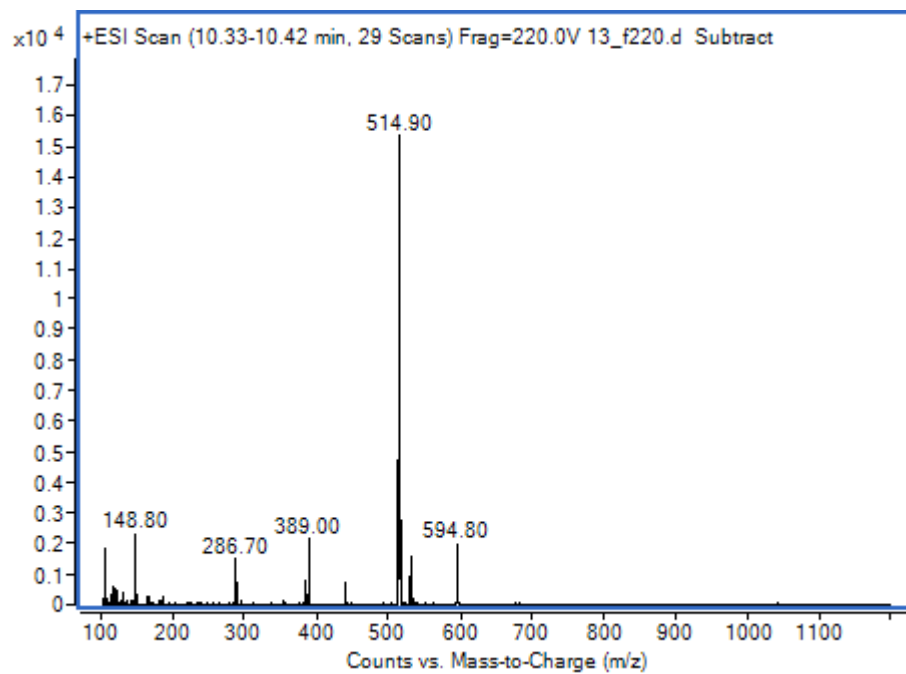
ESI(+)-MS¹ спектри једињења детектованих у етанолном екстракту плода *R. discolor*.



ESI(+) MS^1 спектри једињења детектованих у воденом екстракту плода *R. discolor*.



ESI(+)-MS¹ спектри једињења детектованих у етанолном екстракту плода *R. serpens*.



ESI(+) MS^1 спектри једињења детектованих у воденом и етанолном екстракту плода *P. mahaleb*.

Прилог 3

Списак скраћеница

ABTS – 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин)-6-сулфонска киселина

A_{C0} – апсорбанца слепе пробе у нултом минути

A_{C60} – апсорбанца слепе пробе након 60 минута

ADA – енгл. *American Diabetes Assosiation*

A_{MON} – апсорбанца мономера антоцијана

A_S – апсорбанца узорка

A_{S0} – апсорбанца узорка у нултом минути

A_{S60} – апсорбанца узорка након 60 минута

ATCC – енгл. *American Type Culture Collection*

AV – енгл. *Average*

A_C – апсорбанца слепе пробе

BHA – 3-терт-бутил-4-хидроксианизол

BHT – 3,5-ди-терт-бутил-4-хидрокситолуен

Caco-2 – малигна ћелијска линија хуманог хепатоцелуларног карцинома

C_{MON} – концентрација мономера антоцијана

COVID-19 – енгл. *Coronavirus Disease 2019*

C_{UK} – концентрација мономера антоцијана

CyE – енгл. *Cyanidin Equivalents*

DA – далтон

DMSO – диметил-сулфоксид

DPPH – 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил

EC₅₀ – ефективна концентрација 50 (енгл. *Effective Concentration 50*)

FRAP – енгл. *Ferric Reducing Antioxidant Power*

GAE – енгл. *Gallic Acid Equivalents*

GRAS – енгл. *Generally Recognized As Safe*

HCT-116 – малигна ћелијска линија хуманог карцинома колона

HeLa – малигна ћелијска линија хуманог аднеокарцинома цервикса

HEP-G2 – малигна ћелијска линија хуманог хепатоцелуларног карцинома,

HEPG2/C3A – хумана малигна ћелијска линија јетре

HPLC – течна хроматографија високих перформанси (енгл. *High Performance Liquid Chromatography*)

IC₅₀ – инхибиторна концентрација 50 (енгл. *Inhibitory Concentration 50*)

IDDM – енгл. *Insulin-Dependent Diabetes Mellitus*

K562 – малигна ћелијска линија хумане мијелоидне леукемије

LC – течна хроматографија (енгл. *Liquid Chromatography*)

MB – енгл. *Malt Broth*

MDA-MB-453 – малигна ћелијска линија хуманог канцера дојке

MKN45 – малигна ћелијска линија хуманог тумора желуца

MRC-5 – ћелијска линија хуманих ембрионалних фибробласта плућа

MRSA – енгл. *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*

MS – масена спектрометрија

MTT – енгл. *Methyl-Thiazol-Tetrazolium*

NCI/ADR/RES – хумана малигна ћелијска линија оваријума резистентна на хемиотерапеутике

QE – енгл. *Quercetin Equivalents*

RBS – енгл. *Reactive Bromine Species*

RCS – енгл. *Reactive Chlorine Species*

RNS – енгл. *Reactive Nitrogen Species*

ROS – енгл. *Reactive Oxygen Species*

RPMI-1640 – фетални говеђи серум (енгл. *Fetal Bovine Serum*)

RSS – енгл. *Reactive Sulphur Species*

SARS-CoV-2 – енгл. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SD – енгл. *Standard Deviation*

TAC – енгл. *Total Anthocyanin Content*

TFC – енгл. *Total Flavonoid Content*

TMAC – енгл. *Total Monomer Anthocyanin Content*

TPC – енгл. *Total Phenol Content*

TPTZ – 2,4,6-трипиридил-*s*-триазин

TRC – енгл. *Total Reducing Capacity*

TSB – енгл. *Tryptic Soy Broth*

UV – енгл. *ultraviolet*

WHO – енгл. *World Health Organisation*

АТР – аденозин-трифосфат

ацетил-СоА – ацетил-коензим А

ДНК – дезоксирибонуклеинска киселина

малонил-СоА – малонил-коензим А

МБЦ – минимална бактерицидна концентрација (енгл. *Minimal Bactericidal Concentrations, MBC*)

МИК – минимална инхибиторна концентрација (енгл. *Minimal Inhibitory Concentrations, MIC*)

МФЦ – минимална фунгицидна концентрација (енгл. *Minimal Fungicidal Concentration, MFC*)

Списак табела

Табела 1. Списак 12 подродова у оквиру рода <i>Rubus</i> L. (преузето са изменама од Alice и Campbell, 1999).....	9
Табела 2. Подаци о ваучерима испитиваних биљних врста у Хербаријуму Института за ботанику и Ботаничке баште „Јевремовац“ Биолошког факултета Универзитета у Београду.....	50
Табела 3. Приноси индивидуалних ултразвучних екстракција листова и плодова <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i> растварачима различите поларности (водом, етанолом и ацетоном) изражени у процентима.....	54
Табела 4. Резултати спектрофотометријске квантификације фенола, флавоноида и антоцијана у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	75
Табела 5. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова <i>Prunus mahaleb</i> LC-MS/MS методом.....	82
Табела 6. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова <i>Prunus spinosa</i> LC-MS/MS методом.....	83
Табела 7. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова <i>Rubus discolor</i> LC-MS/MS методом.....	85
Табела 8. Резултати хемијске анализе водених и етанолних узорака листова и плодова <i>Rubus serpens</i> LC-MS/MS методом.....	86
Табела 9. Резултати испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i> добијени различитим <i>in vitro</i> спектрофотометријским методама.....	92
Табела 10. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i>	97
Табела 11. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова <i>P. spinosa</i>	101
Табела 12. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова <i>R. discolor</i>	105
Табела 13. Корелација између фитохемијског састава и антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката листова и плодова <i>R. serpens</i>	109
Табела 14. Скала за процену антимикуробне активности екстраката јестивих и медицинских биљака.....	112
Табела 15. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i> добијени микродилуционом методом.....	115
Табела 16. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i> добијени микродилуционом методом.....	115
Табела 17. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i>	116

Табела 18. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i>	117
Табела 19. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. spinosa</i> добијени микродилуционом методом.....	119
Табела 20. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. spinosa</i> добијени микродилуционом методом.....	119
Табела 21. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. spinosa</i>	120
Табела 22. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. spinosa</i>	121
Табела 23. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. discolor</i> добијени микродилуционом методом.....	124
Табела 24. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. discolor</i> добијени микродилуционом методом.....	124
Табела 25. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. discolor</i>	125
Табела 26. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. discolor</i>	126
Табела 27. Резултати испитивања антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. serpens</i> добијени микродилуционом методом.....	128
Табела 28. Резултати испитивања антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. serpens</i> добијени микродилуционом методом.....	128
Табела 29. Корелација између фитохемијског састава и антибактеријске активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. serpens</i>	129
Табела 30. Корелација између фитохемијског састава и антифунгалне активности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>R. serpens</i>	130
Табела 31. Резултати испитивања цитотоксичности водених и етанолних екстраката листова и плодова <i>P. mahaleb</i> , <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i> на малигне и контролну ћелијску линију МТТ методом.....	135
Табела 32. Корелација између фитохемијског састава и антитуморске активности екстраката <i>P. spinosa</i> , <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	137
Табела 33. Резултати селективности антитуморског дејства екстраката листова <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i> презентовани путем коефицијента селективности (SI).....	137
Табела 34. Резултати анализе вијабилности и типа ћелијске смрти HeLa ћелија на основу морфолошких промена индукованих деловањем испитиваних екстраката листова <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i> добијени Aneksin V-FITC/PI методом обојења.....	139
Табела 35. Резултати дистрибуције HeLa ћелија по фазама ћелијског циклуса након 24 h континуираног деловања екстраката листова <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	141

Табела 36. Резултати дистрибуције HeLa ћелија по фазама ћелијског циклуса након 48 h континуираног деловања екстракта листова <i>R. discolor</i> и <i>R. serpens</i>	141
Табела 37. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстракта листова и плодова <i>P. mahaleb</i>	145
Табела 38. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених, етанолних и ацетонских екстракта листова и плодова <i>P. mahaleb</i>	146
Табела 39. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстракта листова и плодова <i>P. spinosa</i>	146
Табела 40. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених, етанолних и ацетонских екстракта листова и плодова <i>P. spinosa</i>	147
Табела 41. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстракта листова и плодова <i>R. discolor</i>	147
Табела 42. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених, етанолних и ацетонских екстракта листова и плодова <i>R. discolor</i>	148
Табела 43. Резултати испитивања антидијабетичне активности водених и етанолних екстракта листова и плодова <i>R. serpens</i>	148
Табела 44. Корелација између фитохемијског састава и антидијабетичне активности водених, етанолних и ацетонских екстракта листова и плодова <i>R. serpens</i>	149

Списак слика**Слика 1.....3**

Писани документи о употреби лековитих биљака:

А) глинена плочица из Нипура (Месопотамија) (фото: Mary Harrch; извор:

<https://www.flickr.com/photos/mharrsch/19189183045/>);

Б) Еберсов папирус из Тебе (Египат) (фото: Hanf музеј у Берлину; извор:

<http://www.ancientpages.com/2016/02/03/the-ebers-papyrus-most-famous-plant-medicine-encyclopedia-of-ancient-egypt/>).

Слика 2.....4

Структурне формуле:

А) морфина (извор:

<https://www.pks.mpg.de/mpidoc/quantumchemistry/ChemieAlltag/Morphin/morphin.html>);

Б) хинидина (извор: <https://www.sielc.com/compound-quinidine.html>);

В) атропина (<https://focusbio.com.au/products/atropine/>).

Слика 3.....7

Prunus mahaleb L.:

А) цела биљка (фото: Stefan.lefnaer; извор:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prunus_mahaleb_sl16.jpg)

Б) изданак са листовима и плодовима (фото: непознати аутор; извор:

<https://plantsam.com/prunus-mahaleb/>).

Слика 4.....8

Prunus spinosa L.:

А) надземни део (фото: Milimidragan 92; извор:

https://sr.m.wikipedia.org/wiki/%D0%94%D0%B0%D1%82%D0%BE%D1%82%D0%B5%D0%BA%D0%B0:Prunus_spinosa,_Rosaceae_01.jpg);

Б) изданак са листовима и плодовима (фото: Rita Bernhardt; извор:

<https://pixabay.com/photos/schlehe-prunus-spinosa-fruits-1500887/>).

Слика 5.....11

Rubus discolor Weihe & Nees:

А) лист (фото: Stan Shebs; извор:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rubus_discolor_1.jpg);

Б) плод (фото: Charles Brun; извор:

<https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/rubus/dicolor/>).

- Слика 6**.....12
Rubus serpens Weihe ex Lej & Court. на локалитету Јастребац (фото: И. З. Величковић).
- Слика 7**.....13
 Лековити представници фамилије Rosaceae:
- А)** *Rosa alba* L– цвет (фото: Salicyna; извор:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosa_Alba_Meidiland_2018-07-15_6120.jpg);
- Б)** *Fragaria chiloensis* L– надземни део (фото: Elaine sa Grey Cats; извор:
<https://www.flickr.com/photos/elainegreycats/9170507456/>);
- В)** *Crataegus laevigata* (Poir) DC– цвет (фото: Jerzy Opiola; извор:
https://ru.m.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%B0%D0%B9%D0%BB:Crataegus_laevigata_a2.jpg);
- Г)** *Crataegus monogyna* Jacq– плод (фото: Siebrand; извор:
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Crataegus-monogyna-frugt.JPG>);
- Д)** *Malus toringoides* (Rehd) Hughes– плод (фото: Arb O'Retum; извор:
<https://www.flickr.com/photos/123413440@N05/42917420940/>);
- Ђ)** *Pyrus communis* L– плод (фото: Tauno Erik; извор:
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pyrus_communis_cv_Pepi_Harilik_pirnipuu_sort_P_epe_estonia.JPG).
- Слика 8**.....14
 Традиционално коришћене лековите биљке рода *Prunus*:
- А)** *P. divaricata* – плод (фото: N. V. Terekhina; извор:
http://www.agroatlas.ru/en/content/cultural/Prunus_cerasifera_K/index.html);
- Б)** *P. dulcis* – плод (фото: Katja Schulz; извор:
<https://www.flickr.com/photos/treegrow/32948415764/>);
- В)** *P. cerasus* – цвет (фото: Andrew Butko; извор:
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prunus_cerasus_\(AB\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Prunus_cerasus_(AB).jpg)).
- Слика 9**.....15
 Традиционално коришћене лековите биљке рода *Rubus*:
- А)** *R. caesius* – плод (фото: Gailhampshire; извор:
<https://www.flickr.com/photos/43272765@N04/8086789019/>);
- Б)** *R. idaeus* – плод (фото: Bernard Dupont; извор:)
[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Red_Raspberry_\(Rubus_idaeus\)_41156562250.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Red_Raspberry_(Rubus_idaeus)_41156562250.jpg)).
- Слика 10**.....18

Основна структура флавоноида – два ароматична прстена (А и В), повезана С3 јединицом.

Слика 11.....19

Структурне формуле флавона, флаванола и дихидрохалкона:

А) кверцетин; Б) кемферол; Г) епикатехин; Д) флоризин; Љ) флоретин.

Слика 12.21

Структурна формула антоцијана:

А) пеларгонидин; Б) цијанидин; В) делфинидин; Г) пеонидин; Д) петунидин; Љ) малвидин.

Слика 13.....23

Структурне формуле деривата фенолних киселина:

А) бензоеве киселине; Б) циметне киселине.

Слика 14.....26

Структурна формула елагитанина сангвин Н6 (извор:

https://en.wikipedia.org/wiki/Sanguin_H-6).

Слика 15.....38

Промене на ћелији изазване дејством слободних радикала:

А) ћелија у физиолошки нормалном стању; Б) ћелија нападнута слободним радикалима; В) ћелија у стању оксидативног стреса услед дејства слободних радикала

(извор: <https://depositphotos.com/vector-images/metabolic-process.html>).

Слика 16.....38

Шематски приказ трансформације здраве ћелије у малигну током фаза канцерогенезе:

иницијације, пропагације и прогресије (преузето са изменама од Siddiqui и сар., 2015;

извор: https://www.researchgate.net/figure/Carcinogenesis-phases-initiation-promotion-progression-and-metastasis-A-Initiation_fig2_279304092).

Слика 17.....69

Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Prunus mahaleb*.

Слика 18.....70

Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Prunus spinosa*.

Слика 19.....72

Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Rubus discolor*.

Слика 20.....73

Хистограми садржаја укупних фенола (А), флавоноида (Б) и антоцијана и мономерних антоцијана (В) у екстрактима листова и плодова *Rubus serpens*.

Слика 21 Упоредни приказ количине хидрокси-бензоевих и хидрокси-циметних киселина и антоцијана одређених LC-MS/MS методом у воденим и етанолним екстрактима испитиваних врста.....**87**

Слика 22.....96

Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Prunus mahaleb* добијени DPPH (А), АВТС (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β -каротен/линолна киселина (Д) методом.

Слика 23.....100

Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Prunus spinosa* добијени DPPH (А), АВТС (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β -каротен/линолна киселина (Д) методом.

Слика 24.....104

Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Rubus discolor* добијени DPPH (А), АВТС (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β -каротен/линолна киселина (Д) методом.

Слика 25.....108

Хистограми резултата испитивања антиоксидантне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката плодова и листова *Rubus serpens* добијени DPPH (А), АВТС (Б), FRAP (В), TRC (Г) и β -каротен/линолна киселина (Д) методом.

Слика 26.....138

Фотомикрографије индукције апоптозе у HeLa ћелијама без третмана - контрола (А) и након 24-часовног третмана воденим (Б) и етанолним (В) екстрактом листа *R. discolor* и воденим (Г) и етанолним (Д) екстрактом листа *R. serpens*.

Слика 27.....140

Дијаграм вијабилних, рано/касно апоптотичних и некротичних HeLa ћелија одређен Annexin V-FITC/PI методом обојења у контролној групи (ћелије без третмана) **(А)**, након дејства етанолног **(Б)** и воденог **(В)** екстракта листа *R. discolor* и етанолног **(Г)** и воденог **(Д)** екстракта листа *R. serpens*.

БИОГРАФИЈА

Ивона Величковић (рођ. Ранковић) је рођена 07.07.1986. у Београду. У истом граду је завршила Основну школу „Васа Пелагић“ као носилац дипломе „Вук Караџић“, а потом Прву београдску гимназију (природно-математички смер).

Биолошки факултет Универзитета у Београду је уписала 2005/2006. године, а дипломирала 2010. са просечном оценом 8,50 након што је са оценом 10 одбранила дипломски рад под називом „Анализа састава етарског уља *Lavandula angustifolia* Mill“.

Докторске студије је уписала 2011/2012. на Биолошком факултету Универзитета у Београду, модул Експериментална и примењена ботаника.

У периоду од јануара 2011. до октобра 2012. је била запослена као сарадник у настави на Катедри за морфологију и систематику биљака Биолошког факултета где је активно учествовала у извођењу практичне наставе на предметима „Упоредна морфологија и систематика биљака“ и „Систематика и филогенија биљака“.

Од фебруара 2013. је запослена на Катедри за морфологију и систематику биљака, Института за ботанику и ботаничкој башти „Јевремовац“ Биолошког факултета Универзитета у Београду на пројекту „Микроморфолошка, фитохемијска и молекуларна истраживања – систематски, еколошки и применљиви аспекти“ (ОИ173029) финансираним од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, најпре као истраживач приправник, а од 2017. до 2019. као истраживач сарадник. Од 2013. је континуирано ангажована у извођењу практичне наставе на предметима „Анатомија и морфологија биљака“ и „Секундарни метаболити биљака“.

Ивона Величковић је, до сада, као први аутор публиковала 4 рада у часописима међународног значаја и 1 рад у часопису националног значаја из области фитохемије и биолошке активности биљака. Резултате свог научно-истраживачког рада је презентовала и на 10 међународних конгреса у виду саопштења, што заједно чини 15 библиографских јединица.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ивона Величковић _____

број индекса _____ Б3053/2011 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Фитохемијска анализа и биолошка активност екстракта *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor* Weihe & Nees и *R. serpens* Weihe ex Lej & Court (Rosaceae)“.

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.06.2021.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Ивона Величковић _____

Број индекса _____ Б3053/2011 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада „Фитохемијска анализа и биолошка активност екстракта *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor* Weihe & Nees и *R. serpens* Weihe ex Lej & Court (Rosaceae).

Ментор: _____ Др Славица Грујић и Др Жељко Жижак _____

Потписани/а: _____ Ивона Величковић _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.06.2021.

Изјава о коришћењу

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

„Фитохемијска анализа и биолошка активност екстраката *Prunus mahaleb* L., *P. spinosa* L., *Rubus discolor* Weihe & Nees и *R. serpens* Weihe ex Lej & Court (Rosaceae)“ која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, 28.06.2021.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.