

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mariana M. Oalđe Pavlović

Biološka aktivnost ekstrakata komercijalnih lekovitih
biljaka familije Lamiaceae iz Srbije

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mariana M. Oalđe Pavlović

Biological activity of commercial medicinal
Lamiaceae plant extracts from Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI:

dr Nemanja Rajčević, docent

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

dr Branka Vuković-Gaćić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

ČLANOVI KOMISIJE ZA OCENU I ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

dr Ana Alimpić Aradski, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

dr Biljana Božić Nedeljković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

dr Petar Marin, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

dr Stoimir Kolarević, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu

Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ –

Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

dr Jelena Živković, viši naučni saradnik

Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Dragoj mentorki **prof. dr Sonji Duletić-Laušević** dugujem beskrajnu zahvalnost na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da upravo uz nju krenem na svoj put otkrivanja botanike i započnem naučnu karijeru. Profesorka, hvala Vam na izdvojenom vremenu da se ova doktorska disertacija detaljno osmisli i realizuje, na stručnom vođenju, posvećenosti, podršci, na tome što ste bili voljni da saslušate i moje ideje i predloge, ali posebno na tome što ste svima nama ulepšali i olakšali svaki radni dan svojom neponovljivom energijom, toplim rečima i osmehom. Istinski ste brinuli o nama i otvarali nam sva moguća vrata – kako poslovna, tako i privatna, i na tome sam Vam večno zahvalna. Uz Vas je svaki problem, veliki ili mali, imao jednostavno i jasno rešenje.

Neizmernu zahvalnost dugujem svojoj dragoj mentorki **prof. dr Branki Vuković-Gačić** na dugogodišnjoj saradnji, uvek zanimljivim idejama i uloženom vremenu da se ova doktorska disertacija koncipira i dobije svoju konačnu formu. Hvala Vam na trudu, uvek jasnim odgovorima na moja pitanja, stručnim savetima i sugestijama, ali pre svega na poverenju i na tome što ste me uveli u čarobni svet mikrobiologije i genotoksikologije.

Veliko hvala dragom mentoru **doc. dr Nemanji Rajčeviću** na tome što uvek nesebično deli svoje znanje i što mi je svojim savetima umnogome olakšao rad u laboratoriji, ali i finalizaciju ove disertacije. Veoma sam zahvalna na posvećenosti, na tome što uvek nalazi vremena da odgovori na svako moje pitanje, kao i na sugestijama i kreativnim idejama koje su značajno doprinele kvalitetu ove disertacije.

Dr Ani Alimpić Aradski dugujem ogromnu zahvalnost na strpljenju i nesebično prenetom znanju još od mojih prvih koraka u laboratoriji. Nakon toliko godina bliske saradnje zahvalna sam ti ne samo na stručnom vođenju u istraživanjima, posvećenosti i smernicama uz koje sam učila, radila i razvijala kritičko razmišljanje, već i na svakom prijateljskom savetu, tvojoj vedrini i podršci, zahvaljujući čemu je svaka prepreka postala lakše premostiva.

Neizmernu zahvalnost dugujem **prof. dr Biljani Božić Nedeljković**, koja mi je ukazala poverenje i dozvolila da se bliže upoznam sa laboratorijskim radom iz oblasti imunologije. Hvala Vam što ste me prihvatili kao ravnopravnog člana Vašeg sjajnog tima stručnjaka, kreativnih i dobrih ljudi, i što nesebično delite svoje ideje i znanje sa mnom. Naučili ste me da kritički pristupam svakom problemu, što se umnogome odrazilo i na finalnu formu ove doktorske disertacije. Ogromno hvala i članovima Imuno tima, posebno **dr. Bojanu Božiću, Tanji Lunić** i **Mariji Mandić**, koji su planiranje i realizaciju eksperimenata podigli na novi, značajno viši nivo.

Srdačno se zahvaljujem **prof. dr Petru Marinu** na ukazanom poverenju da učestvujem na projektu „Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja – sistematski, ekološki i primenljivi aspekti“, kao i na korisnim sugestijama i komentarima prilikom pisanja naučnih radova, ali i ove doktorske disertacije.

Neizmerno sam zahvalna **dr Stoimiru Kolareviću** na posvećenom vođenju eksperimentalnog rada i dragocenom znanju koje mi je preneo iz oblasti mikrobiologije, genotoksikologije i statističke obrade podataka. Uvek se rado prisetim tvojih saveta i smernica koji su mi trajno olakšali rad u laboratoriji, i koje sada ponosno ponavljam svakome ko kreće da se upoznaje sa radom u laboratoriji. Hvala ti na divnoj saradnji, prijateljskoj atmosferi i na tome što uvek strpljivo odgovaraš na sva moja pitanja.

Dr Jeleni Živković se srdačno zahvaljujem na hemijskoj analizi, sugestijama i komentarima koji su unapredili kako ovu doktorsku disertaciju, tako i naše zajedničke naučne radove. Veliko hvala **dr Katarini Šavikin** na ustupanju biljnog materijala za izradu ove disertacije, kao i na uvek brzim i jasnim odgovorima i velikoj pomoći tokom pisanja radova.

Dragim kolegicama **Jasmini Gradojević, dr Ivoni Veličković** i **dr Kseniji Mileski** sam neizmerno zahvalna na tome što su me prihvatile kao člana „arhivatorskog odeljenja“ i pomogle mi da se snađem i razumem pravila i obaveze našeg posla. Kolegicama iz kancelarije dugujem veliku zahvalnost na prijateljstvu, podršci i razumevanju, posebno tokom pisanja ove disertacije i rada od kuće u uslovima pandemije. Drage moje, hvala vam što uz vas radno vreme uvek protiče u lepšoj i veselijoj atmosferi.

Veliko hvala **prof. dr Mirjani Stajić, dr Jasmini Čilerdžić, dr Jelici Novaković, Oliveri Popović, Mariji Jončić i Veri Robović** na tome što su me svojom vedrinom i lepim rečima ohrabrivale na ovom zahtevnom putu.

Mojim divnim koleginicama **Jeleni Đorđević, Smiljani Janković, dr Jovani Jovanović Marić**, i drugarici **dr Mariji Čosić** ogromno hvala za pomoć u planiranju i realizaciji eksperimentalnog rada i sređivanju rezultata, ali pre svega, hvala vam na divnoj i veseloj atmosferi tokom rada u laboratoriji, na svakoj reči podrške, razumevanja i ohrabrenja, na svakom osmehu i prijateljskom razgovoru.

Mima, Neti, Irena, Tina, Ema, Simona, Vanesa, Ljilja, Milice, City, Nikola, Đole, Aleše, Vladimire, Dule – izuzetno sam srećna i ponosna što vas imam u svom životu. Hvala vam za svaki osmeh i zagrljaj, svaku toplu reč, svaki put kada ste izdvojili vreme da me pitate kako sam, svaki put kada ste znali da mi treba vaš savet i onda kada vam to nisam tražila. Hvala vam za konstantno navijanje i podršku, ali i za svaki put kada ste me „odvukli“ iz kuće da zajedno negde otputujemo i radimo nešto zabavno. Bolje drugare nisam mogla poželeti! Mojim malenim sunašcima **Damjanu, Sonji, Nađi i Davidu** neizmerno hvala za svaki poljubac i zagrljaj, razvedravali ste mi dane onda kada mi je bilo najpotrebnije.

Tetki i teći, koji su mi bili podrška od malih nogu, koji su me uveli u neverovatni svet knjiga i nauke, i koji su pratili sve moje uspehe i padove. Hvala vam za svu vašu nesebičnu ljubav i pomoć, nikad vam to neću zaboraviti! **Kokou i Renati** – savetima, smernicama i razgovorima ste mi olakšali mnoge životne odluke, a neprestanim smehom i dobrim raspoloženjem – svaki zajednički trenutak. Uvek ste uz mene i ne mogu vam biti zahvalnija zbog toga! **Steli, Anastasiji i Irini Magdaleni**, uvek znate da odaberete prave reči, da mi date dodatnu energiju i ulepšate dan. Hvala vam!

Bez podrške, razumevanja i ljubavi roditelja mog supruga, **Gordane i Novice**, i sestre **Ane** ovaj put ne bi bio moguć. Ogromno hvala što ste me prihvatili i što ste sve vreme uz mene.

Mami, tati, Floriju, Ani i dedi **Nikucuu** – hvala vam na beskrajnoj podršci, razumevanju i bezuslovnoj ljubavi. Hvala vam što ste me hrabрили, jačali, spremali za život, podržali da sledim svoje snove i što ste od mene napravili to što danas jesam. Mojim patuljcima, **Vikiju i Akiju** hvala za svaki poljubac, osmeh i zagrljaj, i za snagu koju ste mi dali i time olakšali ovaj put!

Beskrajnu zahvalnost dugujem svom suprugu **Aleksandru**, najdivnijoj i najbrižnijoj osobi u mom životu. Ti si moj pokretač, inspiracija, snaga i oaza mira! Svojom bezrezervnom ljubavlju, vedrinom i razumevanjem si mi neizmerno olakšao ovaj put. Ne postoje reči kojima bih iskazala zahvalnost koju osećam što si uvek uz mene i što mi svaki dan činiš lepšim.

Ovu doktorsku disertaciju posvećujem dragim osobama čiju sam ljubav i podršku uvek imala kako tokom života, tako i tokom školovanja, a koji više nisu među nama. **Baki, nani, tatiju, mumi i profesorima Nikoli i Sonji**.

Autor

Doktorska disertacija je izvedena uz finansijsku podršku projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja biljaka – sistematski, ekološki i primenljivi aspekti“ (OI 173029).

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je rađen u laboratorijama:

- ☼ Katedre za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,*
- ☼ Katedre za mikrobiologiju Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu,*
- ☼ Katedre za opštu fiziologiju i biofiziku Instituta za fiziologiju i biohemiju „Ivan Đaja“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu i*
- ☼ Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“.*

Bioška aktivnost ekstrakata komercijalnih lekovitih biljaka familije Lamiaceae iz Srbije

SAŽETAK

Čovekova potraga za terapeutskim sredstvima prirodnog, a posebno biljnog porekla, datira još iz starih vremena. Sa napretkom savremene nauke omogućeno nam je da detaljno istražujemo njihove fitokonstituente, biošku aktivnost i mehanizme delovanja, sa ciljem dobijanja bezbednijih i efikasnijih farmakoloških agenasa.

Cilj ove doktorske disertacije je bio određivanje hemijskog sastava i bioške aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata 18 vrsta familije Lamiaceae koje se tradicionalno upotrebljavaju i komercijalno gaje u Srbiji.

Hemijska karakterizacija je urađena korišćenjem spektrofotometrijskih metoda (određivanjem ukupnog sadržaja fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, flavonola, kumarina i triterpena), kao i HPLC-DAD analizom. Bioški potencijal pomenutih ekstrakata je određen testiranjem njihove antioksidativne, genoprotektivne, antigenotoksične, antidijabetične, antineurodegenerativne, antineuroinflamatorne, antitumorske i antibakterijske aktivnosti, kao i procenom njihovog uticaja na modelu zarastanja rane.

Ekstrakti ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae obiluju sekundarnim metabolitima, posebno onima iz grupe fenolnih jedinjenja, pri čemu sastav i količina komponenti zavisi od primenjenog rastvarača za ekstrakciju. U ovim ekstraktima, najprisutnija fenolna kiselina je bila rozmarinska kiselina, a najprisutniji flavonoid, flavon luteolin-7-*O*-glukozid.

Iako su svi ekstrakti ispoljili antioksidativnu aktivnost, najjači potencijal su imali ekstrakti *Origanum vulgare* i *Melissa officinalis*. Vodeni ekstrakti su pružali najviši nivo zaštite plazmidne DNK, posebno ekstrakti *Mentha × piperita* i *Thymus vulgaris*. Dok su najjaču antigenotoksičnu aktivnost u prokariotskom modelu imali etanolni ekstrakti *Rosmarinus officinalis* i *Salvia officinalis*, na eukariotskom modelu posebno dobru aktivnost su pokazali ekstrakti *Hyssopus officinalis*, *Leonurus cardiaca* i *Marrubium vulgare*. Iako ekstrakti nisu inhibirali aktivnost enzima α -amilaze, svoju antidijabetičnu aktivnost su ispoljili inhibicijom aktivnosti α -glukozidaze, pri čemu su se posebno izdvojili vodeni ekstrakti *M. piperita*, *Satureja montana* i *Thymus serpyllum*. Ispitivani ekstrakti imaju dobar antineurodegenerativni potencijal procenjivan inhibitornim efektom na aktivnost acetilholinesteraze tirozinaze, kao i antineuroinflamatorni i antineurocitotoksični efekat prema LPS-om aktiviranim ćelijama mikroglije. Većina ispitivanih etanolnih ekstrakata je imala antitumorski efekat prema ćelijskoj liniji kolorektalnog kancera. Genotoksični potencijal prema ovim tumorskim ćelijama koji je bio sličan efektu etopozida je ispoljio jedino etanolni ekstrakt *Ocimum basilicum*. Ekstrakti su imali i antibakterijski potencijal: inhibirali su rast testiranih bakterijskih sojeva, posebno gram-pozitivnih, inhibirali su invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 prilikom infekcije fibroblasta pluća i formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1, a takođe su degradirali i već formirani biofilm *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu su se posebno izdvojili ekstrakti *S. montana* i *O. vulgare*.

U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put testirana i potvrđena genoprotektivna, kao i antigenotoksična aktivnost ispitivanih ekstrakata, a takođe po prvi put daje uvid u antineuroinflamatornu i antitumorsku aktivnost pojedinih predstavnika familije Lamiaceae. Na osnovu IBR analize svih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae, najbolji ukupni bioški potencijal su imali *O. vulgare* i *M. officinalis*, kao i etanolni ekstrakt *S. officinalis*, dok su najniži bioški potencijal pokazali ekstrakti *M. vulgare*, kao i etanolni ekstrakt *G. hederacea*.

Ključne reči: Lamiaceae; metanolni ekstrakti; etanolni ekstrakti; vodeni ekstrakti; bioška aktivnost; hemijska karakterizacija.

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Morfologija, fitohemija i sistematika biljaka

Biological activity of commercial medicinal Lamiaceae plant extracts from Serbia

ABSTRACT

The man's search for natural therapeutic agents, especially those of plant origin, dates back to ancient times. However, with the progress of modern science, we have been able to investigate in detail their phytoconstituents, biological activity and mechanisms of action in the human body, in order to obtain safer and more effective pharmaceuticals.

The aim of this dissertation was to determine the chemical composition and biological activity of methanolic, ethanolic and aqueous extracts of 18 species of the Lamiaceae family that are being traditionally used and commercially grown in Serbia.

Chemical characterization was performed using spectrophotometric methods (by the determination of the total content of phenols, phenolic acids, flavonoids, flavonols, coumarins, and triterpenes), as well as by HPLC-DAD analysis. The biological potential of the extracts was determined by testing their antioxidant, genoprotective, antigenotoxic, antidiabetic, antineurodegenerative, antineuro-inflammatory, antitumor, and antibacterial activities, as well as by assessing their influence on wound healing.

The extracts of the tested Lamiaceae representatives are rich in secondary metabolites, mainly phenolic compounds. However, the content and amount of phytocomponents depends on the extraction solvent. In these extracts, the dominant phenolic acid was rosmarinic acid, and the dominant flavonoid was flavone luteolin-7-*O*-glucoside.

Although all extracts showed antioxidant activity, *Origanum vulgare* and *Melissa officinalis* had the highest antioxidant potential. Aqueous extracts provided the highest plasmid DNA protection, especially *Mentha × piperita* and *Thymus vulgaris*. While the ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* had the strongest antigenotoxic activity in the prokaryotic model, *Hyssopus officinalis*, *Leonurus cardiaca*, and *Marrubium vulgare* extracts showed excellent activity in the eukaryotic model. Although the extracts had no effect on α -amylase inhibition, they exhibited antidiabetic activity by inhibiting the activity of α -glucosidase, especially aqueous extracts of *M. piperita*, *Satureja montana* and *Thymus serpyllum*. The tested extracts possess antineurodegenerative potential, which they exhibit by inhibiting the activities of acetylcholinesterase and tyrosinase, as well as antineuroinflammatory and antineurocytotoxic potentials against LPS-activated microglia. Most of the ethanolic extracts had an antitumor effect on colorectal cancer cells, while only the genotoxic effects of *Ocimum basilicum* were similar to etoposide. The extracts, especially *S. montana* and *O. vulgare*, exhibited their antibacterial potential by inhibiting the growth of tested bacterial strains, especially gram-positive ones, by inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 invasion during human lung fibroblast infection, as well as biofilm formation inhibition and degradation of already formed *P. aeruginosa* PAO1 biofilm.

In this dissertation, the genoprotective and antigenotoxic activities of the examined plant extracts were tested and confirmed for the first time. Moreover, this study provides the first insight into the antineuroinflammatory and antitumor activities of certain investigated Lamiaceae representatives. Based on the IBR analysis of all tested Lamiaceae extracts, *O. vulgare* and *M. officinalis*, as well as ethanolic extract of *S. officinalis* had the best overall biological potential, while extracts of *M. vulgare* and ethanolic extract of *G. hederacea* showed the lowest biological potential.

Keywords: Lamiaceae; methanol extracts; ethanolic extracts; aqueous extracts; biological activity; chemical characterization.

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Morphology, phytochemistry and systematics of plants

Sadržaj

1. UVOD	2
1.1. Lekovite biljke	2
1.1.1. Istorijat korišćenja lekovitih biljaka.....	2
1.2. Opšte karakteristike familije Lamiaceae	4
1.3. Sekundarni metaboliti biljaka.....	5
1.3.1. Polifenolna jedinjenja.....	6
1.3.2. Terpeni	8
1.3.3. Polifenolna i terpenska jedinjenjima biljaka familije Lamiaceae.....	9
1.4. Biološka aktivnost biljaka.....	13
1.4.1. Antioksidativna, genoprotektivna i antigenotoksična aktivnost.....	13
1.4.2. Antidiabetična aktivnost.....	14
1.4.3. Antineurodegenerativna i neuroprotektivna aktivnost	16
1.4.4. Imunomodulatorna aktivnost	18
1.4.5. Antibakterijska aktivnost	19
1.5. Pregled morfoloških karakteristika, fitohemijskog sastava i biološke aktivnosti odabranih predstavnika familije Lamiaceae	26
1.5.1. <i>Glechoma hederacea</i> L. (dobričica)	26
1.5.2. <i>Hyssopus officinalis</i> L. (izop).....	27
1.5.3. <i>Lavandula angustifolia</i> Mill. (lavanda, despik).....	28
1.5.4. <i>Leonurus cardiaca</i> L. (srdačica)	29
1.5.5. <i>Marrubium vulgare</i> L. (očajnica)	30
1.5.6. <i>Melissa officinalis</i> L. (matičnjak).....	30
1.5.7. <i>Mentha × piperita</i> L. (pitoma nana)	31
1.5.8. <i>Ocimum basilicum</i> L. (bosiljak)	32
1.5.9. <i>Origanum majorana</i> L. (slatki majoran)	33
1.5.10. <i>Origanum vulgare</i> L. (vranilovka, vranilova trava)	34
1.5.11. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (sinonim <i>Salvia rosmarinus</i> Spenn., ruzmarin)	35
1.5.12. <i>Salvia officinalis</i> L. (žalfija).....	37
1.5.13. <i>Satureja montana</i> L. <i>sensu lato</i> (čubur).....	38
1.5.14. <i>Sideritis scardica</i> L. (šarplaninski čaj).....	39
1.5.15. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. (podubica).....	40
1.5.16. <i>Teucrium montanum</i> L. (trava iva)	41
1.5.17. <i>Thymus serpyllum</i> L. (majkina dušica).....	42

1.5.18. <i>Thymus vulgaris</i> L. (timijan)	42
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	45
3. MATERIJAL I METODE.....	48
3.1. Biljni materijal.....	48
3.2. Hemikalije i reagensi.....	48
3.2.1. Rastvori	49
3.3. Priprema ekstrakata.....	53
3.4. Priprema bakterijskih sojeva	54
3.5. Izolacija plazmida alkalnom lizom	55
3.6. Priprema ćelijskih linija.....	56
3.6.1. Održavanje ćelijske kulture	56
3.6.2. Tripsinizacija	56
3.6.3. Određivanje broja ćelija	57
3.6.4. Zasejavanje ćelija i tretman ekstraktima za određivanje antineuroinflamatorne, citotoksične i antitumorske aktivnosti	57
3.6.5. Priprema ćelijske kulture za određivanje uticaja na adheziju i invaziju <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	57
3.7. Određivanje fitohemijskog sastava ekstrakata	57
3.7.1. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja	57
3.7.2. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina.....	58
3.7.3. Ukupni sadržaj flavonoida.....	58
3.7.4. Ukupni sadržaj flavonola	59
3.7.5. Ukupni sadržaj kumarina	59
3.7.6. Ukupni sadržaj triterpena	59
3.7.7. HPLC-DAD analiza.....	60
3.8. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata	60
3.8.1. Antioksidativna aktivnost	60
3.8.2. Genoprotektivna aktivnost	63
3.8.3. Antigenotoksična aktivnost.....	65
3.8.4. Antidijabetična aktivnost ekstrakata.....	67
3.8.5. Antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna aktivnost	68
3.8.6. Antitumorska aktivnost.....	71
3.8.7. Antibakterijska aktivnost	71

3.8.8. Uticaj na migraciju ćelija u <i>in vitro</i> modelu zarastanja rana.....	73
3.9. Obrada podataka.....	74
4. REZULTATI I DISKUSIJA	78
4.1. Prinos ekstrakata.....	78
4.2. Sadržaj i hemijski sastav pojedinih fitokonstituenata ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	79
4.2.1. Spektrofotometrijski određen sadržaj pojedinih fitokonstituenata.....	79
4.2.2. HPLC-DAD analiza ekstrakata odabranih predstavnika familije Lamiaceae	84
4.3. Antioksidativna aktivnost.....	102
4.4. Genoprotektivna aktivnost.....	120
4.5. Antigenotoksična aktivnost	123
4.5.1. Prokariotski model sistem	123
4.5.2. Eukariotski model sistem.....	126
4.6. Antidijabetična aktivnost.....	129
4.7. Antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna aktivnost.....	137
4.8. Antitumorska aktivnost.....	151
4.9. Antibakterijska aktivnost ekstrakata biljaka familije Lamiaceae.....	162
4.10. Uticaj na migraciju ćelija u <i>in vitro</i> modelu zarastanja rana	177
4.11. Opšta diskusija	179
5. ZAKLJUČCI.....	198
6. LITERATURA	202
7. PRILOZI	252

UVOD

1. UVOD

1.1. Lekovite biljke

Zahvaljujući sintezi biološki aktivnih metabolita, lekovite biljke ispoljavaju terapijske i farmakološke efekte, te su od davnina široko zastupljene u lečenju različitih bolesti (Petrovska, 2012; Namdeo, 2018). Procenjeno je da oko jedne trećine lekova koji se danas koriste sadrže sastojke biljnog porekla, što nije iznenađujuće s obzirom na to da upotreba prirodnih proizvoda ima brojne prednosti u odnosu na sintetičke preparate – između ostalog su bezbedniji za korišćenje, veća im je dostupnost, niža cena i imaju širu primenu (Ma i sar., 2005; Singab, 2012; Abubakar i Haque, 2020). S tim u vezi, u novije vreme se zapaža sve veće interesovanje za lekovite biljke, što je dodatno opravdano činjenicom da biljke i brojna jedinjenja koja se u njima nalaze mogu pozitivno uticati na veći broj različitih poremećaja i oboljenja, dok s druge strane, sintetički lekovi neretko usmerenije ostvaruju svoje farmakološke efekte. Pored toga, prema podacima Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO), 70–95% svetskog stanovništva koristi znanja tradicionalne medicine kao primarni pristup u održavanju svog zdravlja (Carmona i Pereira, 2013). Iako je mišljenje naučne zajednice u vezi aplikativne vrednosti tradicionalne medicine podeljeno, etnobotanička istraživanja su pokazala da se biljke uspešno koriste kao terapijski agensi u lečenju akutnih i hroničnih bolesti, kao i za poboljšanje opšteg stanja organizma. Takođe, brojna savremena naučna istraživanja su pokazala da lekovite i aromatične biljke ispoljavaju veliki broj bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antidijabetična, neuroprotektivna, antimikrobna, antivirusna, anti-inflamatorna, imunomodulatorna, antinociceptivna, antitumorska aktivnost i mnoge druge (Bakkali i sar., 2008; Alimpić i sar., 2014; Abdollahi i sar., 2018; El-Boshy i sar., 2019; de Macedo i sar., 2020; Vladić i sar., 2020; Jakovljević Kovač i sar., 2021). Zahvaljujući tome, tradicionalno korišćenje biljaka u lekovite svrhe je vremenom postalo deo savremene farmakoterapije.

Čovekova potraga za terapijskim sredstvima prirodnog porekla datira još iz starih vremena, o čemu svedoči veliki broj dokaza poput pisanih dokumenata, spomenika, čak i sačuvanih originalnih biljnih droga. Zbog toga se može tvrditi da je evolucija podizanja svesti o korišćenju lekovitih i aromatičnih biljaka rezultat viševjekovnih borbi za opstanak, ali i borbi protiv bolesti zbog kojih je čovek bio primoran da nauči da traga za lekovitim svojstvima listova, semena, plodova i drugih biljnih delova. Razvoj novih naučnih saznanja o lekovitim biljkama, kao i razvoj svesti o korišćenju prirodnih namirnica su povećali interesovanje istraživača da odgovore na brojne izazove sa ciljem da se poboljša kvalitet života ljudi u modernom svetu (Petrovska, 2012). Prethodno rečeno je još relevantnije tokom aktuelne pandemije izazvane SARS-CoV-2 virusom, kada su primećene istorijske promene u modernom društvu, što je uticalo i na prehrambeni sektor (bioaktivni sastojci hrane, bezbednost i sigurnost hrane, kao i održivost). Jedna od obećavajućih alternativa u postpandemijskom svetu jeste razvoj prehrambenih proizvoda biljnog porekla koji pojačavaju imunitet i utiču na poboljšanje ljudskog zdravlja (Galanakis i sar., 2021).

1.1.1. Istorijat korišćenja lekovitih biljaka

Čovek je u bliskom kontaktu sa svojim okruženjem od svog nastanka, čime mu je pružena prilika da nailazi na različite sastojke koje može dalje da koristi u ishrani i lečenju. Smatra se da je upotreba biljaka u svakodnevnom životu pre svega zasnovana na pokušajima, ali i greškama, na osnovu kojih su ljudi vekovima sticali iskustvo i upotpunjavali svoje znanje koje su prenosili iz generacije u generaciju. Zahvaljujući tome, lekovite biljke se koriste u

gotovo svim kulturama i u svim delovima sveta. U novije vreme, bezbednost, kvalitet i efikasnost lekovitih biljaka i biljnih preparata postali su ključni ciljevi u industrijski razvijenim zemljama, kao i zemljama u razvoju (Galanakis i sar., 2021). Standardizacijom procesa ekstrakcije i procenom efikasnosti biljnih ekstrakata, etarskih ulja, kao i njihovih aktivnih jedinjenja, lekovi na bazi biljaka mogu doprineti nastanku nove ere zdravstvenog sistema za lečenje velikog broja bolesti u budućnosti (Jamshidi-Kia i sar., 2018).

Arheološki podaci ukazuju na to da su ljudi u primitivnim zajednicama, još pre oko 60.000 godina, gajili lekovite biljke koje su zatim upotrebljavane u okviru religijskih obreda. Najraniji otkriveni pisani dokaz, starosti oko 5000 godina, o upotrebi lekovitih biljaka kao terapijskih sredstava potiče iz južne Mesopotamije – sumerska tablica nađena u blizini Nipura (Sewell i Rafieian-Kopaei, 2014; Jamshidi-Kia i sar., 2018). Zatim, kineska knjiga o korenju i travama pod nazivom „*Pen T'Sao*“, koju je napisao vladar Shen Nung oko 2800. god. p.n.e., koju pojedini farmakoistoričari smatraju najstarijom farmakopejom na svetu, sadrži opise 365 biljnih droga domaćeg porekla, od kojih se mnoge i danas upotrebljavaju: *Rhei rhizoma*, kamfor, *Cinnamomi cortex*, *Theae folium* i druge (Janick, 2003; Petrovska, 2012; Sewell i Rafieian-Kopaei, 2014). Ebersov papirus, datiran na oko 1550. godinu p.n.e., predstavlja najopsežniji i najbolje sačuvani zapis o drevnoj egipatskoj medicini, sa oko 700 formula i narodnih lekova za tretiranje različitih zdravstvenih problema, od ujeda krokodila do depresivnih stanja i hirurških interencija (Kurhekar, 2021). Takođe, zahvaljujući darovima iz grobnica iz doba faraona Ehnatona i Tutankamona (oko 1300. godine p.n.e.) ostao je relativno dobro očuvan jedan broj originalnih biljnih droga iz perioda Starog veka (Dwivedi, 2004).

Prema podacima iz Biblije i svete jevrejske knjige Talmuda, mirisne smole, najčešće miro, smirna (iz drveta *Commiphora myrrha*) i tamjan, olibanum (iz drveta roda *Boswellia*), su korišćene prilikom različitih obreda lečenja. U indijskim svetim knjigama, Rig-Vedi i Atarva-Vedi (2000. do 1000. godina p.n.e), se takođe pominje lečenje biljem, zbog čega se one smatraju značajnim za začetak indijske tradicionalne medicine. Zapravo, mnoge začinske biljke, kao što su muskatni oraščić, biber, karanfilić, upravo vode poreklo iz Indije (Janick, 2003; Petrovska, 2012).

Evropski antički narodi su takođe bili upoznati sa lekovitim svojstvima pojedinih biljaka. Hipokrat (459-370. godine p.n.e.), koji je osnivač grčke medicine, kao i Aristotel (384-322. godine p.n.e.), su koristili biljke u lečenju. Teofrast (371-287. godine p.n.e.) je čak osnovao Školu lekovitih biljaka i napisao dve značajne knjige: „*De Causis Plantarum*“ i „*De Historia Plantarum*“. Značajan doprinos proučavanju lekovitih biljaka je dao i Dioskorid (40-90. godine n.e.), koji je napisao knjigu pod nazivom „*De Materia Medica*“, u kojoj je opisao više od 600 lekovitih biljaka koje su se u to vreme koristile u lečenju različitih bolesti. Plinije Stariji (23-79. godine n.e.), rimski pisac i naučnik, savremenik Dioskorida, je u svojoj knjizi „*Historia Naturalis*“ opisao oko 1000 lekovitih biljaka. Smatra se da su Plinijeva i Dioskoridova dela objedinila mnoga znanja o lekovitim biljkama iz tog doba (Janick, 2003; Petrovska, 2012; Jamshidi-Kia i sar., 2018).

Tokom srednjeg veka su se lečenje, gajenje lekovitih biljaka, kao i priprema terapijskih preparata obavljali u manastirima, gde su monasi sa medicinskim znanjem često upotrebljavali žalfiju, anis, nanu, čubar i druge lekovite biljke (Petrovska, 2012). Takođe, u ovom periodu, evropski lekari su se rado oslanjali na postojeću literaturu poput „*De Re Medica*“ Celzusa, „*Canon Medicinæ*“ Avicene i „*Liber Magnæ Collectionis Simplicium Alimentorum et Medicamentorum*“ Ibn al-Baitara, u kojima je bilo opisano preko 1000 različitih lekovitih biljaka. Putovanja Marka Pola (1254-1324) po Aziji, Persiji i Kini, otkriće Amerike od strane Kristofera Kolumba (1451-1506) i putovanje Vaska De Game (1469-1524)

u Indiju, rezultirali su donošenjem velikog broja lekovitih biljaka u Evropu. U isto vreme, Paracelzus (1493-1541) je bio vodeći zagovornik lekova koji su se bazirali na različitim sirovim biljkama i mineralnim supstancama (Sewell i Rafieian-Kopaei, 2014).

U periodu od XV do XVII veka je biljna medicina bila u procvatu i opisi lekovitih biljaka su počeli da se pojavljuju na više jezika. U XVIII veku Line je osmislio binomnu nomenklaturu, što je uticalo i na klasifikaciju lekovitih biljaka koje su do tada koristili različiti narodi, a koji su za te biljke imali sopstvene nazive. S tim u vezi, uvođenje binomne nomenklature je uticalo na globalizaciju botaničke literature. Međutim, početak XIX veka predstavlja prekretnicu u poznavanju i upotrebi lekovitih biljaka. Naime, otkriće i izolacija alkaloida iz pojedinih biljaka, kao i izolacija glikozida, su označili početak razvoja farmacije kao nauke. Razvojem naprednijih hemijskih metodologija i protokola, otkrivene su i druge aktivne supstance iz lekovitih biljaka kao što su tanini, saponozidi, vitamini i hormoni, ali su ujedno ljudi počeli sa više opreza da koriste određene biljne preparate, posebno one koji su sadržali visoke koncentracije alkaloida, što je zahtevalo opsežnija istraživanja tadašnjih naučnika kako bi se omogućilo bezbedno korišćenje terapijskih sredstava (Petrovska, 2012; Sewell i Rafieian-Kopaei, 2014).

U današnje vreme, primena lekovitih biljaka se temelji na tradicionalnoj medicini, ali ujedno i na savremenim naučno-istraživačkim saznanjima. Zahvaljujući tome, mnoge lekovite biljke se upravo koriste po preporuci lekara ili farmaceuta – samostalno ili u kombinaciji sa postojećim sintetičkim lekovima (Petrovska, 2012; Sewell i Rafieian-Kopaei, 2014; Lu i sar., 2021). Budući da se tehnologija u modernom svetu ubrzano razvija, da je ekološka svest ljudi u porastu i da se lekovite biljke komercijalno gaje u većoj meri nego proteklih decenija, može se pretpostaviti da će lekovite biljke imati još značajniju ulogu u našoj svakodnevici i da će se pažnja sve više usmeravati ka unapređenju kvaliteta života uz pomoć prirodnih proizvoda, na šta se očekuje da će uticati naučna saznanja dobijena detaljnijim ispitivanjima hemijskog sastava lekovitih, ali i potencijalno-lekovitih biljaka, kao i njihovih bioloških aktivnosti.

1.2. Opšte karakteristike familije Lamiaceae

Familija Lamiaceae (usnatice) predstavlja jednu od najvećih familija skrivenosemenica, koja obuhvata 236 rodova i oko 7200 vrsta (Esra i sar., 2011; Badamtsetseg i sar., 2012; Raja, 2012; Etsassala i sar., 2021).

Prema starijim klasifikacijama, familija Lamiaceae se može podeliti na dve podfamilije (Erdtman, 1945; Pedersen, 2000; Marin, 2003; Valant-Vetschera i sar., 2003):

1. Nepetoideae – sa heksakolpatnim, trojedarnim polenovim zrnima, čije su vrste generalno bogate etarskim uljima;
2. Lamioideae – sa trikolpatnim, dvojedarnim polenovim zrnima i sa manjim količinama etarskih ulja, ali bogate iridiodima, koji nisu nalaženi kod Nepetoideae.

S druge strane, hemotaksonomska istraživanja koja su bazirana na sadržaju fenolnih jedinjenja su pokazala da se familija Lamiaceae može podeliti na osam podfamilija, i to: Ajugoideae, Chloanthoideae, Lamioideae, Nepetoideae (najbrojnija podfamilija), Pogostemonoideae, Scutellarioideae, Teucroideae i Viticoideae (Pedersen, 2000; Valant-Vetschera i sar., 2003).

Biljke familije Lamiaceae nastanjuju suva staništa sa visokim stepenom insolacije. Kosmopolitskog su rasprostranjenja (Pedersen, 2000), ali postoje i endemične vrste. Najveći diverzitet vrsta je prisutan u oblasti Mediterana i severozapadne Azije (Xiwen i Hedge, 1994).

Srbiju odlikuje velika raznolikost vegetacije i flore, zbog čega naša država i predstavlja jedan od 158 svetskih centara biodiverziteta. Ovaj biodiverzitet se ogleda i u broju lekovitih biljnih vrsta, koji je procenjen na oko 700, od čega su usnatice zastupljene sa 32 roda i 160 vrsta (Vasić, 1997; Jarić i sar., 2014).

Biljke ove familije mogu biti jednogodišnje ili višegodišnje biljke, polužbunovi, žbunovi, ređe nisko drveće. Morfološke odlike su četvorougono, ređe okruglo stablo, naspramno raspoređeni listovi (dekusirani) i dvousnat cvet, po čemu je ova familija i dobila ime (Diklić, 1974; Raja, 2012).

Biljke familije Lamiaceae imaju značajnu primenu u narodnoj medicini zbog visokog sadržaja aktivnih sastojaka u etarskim uljima, ekstraktima i drugim preparatima (Jančić i sar., 1995). Mnoge od njih, poput bosiljka, nane, ruzmarina, žalfije, čubra, slatkog majorana, origana, majčine dušice, lavande i drugih, koriste se takođe u kulinarstvu i industriji parfema (Raja, 2012; Venkateshappa i Sreenath, 2013).

Istraživanja su pokazala da biljke familije Lamiaceae ispoljavaju veliki broj bioloških aktivnosti, kao što su antioksidativna, antimikrobna, antivirusna, anti-inflamatorna, imunomodulatorna, antiproliferativna, antitumorska, antidijabetična, hipoglikemijska, kardio- i neuroprotektivna aktivnost (Berrougui i sar., 2006; Matkowski i sar., 2008; Raja, 2012; Alimpić i sar., 2014; Pérez-González i sar., 2019).

1.3. Sekundarni metaboliti biljaka

Biljke sintetišu veliku količinu organskih jedinjenja koje se tradicionalno dele na primarne i sekundarne metabolite, mada ponekad granice između ove dve grupe nisu u potpunosti definisane budući da se mnogi međuprodukti u primarnom metabolizmu preklapaju sa intermedijerima sekundarnog metabolizma. Primarni metaboliti su jedinjenja koja imaju važnu ulogu u fotosintezi, disanju, rastu i razviću biljaka i ovoj grupi pripadaju ugljeni hidrati, proteini i lipidi (Crozier i sar., 2007; Thirumurugan i sar., 2018).

Drugu grupu jedinjenja, od kojih se neki mogu naći u veoma visokim koncentracijama kod određenih vrsta biljaka, predstavljaju sekundarni metaboliti (Crozier i sar., 2007). Termin „sekundarni metaboliti“ uveo je Albreht Kosel 1891. godine, čime je nameravao da napravi razliku između primarnih metabolita koji su prisutni u svakoj živoj ćeliji koja poseduje sposobnost deobe, i onih metabolita koji imaju, prema njegovom mišljenju, manji značaj u životu tog organizma. Iako su sekundarni metaboliti izvedeni iz primarnog metabolizma, oni ne čine osnovni molekularni skelet biljnog organizma. Njihovo odsustvo ne utiče direktno na smanjenje trajanja života biljke i na njihov vegetativni rast, za razliku od primarnih metabolita, međutim bez njih, opstanak biljnog organizma bi u velikoj meri bio narušen (Thirumurugan i sar., 2018). Sekundarni metaboliti su strukturno raznovrsni i neki od njih se nalaze samo kod određenih vrsta biljaka, što često predstavlja predmet hemotaksonomskih ispitivanja. Njihova funkcija kod biljaka je dugo bila zanemarena, međutim u novije vreme ova jedinjenja sve više privlače pažnju, budući da neka od njih imaju vodeću ulogu u zaštiti biljaka od herbivora, napada mikroorganizama, ulogu atraktanata polinatora, alelopatskih agenasa, UV protektanata i signalnih molekula. Takođe, pojedini sekundarni metaboliti biljaka se primenjuju i kao lepkovi, voskovi, ulja, mirišljava sredstva, i drugo, a od njih se potencijalno mogu napraviti novi lekovi, antibiotici, insekticidi i herbicidi. Pored toga, poslednjih nekoliko godina poraslo je interesovanje za pojedine sekundarne metabolite kao sredstva za konzerviranje namirnica, a sve se češće koriste i kao dodatne komponente savremenih lekova (Crozier i sar., 2007; Lee i sar., 2021).

Prema Thirumurugan i sar. (2018), do sada je poznato više desetina hiljada sekundarnih metabolita koji su obično klasifikovani prema raznolikosti u strukturi, funkciji i biosintezi. Na osnovu biosintetskog porekla, sekundarni metaboliti biljaka se ugrubo mogu podeliti na nekoliko velikih grupa (Crozier i sar., 2007; Thirumurugan i sar., 2018):

1. polifenolna jedinjenja,
2. terpenoidi,
3. azotofiksirajući alkaloidi i komponente koje sadrže sumpor i
4. enzimski kofaktori,

a u okviru ove doktorske disertacije će biti reči o polifenolnim jedinjenjima i terpenima.

1.3.1. Polifenolna jedinjenja

Polifenoli su jedinjenja sa najmanje jednim aromatičnim prstenom u svojoj strukturi, i sa jednom ili više dodatih hidroksilnih grupa. Pronađeno je više od 8000 fenolnih jedinjenja široko rasprostranjenih u različitim biljkama (Crozier i sar., 2007; Pandey i Rizvi, 2009).

Polifenoli se često nalaze konjugovani sa šećerima i organskim kiselinama, a njihova podela se može izvršiti na osnovu broja i položaja ugljenikovih atoma. Najčešći polifenoli su fenolne kiseline, flavonoidi, stilbeni, kumarini i tanini (Shahidi i Yeo, 2018).

1.3.1.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su među najrasprostranjenijim biljnim fenolnim jedinjenjima koja su prisutna u slobodnim, konjugovano-rastvorljivim i nerastvorljivim vezanim oblicima (Neilson i sar., 2017; Chandrasekara i sar., 2018). Fenolne kiseline se hemijski mogu definisati kao aromatične karboksilne kiseline sa osnovom benzojeve ili cimetine kiseline (Neilson i sar., 2017), zbog čega se uglavnom i dele u dve podgrupe: derivati hidroksibenzojeve (sa sedam atoma ugljenika: C₆-C₁ struktura) i derivati hidroksicimetine kiseline (sa devet atoma ugljenika: C₆-C₃ struktura). U derivate hidroksibenzojeve kiseline, koje se nalaze u rastvorljivom obliku (konjugovane sa šećerima ili organskim kiselinama) i spregnute su sa frakcijama ćelijskog zida, spadaju galna, *p*-hidroksibenzojeva, salicilna, vanilinska, siringinska i protokatehinska kiselina. S druge strane, u derivate hidroksicimetine kiseline, koje su često prisutne u hrani kao jednostavni estri sa hina kiselinom ili glukozom, spadaju *p*-kumarinska, kafena, ferulinska, sinapinska i cimena kiselina (Chandrasekara i sar., 2018; Kumar i Goel, 2019) (Tabela 1).

Fenolne kiseline daju jedinstvena svojstva aromi biljaka u kojima se nalaze, ali doprinose i njihovim lekovitim dejstvima (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011). Većina fenolnih kiselina je vezano za druge strukturne komponente ili prirodne molekule kao što su celuloza, glukoza, flavonoidi, maleinska ili vinska kiselina. U biljkama imaju važne uloge u fizičkoj i hemijskoj odbrani od patogena, različite strukturne uloge, utiču na modulaciju aktivnosti enzima, uključene su u transport nutrijenata, sintezu proteina, fotosintezu i alelopatiju (Rashad i sar., 2020). Biljke na napad patogena reaguju pokretanjem različitih odbrambenih odgovora akumulacijom signalnih molekula (među koje spadaju i neke fenolne kiseline, poput salicilne) koje deluju kao signalni molekuli koji aktiviraju mehanizme odbrane na mestu infekcije (reakcija preosetljivosti) i duž biljnih tkiva, kako bi se sprečilo dalje širenje infekcije (Mandal i sar., 2010).

Međutim, pored uloge u rastu, razvoju i odbrani biljke, fenolne kiseline poseduju lekoviti potencijal za čoveka, budući da su snažni prirodni antioksidativni agensi i imaju ključnu ulogu u širokom spektru bioloških i farmakoloških svojstava kao što su, između

ostaloga anti-inflamatorno, antitumorsko, antimikrobno, antialergijsko, antivirusno, neuro- i hepatoprotektivno svojstvo (Kumar i Goel, 2019).

1.3.1.2. Flavonoidi

Flavonoidi su polifenolna jedinjenja sa 15 ugljenikovih atoma, raspoređenih u tri prstena (C₆-C₃-C₆), od kojih su dva aromatična povezana tri-karbonskim mostom. Osnovni strukturni skelet flavonoida ima brojne supstituente, a jedni od njih su i glikozidi. Hidroksilne grupe su obično prisutne na pozicijama 4', 5 i 7. Šećerne komponente i hidroksilne grupe povećavaju solubilnost flavonoida u vodi, dok drugi supstituenti, poput metil i izoprenil grupa, povećavaju njihovu lipofilnost (Crozier i sar., 2007).

Flavonoidi su najbrojnija grupa polifenola: do sada je identifikovano više od 6000 različitih jedinjenja kod velikog broja predstavnika biljaka (Falcone Ferreyra i sar., 2012). Koncentracije ovih jedinjenja variraju u zavisnosti od biljne vrste, biljnog organa, fenofaze i uslova za rast (Petruša i sar., 2013). Obično se nalaze u visokim koncentracijama u epidermisu lista i egzokarpu plodova voća (Crozier i sar., 2007), a daju obojenost i velikom broju cvetova, plodova i semena (Falcone Ferreyra i sar., 2012).

Flavonoidi imaju važne uloge kao sekundarni metaboliti: štite biljku od UV zračenja, uključeni su u pigmentaciju, a time i u privlačenju polinatora, stimulišu formiranje azotofiksirajućih nodula, utiču na stvaranje rezistencije na bolesti (Crozier i sar., 2007) i fitopatogene (npr. izoflavoni imaju ulogu fitoaleksina kod povrća), a uključeni su i u transport auksina (Falcone Ferreyra i sar., 2012). S obzirom na to da su odgovorni za „jesenje“ boje mnogih biljaka, flavonoidi štite ćelije listova od fotooksidativnih oštećenja, povećavajući efikasnost dopremanja nutrijenata tokom procesa senescencije (Falcone Ferreyra i sar., 2012; Petruša i sar., 2013).

Glavne potklase flavonoida su: flavoni, flavonoli, flavan-3-oli, izoflavoni, flavanoni i antocijanidini (Petruša i sar., 2013), mada postoje i druge potklase, koje su kvantitativno manje zastupljene, a to su: dihidroflavonoli, flavan-3,4-dioli, halkoni, dihidrohalkoni i auronini (Crozier i sar., 2007). Flavonoli se smatraju jednom od najvažnijih grupa flavonoida, jer učestvuju u odgovoru na stres, a takođe se smatra da su među najrasprostranjenijim flavonoidima iz razloga što imaju širok opseg značajnih fizioloških funkcija (Falcone Ferreyra i sar., 2012) (Tabela 2).

Flavonoidi su počeli da privlače pažnju istraživača zahvaljujući visokom farmakološkom potencijalu (vazoprotektivni, anti-inflamatorni, antivirusni i antimikrobni potencijal). Neke od ovih farmakoloških aktivnosti su povezane sa njihovom antioksidativnom aktivnošću, koja je omogućena zahvaljujući sposobnosti flavonoida da hvataju slobodne radikale, da formiraju interakcije sa jonima metala, kao i da ostvaruju sinergističke efekte sa drugim antioksidantima (Mira i sar., 2002). S druge strane, pod uslovima oksidativnog stresa flavonoidi mogu imati prooksidativno dejstvo, te umesto hvatanja, mogu formirati slobodne radikale (Pietta, 2000), što je povezano sa njihovim sposobnostima da redukuju gvožđe i bakar. Ovi metali katalizuju produkciju hidroksil radikala preko Fentonove reakcije, i lipidnih radikala preko rastavljanja formiranog lipidnog vodonik-peroksida (Mira i sar., 2002), što je koristan mehanizam u borbi protiv mnogih humanih oboljenja (Mishchenko i sar., 2021; Sahu i sar., 2021; Sklias i sar., 2021).

1.3.1.3. Kumarini

Kumarini (2*H*-1-benzopiran-2-oni) su najjednostavnija prirodna fenolna jedinjenja (Grazul i Budzisz, 2009), koja pripadaju familiji benzopirona, i za njih je zajedničko da sadrže

vezan benzenov za pironov prsten. Benzopironi se klasifikuju na benzo- α -pirone, kojima pripadaju kumarini, i benzo- γ -pirone, čiji su glavni predstavnici flavonoidi (Jain i Joshi, 2012).

Do sada je identifikovano više od 1300 različitih kumarina, izolovanih iz biljaka, bakterija i gljiva (Venugopala i sar., 2013). Postoje četiri podgrupe kumarina: jednostavni kumarini, furanokumarini, piranokumarini i piron-supstituisani kumarini. Jednostavni kumarini (kumarin, 7-hidroksikumarin i 6,7-dihidroksikumarin) predstavljaju hidroksilovane, alkoksilovane i alkalovane derivate osnovne komponente – kumarina. Furanokumarini sadrže petočlani furanov prsten dodat kumarinskom jezgru. Mogu biti linearni ili angularni, i supstituisani na jednom ili oba benzoid mesta (Jain i Joshi, 2012). Pokazano je da neki prirodni furanokumarini mogu sprečiti prokarcinogeno-indukovano oštećenje DNK i da inhibiraju citohrom P450 enzime, uključene u bioaktivaciju kancerogeneze (Sumorek-Wiadro i sar., 2020). Piranokumarini su analozi furanokumarina, ali sadrže šestočlani prsten. U četvrtu grupu kumarina spada 4-hidroksikumarin (Jain i Joshi, 2012). Pored navedene, postoji i podela kumarina na šest podgrupa: jednostavni kumarini, furanokumarini, dihidrofuranokumarini, piranokumarini, fenilkumarini i bikumarini (Venugopala i sar., 2013).

Pokazano je da biljke sintetišu kumarine iz njihovih prekursora dejstvom enzima nakon oštećenja ćelija, što se često dešava tokom berbe i obrade biljnog materijala (Maggi i sar., 2011). U nekim etarskim uljima su nađeni u velikoj količini, posebno u ulju koje je dobijeno iz kore cimeta, ulju iz lišća biljaka roda *Cassia*, kao i u ulju lavande. Kumarini se takođe mogu naći u voću i zelenom čaju. Najviše ih ima kod predstavnika familija Rutaceae i Apiaceae. Iako su oni distribuirani u svim biljnim delovima, u najvećoj količini se nalaze u plodu (*Aegle marmelos*), zatim korenu (*Ferulago campestris*), pupoljcima i listovima (*Murraya paniculata*), međutim promena sredinskih uslova i sezonske promene mogu da dovedu do drugačije distribucije ovih jedinjenja u biljci (Jain i Joshi, 2012).

U biljkama kumarini imaju ulogu odbrane od fitopatogena, učestvuju u odgovoru na abiotički stres, regulaciji oksidativnog stresa, kao i u regulaciji hormona (Bourgaud i sar., 2006). Zahvaljujući različitim supstitucijama koje su moguće u njihovoj osnovnoj strukturi, kumarini se mogu naći u velikom broju formi, što dalje utiče na njihovu biološku aktivnost. Pokazano je da ova jedinjenja poseduju značajna lekovita svojstva, kao što su antioksidativna, anti-inflamatorna, antialergijska, hepatoprotektivna, antikoagulantna, antivirusna, antimikrobna i antitumorska svojstva (Grazul i Budzisz, 2009).

1.3.2. Terpeni

Terpeni su poznati i kao izopreni budući da izopren, 2-metilbuta-1,3-dien (C₅H₈), predstavlja gradivni blok terpena. Do sada je opisano oko 25.000 terpena, te ova jedinjenja spadaju među najbrojnije i strukturno veoma raznolike sekundarne metabolite (Ludwiczuk i sar., 2017; Thirumurugan i sar., 2018; Huang i Osbourn, 2019). Naziv „terpen“ se prvobitno primenjivao na ugljovodonike pronađene u terpentinu, a sufiks „en“ ukazuje na prisustvo olefinske veze. Terpeni su klasifikovani na osnovu broja i strukturne organizacije ugljenika koji su formirani linearnim rasporedom izoprenskih jedinica, ciklizacijom i preuređivanjem ugljeničnog skeleta sa empirijskim obeležjem poznatim kao „pravilo izoprena“, prema kome su svi terpeni izvedeni iz uređenog spajanja izoprena – od glave do repa jedinice. Pojedinačna izoprenska jedinica predstavlja osnovnu klasu terpena – hemiterpena (jedna izoprenska jedinica; 5 atoma ugljenika, C). Pored hemiterpena, postoje i monoterpeni (dve izoprenske jedinice; 10 C-atoma), seskviterpeni (tri izoprenske jedinice; 15 C-atoma), diterpeni (četiri izoprenske jedinice; 20 C-atoma), sesterterpeni (pet izoprenskih jedinica; 25 C-atoma), triterpeni (šest izoprenskih jedinica; 30 C-atoma), tetraterpeni (karotenoidi, osam

izoprenskih jedinica; 40 C-atoma) i politerpeni (>8 izoprenskih jedinica, >40 C-atoma) (Ludwiczuk i sar., 2017; Salha i sar., 2019).

Molekulska težina i celokupna struktura terpenkih potklasa određuju njihova fizička svojstva, poput isparljivosti, i utiču na način na koji oni posreduju u različitim interakcijama između biljaka i insekata, biljaka i patogena, ali i između različitih biljaka (Cheng i sar., 2007). Budući da mogu delovati kao interspecijski signali, terpeni često imaju veliki značaj u agronomiji (Huang i Osbourn, 2019).

Biološke aktivnosti terpena su takođe intenzivno proučavane poslednjih godina, pri čemu je pronađeno da ovi sekundarni metaboliti imaju značajnu antioksidativnu, anti-inflamatornu, imunomodulatornu, antitumorsku, kardio- i neuroprotektivnu, hipoglikemijsku, ali i antivirusnu i antimikrobnu aktivnost (Boozari i Hosseinzadeh, 2020; Yang i sar., 2020). Iako su predominantno prisutni u etarskim uljima biljaka, ovi metaboliti se takođe mogu kvantifikovati i u biljnim ekstraktima (Boozari i Hosseinzadeh, 2020).

1.3.3. Polifenolna i terpenka jedinjenjima biljaka familije Lamiaceae

Biljke familije Lamiaceae su bogate sekundarnim metabolitima od kojih su najzastupljenija polifenolna jedinjenja i terpeni.

Na osnovu literaturnih podataka se može videti da biljke familije Lamiaceae sadrže širok spektar fenolnih kiselina, pri čemu je naglasak često stavljen na derivate kafene kiseline (Ahn i sar., 2020). U Tabeli 1 je dat literaturni pregled najčešće zastupljenih fenolnih kiselina.

Tabela 1. Literaturni pregled nazastupljenijih fenolnih kiselina u biljkama familije Lamiaceae.

Podgrupa	Naziv fenolne kiseline	Reference
derivati hidroksibenzojeve kiseline	4-hidroksibenzoeva	Zgórka i Głowniak (2001); Hossain i sar. (2010); Miron i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Farnad i sar. (2014); Irakli i sar. (2018); Sytar i sar. (2018)
	galna	Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2009); Hossain i sar. (2010); Baj i sar. (2011); Kamdem i sar. (2013); Farnad i sar. (2014); Gavarić i sar. (2015); Mahdavia i Saharkhiz (2015); Shakeri i sar. (2016); de Medeiros Gomes i sar. (2021)
	protokatehinska	Zgórka i Głowniak (2001); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Hossain i sar. (2010); Hatipoğlu i sar. (2013); Martins i sar. (2014); Gavarić i sar. (2015); López-Cobo i sar. (2015); Irakli i sar. (2018); Zengin i sar. (2020)
	siringinska	Zgórka i Głowniak (2001); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Sellami i sar. (2009); Hossain i sar. (2010); Miron i sar. (2011); Boulila i sar. (2015); Gavarić i sar. (2015); Irakli i sar. (2018); Sytar i sar. (2018); Zengin i sar. (2020)
	vanilinska	Zgórka i Głowniak (2001); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Tang i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Hossain i sar. (2010); Farnad i sar. (2014); Duda i sar. (2015); Irakli i sar. (2018); Sytar i sar. (2018); Zengin i sar. (2020)
derivati hidroksicimetne kiseline	ferulinska	Zgórka i Głowniak (2001); Proestos i sar. (2005); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Hossain i sar. (2010); Komes i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Farnad i sar. (2014); Vlase i sar. (2014); Boulila i sar. (2015); Duda i sar. (2015); Flemmig i sar. (2015); Gavarić i sar. (2015); Mahdavia i Saharkhiz (2015); Zenão i sar. (2017); Irakli i sar. (2018); Chou i sar. (2019); Ahn i sar. (2020); Al-Zaban i sar. (2021); Babich i sar. (2021)

Podgrupa	Naziv fenolne kiseline	Reference
	hlorogena	Zgórka i Głowniak (2001); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Sellami i sar. (2009); Hossain i sar. (2010); Komes i sar. (2011); Miron i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Tsibranska i sar. (2011); Boudjelal i sar. (2012); Hatipoğlu i sar. (2013); Kamdem i sar. (2013); Döring i Petersen (2014); Farnad i sar. (2014); Vlase i sar. (2014); Flemmig i sar. (2015); López-Cobo i sar. (2015); Shakeri i sar. (2016); Irakli i sar. (2018); Sytar i sar. (2018); Chou i sar. (2019); Šeremet i sar. (2020)
	kafena	Zgórka i Głowniak (2001); Regnault-Roger i sar. (2004); Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kulišić i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007, 2009); Hossain i sar. (2010); Komes i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Hatipoğlu i sar. (2013); Kamdem i sar. (2013); Döring i Petersen (2014); Farnad i sar. (2014); Boulila i sar. (2015); Flemmig i sar. (2015); Duda i sar. (2015); López-Cobo i sar. (2015); Zhao i sar. (2015); Chou i sar. (2019); Soheili i Salami (2019); Šeremet i sar. (2020); Zengin i sar. (2020)
	<i>p</i> -kumarinska	Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Duda i sar. (2010); Hossain i sar. (2010); Komes i sar. (2011); Miron i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Lin i sar. (2012); Hatipoğlu i sar. (2013); Roby i sar. (2013); Vlase i sar. (2014); Gavarić i sar. (2015); Boulila i sar. (2015); Mahdavikia i Saharkhiz (2015); Irakli i sar. (2018); Sytar i sar. (2018)
	rozmarinska	Zgórka i Głowniak (2001); Regnault-Roger i sar. (2004); Kadifkova Panovska i sar. (2005); Kivilompolo i Hyötyläinen (2007); Matkowski (2008); Sellami i sar. (2009); Hossain i sar. (2010); Baj i sar. (2011); Komes i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Gião i sar. (2012); Gudzenko (2013); Boulila i sar. (2015); Brahmi i sar. (2015); Duda i sar. (2015); Zhao i sar. (2015); Chou i sar. (2019); Šeremet i sar. (2020); Taghouti i sar. (2020); Zengin i sar. (2020)

Literaturni podaci sugerišu da biljke familije Lamiaceae sadrže širok spektar flavonoida, i može se tvrditi da je stepen hemodiverziteta u ovoj familiji prilično visok. S tim u vezi, do sada je pokazano da flavoni imaju jaku tendenciju ka 6- i/ili 8-supstituciji, dok flavonoli imaju nešto nižu tendenciju ka supstituciji (Valant-Vetschera i sar., 2003). Takođe, značajno je istaći da su mnogi flavonoidi u biljkama familije Lamiaceae prisutni u formi mono- ili diglikozida: kemferol diglukozid, luteolin-7-*O*-glukozid, trihidroksiflavon glukozid, apigenin-7-*O*-rutinozid, kvercetin-3-*O*-rutinozid, i drugi (Ahn i sar., 2020; Mamadalieva i sar., 2021). U Tabeli 2 su predstavljeni najčešće identifikovani flavonoidi u vrstama familije Lamiaceae.

Tabela 2. Literaturni pregled nazastupljenijih flavonoida u biljkama familije Lamiaceae.

Podgrupa	Naziv flavonoida	Reference
Flavoni	akacetin	Marin i sar. (2001); da Silva i sar. (2015); Freitas i sar. (2019); Elansary i sar. (2020a); Zengin i sar. (2020); Frezza i sar. (2021)
	apigenin	Skoula i sar. (2005); Kulišić i sar. (2006); Stefkov i sar. (2009); Hossain i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Kapp i sar. (2013); Rai i sar. (2013); Roby i sar. (2013); Mitreski i sar. (2014); Boulila i sar. (2015); Gavarić i sar. (2015); López-Cobo i sar. (2015); Zhao i sar. (2015); Pereira i sar. (2016); Shakeri i sar. (2016); Uritu i sar. (2018); Elansary i sar. (2020a); Taghouti i sar. (2020); Zengin i sar. (2020); Han i sar. (2021); Zhou i sar. (2021)
	cirzimaritin	Valant-Vetschera i sar. (2003); Skoula i sar. (2005); Stefkov i sar. (2009); Bahramikia i Yazdanparast (2012); Kremer i sar. (2013); Mitreski i sar. (2014); Peter i sar. (2015); Ghorbani i Esmaeilzadeh (2017); Frezza i sar. (2021)

Podgrupa	Naziv flavonoida	Reference
	cirziliol	Stefkov i sar. (2009); Bahramikia i Yazdanparast (2012); Kremer i sar. (2013); da Silva i sar. (2015); Uritu i sar. (2018); de Oliveira i sar. (2019); Al-Shalabi i sar. (2020); Ahangari i sar. (2021); Frezza i sar. (2021)
	diosmetin i glikozidi diosmetina	Kadifkova Panovska i sar. (2005); Fecka i Turek (2008); Androutsopoulos i sar. (2009); Lin i sar. (2009); Fatiha i sar. (2015); Pinzon i Mylene (2016); Prabhu i sar. (2016); Chen i sar. (2017); Aghakhani i sar. (2018); Uritu i sar. (2018); Zengin i sar. (2020); Etsassala i sar. (2021); Frezza i sar. (2021)
	hispidulin	Kontogianni i sar. (2013); Exarchou i sar. (2015); Martins i sar. (2015); Bonesi i sar. (2017); Uritu i sar. (2018); Liu i sar. (2020); Kim i Lee (2021)
	genkvanin	El-Hawary i sar. (2012); Wojtyniak i sar. (2012); Begum i sar. (2013); Uritu i sar. (2018); Freitas i sar. (2019); Etsassala i sar. (2021)
	kemferol	Kadifkova Panovska i sar. (2005); Hossain i sar. (2010); Calderon-Montano i sar. (2011); Komes i sar. (2011); Spiridon i sar. (2011); Baba i Usifoh (2014); Fatiha i sar. (2015); Aghakhani i sar. (2018); Abu-Reidah i sar. (2019); Ahn i sar. (2020); Altemimi i sar. (2020)
	luteolin i derivati luteolina	Kadifkova Panovska i sar. (2005); Skoula i sar. (2005); Sellami i sar. (2009); Stefkov i sar. (2009); Komes i sar. (2011); Bahramikia i Yazdanparast (2012); Rai i sar. (2013); Roby i sar. (2013); Martins i sar. (2014); Vlase i sar. (2014); López-Cobo i sar. (2015); Zhao i sar. (2015); Tundis i sar. (2017); Oniga i sar. (2018); Uritu i sar. (2018); Freitas i sar. (2019); Soheili i Salami (2019); Taghouti i sar. (2020); Zengin i sar. (2020); Babich i sar. (2021); Etsassala i sar. (2021); Zhou i sar. (2021)
	salvigenin	Bahramikia i Yazdanparast (2012); Rai i sar. (2013); da Silva i sar. (2015); Mansourabadi i sar. (2016); Bonesi i sar. (2017); Tundis i sar. (2017); Frezza i sar. (2021); Michailidou i sar. (2021)
Flavanoni	naringenin	Zengin i sar. (2020); Etsassala i sar. (2021); Frezza i sar. (2021)
	naringin	Lin i sar. (2012); Roby i sar. (2013); Martins i sar. (2014); Riachi i De Maria (2015); Nastić i sar. (2018); Etsassala i sar. (2021)
Flavonoli	hiperozid	Tiwari (2019); Carev i Sarikurkcuc (2021); Patrignani i sar. (2021); Yezerska i sar. (2021)
	kvercetin	Kulišić i sar. (2006); Sellami i sar. (2009); Komes i sar. (2011); Stanković (2012); Kamdem i sar. (2013); Rai i sar. (2013); Roby i sar. (2013); Martins i sar. (2014); Vlase i sar. (2014); Boulila i sar. (2015); Gavarić i sar. (2015); Pereira i sar. (2016); Ghorbani i Esmailizadeh (2017); Oniga i sar. (2018); Šeremet i sar. (2020); Babich i sar. (2021); Mamadalieva i sar. (2021)
	kvercitrin	Vlase i sar. (2014); Nastić i sar. (2018); Oniga i sar. (2018); Mamadalieva i sar. (2021); Yezerska i sar. (2021)
	mircetin	Komes i sar. (2011); Alcántara i sar. (2019); Skendi i sar. (2019); Mamadalieva i sar. (2021)
Flavanoli	rutin	Čanadanović-Brunet i sar. (2006); Sellami i sar. (2009); Bahramikia i Yazdanparast (2012); Gião i sar. (2012); Kamdem i sar. (2013); Farnad i sar. (2014); Vlase i sar. (2014); Xie i sar. (2014); Flemmig i sar. (2015); Gavarić i sar. (2015); Shakeri i sar. (2016); Tundis i sar. (2017); Oniga i sar. (2018); Chou i sar. (2019); Šeremet i sar. (2020); Babich i sar. (2021); Etsassala i sar. (2021)
	katehin	Kwon i sar. (2006); Lee i sar. (2011); Samanidou i sar. (2012); Husak i sar. (2017); Daga i sar. (2021); Etsassala i sar. (2021); Yezerska i sar. (2021)
	galokatehin	Samanidou i sar. (2012); Taamalli i sar. (2015); Husak i sar. (2017); Nabet i sar. (2019); Etsassala i sar. (2021)

Istraživanja su pokazala da biljke familije Lamiaceae sintetišu kumarine u slobodnoj ili vezanoj formi. U kasnijim fenofazama, kao i tokom procesuiranja biljnog materijala, posebno tokom sušenja, ukupan sadržaj ovih jedinjenja se znatno smanjuje (Maggi i sar., 2011). Na primeru biljke *Melittis melissophyllum* je pokazano da je najviše ukupnih kumarina bilo prisutno u početku fenološkog ciklusa biljke, u maju, dok je u kasnijoj fazi, u avgustu, detektovano čak do tri puta manje kumarina. Takođe, pokazano je da najviše kumarina sadrže

sveže biljke u odnosu na suvi biljni materijal (Maggi i sar., 2011; Skrzypczak-Pietraszeka i Pietraszek, 2012).

Na osnovu pregleda literature se može primetiti da je tačan sastav kumarina u predstavnicima familije Lamiaceae ređe analiziran, dok se nešto češće mogu naći podaci o ukupnom sadržaju kumarina u ovim biljkama. Ipak, postoje neki podaci o detektovanim kumarinima u biljkama familije Lamiaceae, tako da se zna da u *Ocimum basilicum*, *Salvia officinalis* i *Prunella vulgaris* ima eskuletina (6,7-dihidroksikumarina), u *O. basilicum* ima i eskulina (6,7-dihidroksikumarin-6-glukozid), u *P. vulgaris* ima i umbeliferona (7-hidroksikumarin), dok su kod *Lavandula angustifolia* nađeni kumarin, herniainin (7-metoksikumarin), santonin i umbeliferon (Hu i sar., 2009; Matos i sar., 2015; Uritu i sar., 2018). Takođe, Simo i sar. (2020) su u metanolnom ekstraktu lista *Vitex rivularis* pronašli imperatorin.

U biljkama familije Lamiaceae se često mogu naći monoterpeni poput borneola, kamfora, kamfena, karvakrola, *p*-cimena, geraniola, lavandulola, lavandulil acetata, linalola, mentofurana, mentola, mentona, mircena, sabinena, terpinen-4-ola, terpinena, terpineola, tujena, tujona, timola, seskviterpeni poput kariofilena, kopaena, burbonena, δ -kadinena i germakrena D, zatim diterpeni poput epirozmanola, izorozmanola, karnozinske kiseline, karnozola, leokardina, metoksikarnozata, metoksikarnozola, rozmadiala, rozmanola, rozmaridifenola i triterpeni poput betulinske, oleanolne i ursolne kiseline, i drugih (Tiwari, 2019; Hajdari i sar., 2020; Espinosa i sar., 2021; Etsassala i sar., 2021; Thakur i sar., 2021).

U jeku pandemije izazvane SARS-CoV-2 virusom, istraživači su počeli da tragaju za proizvodima i jedinjenjima prirodnog porekla sa potencijalnim dejstvom protiv ovog virusa. Tako je nađeno da neki diterpeni izolovani iz predstavnika familije Lamiaceae, kao što su ruzmarikvinon, metil tanšionat i dihidrotanšionin I (abietanski diterpen) iz *Salvia miltiorrhiza*, kao i flavonoidi iz *Ocimum sanctum*, posebno eugenol, imaju sposobnost da inhibiraju 3C-like proteazu SARS-CoV-2 virusa, čime se može sprečiti proteoliza, virusna replikacija, kao i generalno infekcija SARS-CoV-2 virusom (Boozari i Hosseinzadeh, 2020, Tagde i sar., 2021). Takođe, abietanski diterpeni izolovani iz ove biljke (tanšionin I i IIA, kriptotanšionin i dihidrotanšionin) imaju sposobnost da inhibiraju proteazu ovog virusa nalik Papainu, koja je odgovorna za proteolizu, deubikvitinaciju i replikaciju virusa. S druge strane, pojedina terpenska jedinjenja imaju sposobnost da inhibiraju RNK-zavisnu RNK polimerazu SARS-CoV-2 virusa, koja je esencijalna za replikaciju ovog virusa, kao i za transkripciju pozitivnog RNK lanca virusa (Boozari i Hosseinzadeh, 2020). Pored aktivnosti u selektivnoj inhibiciji ove dve proteaze, tanšionini ispoljavaju i druge biološke aktivnosti povoljne po humani organizam tokom infekcije: anti-inflamatornu, kardio- i neutroprotektivnu aktivnost. Takođe, pojedini predstavnici familije Lamiaceae bogati polifenolima su se uspešno pokazali u lečenju teškog akutnog respiratornog sindroma (engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome*, SARS), izazvanog SARS-CoV virusom tokom epidemije 2002. i 2003. godine (Chaudhary i sar., 2020; Sharma, 2020; Tiwari i Dubey, 2020; Adeniran i sar., 2021; Sytar i sar., 2021; Ugwah-Oguejiofor i Adebisi, 2021). Na osnovu prethodno navedenih činjenica se može zaključiti da biljke koje poseduju ove sekundarne metabolite potencijalno mogu biti odlični agensi za antivirusnu terapiju, ali i za terapiju koja je asocirana sa pratećim inflamatornim procesima (Boozari i Hosseinzadeh, 2020; Fang i sar., 2021; Subedi i Gaire, 2021). Takođe je značajno pomenuti da pored direktnog uticaja na virus ili smanjenjem rizika od virusne infekcije, tretman pojedinim biljnim preparatima može jačati imunski sistem, čime bi organizam bio bolje pripremljen za borbu protiv ovog virusa (Tagde i sar., 2021).

1.4. Biološka aktivnost biljaka

1.4.1. Antioksidativna, genoprotektivna i antigenotoksična aktivnost

Slobodni radikali su molekuli sa nesparenim parom elektrona, koji kontinuirano nastaju kao produkti metaboličkih procesa. Vrlo su reaktivni i jaki oksidansi, sposobni da lančanom reakcijom prouzrokuju oštećenja u ćelijama. U ćeliji, normalno aerobno disanje, stimulacija polimorfonuklearnih leukocita, makrofaga, kao i peroksizoma predstavljaju glavne endogene izvore većine oksidanasa koje ćelije proizvode u procesu oksidacije. Tokom ovih reakcija može doći do stvaranja kiseoničnih i azotnih slobodnih radikala poput superoksidnih jona ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilnih (OH^{\cdot}) i radikala azot oksida (NO^{\cdot}), kao i vodonik-peroksida (H_2O_2) i azotaste kiseline (HNO_2) (Sies, 1991; Özgen i sar., 2006; Rocamora i sar., 2020).

U biološkom smislu, oksidativni stres se definiše kao fiziološka neravnoteža između slobodnih radikala i sposobnosti tela da ih eliminiše (Gupta i sar., 2014). Slobodni radikali poput vodonik-peroksida mogu dovesti do oksidacije lipida, ugljenih hidrata i proteina, čak i nepovratno oštetiti genetički materijal unutar ćelija. Ipak, ovaj takozvani genotoksični efekat slobodnih radikala ne mora imati uticaja samo na DNK, već može oštetiti i ćelijske komponente koje su uključene u održavanje funkcija hromozoma unutar žive ćelije (López-Romero i sar., 2018; Rocamora i sar., 2020). Oksidativni stres, pored starenja, leži u osnovi velikog broja oboljenja – inflamacija, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih bolesti, stečenog sindroma imunodeficijencije, hroničnih bolesti bubrega, opstrukcije pluća, kao i dijabetesa i kancera (Özgen i sar., 2006; Liguori i sar., 2018; Kuciel-Lewandowska i sar., 2020). U zdravom organizmu nivoi slobodnih radikala se održavaju različitim kontrolnim mehanizmima, te oksidativni stres može biti poništen uključivanjem mehanizama antioksidativnog odgovora koji se normalno javljaju u ćelijama, i to uz pomoć kako enzimskih, tako i neenzimskih endogenih antioksidanasa (Kuciel-Lewandowska i sar., 2020).

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat podložan oksidaciji, inhibiraju ili potpuno sprečavaju njegovu oksidaciju (Tirzitis i Bartosz, 2010). Međutim, s obzirom na to da su ljudi danas izloženi prekomernom zagađenju životne sredine i jonizujućem zračenju, pesticidima, hroničnom psihološkom stresu i fizičkom naporu, a takođe često koriste cigarete i alkohol, uloga antioksidativne zaštite se uglavnom svodi samo na ublažavanje oksidativnih oštećenja (Özgen i sar., 2006; Liguori i sar., 2018). Dodatni zaštitni faktori, kao što su egzogeni antioksidanti, potrebni su da bi se izbegli štetni efekti slobodnih radikala, kako bi se prenos ćelijskih signala, kao i aktivnost različitih proteina i gena koji su uključeni u mehanizme popravke DNK odigrali bez dodatnih poteškoća (Kuciel-Lewandowska i sar., 2020).

U novije vreme se velika pažnja posvećuje egzogenim antioksidantima koji imaju antigenotoksične, ali i genoprotektivne efekte (López-Romero i sar., 2018; Shruthi i Shenoy, 2021). Ovi agensi, koji se unose u organizam kroz hranu ili suplemente, mogu biti veštačkog ili prirodnog porekla (Gupta i sar., 2014; Liguori i sar., 2018). Sintetički antioksidanti, poput butil hidroksi toluena (BHT) i butil hidroksi anisola (BHA), koriste se kao aditivi u hrani. Međutim, istraživanja su pokazala da prirodni antioksidanti mogu biti alternativa sintetičkim u industrijskoj proizvodnji hrane i preventivnoj medicini iz razloga što oni ne ispoljavaju prateće efekte koji bi bili štetni po zdravlje (Čanadanović-Brunet i sar., 2006; Krishnaiah i sar., 2011; Islam i sar., 2021). Sintetički antioksidanti su veoma efikasni, međutim njihov nedostatak jeste taj što u većim količinama i usled duže primene mogu dovesti do razvoja različitih poremećaja, između ostalog i kancera (Farlow, 2007; Alimpić i sar., 2014; Islam i sar., 2021).

Brojna dosadašnja istraživanja su pokazala da izmerena antioksidativna aktivnost zavisi od metode koja se koristi u istraživanju. Većina metoda za određivanje antioksidativne aktivnosti se bazira na merenju sposobnosti testirane supstance ili produkta da hvata slobodne radikale i/ili da formira helatne komplekse, komplekse jona metala, koji su nosioci oksidativnog procesa (Tirzitis i Bartosz, 2010). Budući da ogroman broj poznatih biljaka poseduje antioksidativni potencijal, *in vitro* istraživanja nisu dovoljno informativna, te je potrebno sakupiti podatke iz složenijih model sistema, poput bakterija, plazmida, ćelijskih linija, izolovanih tkiva ili *in vivo* istraživanja, što iziskuje zahtevniju metodologiju (Halliwell, 2012; Shivakumar i Yogendra Kumar, 2018).

1.4.1.1. Antioksidativna, genoprotektivna i antigenotoksična aktivnost biljaka familije Lamiaceae

Iako se antioksidativna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja mnogih biljaka familije Lamiaceae aktivno ispitala još krajem prošlog veka (Lamaison i Petitjean-Freytet, 1990; Lamaison i sar., 1991; Piccaglia i sar., 1993; Pićurić-Jovanović i sar., 1995; Yanishlieva i Marinova, 1995; Lagouri i Boskou, 1997; Potterat, 1997; Cuppett i Hall, 1998; Ho i sar., 1999; Hohmann i sar., 1999), ova tema je aktuelna i u savremenim istraživačkim studijama (Duletić-Laušević i sar., 2018a; Nikšić i sar., 2018; Ekin i sar., 2019; Mamadalieva i sar., 2019; 2021; Skendi i sar., 2019; Rocamora i sar., 2020; Zengin i sar., 2020; Ahn i sar., 2021; de Medeiros Gomes i sar., 2021).

Trend ispitivanja veze između antioksidativne aktivnosti i genoprotektivne i antigenotoksične aktivnosti se takođe može pratiti i u literaturnim podacima koji kao objekat istraživanja imaju predstavnike familije Lamiaceae (Borrelli i sar. 2019; Zowail i sar., 2019; Kolumbayeva i sar., 2020; Devi i sar., 2021; Elahian i sar., 2021; Iqbal i sar., 2021).

1.4.2. Antidijabetična aktivnost

Dijabetes je veoma rasprostranjen metabolički poremećaj kod ljudi, koji je odgovoran za visoku stopu smrtnosti u celom svetu (Etsassala i sar., 2021). Ovo oboljenje se manifestuje povećanim nivoom glukoze u krvi (hiperglikemija) i poremećenim metabolizmom proteina, ugljenih hidrata i lipida (Behradmanesh i sar., 2013; Kianbakht i Dabaghian, 2013; Kianbakht i sar., 2016). Može se javiti u obliku dijabetesa tipa 1 (DT1, autoimunsko oboljenje koje karakteriše nedovoljno endogeno lučenje insulina od strane β -ćelija pankreasa) i dijabetesa tipa 2 (DT2, predstavlja do 95% registrovanih slučajeva dijabetesa i podrazumeva rezistenciju na insulin i abnormalno lučenje ili delovanje insulina) (Lima i sar., 2006; Chinsembu, 2019; Petersmann i sar., 2019; Etsassala i sar., 2021). Prema podacima SZO, 180 miliona osoba širom sveta trenutno ima dijagnozu DT2 (Javid i sar., 2021). Kod osoba sa DT2 dolazi do promene lipidnog statusa u krvi: povećanja ukupnog holesterola, nivoa lipoproteina niske gustine i triglicerida, kao i smanjenja nivoa lipoproteinskog holesterola velike gustine (Strain i Paldánus, 2018; Petersmann i sar., 2019). Zbog toga, kao i zbog drugih implikacija ove bolesti, DT2 je doveden u vezu sa kardiovaskularnim, gastrointestinalnim, neurodegenerativnim oboljenjima, kao i sa kancerom (Pafili i sar., 2018; Strain i Paldánus, 2018; Zawada i sar., 2018; Berezin i Berezin, 2019; Madhusudhanan i sar., 2020; Rocamora i sar., 2020). Prema podacima Yao i sar. (2014), DT2 povećava incidencu kolorektalnog kancera do tri puta u odnosu na populaciju koja ne boluje od DT2, dok je rizik od razvoja Alchajmerove bolesti kod dijabetičara povećan za 50–60% (Mittal i sar., 2016).

Poznato je da enzim α -amilaza katalizuje hidrolizu unutrašnjih α -1,4-glikozidnih veza u skrobu iz hrane, a takođe predstavlja i važan sastojak pankreasnog soka (Barbosa i sar., 2013). S druge strane, enzim α -glukozidaza katalizuje završni korak digestije ugljenih hidrata,

koji se odigrava u crevima. Inhibicijom crevne α -glukozidaze, može doći do odlaganja varenja i apsorpcije ugljenih hidrata, čime bi se suzbila najranija metabolička abnormalnost koja se pojavljuje u DT2, a to je postprandijalna hiperglikemija (Wang i sar. 2015). Inhibicija α -amilaze i α -glukozidaze se smatra pouzdanom strategijom za lečenje poremećaja u unosu ugljenih hidrata, poput dijabetesa i gojaznosti, kao i zubnog karijesa i parodontalnih bolesti (Tundis i sar., 2010; Sales i sar., 2012; Chinsembu, 2019; Mahdi i sar., 2020). Jedan od široko primenjenih lekova, akarboza (pseudotetrasaharid koji proizvodi *Actinoplanes* sp. u procesu fermentacije), upravo usporava razlaganje glukoze inhibicijom α -amilaze i α -glukozidaze u tankom crevu (Tundis i sar., 2010; Sales i sar., 2012; Wang i sar., 2021). Međutim, kada se upotrebljavaju u većim dozama, većina postojećih antidijabetičnih lekova mogu dovesti do neželjenih efekata poput hipoglikemije, problema sa jetrom, laktacidoze, nadimanja i dijareje, te su naučnici svoja istraživanja usmerili na lekovite biljke kao efikasnijoj strategiji za kontrolu dijabetesa (Tundis i sar., 2010; Barbosa i sar., 2013; Jacob i Narendhirakannan, 2019). Pored sposobnosti inhibicije ova dva enzima uključena u metabolizam ugljenih hidrata, antidijabetično dejstvo pojedinih biljaka se takođe može manifestovati putem drugih mehanizama kao što su dejstvo na obnavljanje ćelija pankreasa i poboljšanje sekrecije insulina, dok istovremeno ispoljavaju i hepatoprotektivno dejstvo (Chinsembu, 2019).

1.4.2.1. Antidijabetična aktivnost biljaka familije Lamiaceae

Budući da su biljke familije Lamiaceae bogat izvor biološki aktivnih sekundarnih metabolita, ispitivanja su pokazala da one mogu imati značajne antidijabetične efekte u različitim model sistemima, kako *in vitro*, tako i *in vivo*. Na osnovu studija Abdel-Megeed i sar., (2020), Giuberti i sar. (2020), Abdelli i sar. (2021) i Etsassala i sar. (2021), gde su ispitivani antidijabetični efekti kvercetina, katehina, epikatehina, kempferola, apigenina, kvercetina, rutina, luteolina i salvigenina, kao i ferulinske, rozmarinske, kafene, hlorogene, elagijske, siringinske i galne kiseline, može se sumirati da je inhibicija α -amilaze i α -glukozidaze fenolnim jedinjenjima posledica kombinacije: (i) njihovih interakcija sa aktivnim mestom pomenutih enzima preko vodoničnih veza između hidroksilne grupe polifenola i specifičnih amino kiselina u katalitičkom mestu enzima, kao i (ii) hidrofobnih interakcija između aromatičnih prstenova polifenola i ostatka aktivnog mesta enzima, čime se smanjuje afinitet vezivanja enzima za supstrat i ograničava se sposobnost interakcije sa hidrofobnim aktivnim mestom enzima. Pored toga, smatra se da se inhibicija aktivnosti α -amilaze može postići i direktnom interakcijom polifenola (flavonoida, kao i fenolnih kiselina poput kafene, ferulinske i galne kiseline) sa skrobom preko nekovalentnih CH- π interakcija duž α -1,4 glikozidnog lanca. Ovakva interakcija bi mogla da rezultira modulacijom kinetike digestije skroba, što kao posledicu ima ograničenje raspoloživosti ugljenih hidrata koji bi bili supstrati za delovanje α -amilaze i α -glukozidaze (Giuberti i sar., 2020), međutim ovaj mehanizam nije u potpunosti potvrđen. Pored fenolnih jedinjenja, u literaturi se takođe pominju antidijabetični efekti terpenskih jedinjenja prisutnih u biljkama familije Lamiaceae, poput marubiina, ursolne i oleanolne kiseline (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020; Etsassala i sar., 2021), međutim mehanizmi njihovog delovanja do danas nisu dovoljno objašnjeni.

Pored toga, neki od mehanizama kojima biljke familije Lamiaceae ostvaruju svoje antidijabetično dejstvo su sledeći (Afolayan i Sunmonu, 2010; Jadhav i Puchchakayala, 2012; Mnonopi i sar., 2012; Singh i sar., 2012; Castellano i sar., 2013; Kianbakht i Dabaghian, 2013; Casanova i sar., 2014; Ríos-Silva i sar., 2014; Wu i sar., 2014; Kianbakht i sar., 2016; Sadeghi i sar., 2016; Zang i sar., 2016; Antora i Salleh, 2017; Fatima i sar., 2017; Guzmán-Ávila i sar., 2018; Rocamora i sar., 2020; Etsassala i sar., 2021):

- inhibicija aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze,
- hipoglikemijsko delovanje,
- modulacija lipidnog statusa,
- stimulacija β -ćelija pankreasa da oslobode više insulina i podsticanje njegove aktivacije,
- povećanje nivoa ekspresije gena za insulin i transporter-2 glukoze u ćelijama INS-1 (engl. *Insulin-secreting cell line 1*).

1.4.3. Antineurodegenerativna i neuroprotektivna aktivnost

Neurodegenerativna oboljenja se karakterišu progresivnim gubitkom strukture i funkcije neurona, kao i promenama u strukturi nervnog sistema, što dovodi do degeneracije i, u krajnjem slučaju, do smrti neurona (Chi i sar., 2018). Klasične manifestacije neurodegenerativnih oboljenja poput Alchajmerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti, kao i multiple skleroze su progresivni problemi sa kretanjem (ataksija) i mentalna disfunkcija (demencija) (van Horssen i sar., 2019; Joseph, 2021; Petretto i sar., 2021).

Na osnovu najnovijih podataka, smatra da je u 2021. godini, u svetu obolelo oko 10 miliona osoba od Parkinsonove bolesti (Surguchov, 2021), dok 44 miliona osoba danas živi sa dijagnozom Alchajmerove bolesti (Alzheimer's News Today, 2021). Takođe, statistički podaci govore u prilog tome da se neurodegenerativne bolesti pojavljuju sa većom incidencom kod starije populacije, što je navelo istraživače na zaključak da one u svojoj osnovi imaju, pre svega, starenje, pojavu oštećenja u genetičkom materijalu, kao i pojavu naslaga abnormalnih amiloid- β (A β) i tau (τ)-proteina u mozgu (Iturria-Medina i sar., 2014). Pored toga, dokazano je da je zajednički imenilac neurodegenerativnih bolesti neuroinflamacija, kao i različite disfunkcije mitohondrija, što se takođe može povezati sa povišenim nivoom oksidativnog, ali i nitroksidativnog stresa (Pourhanifeh i sar., 2019; Simpson i Oliver, 2020). U stanju povišenog oksidativnog stresa indukuje se oksidativno oštećenje esencijalnih molekula poput lipida, proteina i DNK u nervnim i glija ćelijama, što dalje dovodi do aktivacije ćelija glije i oslobađanja pro-inflamatornih citokina, uzrokujući ozbiljne posledice koje su povezane sa razvojem neurodegeneracije (van Horssen i sar., 2019; Simpson i Oliver, 2020).

U normalnom imunskom odgovoru na inflamatorni stimulus oslobađaju se medijatori poput citokina, leukotriena, prostanglandina i vazoaktivnih amina, što je praćeno kaskadom događaja koji vode ka smanjenju inflamacije i obnavljanju homeostaze (Bonesi i sar., 2017; Tasneem i sar., 2019). Ipak, u određenim slučajevima je teško obnoviti fiziološke uslove. Na primer, aktivirani makrofagi, neutrofil i dendritske ćelije oslobađaju reaktivne oblike kiseonika (ROK) i azota (ROA) sa ciljem da zaštite organizam i ublaže inflamatorne procese, međutim ukoliko proizvodnja ROK i ROA premaši antioksidativni kapacitet ćelije, ovi radikali počinju da oksiduju proteinske i lipidne ćelijske elemente, dovodeći do oštećenja molekula DNK i do promene fiziologije ćelija, što dalje ima za posledicu prekomerno oštećenje tkiva. Drugim rečima, produženo stanje prekomerne proizvodnje ROK i ROA, kao i proinflamatornih medijatora u normalnim ćelijama, dovodi do nepovratnih oštećenja i hroničnih inflamacija, što može imati odlučujuću ulogu u pokretanju i napredovanju višestrukih poremećaja kao što su neurodegeneracija, ali i dijabetes i kancer (Bonesi i sar., 2017; Tasneem i sar., 2019; Vieira i sar., 2020). Zbog toga je blagovremena primena antioksidativnih i/ili anti-inflamatornih agenasa od suštinske važnosti, jer se time sprečava neregulisana inflamacija, ali u isto vreme se može postići i neuroprotektivni efekat (Vieira i sar., 2020). Literaturni podaci ukazuju na to da su brojni sintetički antineuroinflamatorni lekovi već u upotrebi i za tretiranje

neurodegenerativnih oboljena, međutim u novije vreme postoji sve veće interesovanje za proučavanje antineuroinflamatornog i/ili neuroprotektivnog potencijala lekovitih biljaka, koje imaju sposobnost da smanje nivo inflamacije, a pritom ne pokazuju neželjena dejstva (Tasneem i sar., 2019).

Jedna od najčešćih neurodegenerativnih oboljenja, Alchajmerova bolest (opisana prvi put od strane Alojsa Alchajmera, 1907. godine), se karakteriše nedostatkom neurotransmitera acetilholina, koji se razgrađuje acetilholinesterazom (Petretto i sar., 2021). Holinesteraze, kao što su AChE i butirilholinesteraza, hidrolizuju acetilholin u sinaptičkom prostoru, što zaustavlja prenos nervnih impulsa. Zato, ukoliko se holinesteraze inhibiraju, prenos nervnih impulsa bi se nesmetano odigravao, a samim tim bi moglo doći i do poboljšanja kognitivne funkcije kod pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti (Angeloni i sar., 2021). Zbog toga je jedna grupa postojećih sintetičkih lekova dizajnirana tako da spreči razgradnju acetilholina time što dovodi do inhibicije acetilholinesteraze u holinergičkim sinapsama i ujedno stimuliše nikotinske i muskarinske receptore (Zhang i sar., 2004). S druge strane, Parkinsonova bolest (opisana prvi put od strane Džejsa Parkinsona, 1817. godine), nastaje usled progresivnog gubitka dopamina u dopaminergičkim neuronima *substantia nigra*, koji sadrže neuromelanin. Tirozinaza, enzim koji se nalazi između ostalog, i u melanocitima kože, kose i epitelu retine oka, katalizuje hidrosilaciju tirozina u levodopu (L-DOPA) i zatim oksiduje L-DOPA u dopamin-kinon, čime igra značajnu ulogu u stvaranju (neuro)melanina. Međutim, prekomerna ekspresija tirozinaze može dovesti do povećane produkcije melanina, kao i do povećanja dopamina i/ili dopamin-kinona, čime dovodi do toksičnog efekta. Budući da inhibicija tirozinaze može kontrolisati hiperpigmentaciju koju uzrokuje visok nivo melanina u mozgu pacijenata sa Parkinsonizmom (Angeloni i sar., 2021), neki od postojećih sintetičkih lekova su, između ostalog, usmereni na inhibiciju ovog enzima, kako bi se uspešnije lečila Parkinsonova bolest (Greggio i sar., 2005; Carballo-Carbajal i sar., 2019).

Pored pomenutih sintetičkih lekova, u poslednje vreme se sve veća pažnja posvećuje potencijalnim antineurodegenerativnim i neuroprotektivnim agensima dobijenim iz različitih prirodnih izvora, pre svega biljnih. Očekuje se da bi ovi agensi podstakli pravilan rad imunskog sistema i da bi se uz njihovu pomoć moglo suprotstaviti napredovanju neurodegeneracije preko smanjenja oksidativnog stresa, inhibicije neuroinflamacije, kao i enzima kao što su acetilholinesteraza i tirozinaza (Ke i sar., 2016; Dey i sar., 2020; Khan i sar., 2020).

1.4.3.1. Antineurodegenerativna i neuroprotektivna aktivnost biljaka familije Lamiaceae

Antineurodegenerativna i neuroprotektivna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae je često istraživana kako ranijih godina, tako i u novije vreme (Imanshahidi i Hosseinzadeh, 2006; López i sar., 2009; 2010; Ożarowski i sar., 2009; Alimpić i sar., 2017; Rahbardar i sar., 2017; Duletić-Laušević i sar., 2018a; Ćilerdžić i sar., 2019; Hanafy i sar., 2020; Pineda-Ramírez i sar., 2020; Rocamora i sar., 2020; Gürbüz i sar., 2021; Serrano i sar., 2021).

Na osnovu literaturnih podataka se može videti da su se jedinjenja poput rozmarinske i karnozinske kiseline poreklom iz biljaka familije Lamiaceae izdvojila po svojim neuroprotektivnim efektima (Fallarini i sar., 2009; Kelsey i sar., 2010; Braidy i sar., 2014; Ghaffari i sar., 2014; Khamse i sar., 2015; de Oliveira, 2016; 2018; Farr i sar., 2016; Rahbardar i sar., 2017; 2020; Cui i sar., 2018; Taram i sar., 2018; Fachel i sar., 2019; AlKahtane i sar., 2020; Thingore i sar., 2021).

1.4.4. Imunomodulatorna aktivnost

Imunomodulator je supstanca koja stimuliše ili suprimira komponente kako urođenog, tako i adaptivnog imunskog odgovora. Razvoj kliničke i eksperimentalne imunologije ukazuje na to da mnoge zarazne bolesti i poremećaji kod čoveka nastaju zbog izloženosti organizma stresu, čime imunski sistem slabi i dolazi do različitih fizioloških promena, zbog kojih organizam postaje osetljiviji na infekcije, inflamacije i maligne bolesti. Dostupni literaturni podaci govore u prilog tome da se u današnje vreme intenzivno proučavaju kako sintetičke, tako i prirodne supstance sa sposobnošću modulacije imunskog odgovora, kako bi se pružila veća zaštita od patogenih mikroorganizama, ali ujedno i kako bi se bolje razumelo funkcionisanje imunskog sistema i način na koji se razvijaju nespecifični i specifični imunski mehanizmi (Singh i sar., 2016).

Odbrambena sposobnost imunskog sistema zahteva kompleksne interakcije između nespecifičnog (ćelijskog) i specifičnog (humoralnog) imunskog odgovora, stimulacije i inhibicije imunokompetentnih ćelija i uticaj endokrinog sistema na imunski sistem. Imunomodulatorna terapija može pružiti alternativu konvencionalnoj terapiji za različita patološka stanja, posebno kada se odbrambeni mehanizmi domaćina moraju aktivirati u uslovima kompromitovanog imunskog odgovora. Imunostimulacija predstavlja profilaktički ili terapijski koncept koji ima za cilj stimulaciju imunskog odgovora. Primarne mete imunostimulatornih agenasa su T i/ili B limfociti ili sistem komplemента, povećanje fagocitoze od strane makrofaga i granulocita (Wagner i sar., 1985; Kuby, 1994; Hidayat i sar., 2021). S druge strane, imunosupresorni agensi se mogu koristiti za kontrolu patološkog imunskog odgovora kod autoimunskih bolesti (reagovanje na sopstveno), odbacivanja transplantata, imunske reakcije preosetljivosti ili infekcije (Singh i sar., 2016). Međutim, za mnoge imunomodulatorne lekove koji se danas koriste prijavljeni su brojni neželjeni efekti: mijelosupresija, alopecija, povećani rizik od infekcije, fibroza jetre, nefrotoksičnost, neurotoksičnost, glavobolja, motorički poremećaji, poremećaji digestivnog sistema, hipertenzija, hiperkalemija, hiperglikemija i dijabetes, hiperplazija desni, hiperurikemija, i drugi (Kremer i sar., 1994, Singh i sar., 2016). Budući da mnogi imunostimulansi i imunosupresori koji su trenutno u kliničkoj upotrebi mogu izazvati ozbiljne neželjene efekte, postoji sve veće interesovanje za prirodne preparate koji su se pokazali kao značajni višekomponentni agensi za modulaciju imunskog sistema. Smatra se da dokazana terapijska efikasnost biljnih ekstrakata upravo predstavlja rezultat širokog spektra imunomodulatornih efekata njihovih komponenti, posebno jedinjenja poput flavonoida, polisaharida, laktona, alkaloida, diterpena i različitih glikozida (Mukherjee i sar., 2014; Shukla i sar., 2014; Jantan i sar., 2015; Singh i sar., 2016; Sharma i sar., 2017; Lewicka i sar., 2019; Di Sotto i sar., 2020).

U današnje vreme, tumor se smatra vodećim uzrokom povećanog mortaliteta širom sveta (Privitera i sar., 2019; Sitarek i sar., 2020). Tokom 2020. godine je potvrđeno 19,3 miliona novih slučajeva obolevanja od različitih tipova tumora, a na osnovu dosadašnjih statističkih podataka se može pretpostaviti da će do 2040. godine taj broj porasti za 47% (Sung i sar., 2021). Imajući to u vidu, kao i činjenicu da je pokazano da sintetički lekovi koji se koriste u hemioterapiji ispoljavaju ozbiljne toksične efekte na normalno tkivo (Seca i Pinto, 2018), u novije vreme istraživanje tumora je usmereno ka traganju za novim i efikasnijim antitumorskim agensima prirodnog porekla koji imaju sposobnost da regulišu složene korake transformacije normalnih ćelija u maligne (Arnaldez i sar., 2020; Hoseinkhani i sar., 2020; Luca i sar., 2020; Rajagopalan i sar., 2020; Sitarek i sar., 2020; Yanagimichi i sar., 2020; Mirzaei i sar., 2021; Patrignani i sar., 2021).

Lekovite biljke poseduju brojne biološki aktivne sekundarne metabolite (alkaloidi, polifenoli i terpeni) koji imaju sposobnost da utiču na različite korake razvoja tumora, istovremeno ispoljavajući i imunomodulatornu aktivnost (Hoseinkhani i sar., 2020, Kury i sar., 2021) tako što utiču na proliferaciju tumorskih ćelija, moduliraju njihov ćelijski ciklus, mehanizme popravke DNK, signalizaciju apoptoze kao i nivo ROK i ROA, mada je značajno pomenuti da je pokazano da se smanjenjem nivoa ovih reaktivnih molekula u normalnim ćelijama takođe prevenira nastanak tumorskih oboljenja. Pomenuti sekundarni metaboliti biljaka, pored toga, imaju tendenciju da se talože u ćelijskoj membrani, čime dovode do povećanja njene propustljivosti, što za posledicu ima izlazak enzima i metabolita iz tumorskih ćelija (Seca i Pinto, 2018; Privitera i sar., 2019; Anwar i sar., 2020; Luca i sar., 2020; Sitarek i sar., 2020; Tariq i sar., 2021).

Do sada je poznato više od 3000 biljaka širom sveta sa značajnim antitumorskim svojstvima i mnoge od njih se već dugo koriste u tradicionalnoj medicini u prevenciji i/ili terapiji tumora (Seca i Pinto, 2018; Sitarek i sar., 2020).

1.4.4.1. Imunomodulatorna aktivnost biljaka familije Lamiaceae

Poznato je da se mnoge biljke od davnina koriste u narodnoj medicini sa ciljem jačanja imunskog sistema. Imajući to u vidu, kao i činjenicu da je pokazano da mnogi sekundarni metaboliti koji su prisutni u biljkama familije Lamiaceae ispoljavaju imunomodulatorne efekte (Cimpan i Gocan, 2002; Chiang i sar., 2003), poslednjih decenija je počelo intenzivnije ispitivanje imunomodulatornog potencijala predstavnika ove familije (Tan i Vanitha, 2004; Harput i sar., 2006; Carrasco i sar., 2009; Dashputre i Naikwade, 2010; Ullah i sar., 2011; Nassar i sar., 2015; Eftekhari i sar., 2019; Slimani i sar., 2020; Cordeiro i sar., 2021; Machado i sar., 2021).

Pored toga, antitumorska aktivnost etarskih ulja i ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae je do sada pokazana na ćelijama različitih tipova kancera: leukemije, kancera kože, pluća, jetre, prostate, dojke, cervikalnog i kolorektalnog kancera, između ostalog (Özkan i Erdoğan, 2011; Privitera i sar., 2014; 2019; Jantová i sar., 2014; Rai i sar., 2016; Duletić-Laušević i sar., 2019; Mesquita i sar., 2019; Rajagopalan i sar., 2020; Luca i sar., 2020; Sitarek i sar., 2020; Yanagimichi i sar., 2020; Al-Hamwi i sar., 2021; Mićović i sar., 2021; Şimşek Sezer i Uysal, 2021).

1.4.5. Antibakterijska aktivnost

Bakterije se smatraju najstarijim organizmima na Zemlji, budući da njihovo nastajanje datira od pre 3,8-3,9 milijardi godina (Madigan i sar., 2012) i tokom otprilike 80% trajanja Zemljine istorije, nisu postojali drugi oblici života. One zajedno sačinjavaju glavninu biomase na Zemlji i odgovorne su za odvijanje mnogih hemijskih reakcija i stvaranje proizvoda značajnih za ostale organizme: biogasa, enzima, antibiotika, hormona poput insulina, a u crevnom sistemu čoveka stvaraju i vitamin K. Zbog toga se smatra da bez njih ni složeniji životni oblici ne bi mogli da se razviju niti da opstanu (Madigan i sar., 2012; Mamfe i sar., 2021).

Ovi prokariotski organizmi čuvaju svoje genetičke informacije u malom, dvolančanom najčešće kružnom molekulu DNK. Mnogi prokarioti takođe sadrže jedan ili više malih molekula DNK plazmida, koji imaju nezavisnu replikaciju. Plazmidi često nose gene koji povećavaju preživljavanje bakterijske ćelije i daju joj selektivnu prednost, kao što je rezistencija na antibiotike ili produkcija toksina.

Bakterije se mogu podeliti prema karakterističnom bojenju ćelijskog zida, koje je uvedeno od strane Hans Kristijana Grama 1884. godine, na gram-pozitivne i gram-negativne, mada neke bakterije nije moguće svrstati ni u jednu od ove dve kategorije (Doron i Gorbach, 2008; Sizar i Unakal, 2020).

Pored navedenog, posebnu pažnju bi trebalo posvetiti značaju mikroorganizama koji su deo crevnog mikrobioma čoveka, komensale, i na njihovu implikaciju u različita patološka stanja. Dok su drugi organizmi relativno slabo tolerantni na oksidativni stres, generalno gledano, mikroorganizmi rutinski proizvode RVK kada rastu u aerobnim uslovima. Zahvaljujući svojoj veoma dugoj evoluciji, mikroorganizmi su razvili mehanizme monitoringa i odbrane sopstvenih esencijalnih biomolekula od posledica visokih nivoa RVK-a (Gambino i Cappitelli, 2016). Glavno mesto proizvodnje RVK-a i reaktivnih vrsta azota (RVA) u eukariotskim ćelijama su mitohondrije, koje predstavljaju primarni energetski centar eukariota uključen u oksidativne reakcije koje dovode do stvaranja energije, odnosno molekula adenozin trifosfata. Metaboliti crevne mikrobiote, kao što su kratkolančane masne kiseline, utiču na funkciju mitohondrija, čime dovode do smanjenja proizvodnje RVK, ali i do smanjenja posledica oksidativnog stresa redukcijom skraćivanja telomera i oštećenja DNK menjanjem hromatinskih struktura i stimulacijom proizvodnje glutationa, kao i povećanjem aktivnosti enzima koji učestvuju u antioksidativnoj odbrani organizma (Wu i sar., 2021). Pored pomenutih uloga, smatra se da kratkolančane masne kiseline imaju ključnu ulogu i u neuro-imunoendokrinim regulatornim signalnim putevima (Silva i sar., 2020). S druge strane, patogene bakterije, poput *Salmonella* i *E. coli*, imaju sposobnost da razgrađuju sumporne aminokiseline, dovodeći do proizvodnje vodonik sulfida (H_2S) u crevima, čime se podstiče oksidativni stres, smanjuje se potrošnja kiseonika u mitohondrijima i dolazi do prekomerne ekspresije proinflamatornih medijatorskih gena, posebno gena za IL-6. Neuravnotežen gastrointestinalni ekosistem (disbioza) doprinosi razvoju bolesti kao što su neurodegenerativne bolesti, depresija i dijabetes (Luca i sar., 2019). Zbog opisanih imunoloških i anti-inflamatornih funkcija produkata mikrobiote i disbalansa koji može nastati ulaskom patogenih mikroorganizama u sistem, održavanje funkcionalne mikrobiote treba biti imperativ modernog čoveka. Polifenolna jedinjenja deluju protiv oksidativnog stresa i pored toga smanjuju rizik od pomenutih oboljenja bolesti (Wu i sar., 2021).

Poznato je da su bakterije uzročnici velikog broja bolesti (kolera, kuga, antraks, tuberkuloza, pneumonija, difterija) i masivnih infekcija koje godišnje odnose živote više miliona osoba širom sveta (10,7 miliona smrtnih slučajeva tokom 2005. godine i 8,6 miliona slučajeva tokom 2015. godine) (Durand i sar., 2019; Mamfe i sar., 2021). Međutim, zahvaljujući pronalasku (Aleksandar Fleming, 1928. godine) i kliničkoj upotrebi antibiotika (od 1945. godine) razvoj bakterijskih infekcija je znatno usporen (Aminov, 2010).

Antibiotici predstavljaju snažno sredstvo u tretiranju bakterijskih infekcija i od svog otkrića se uspešno primenjuju u lečenju (Bhalodia i Shukla, 2011). Međutim, primećeno je da u poslednjih nekoliko decenija njihov efekat sve više slabi iz razloga što bakterije stiču rezistenciju kako na postojeće, tako i na nove antibiotike (Aminov, 2010; Durand i sar., 2019). Zbog toga su postala sve interesantnija istraživanja novih antibakterijskih agenasa poreklom iz biljaka, a koji bi mogli da zamene ili da budu dopuna već postojećim agensima, na koje bakterije još uvek nisu stvorile otpornost (Bhalodia i Shukla, 2011).

1.4.5.1. Antibakterijska aktivnost biljaka familije Lamiaceae

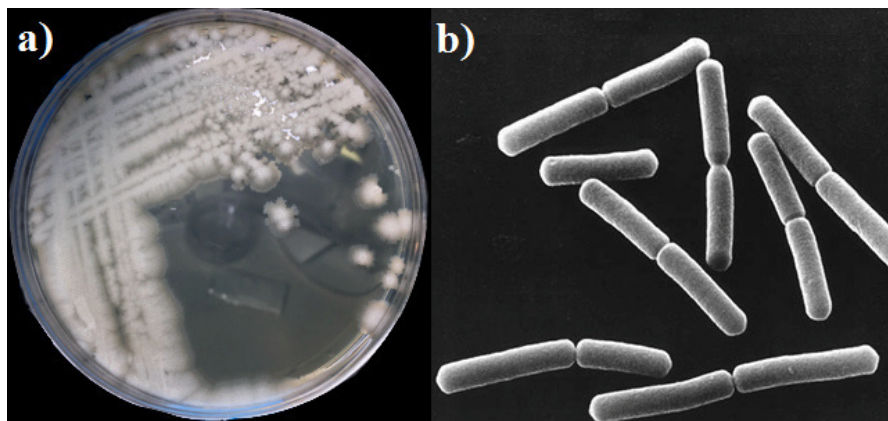
Ekstrakti i etarska ulja biljaka familije Lamiaceae su godinama unazad ispitivani sa ciljem da se odredi njihov antibakterijski potencijal. U ovim istraživanjima je pokazano da ove biljke imaju sposobnost (same ili u kombinaciji sa postojećim antibiotskim lekovima) da

inhibiraju rast bakterijskih ćelija, da smanje virulenciju čak i visoko rezistentnih sojeva kao što je MRSA, i da spreče formiranje ili da izazovu degradaciju već postojećeg biofilma pojedinih bakterija (Piccaglia i sar., 1993; Vuković i sar., 2008; Quave i Smeltzer, 2009; Marin i sar., 2012; Elmasri i sar., 2014; Gormez i sar., 2015; Abdolshahi i sar., 2018; Duletić-Laušević i sar., 2018a; Piras i sar., 2018; Čabarkapa i sar., 2019; Iseppi i sar., 2020; Ben Abdallah i sar., 2021; Jakovljević Kovač i sar., 2021).

1.4.5.2. Bakterijski sojevi korišćeni u eksperimentalnom radu

Bakterijski sojevi koji su korišćeni u eksperimentalnom delu izrade ove doktorske disertacije su patogeni ili modeli patogena sa svojstvima sličnim patogenim sojevima koji su kontaminanti hrane, izazivači brojnih oboljenja čoveka i životinja, kao i klinički problematični sojevi.

Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn (Slika 1) je štapićasta gram-pozitivna bakterija sposobna da produkuje metabolički neaktivne spore koje su visoko otporne na stresne uslove sredine (raste u zemljištu ili na vegetaciji) (Lopez i sar., 2009). Ova bakterija brzo raste i ima prilagodljiv metabolizam, te se često koristi za produkciju hemikalija, enzima i antimikrobnih materijala u industriji, poljoprivredi i medicini (Su i sar., 2020). *B. subtilis* se tradicionalno ne smatra patogenom ljudi, mada se može naći u svežim i u pasterizovanim namirnicama (zahvaljujući sporama otpornim na toplotu), zbog čega povremeno može izazvati trovanje hranom (Fernández-No i sar., 2011). Soj *B. subtilis* ATCC 6633 se često koristi za ispitivanje osetljivosti i molekularnih mehanizama delovanja antibiotičkih agenasa (Kugler i sar., 1990).



Slika 1. *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn.

a) izgled kulture na hranljivoj podlozi

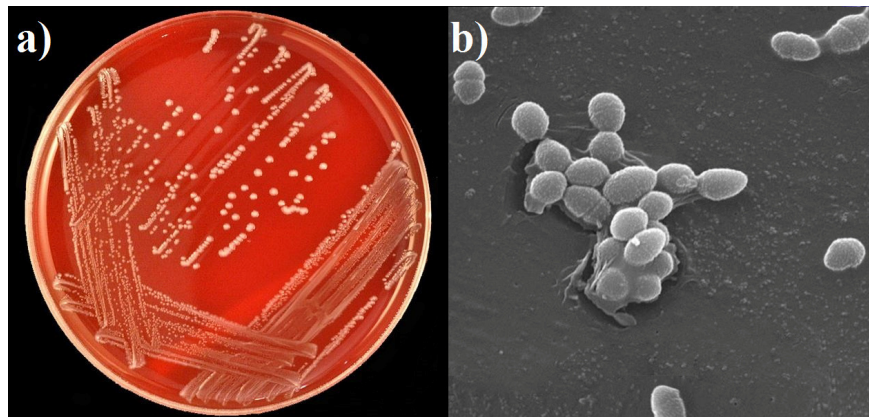
(izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis_natto_colonies.png, modifikovano);

b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom

(izvor: <https://www.flickr.com/photos/23925401@N06/5558175110/>).

Enterococcus faecalis (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper-Balz (Slika 2) je gram-pozitivna koka koja se može nalaziti pojedinačno, u kratkim lancima ili u grupama. Ova bakterija je do sada izolovana iz gastrointestinalnog trakta, fecesa, urina i krvi čoveka i drugih životinja, kao i iz vode i fermentisane hrane (mlečni proizvodi). Mnogi sojevi *E. faecalis* su oportunistički patogeni koji mogu izazvati infekcije urinarnog trakta, endokarditis, bakterijemiju, neonatalnu infekciju, bolničku infekciju rana i centralnog nervnog sistema (CNS) (Toledo-Arana i sar., 2011; He i sar., 2018). Pretpostavlja se da je učestalost ovih infekcija značajno povećana zahvaljujući enterokokalnom površinskom proteinu velike molekulske mase, koji je uključen i u formiranje biofilma (Toledo-Arana i sar., 2011). Takođe, veliki problem predstavlja razvoj rezistencije pojedinih sojeva *E. faecalis* na određene

antibiotike, uključujući vankomicin, koji je poslednja linija odbrane od širokog spektra multirezistentnih gram-pozitivnih bakterija (He i sar., 2018). Zbog toga, *E. faecalis* ATCC 29212 se koristi kao reprezentativni kontrolni soj za kliničke i laboratorijske eksperimente budući da je osetljiv na vankomicin (Allen i Bierman, 2009).



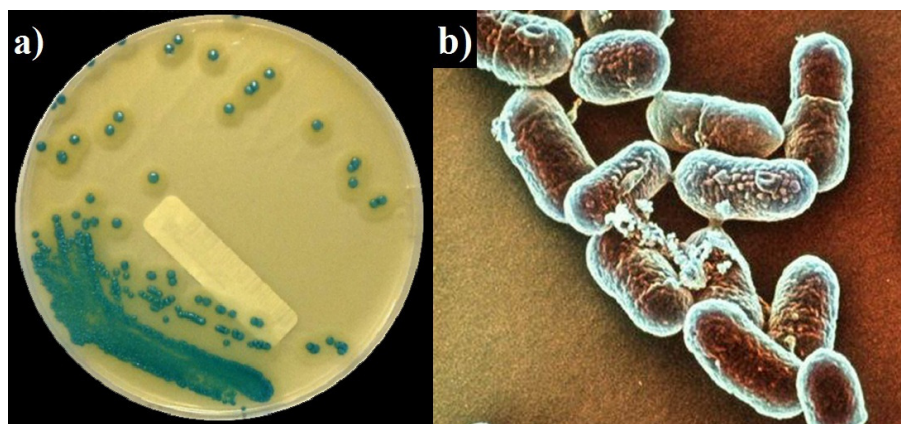
Slika 2. *Enterococcus faecalis* (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper-Balz.

a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: <https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1417959903/>);

b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom

(izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enterococcus_faecalis_SEM_01.png, modifikovano).

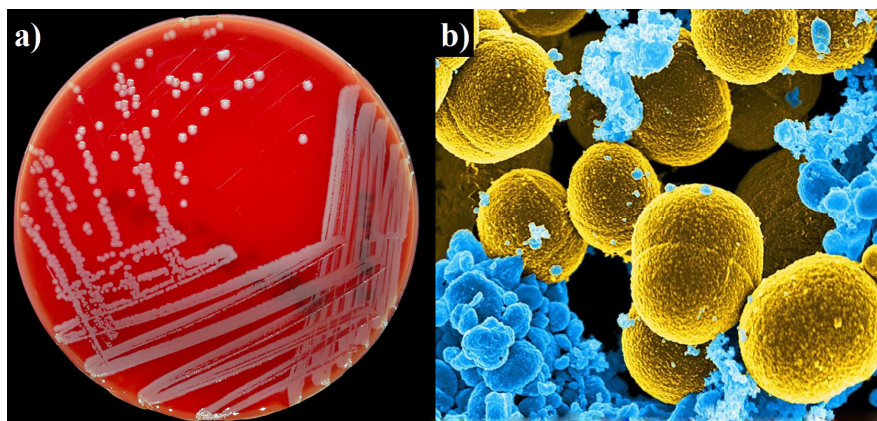
Listeria innocua Selinger je štapičasta gram-pozitivna bakterija koja ne formira spore. Ova bakterija je taksonomski veoma bliska *L. monocytogenes* (Murray i sar.) Pirie (Slika 3), patogenoj bakteriji koja se lako razmnožava u mlečnim proizvodima i mesu, čime predstavlja veliki rizik po ljudsko zdravlje (Meylheuc i sar., 2002). Imajući u vidu visoku virulentnost *L. monocytogenes*, *L. innocua*, posebno soj ATCC 33090 veoma često služi kao zamena za *L. monocytogenes* (Petran i Swanson, 1993; Aymerich i sar., 2000; Meylheuc i sar., 2002; Buchrieser i sar., 2003; Friedly i sar., 2008). Međutim, pokazano je da ipak postoje razlike u reakcijama na stres između ove dve bakterije, kao i između različitih podgrupa *L. monocytogenes*, zbog čega je potrebno voditi računa kada se biraju za eksperiment Milillo i sar. (2012). Iako se *L. innocua* smatra nepatogenom bakterijom, 2003. godine je zabeležen prvi slučaj humane bakterijemije sa letalnim ishodom (Perrin i sar., 2003), a nakon ovog slučaja, prijavljeno je još nekoliko slučajeva infekcije ovom bakterijom (Rocha i sar., 2013; Favaro i sar., 2014; Moura i sar., 2019; Demetriou i Papaemmanouil, 2021).



Slika 3. *Listeria monocytogenes* (Murray i sar.) Pirie.

- a) izgled kulture na hromatogenom selektivnom podlozi
(izvor: <https://www.flickr.com/photos/76475368@N04/6847656016/>, modifikovano);
b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom (izvor:
<https://www.flickr.com/photos/avp1990/7864289590/>).

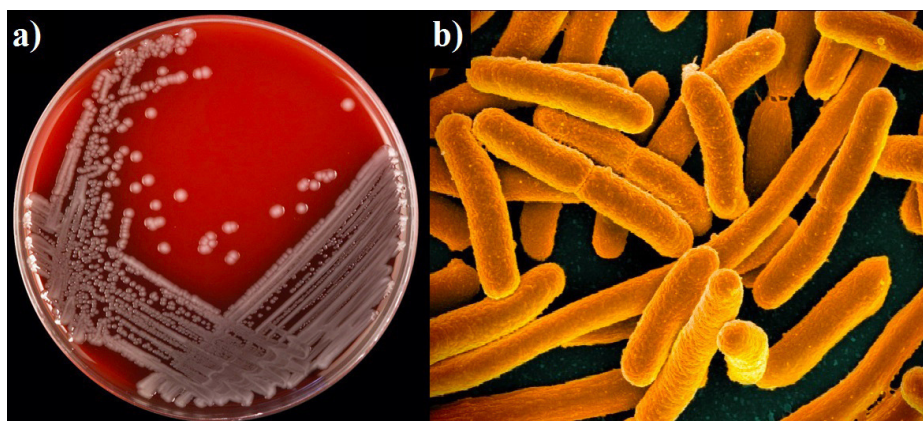
Staphylococcus aureus Rosenbach (Slika 4) je gram-pozitivna koka koja se smatra oportunističkim patogenom sa širokim spektrom faktora virulencije, bez sposobnosti da stvara spore ili da se kreće (Foster i Geoghegan, 2015). Boja kolonija potiče od zlatnog pigmenta, po kome je i dobila naziv (lat. *aureus* – zlatan), koji joj ujedno omogućava zaštitu od urođenog imunskog odgovora domaćina na infekciju (Lan i sar., 2010). Može se naći u životnoj sredini, kao i u normalnoj flori većine zdravih osoba – na koži i sluzokoži (najčešće u nosnom predelu), međutim može postati izuzetno opasna ukoliko pređe u krv (Doron i Gorbach, 2008; Taylor i Unakal, 2017). Ova bakterija se prenosi dodirrom i može izazvati inflamatorna oboljenja, uključujući infekcije kože, upalu pluća, endokarditis, septični artritis, osteomijelitis, apscese, sindrom toksičnog šoka, sindrom oparene kože, kao i trovanje hranom (Sizar i Unakal, 2020). Pored toga, *S. aureus* ima jedinstvenu sposobnost brzog reagovanja na nove antibiotike razvojem mehanizama rezistencije, zbog čega se danas smatra jednim od najopasnijih bolničkih patogena, posebno MRSA soj (engl. *Meticillin-Resistant Staphylococcus aureus*) (Pantosti i sar., 2007; Foster i Geoghegan, 2015; Kaiki i sar., 2021). *S. aureus* soj ATCC 25923 se često koristi kao kontrolni soj za ispitivanje osetljivosti na antibiotike i za kontrolu kvaliteta komercijalnih proizvoda (Treangen i sar., 2014).



Slika 4. *Staphylococcus aureus* Rosenbach.

- a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50039461832/>);
b) bakterijske ćelije okružene humanim limfocitima, posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_bacteria_escape.jpg).

Escherichia coli (Migula) Castellani & Chalmers (Slika 5) je komensalna, patogena gram-negativna štapićasta bakterija koja živi u različitim ekološkim nišama, uključujući slatke vode i zemljište, ali i gastrointestinalni i urogenitalni trakt čoveka. Njena fleksibilnost po pitanju zahteva za rast primećena je i u laboratorijskim uslovima, i ona se ogleda u izrazitoj proliferaciji u širokom opsegu temperature, prisustva soli, pH, oksigenacije i hranljivih sastojaka (Mueller i sar., 2019). Iako se obično smatra bezopasnim komensalom, kada stekne adekvatnu kombinaciju mobilnih genetičkih elemenata može postati visoko prilagođen patogen koji je sposoban da izazove niz bolesti: od gastroenteritisa do ekstraintestinalnih infekcija, infekcija urinarnog trakta, krvotoka i CNS, pri čemu su komplikacije izazvane ovom bakterijom dokazane kod stotina miliona osoba širom sveta na godišnjem nivou (Croxen i Finlay, 2010). *E. coli* ATCC 25922 je preporučeni referentni soj za ispitivanje osetljivosti na antibiotike (Hombach i sar., 2015), dok se soj XL1-Blue često koristi za izolaciju plazmida (Jooybari i sar., 2020).

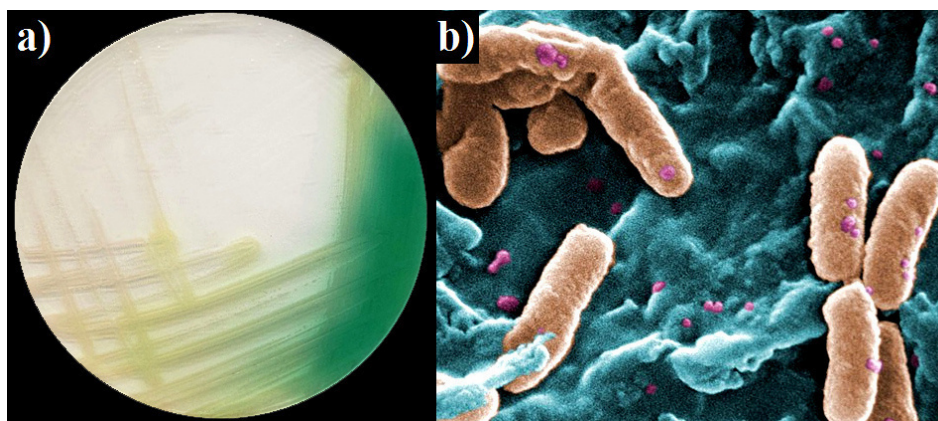


Slika 5. *Escherichia coli* (Migula) Castellani & Chalmers.

- a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: <https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1418842994/>);
b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: <https://www.flickr.com/photos/nihgov/24661308922/>).

Pseudomonas aeruginosa (Schroeter) Migula (Slika 6) je aerobna gram-negativna štapićasta bakterija koja se kreće uz pomoć flagele. Ova bakterija poseduje izuzetnu sposobnost virulencije: od prvog zabeleženog slučaja infekcije ovom bakterijom (1890. godine) do danas, ona je zauzela visoko mesto na listi izuzetno opasnih ljudskih patogena (Nadal Jimenez i sar., 2012), pri čemu se nalazi među prvih pet najvećih uzročnika infekcije pluća, krvi, urinarnog trakta, hirurških rana i mekih tkiva (Veesenmeyer i sar., 2009). Ovako visoka virulencija se može opisati njenom dobro razvijenom rezistencijom na antibiotike budući da ima višestruke mehanizme rezistencije, uključujući nisku propustljivost ćelijskog zida, ali i visoku sposobnost prilagođavanja, koje zajedno omogućavaju brzu kolonizaciju različitih sredina. Pored toga, *P. aeruginosa* je razvio složen i opsežan niz regulatornih signalnih mreža koje otkrivaju i reaguju na endogene molekule, ali i molekule okoline, čime pokreću značajne promene u ekspresiji mnogobrojnih gena (Nadal Jimenez i sar., 2012). Veliki problem sa kojim se današnja medicina takođe suočava predstavlja sposobnost ove bakterije da formira biofilm (visoko strukturisanu zajednicu mikroorganizama vezanih za površinu i ugrađenih u sopstveni vanćelijski matriks) na plastičnoj medicinskoj opremi, kao što su, između ostalog, urinarni kateteri (Čabarkapa i sar., 2019; Lewis Oscar i sar., 2021). S obzirom na to da je glavna karakteristika biofilma visoka tolerancija na antibiotike, istraživači pokušavaju da pronađu nove načine za njihovo suzbijanje, a za to se u istraživanju koriste sojevi ATCC 15442 (često se koristi za ispitivanje antimikrobnih konzervansa) i PAO1

(najčešće korišćeni soj za istraživanje ovog patogena) (Klockgether i sar., 2010; Gilbert-Girard i sar., 2020).



Slika 6. *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula.

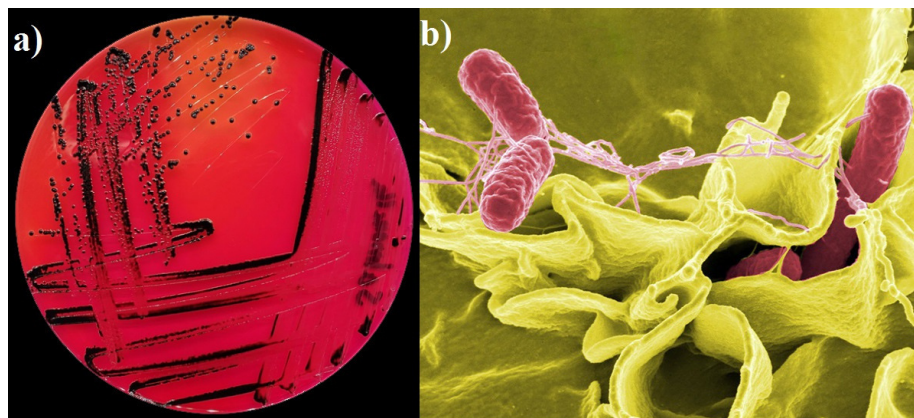
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi

(izvor: <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50051412277/in/photostream/>, modifikovano);

b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom

(izvor: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas.jpg>).

Salmonella typhimurium (Loeffler) Castellani & Chalmers (Slika 7) je fakultativna anaerobna štapičasta gram-negativna bakterija koja se kreće uz pomoć peritrihijalnih flagela. Ova bakterija je jedna od najčešćih serotipova *Salmonella enterica* koji uzrokuje sistemsku infekciju kod miševa koja podseća na tifusnu groznicu izazvanu *S. enterica* serovar *Typhi* kod ljudi (Chaudhuri i sar., 2018). Ukoliko se čovek inficira bakterijom *S. typhimurium*, dolazi do razvoja samoograničavajućeg gastroenteritisa, mada se pokazalo da su neki sojevi *S. typhimurium* invazivni jer prolaze crevni zid i ulaze u cirkulaciju (Dos Santos i sar., 2018; Wang i sar., 2019). Istraživanja na miševima su pokazala da je ova bakterija sposobna da pređe krvno-moždanu barijeru, čime bi mogla da ima implikacije na korteks, medulu, mali i srednji mozak (Chaudhuri i sar., 2018). Kako bi se proučavala genetička osnova patogeneze tifusne groznice, koristi se *S. typhimurium* ATCC 14028, koja predstavlja visoko virulentni soj izolovan 1960. godine iz srca i jetre pileta (Jarvik i sar., 2010).



Slika 7. *Salmonella typhimurium* (Loeffler) Castellani & Chalmers.

a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: <https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50044581602/>);

b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom

(izvor: <https://www.flickr.com/photos/microbeworld/5807837573/>).

1.5. Pregled morfoloških karakteristika, fitohemijskog sastava i biološke aktivnosti odabranih predstavnika porodice Lamiaceae

1.5.1. *Glechoma hederacea* L. (dobričica)

Glechoma hederacea L. (Slika 8) je polikarpna, aromatična perena. Mlade jedinice se razvijaju sa plagiotropnih izdanaka, stolona, koji mogu da prežive više od jedne sezone. Cvetni izdanak je dugačak od 10-30 cm, četvorougao je na poprečnom preseku, uspinjuć ili uspravan. Stabljike koje ne nose cvetove su takođe četvorougaoe na poprečnom preseku, kod mnogih su puzeće. Lamine listova su bubrežastog oblika, tupe i nazubljene (Diklić, 1986). Cvetovi su zigomorfni i hipogini, raspoređeni u dva do pet prividnih pršljenova. Brakteje se ne razlikuju od listova. Čašica je ravna u osnovi i dvousnata. Gornja usna krunice je ravna, sa tri trouglasta, zašiljena zupca, koji su duži od krunične cevi. Donja usna ima dva zupca. Krunica je obično plavo-ljubičaste boje sa ljubičastim tačkama na donjoj usni. Prašnika ima četiri: dva duga i dva kratka, i nalaze se u kruničnoj cevi, ispod donje usne. U plodniku su smeštena četiri semena zametka, svaki u svom lobusu, od kojih nastaju četiri elipsaste, neizraženo uglaste, glatke orašice (1,9 × 1,1 mm) (Hutchings i Price, 1999; Săvulescu i Nyárády, 1961). U kontaktu sa vodom, orašice proizvode sluz (miksokarpija), koja ih fiksira za supstrat ili određene prenosioce (Böllmann i Scholler, 2004).

Dobričica živi na vlažnim staništima, senovitim obalama reka, na obodima šuma, u svetlim vrbovim, topolinim, jasenovim i lužnjakovim šumama duž reka, na livadama i oko naselja (Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974). Nativna je za umerene regione Evroazije (Skandinavija, zapadna, srednja i istočna Evropa, Sredozemlje). Introdudovana je u jugoistočnu Aziju, Novi Zeland i Severnu Ameriku (Böllmann i Scholler, 2004). Na Balkanskom poluostrvu i u Srbiji je veoma rasprostranjena (Diklić, 1974).

Literaturni podaci sugerišu da su ekstrakti *G. hederacea* bogati fenolnim jedinjenjima, a iz ove biljke su takođe izolovani i pojedini alkaloidi, kao što su hederacin A i hederacin B (Kumarasamy i sar., 2003). Ferulinska, rozmarinska, kafena i hlorogena kiselina su među najčešćim fenolnim kiselinama koje su pronađene u ovoj biljci (Matkowski, 2008; Döring i Petersen, 2014; Chou i sar., 2019; Šeremet i sar., 2020), dok su, s druge strane, od flavonoida najčešće zastupljeni apigenin, kvercetin, luteolin, rutin, genistin, genistein, kao i neki od njihovih derivata (Masuda i sar., 2013; Xie i sar., 2014; Chou i sar., 2019; Šeremet i sar., 2020). U etarskom ulju ove biljke su nađena i isparljiva jedinjenja, poput *trans*-3-pinanona, sabinena, sabinola, α - i β -kariofilena, β -mircena i β -pinena (Chou i sar., 2018). Zahvaljujući bogatom fitohemijskom sastavu, ekstrakti, ali i etarska ulja ove biljke ispoljavaju brojne biološke aktivnosti, poput antioksidativne, anti-inflamatorne, antimutagene, antitumorske i antibakterijske aktivnosti (Chou i sar., 2012; 2018; 2019; Dobrucka i sar., 2021). U tradicionalnoj medicini se od dobričice pravi napitak protiv tuberkuloze, bronhitisa i plućnih krvarenja. Sveža biljka se može koristiti protiv anemije, a dekokt protiv gastrointestinalnih i digestivnih bolesti, kašlja, gripa i groznice, kao diuretik, antiseptik, antipiretik i za smanjenje



Slika 8. Morfološke karakteristike biljke *Glechoma hederacea* L.

Izvor:

<https://www.flickr.com/photos/biodivlibrary/27163044570/>.

krvnog pritiska (Šarić-Kundalić i sar., 2010; Ciocârlan, 2016). U Srbiji se ova biljka koristi još i za jačanje imunskog sistema (Janačković i sar., 2019).

1.5.2. *Hyssopus officinalis* L. (izop)

Hyssopus officinalis L. (Slika 9) je aromatična žbunasta perena visoka od 30-60 cm. Grančice izdanaka su uspravne ili difuzno raspoređene (Chauhan, 1999). U osnovi, izdanak je lignifikovan (Săvulescu i Nyárády, 1961), više ili manje zimzelen, pokriven kratkim dlakama, ređe je bez njih (Diklić, 1974). Listovi su sedeći ili polusedeći (Tutin i sar., 1972), linearni, izduženi ili lancetasti, celi i sjajni (Săvulescu i Nyárády, 1961; Chauhan, 1999). Na svojim vrhovima, listovi su većinom šiljati, nenazubljeni, ravni. Čvrsti su, kožasti, bez istaknutih bočnih nerava, goli. Cvetovi su sa kratkim uspravnim cvetnim drškama, po tri do devet složeni u pazuhu gornjih listova (Diklić, 1974, Chauhan, 1999). Čašica je cevasta, sa mekim dlačicama i zupcima (Săvulescu i Nyárády, 1961; Tutin i sar., 1972). Krunica je plavo-ljubičaste boje, cevasta (Tutin i sar., 1972; Chauhan, 1999). Krunična cev je prava, u vršnom delu proširena, većinom nešto duža od čašice (Diklić, 1974). Gornja usna je kratka, skoro prava, ovalna, na vrhu usečena, spolja pokrivena kratkim dlakama; donja je oko dva puta duža od gornje i trorežnjevita, sa srednjim režnjem koji je razvijeniji od lateralnih (Săvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Prašnika ima četiri, a stubić tučka je duži od prašnika (Diklić, 1974). Orašice su tamno braon boje, uske, elipsaste i glatke, veličine 2-2,5 sa 1-1,5 mm (Săvulescu i Nyárády, 1961; Chauhan, 1999; Moon i sar., 2009).



Slika 9. Morfološke karakteristike biljke *Hyssopus officinalis* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:256_Hyssopus_officinalis_L.jpg

Živi na sušnim, veoma osunčanim stenama i osulinama, na siromašnim pašnjacima, pre svega na krečnjačkoj podlozi. Areal rasprostranjenja joj je od Altaja i Urala, pored Kaspijskog jezera i Crnog mora, u Bugarskoj, Srbiji, Crnoj Gori, Italiji, južnoj Francuskoj i Španiji. U Srbiji se javlja *H. officinalis* subsp. *pilifer* (Gris.) Murb. (Diklić, 1974; Džamić i sar., 2013).

Ekstrakti *H. officinalis* su bogati fenolnim jedinjenjima poput fenolnih kiselina (galna, siringinska, vanilinska, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, rozmarinska, kafena, hlorogena, ferulinska i *p*-kumarinska) i flavonoida (apigenin, luteolin, kvercetin, kvercetin, rutin i katehin) (Zgórka i Głowniak, 2001; Baj i sar., 2011; Hatipoğlu i sar., 2013; Vlase i sar., 2014; Babich i sar., 2021). U etarskom ulju ove biljke se mogu naći terpeni i druga isparljiva jedinjenja poput 1,8-cineola, linalola, sabinola, kamfora, bornil- i mirtenil-acetata, germakrena, α - i β -kariofilena i δ -kadinena (Fathiazad i sar., 2011; Džamić i sar., 2013; Semerdjieva i sar., 2019). Pokazano je da izop ima antibakterijsku, antifungalnu, antioksidativnu, genoprotektivnu, antidijabetičnu i antihemolitičku aktivnost (Letessier i sar., 2001; Kizil i sar., 2010; Alinezhad i sar., 2011; Fathiazad i sar., 2011; Džamić i sar., 2013; Vlase i sar., 2014; Borrelli i sar., 2019). U narodnoj medicini, ova biljka se koristi kao infuzija ili dekokt za lečenje reumatizma, hroničnog bronhitisa, astme i tegoba gastrointestinalnog trakta, a takođe i kao antipiretik, dijaforetik, stimulans, kao i za relaksaciju mišića (Naghbi i sar., 2005; Jarić i sar., 2014).

1.5.3. *Lavandula angustifolia* Mill. (lavanda, despik)

Lavandula angustifolia Mill. (Slika 10) je višegodišnja biljka visine od 20 do 100 cm, od osnove veoma razgranata, sa tankim granama i brojnim sterilnim izdancima (Diklić, 1974). Listovi su celi, linearni, na vrhu šiljati, duž oboda blago uvijeni. Donji listovi su pepeljasti, dok su gornji pepeljasto-zelene boje, u manjoj meri pokriveni dlakama, dok se one gube u kasnijim fazama života biljke (Sāvulescu i Nyárády, 1961). Po četiri do šest cvetova je složeno u pršljenu, pri čemu su tri do četiri međusobno udaljena pršljena grupisana u klasoliku cvast. Brakteje su jajaste, mrke, opnaste, šiljate, kraće od čašice (Diklić, 1974). Čašica je cevasta, pepeljasto ljubičaste boje, sa zupcima, od kojih je jedan više razvijen i on kod mladog cveta pokriva krunicu kao poklopac. Krunica je cevasta, dvousnata, duža od čašice, plavo-ljubičaste boje, sa dlakama i žlezdama. Gornja usna je dvorežnjevita, donja trorežnjevita. Prašnika ima četiri, uzdižu se ispod gornje usne krunice (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Orašice su ovalne, glatke, sjajne, dužine oko 2 mm, svetlo braon boje (Sāvulescu i Nyárády, 1961).

Lavanda raste na kamenjarima u mediteranskoj oblasti. U Evropi je kultivisana kao industrijska, mirisna i dekorativna biljka (Diklić, 1974).

Lekovita svojstva *L. angustifolia* su poznata još iz antičkog doba, kada ih je Dioskorid opisao u svom delu „*De Materia Medica*“ (Prusinowska i Śmigielski, 2014). Pored toga, ova biljka je često predmet savremenih naučnih istraživanja, zahvaljujući čemu je njen hemijski sastav u velikoj meri poznat. Ekstrakti lavande su bogati fenolnim jedinjenjima, dok je njeno etarsko ulje bogato oksidovanim mono- i seskviterpenima. Najčešće prisutne fenolne kiseline u ovoj biljci su galna, vanilinska, sinapinska, *p*-hidroksibenzojeva, 3,4-dihidroksibenzojeva, rozmarinska, kafena, hlorogena, ferulinska, 2- i 4-hidroksicimetna, elagna i *p*-kumarinska kiselina (Duda i sar., 2015; Yadikar i sar., 2017; Stanciu i sar., 2019), dok su najčešći flavonoidi luteolin, naringenin, mircetin, kemferol, rutin, viteksin, hiperozid, apigenin, apigetrin, kvercetin i njihovi derivati (Komes i sar., 2011; Spiridon i sar., 2011; Zhao i sar., 2015; Adaszyńska-Skwirzyńska i Dziecioł, 2017; Yadikar i sar., 2017; Sytar i sar., 2018). Yadikar i sar. (2018) su nedavno otkrili još sedam fenolnih jedinjenja u etil-acetatnom ekstraktu lavande: lavandunat, lavandufurandiol, lavandufluoren, lavandupiron A i B, kao i lavandudifenil A i B. S druge strane, glavni sastojci njenog etarskog ulja su 1,8-cineol, linalol, borneol, terpinen-4-ol, kamfor, linalil acetat, kariofilen, kamfen, lavandulol i lavandulol acetat (Da Porto i sar., 2009; Prusinowska i Śmigielski, 2014). Naučna istraživanja su pokazala da ekstrakti, ali i etarska ulja ove biljke poseduju antioksidativni, antineurodegenerativni, antitumorski i antibakterijski potencijal (Prusinowska i Śmigielski, 2014; Soheili i Salami, 2019). Ova biljka se u narodu koristi za lečenje glavobolja, migrena, depresije, vrtoglavice, bolesti digestivnog sistema, nadimanja i stomaknih spazama (Šarić-Kundalić i sar., 2010). U Srbiji se takođe često upotrebljava protiv nesanice, ali i kao sedativ, analgetik, antimikrobni, antiseptički, karminativni, diuretski i hipotenzivni agens (Šavikin i sar., 2013; Uritu i sar., 2018; Janačković i sar., 2019).



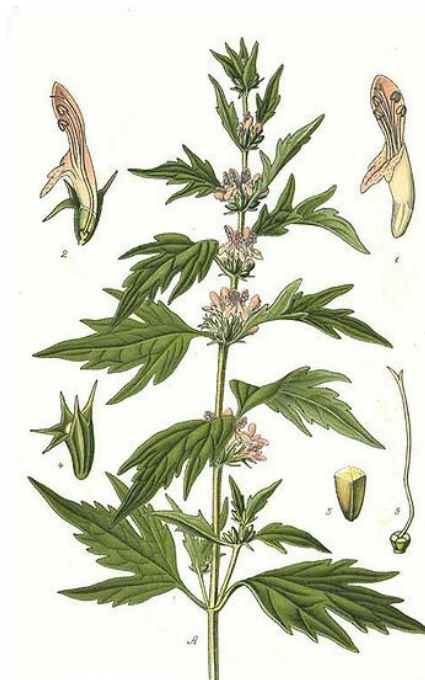
Slika 10. Morfološke karakteristike biljke *Lavandula angustifolia* Mill.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lavandula_angustifolia_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-087.jpg

1.5.4. *Leonurus cardiaca* L. (srdačica)

Leonurus cardiaca L. (Slika 11) je perena sa kratkim rizomom i veoma razvijenim korenom. Izdanak je prav, visok 50-60, a nekad i do 150 cm, četvorougaoonog oblika na preseku, razgranat, u osnovi lignifikovan i pokriven kratkim dlakama, ređe bez njih (Sävulescu i Nyárády, 1961; Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974). Listovi su prstasto deljeni, a mrežasta nervatura je veoma istaknuta. Na licu su više ili manje goli, dok su na naličju pokriveni retkim sivim, mekim dlakama (Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974). Listovi u vreme cvetanja biljke opadaju. Brakteje su nepravilno deljene ili cele. Cvetovi su sedeći, ružičaste boje, retko bele (Sävulescu i Nyárády, 1961), složeni u 10-20 gustih prividnih pršljenova (Diklić, 1974). Čašica je levkasta, gotovo gola, neizraženo dvousnatog oblika i sa pet trouglastih, oštih zubaca. Krunica je duplo duža od čašice, sa belim cilindričnim početnim delom, nekada sa ljubičastim pegama i prstenom dlaka u unutrašnjem delu (Tutin i sar., 1972). Gornja usna je jajastog oblika, blago konveksna i prava, dlakava, dok je donja usna kraća, trorežnjevita, sa srednjim režnjem koji je veći od lateralnih. Prašnici su sa braonkastim anterama, koje su spojene ispod gornje usne cveta. Orašice su izdužene, četvorougaoone, na vrhu pokrivene dlačicama, dužine oko 2,5-3 mm (Sävulescu i Nyárády, 1961).



Slika 11. Morfološke karakteristike biljke *Leonurus cardiaca* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:263_Leonurus_cardiaca_L.jpg

Srdačica živi na osulinama, pored puteva, u živim ogradama, na sušnim pašnjacima, do 1500 m nadmorske visine (Diklić, 1974). Naseljava veći deo Evrope, osim krajnje severnih regiona, ostrva i većeg dela Mediterana (Tutin i sar., 1972).

Literaturni podaci sugerišu da je ova biljka bogata fenolnim kiselinama, poput kafene, kafeoilmalne, hlorogene i ferulinske kiseline, kao i drugim fenolnim jedinjenjima poput apigenina, kvercetina, kvercitrina, rutina, verbaskozida, genkvanina i viteksina. Terpeni, poput ursolne kiseline, leonurida, leokardina, leosibiricina, su takođe nalaženi u ovoj biljci (Wojtyniak i sar., 2012; Flemmig i sar., 2015; Angeloni i sar., 2021; Koshovyi i sar., 2021). Pored toga, iz ove biljke su izolovani pojedini alkaloidi, kao što je leonurin (Kuchta i sar., 2012; Wojtyniak i sar., 2012; Angeloni i sar., 2021). Istraživanja su pokazala da ova biljka poseduje kardio- i neuroprotektivna, antihipertenzivna, antimikrobna, antioksidativna, analgetska i anti-inflamatorna svojstva (Kuchta i sar., 2012; Wojtyniak i sar., 2012). Čaj ove biljke deluje na miokard srca tako što ga jača, olakšava protok krvi kroz koronarne arterije, smanjuje srčane palpitacije (osećaj lupanja srca) i tahikardiju udruženu sa hipertireoidizmom. Takođe se koristi u lečenju digestivnih tegoba, bronhijalne astme, ublažava simptome menopauze i kožnih upala, a ima i sedativni i hipotenzivni efekat (Wojtyniak i sar., 2012).

1.5.5. *Marrubium vulgare* L. (očajnica)

Marrubium vulgare L. (Slika 12) je višegodišnja zeljasta biljka, katkad polužbun visine 40-50 cm. Karakteriše je gorak ukus i neprijatan miris. Stabljika je četvorougaoona na poprečnom preseku, a dok je još uvek mlada, pokrivena je dlakama. Listovi su okruglasti do jajasti (Sävulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Liska je veoma naborana, duž oboda tupo

nazubljena. Kod mladog lista, i na licu i na naličju su prisutne guste bele dlake, dok se kod starijeg lista one vremenom prorade, tako da je lice liske gotovo golo (Diklić, 1974). Gornji listovi su manji, sa kraćim lisnim drškama, široko elipsasti (Săvulescu i Nyárády, 1961). Cvetovi su sa kratkim cvetnim drškama i po 20-50 cvetova složeno je u šest do osam gustih loptastih pršljenova u pazuhu brakteja i međusobno su udaljeni za dužinu brakteja. Brakteole su linearno šiljate, savijene naniže, dužine kao čašica ili nešto kraće, pokrivene gustim i dugačkim dlakama, na vrhu kukaste. Čašica je cevasta, bela, sa 10 šiljatih zubaca, pokrivena zvezdastim i prostim dlakama. (Diklić, 1974). Krunica je bela, pokrivena dlakama. Orašice su tupo trouglaste, glatke i sjajne, sivo-mrke boje, jednoboje ili poprskane tamnijim pegama (Diklić, 1974).

Raste na sušnim pašnjacima, osulinama, siromašnim livadama, pored seoskih puteva i u šikarama. Areal rasprostranjenja se pruža od centralne Azije do Sredozemne oblasti. Naknadno je prenetu u srednju i severnu Evropu, Severnu i Južnu Ameriku, dok je u Srbiji široko rasprostranjena (Diklić, 1974).

Poznato je da je biljka *M. vulgare* veoma bogata fenolnim kiselinama poput rozmarinske, kafene, hlorogene, ferulinske, *p*-kumarinske, 2-hidroksicimetne, siringinske, sinapinske i *trans*-cimetne kiseline, ali i flavonoidima kao što su apigenin, kvercetin, kemferol, verbaskozid i luteolin-7-*O*-glukozid. Takođe, iz ove biljke su izolovani i diterpeni marubenol i marubiin (Boudjelal i sar., 2012; Amessis-Ouchemoukh i sar., 2014a; Shaheen i sar., 2014; Boulila i sar., 2015; Gavarić i sar., 2021). Istraživanja su pokazala da ova biljka ima antimikrobnu, analgetičku, antinociceptivnu, anti-inflamatornu, antioksidativnu, gastroprotektivnu, antidijabetičnu, imunomodulatornu, kao i hipotenzivnu aktivnost budući deluje i vazorelaksantno na krvne sudove (Šarić-Kundalić i sar., 2010; Lodhi i sar., 2017; Rezgui i sar., 2020). U tradicionalnoj medicini se koristi kao antipiretik, za lečenje bronhitisa i za regulaciju menstrualnog ciklusa. Diuretik je, ekspektorans, spazmolitik, holeretik, holagog, kao i sedativni agens (Naghbi i sar., 2005; Šarić-Kundalić i sar., 2010; Uritu i sar., 2018).

1.5.6. *Melissa officinalis* L. (matičnjak)

Melissa officinalis L. (Slika 13) je višegodišnja, zeljasta biljka sa prijatnim, intenzivnim mirisom (Săvulescu i Nyárády, 1961) koji podseća na limun. Posедуje kratak rizom, a razvijaju se i kratke podzemne stolone koje su pokrivene mesnatim donjim listovima. Stabljika je četvorougona, uspravna, visine 30-80, nekad i do 120 cm, pokrivena dlakama. Liska je jajasta do skoro rombična, na vrhu većinom kratko zašiljena, duž oboda većinom nazubljena. Cvetovi su sa kratkom drškom i složeni su po 6-10 u pazuhu listova. Brakteje su duže od cvetova, po obliku su slične listovima stabla. Brakteole su male, jajasto lancetaste, nenazubljene, pri osnovi sužene u vidu drške. Čašica je cevasto zvonasta, dvousnata, sa 10 veoma istaknutih nerava. Pokrivena je mekim proređenim dlakama. Čašična cev je pri osnovi



Slika 12. Morfološke karakteristike biljke *Marrubium vulgare* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Marrubium_vulgare_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-224.jpg

neznatno trbušasto proširena i iskrivljena, sa ledne strane je malo spljoštena. Gornja usna je povijena naviše, široka, odsečena, sa tri vrlo mala zupca; a donja je duža, sa dva lancetasta zupca. Krunica je dvousnata, plavičasto-bela, blede-ljubičasta ili žućkasto-bela, dva puta duža od čašice. Krunična cev je povijena naviše i postepeno se levkasto širi. Prašnika ima četiri i goli su. Antere su bele boje, leže ispod gornje usne krunice, prednje su veće od zadnjih. Stubić je dugačak kao i prašnici, leži ispod gornje usne krunice. Orašice su izduženo jajaste, dužine 1,5-2 mm, kestenjasto-mrke boje (Sävulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974).

Raste na međama, na zidinama, u vinogorju i oko naselja. Rasprostranjena je od istočnog dela sredozemne oblasti, od Italije do Kavkaza, Sirije, Irana, Turkmenistana i jugozapadnog Sibira. U Srbiji se može naći sporadično (Diklić, 1974).

Hemijski sastav ove biljke je detaljno proučen, a u nastavku će biti nabrojani samo neki od najzastupljenijih sekundarnih metabolita. Od fenolnih jedinjenja, u *M. officinalis* su najčešće detektovane fenolne kiseline, kao i flavonoidi. Od fenolnih kiselina najčešće su nalažene: rozmarinska, kafena, hlorogena, ferulinska, galna, sagerinska, elagna, *p*-kumarinska, vanilinska i sinapinska kiselina, dok su apigenin, katehin, rutin, naringin, hesperidin, kvercetin, kemferol i luteolin-7-*O*-glukozid najčešće prisutni flavonoidi (Zgórka i Głowniak, 2001; Lin i sar., 2012; Kamdem i sar., 2013; Duda i sar., 2015; Shakeri i sar., 2016). U etarskom ulju su predominantno prisutni oksidovani monoterpeni (geranial, neral, citronelal i geraniol), dok su među triterpenima najzastupljenije ursolna i oleanolna kiselina (Ntalli i sar., 2010; Shakeri i sar., 2016). Zahvaljujući visokom sadržaju sekundarnih metabolita, pokazano je da ova biljka poseduje značajan biološki potencijal: antimikrobni, antioksidativni, anti-inflamatorni, citotoksični, antitumorski, antivirusni, hipoglikemijski, anksiolitički, antinociceptivni, spazmolitički i neurotropni potencijal. U tradicionalnoj medicini se takođe koristi za lečenje dispepsije, palpitacije, kao ekspektorans i diuretik, a takođe smanjuje i glavobolje (Naghibi i sar., 2005; Shakeri i sar., 2016; García-Risco i sar., 2017). Matičnjak se takođe kao sirup koristi za smirenje, bolove u leđima, pospešivanje digestije, protiv spazama i nesаницe (Šarić-Kundalić i sar., 2010).

1.5.7. *Mentha × piperita* L. (pitoma nana)

Mentha × piperita L. (Slika 14) je višegodišnji hibrid *M. aquatica* i *M. spicata*, sa horizontalnim rizomom, visok 30-100 cm. Stablo se uzdiže od osnove ili je pravo, razgranato, nekada crvenkasto, golo ili sa kratkim, retkim dlakama. Listovi su tamno zelene boje, jajasti do lancetasti, po obodu nejednako oštro nazubljeni, sa dugačkim lisnim drškama, goli ili na naličju sa kratkim dlakama (Sävulescu i Nyárády, 1961). Grane sa cvetovima su organizovane kao uski izduženi klasovi ili subglobularne formacije (Tutin i sar., 1972). Brakteje su uske, bez dlaka. Čašica je cevasta, sa 10 glavnih nerava, u bazi bez dlaka, sa oštrim zupcima i žlezdama.



Slika 13. Morfološke karakteristike biljke *Melissa officinalis* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melissa_officinalis_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizin-al-Pflanzen-094.jpg

Krunica je bez dlaka, gotovo je iste dužine kao i čašica, ljubičasto-ružičaste boje. Prašnici su obično kraći od krunice. Orašice su objajaste, dužine oko 0,75 mm i širine 0,5 mm (Săvulescu i Nyárády, 1961).

Jedinke koje nose manje dlaka na svim organima se često gaje i mogu se naći u prirodi, dok su one sa više dlaka u svom indumentumu nastale spontano tamo gde su prisutne obe roditeljske biljke. Kod njih postoji mnogo veća varijabilnost u obliku listova i granama koje nose cvetove, mirisu i često budu pogrešno klasifikovane kao *Mentha × dumentorum* (Tutin i sar., 1972).

Pitoma nana živi na livadama, pašnjacima i u baštama. Rasprostranjena je u Aziji, istočnoj Evropi, a introdukovana je u Centralnu Evropu (Săvulescu i Nyárády, 1961).

Fitohemijski sastav ovog hibrida je dobro poznat. Pronađeno je da se od fenolnih kiselina u njegovom sastavu nalaze obično rozmarinska, kafena, kafeoihina, hlorogena, ferulinska, galna, elagna, *p*-kumarinska, *p*-hidroksibenzojeva, vanilinska i sinapinska kiselina. Među flavonoidima su najzastupljeniji luteolin i njegovi derivati (luteolin-7-*O*-glukozid i luteolin-*O*-glukoronid), apigenin, katehin i naringin (Zgórka i Głowniak, 2001; Gudzenko, 2013; Kapp i sar., 2013; Mahdavia i Saharkhiz, 2015; Riachi i De Maria, 2015; Pereira i sar., 2016). Jedinjenja poput α -tujona, α - i β -pinena, limonena, 1,8-cineola, kariofilena, mentona, mentola, germakrena D, palmitinske kiseline i β -sitosterola su česta u etarskim uljima pitome nane (Ruiz de Castillo i sar., 2004; Hossain i sar., 2014). *M. piperita* je odličan antifungalni, antibakterijski, antivirusni, insekticidni, antihelminтни, antioksidativni, anti-inflamatorni, neuroprotektivni, hepatoprotektivni, antidijabetični, antitumorski i antialergijski agens (Pérez-González i sar., 2019; Almatroodi i sar., 2021). U tradicionalnoj medicini se od ove biljke pravi čaj koji pospešuje varenje i diurezu, koristi se protiv nadimanja i stomaćnih spazama, astme, kašlja i reguliše menstrualni ciklus. Dekokt ove biljke se koristi za lečenje digestivnih bolesti i nadimanja, kao i za lečenje reumatizma (Šarić-Kundalić i sar., 2010; Alexa i sar., 2018).

1.5.8. *Ocimum basilicum* L. (bosiljak)

Ocimum basilicum L. (Slika 15) je jednogodišnja biljka sa uspravnim stabljikama, visoke 20-60 cm (Săvulescu i Nyárády, 1961), većinom busenasto razgranate, najčešće bez dlaka, ređe gušće pokrivena dlakama. Listovi su jajasti do skoro rombični. Na vrhu su šiljati, celog oboda, grubo do proređeno testerasto nazubljeni. Kod mnogih vrtnih formi listovi su goli, sa tri do sedam pari lučno povijenih bočnih nerava. Cvetovi imaju kratku cvetnu dršku, i većinom ih je po šest složeno u prividne pršljenove, postavljene jedan iznad drugog na rastojanju dužine brakteja. Čašica je jajasta, dvousnata, zelena, sa veoma istaknutom mrežastom nervaturom. Više ili manje je pokrivena dlakama. Čašična cev je vrlo kratka, sa skoro okruglom, nedeljenom gornjom usnom, dok je donja nešto duža, deljena na četiri lancetasta režnja. Krunica je crvenkasta ili žućkasto-bela. Krunična cev je kratka, zatvorena u čašici. Gornja usna je široka, tupa, deljena u četiri režnja, dok je donja nešto duža, neznatno



Slika 14. Morfološke karakteristike biljke *Mentha × piperita* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mentha_%C3%97_piperita_-_K%C3%B6hler%20%80%93s_Medizinal-Pflanzen-095.jpg

ispupčena, katkad slabo nazubljena, pravo ispružena. Prašnici leže na donjoj usni krunice (Diklić, 1974), slabo su uzdignuti na gore (Sävulescu i Nyárády, 1961). Orašica ima četiri, jajastog su oblika, dugačke 1,5-2 mm, tamno mrke do crne boje (Diklić, 1974). U vlažnoj sredini dolazi do pojave miksokarpije (Nazir i Wani, 2021).

Bosiljak raste u severnoj Indiji, južnoj Aziji i severoistočnoj Africi, kao i u tropskom delu Amerike, a kultivisan je u umerenoj zoni obe hemisfere (Diklić, 1974).

Hemijska karakterizacija ove biljke je pokazala da su fenolna jedinjenja zastupljena u visokom procentu, ali takođe ima i visok sadržaj mono- i seskviterpena (Dev i sar., 2011). Među fenolnim kiselinama su najčešće identifikovane rozmarinska, kafena, hlorogena, ferulinska, galna, protokatehinska, *p*-hidroksibenzojeva, *p*-kumarinska, siringinska, 2,5-dihidroksibenzojeva i vanilinska kiselina (Zgórka i Głowniak, 2001; Kivilompolo i Hyötyläinen, 2007; 2009; Elansary i sar., 2020a). Ipak, na osnovu pretrage literature se može zaključiti da je hemijski sastav etarskog ulja ove biljke intenzivnije izučavan u odnosu na ekstrakte. U etarskom ulju je predominantno zastupljen linalol, kao i 1,8-cineol, mada su prisutni i kamfor, β -sitosterol, kao i palmitinska, linolna i linoleinska kiselina (Ismail, 2006; Filip i sar., 2014; Kadan i sar., 2016). Do sada je potvrđeno da bosiljak ima antimikrobnu, antioksidativnu, anti-inflamatornu, citotoksičnu, antiproliferativnu, antihipertenzivnu, vazorelaksantnu, anksiolitičku, sedativnu i hipoglikemijsku aktivnost (Naghbi i sar., 2005; Berić i sar., 2008; Miraj i Kiani, 2016; Elansary i sar., 2020a). U narodnoj medicini se čaj od bosiljka koristi protiv zapaljenja uha i prehlade, bubrežnih oboljenja (Šarić-Kundalić i sar., 2010) i upala urinarnog trakta. Diuretik je i ekspektorans, a koristi se i kao sedativ (Naghbi i sar., 2005; Miraj i Kiani, 2016).



Slika 15. Morfološke karakteristike biljke *Ocimum basilicum* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ocimum_basilicum_Blanco2.407-cropped.jpg

1.5.9. *Origanum majorana* L. (slatki majoran)

Origanum majorana L. (Slika 16) je jednogodišnja, dvogodišnja ili višegodišnja zeljasta biljka, sa karakterističnom aromom. Raste u obliku polužbuna visine 20-60 cm. Stabljika je uspravna, četvorougona na poprečnom preseku, razgranata, (Garland, 2004), tanka, dlakava, zelena sa crvenim pegama (Vasudeva, 2015). Listovi su naspramni, beličasto-sive do zelene boje, široki, elipsasto jajasti, donji nešto izduženiji, na vrhovima tupi ili zašiljeni, okrugli do tanji u bazi, prekriveni žlezdanim dlakama (Hedge, 1972; Garland, 2004). Brakteje su sivo-zelene boje, ljuspaste. U pazuhu brakteja se nalazi po dva petočlana, sitna cveta bele ili blede roze boje (Sävulescu i Nyárády, 1961; Hedge, 1972). Cvetovi su u prirodi hermafroditni (Vasudeva, 2015). Čašica je redukovana na jedan objajasti list tako što su se dva donja čašična listića redukovala, a tri gornja su srasla. Krunica je dvousnata, bela, blede ljubičasta ili crvenkasta, sa više ili manje jednakim režnjevima (Sävulescu i Nyárády, 1961). Plod je orašica veličine 0,75-1 mm, glatka, jajasta, svetlo braon boje (Sävulescu i Nyárády, 1961; Hedge, 1972).

Slatki majoran raste u severnoj Africi, južnoj i zapadnoj Aziji, južnoj Evropi i Mediteranu, a u ostalim delovima sveta se gaji. U veoma toplim krajevima biljka živi više od dve godine, dok je u hladnijim krajevima jednogodišnja. Uzgaja se u vrtovima (Deans i Svoboda, 1990), ali je osetljiva na hladnoću i mraz (Vasudeva, 2015).

Nadzemni deo slatkog majorana je aromatičan. Nađeno je da su fenolne kiseline poput rozmarinske, hlorogene, kafene, kaftarne, ferulinske, galne, *p*-kumarinske, 2-hidroksicimetne, protokatehinske, *p*-hidroksibenzojeve, 2,5-dihidroksibenzojeve, siringinske i vanilinske kiseline u visokom procentu prisutne u ovoj biljci. Takođe, u ovoj biljci su česti i flavonoidi luteolin i luteolin-7-*O*-glukozid, rutin, hesperetin, apigenin, amentoflavon, naringin, naringenin, diosmetin, katehin, kemferol i kvercetin, a nađeni su i kumarini (Zgórka i Głowniak, 2001; Sellami i sar., 2009; Hossain i sar., 2011; Roby i sar., 2013; Bina i Rahimi, 2017; Sharifi-Rad i sar., 2020). Takođe, diterpenski fenoli, poput karnozinske kiseline i karnozola, kao i triterpen ursolna kiselina su u velikoj meri prisutni u ovoj biljci (Vági i sar., 2005; Bina i Rahimi, 2017). Istraživanja su pokazala da ova biljka ima visok antioksidativni, antiproliferativni, antitumorski, anti-inflamatorni, antimikrobni, neuro-, kardio- i hepatoprotektivni potencijal (Bina i Rahimi, 2017; García-Risco i sar., 2017; Aseyd Nezhad i sar., 2019; Sharifi-Rad i sar., 2020). Majoran se koristi kao terapijsko sredstvo i začim, a od listova se može praviti salata. U lekovite svrhe se beru cvetovi ili cela biljka za vreme cvetanja. Njegov miris i ukus je doprineo da bude cenjen u antičkoj Grčkoj i Rimu, gde se od ove biljke pravilo vino (Meyers, 2005). U Srbiji se u narodnoj medicini koristi svež ili kao infuz protiv upale grla, pneumonije i kao sedativ (Janačković i sar., 2019).



Slika 16. Morfološke karakteristike biljke *Origanum majorana* L.

Izvor:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Icones_plantarum_medico-oeconomico-technologiarum_cum_earum_fructus_ususque_descriptione_%3D_\(Tab._122\)_\(8096970445\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Icones_plantarum_medico-oeconomico-technologiarum_cum_earum_fructus_ususque_descriptione_%3D_(Tab._122)_(8096970445).jpg)

1.5.10. *Origanum vulgare* L. (vranilovka, vranilova trava)

Origanum vulgare L. (Slika 17) je višegodišnja zeljasta biljka. Rizom je horizontalan, sa podzemnim stolonama i mnogobrojnim končastim korenovima. Izdanak je uglavnom snažan, aromatičan, tamnozeleno boje, često purpurno-ljubičast do mrko-crven. Stabljika samo pri osnovi delimično leži na zemlji, ostalim delom je uspravna, kruta i visoka 20-50, nekad i do 80 cm. Sa donjih nodusa, iz pazuha listova polaze kratki sterilni izdanci, a sa gornjih nodusa – cvasti. Listovi su sa lisnom drškom. Liska je jajasta, nenazubljena ili nejasno nazubljena. Pri osnovi je jasno sužena u dršku, na vrhu uglavnom tupa, sa dva do pet pari lučno savijenih bočnih nerava. Brakteje su najčešće sedeće, jajaste (Săvulescu i Nyárády, 1961; Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974), često purpurne. Cvetovi su sa kratkom cvetnom drškom. Čašica je zvonasta, nešto kraća od brakteja. Čašična cev je levkasta, spolja većinom gola, dok se u zdrelu nalaze dugačke dlake. Ima 13 slabo istaknutih nerava. Čašični zupci, kojih ima pet, su za polovinu kraći od cevi, trouglasti. Krunica je dvousnata, cevasta, svetlo jarko crvene do tamno crvene boje. Krunična cev je uočljivo duža od čašice. Stubić dužinom nadmašuje prašnike i ima

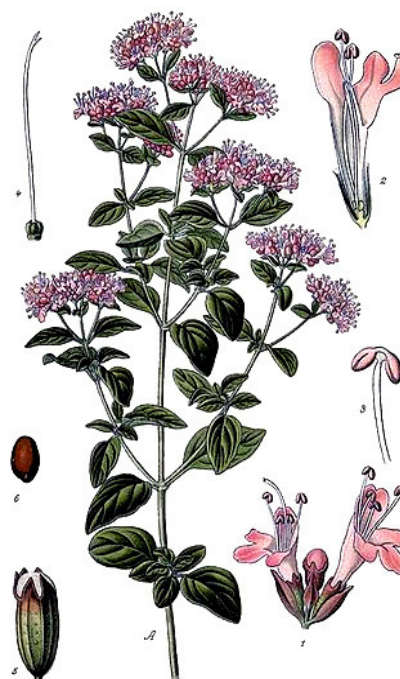
neznatno nejednake režnjeve žiga. Orašice su izduženo jajastog oblika, dužine oko 1 mm, glatke, mrke boje (Săvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974).

Vranilovka živi na sušnim obroncima, livadama, u svetlijim listopadnim šumama, šikarama, na šumskim proplancima, do 2000 m nadmorske visine. Rasprostranjena je u Evropi i Aziji (Săvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Prirodno stanište vranilovke u Srbiji predstavljaju brdsko-planinske oblasti, a njeno sakupljanje iz prirode je zakonom ograničeno (Popović i sar., 2010).

O. vulgare je bogat fenolnim jedinjenjima, posebno fenolnim kiselinama i flavonoidima kao što su: rozmarinska, kafena, kafeoilhina, hlorogena, cimetna, galna, *p*-kumarinska, 2,5-dihidroksibenzojeva, protokatehinska, vanilinska i sinapinska kiselina; hiperozid, luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid, luteolin-*O*-glukuronid, rutin, apigenin, naringin, kvercetin, kvercitrin i kemferol (Kulišić i sar., 2006; Kivilompolo i Hyötyläinen, 2007; 2009; Hossain i sar., 2011; Miron i sar., 2011; Martins i sar., 2014; Oniga i sar., 2018). Zahvaljujući širokom opsegu jedinjenja nađenih u ovoj biljci, ona ispoljava veliki broj bioloških aktivnosti, poput antioksidativne, antiproliferativne, citotoksične, antitumorske, vazoprotektivne, hepatoprotektivne, antidijabetične, anti-inflamatorne, imunomodulatorne i antimikrobne aktivnosti, kao i aktivnost u zarastanju rana (Han i Parker, 2017; Pezzani i sar., 2017; Oniga i sar., 2018; Sharifi-Rad i sar., 2020). Njena lekovita svojstva su odavno poznata – čak ju je Plinije Stariji opisao kao odličan lek za poboljšanje varenja, dok su je drevni Egipćani takođe koristili u lečenju, ali i za dezinfekciju (Popović i sar., 2010). U današnje vreme, vranilovka se koristi kao čaj za lečenje gastrointestinalnih i respiratornih bolesti, nesаницe, prehlade, bronhitisa, reumatizma, glavobolje, kao antiseptik i diuretik, a u Srbiji se takođe koristi i za lečenje infekcija urinarnog trakta (Naghibi i sar., 2005; Šarić-Kundalić i sar., 2010; Šavikin i sar., 2013; Jarić i sar., 2014).

1.5.11. *Rosmarinus officinalis* L. (sinonim *Salvia rosmarinus* Spenn., ruzmarin)

Rosmarinus officinalis L. (Slika 18) je zimzelen, veoma aromatičan žbun. Stablo je sive boje, kao i grane, veoma je razgranato, visine 60-150 cm (Săvulescu i Nyárády, 1961). Mlade grane su tupo četvorougane na preseku, prekrivene dlakama. Listovi su dekusirani, pazušno se razvijaju kratki bočni izdanci sa cvetovima, blede do tamno zelene boje, pokriveni pojedinačnim, vrlo sitnim zvezdastim dlakama (Săvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Na naličju listova se uočava veoma razvijeni srednji nerv (Săvulescu i Nyárády, 1961). Po 5-10 cvetova je složeno na vrhu kratkih bočnih izdanaka u pazuhu listova. Cvetovi su sedeći ili sa kratkom cvetnom drškom. Cvetne drške, kao i linearne brakteole su gusto pokrivenive sivim dlakama. Čašica je dvousnata, zvonasta, sa 8-12 nerava, mrko-zelena, siva. Gornja usna je konkavna, sa tri kratka zupca, dok je donja dvorežnjevita. Krunica je dvousnata, plavoljubičasta, ređe bela, spolja pokrivena proređenim dlakama. Krunična cev je kratka, nešto duža od čašice. Gornja usna je neznatno unazad povijena, na vrhu duboko urezana. Donja usna



Pl. 234. *Origan vulgare*. *Origanum vulgare* L.

Slika 17. Morfološke karakteristike biljke *Origanum vulgare* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:254_Origanum_vulgare_L.jpg

je nešto duža od gornje, trorežnjevita, sa srednjim režnjem koji je veliki, konkavan, nazubljen, pri osnovi gotovo sužen u dršku, naniže oboren. Kao i kod vrste *Salvia officinalis*, prašnika ima dva i mnogo su duži od gornje usne krunice. Plodnik je duboko četvororežnjevit (Diklić, 1974). U bazi plodnika se nalazi disk sa nektarijama (Sävulescu i Nyárády, 1961). Stubić je dugačak, visoko postavljen. Orašice su obrnuto jajaste, dugačke 1,5-2 mm, glatke, braon boje (Diklić, 1974).

Pre razvoja molekularne filogenetike, grane filogenije koja proučava genetičke, nasledne razlike prevashodno u genomskoj sekvenci sa ciljem dobijanja informacija o evolucionim odnosima između različitih organizama, primarni kriterijum klasifikacije organizama je bila morfološka sličnost (Yang i Rannala, 2012). Međutim, razvoj molekularne biologije je u velikoj mjeri uticao i na razvoj znanja na polju evolucije, samim tim i sistematike. Zahvaljujući Karlu Lineu, žalfija i ruzmarin su od 1753. godine klasifikovani u dva različita roda budući da između njih postoje uočljive morfološke razlike. Međutim, 2017. je pokazano da je *R. officinalis* L. jednako srodan *S. officinalis* L. kao i druge vrste roda *Salvia*, zbog čega je urađena reklasifikacija ovog roda, a ruzmarinu je promjenjen naziv u *Salvia rosmarinus* Spenn. (Drew i sar., 2017; Roma-Marzio i Galasso, 2019).

Ruzmarin naseljava makiju sredozemne oblasti, gde često raste kao žbun. Budući da je značajna začinska biljka, gaji se u vrtovima i baštama, dok na osunčanim stenovitim obalama Mediterana raste spontano (Sävulescu i Nyárády, 1961). Areal rasprostranjenja ove biljke je južna Evropa, od južne Francuske do Grčke, zapadna obala Male Azije i severna Afrika. U Srbiji se često gaji u vrtovima (Diklić, 1974).

Najčešća identifikovana grupa jedinjenja u ruzmarinu su polifenolna jedinjenja, posebno fenolne kiseline poput rozmarinske, kafene, hlorogene, ferulinske, galne, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzojeve, siringinske i vanilinske kiseline (Zgórka i Głowniak, 2001; Kivilompolo i Hyötyläinen, 2007; 2009; De Macedo i sar., 2020). Takođe, flavonoidi poput eriocitrina, apigenina, luteolin-7-*O*-glukozida i luteolin-3'-*O*-β-D-glukuronida, hispidulina, hesperidina, diosmina i genkvanina, kao i neki terpeni karnozol, betulinska, oleanolinska, ursolna i karnozinska kiselina su često identifikovani u listovima, cvetovima, stablu i korenu ruzmarina (Hossain i sar., 2011; Kontogianni i sar., 2013; De Macedo i sar., 2020). Zahvaljujući bogatom sastavu sekundarnih metabolita, ruzmarin ispoljava veliki broj bioloških aktivnosti: antioksidativna, antibakterijska, antivirusna, anti-inflamatorna, antispazmodijska, diuretična, hiperglikemijska i hemopreventivna aktivnost, kao i efekat inhibicije oslobađanja insulina i aktivnost u zarastanju rana (Andrade i sar., 2018; Pérez-González i sar., 2019; De Macedo i sar., 2020). Od ruzmarina se u narodnoj medicini pravi čaj za lečenje anemije, migrene, reumatizma, rana, osipa, dispepsije, problema sa cirkulacijom, kao i za smirenje, a koristi se i kao antiseptik. Diuretik je, holagog i analgetik (Naghbi i sar., 2005; Šarić-Kundalić i sar., 2010).



Slika 18. Morfološke karakteristike biljke *Rosmarinus officinalis* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosmarinus_officinalis_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-258.jpg

1.5.12. *Salvia officinalis* L. (žalfija)

Salvia officinalis L. (Slika 19) je polužbun čiji izdanak leži na zemlji ili se izdiže i veoma je razgranat. Kora grana je sivo mrka i ljušti se. Izdanak je zelene boje, bez sjaja, više ili manje je prekriven belim dlakama. Stabljika je uspravna ili se izdiže, visoka 20-70 cm, dobro razvijena, na poprečnom preseku je gotovo okrugla. U donjem delu je ljubičaste boje, većinom gusto pokrivena belim dlakama. Iz pazuha listova obično polaze kratki sterilni bočni izdanci. Listovi su delimično zimzeleni i čvrsti. Liska je izduženo jajasta do lancetasta, ređe elipsasta. Nenazubljena je ili duž celog oboda vrlo fino tupo nazubljena. Mladi list je gusto pokriven sivim dlakama, a kasnije, posebno na licu, one se gotovo u potpunosti gube. Stariji listovi su fino naborani, sa perasto-mrežastom nervaturom. Brakteje su jajaste, na vrhu oštro šiljate. U vršnom delu, brakteje su zeljaste, pri osnovi više ili manje opnaste, otpadaju pre zrelosti biljke (Diklić, 1974). Šest do 20 cvetova je složeno u šest do osam pršljenova postavljenih jedan iznad drugog, koji su razmaknuti najmanje za dužinu cveta. Čašica je cevasto zvonasta, zelena ili katkad ljubičasta, sa 15 nerava, između kojih je duboko izbrazdana. Duž nerava i oboda je prekrivena kratkim dlakama, skoro do sredine je podeljena na dve podjednako dugačke usne. Krunica je svetlo ljubičaste boje, ređe bela, oko 2,5 puta duža od čašice. Krunična cev je prava i postepeno se širi na vrhu. Karakteristično za ovaj rod jeste postojanje dva prašnika. Orašice su gotovo loptaste, veličine 2-3 mm, glatke, mrke boje (Sävulescu i Nyárady, 1961; Diklić, 1974).

Žalfija raste na sušnim, krečnjačkim, kamenitim površinama. Rasprostranjena je u mediteranskom delu južne Evrope, od Španije do severnih Balkanskih zemalja, Male Azije, severne Sirije. Kultivisana je u celoj Evropi i Severnoj Americi (Diklić, 1974). U Srbiji se može naći u prirodi, ali se takođe i kultiviše (Stojanović i sar., 2015).

Žalfija je bogat izvor fenolnih kiselina, poput sagerinske, salvianolske, rozmarinske, kafene, kafeoilhine, hlorogene, ferulinske, cimetne, galne, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzojeve, vanilinske i siringinske kiseline. Takođe, bogata je flavonoidima kao što su luteolin, luteolin-7-*O*-glukozid i luteolin-*O*-glukuronid, rutin, mircetin, apigenin, naringin, hispidulin i kvercetin (Zgórka i Głowniak, 2001; Kivilompolo i Hyötyläinen, 2007; 2009; Roby i sar., 2013; Martins i sar., 2015; Sharma i sar., 2019; Alimpić Aradski i sar., 2021). Pored nabrojanih jedinjenja, žalfiju karakterišu još i sagekumarin (trimer kafene kiseline), eskuletin, karnozol, karnozinska, betulinska, oleanolinska i ursolna kiselina (Lu i sar., 1999; Roby i sar., 2013; Martins i sar., 2015; Matos i sar., 2015; Jakovljević Kovač i sar., 2021). Potvrđene su njene brojne farmakološke aktivnosti, uključujući antibakterijsku, antioksidativnu, antineurodegenerativnu, anti-inflamatornu, antinociceptivnu, antitumorsku, hipoglikemijsku, antidijabetičnu, hipolipidemijsku i antimutagenu aktivnost (Vuković-Gačić i sar., 2006; Ghorbani i Esmaeilzadeh, 2017; Sharma i sar., 2019; Jakovljević Kovač i sar., 2021). U narodnoj medicini se čaj od žalfije koristi protiv upale grla, gripa, kašlja, stomaćnih bolova i spazama, infekcija urinarnog trakta i crvenila na koži. Takođe se koristi za lečenje bolesti jetre



Slika 19. Morfološke karakteristike biljke *Salvia officinalis* L.

Izvor:

<https://www.flickr.com/photos/biodivlibrary/6972241336/>.

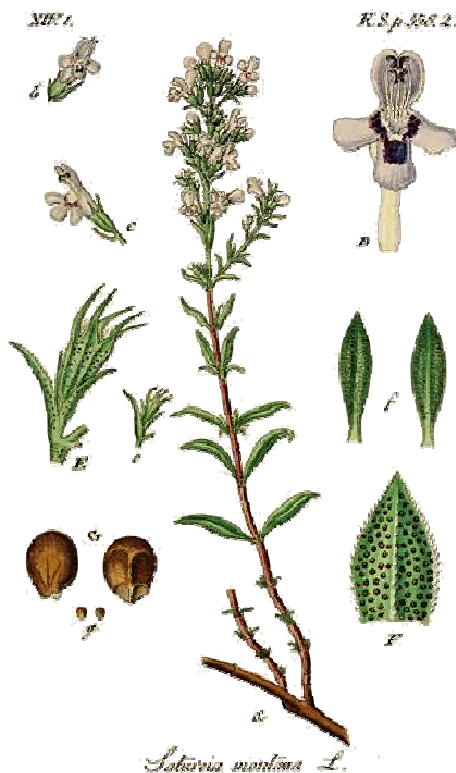
i kamena u bubrezima. Dekokt se koristi za čišćenje krvi, stomaćnih bolova i bolova u grlu, dok se tinktura koristi za smirenje i lečenje nesanic (Šarić-Kundalić i sar., 2010).

1.5.13. *Satureja montana* L. *sensu lato* (čubur)

Satureja montana L. (Slika 20) *sensu lato* je žbunasta biljka sa snažnim, vretenastim korenom. Grane su uspravne ili se izdižu, visoke su do 50 cm, na poprečnom preseku tupo četvorougane, skoro okrugle, veoma odrvenele. Izdanak je skoro go, blede zelen, u gornjem delu često ljubičaste boje. Listovi su uzano do linearno lancetasti, ravni, nenazubljeni, više ili manje oštro šiljati, bez jasno izdvojene drške i istaknutih bočnih nerava. Kožasti su, svetlo istačkani, na naličju duž oboda pokriveni dlakama ili goli. Po tri do pet cvetova je složeno na zajedničkoj dršci u pazuhu gornjih listova stabla. Čašica je kratko cevasto levkasta. Čašična cev ima 10 nejasno istaknutih nerava, a čašični zupci su šiljati na vrhu. Krunica je bela, ređe ružičasta ili ljubičasta. Krunična cev je duža od čašice, zatvorena u čašici, u vršnom delu veoma proširena. Gornja usna krunice je okruglasta, ravna, donja nešto duža, trorežnjevita, purpurno istačkana. Srednji režanj je objajast, većinom neznatno nazubljen, dok su bočni okruglasti. Prašnici leže ispod gornje usne krunice, goli su, a poluantere stoje skoro pod pravim uglom. Plodići su okruglasto jajasti, dugački 10-15 mm, svetlo mrki, vrlo fino istačkani (Diklić, 1974).

Ova biljka živi na sušnim staništima, veoma toplim krečnjačkim kamenjarima i pašnjacima mediteranskog i submediteranskog tipa. Rasprostranjena je u Alžiru, Portugalu, Španiji, južnoj Francuskoj, severnoj i srednjoj Italiji, na Balkanskom poluostrvu, Ukrajini i južnoj Rusiji do Kavkaza (Diklić, 1974). Novija sistematska istraživanja tretiraju *S. montana sensu stricto* isključivo populacije koje na Balkanskom poluostrvu rastu od planine Tare na zapad i jug, dok se populacije koje rastu u istočnoj Srbiji, jugozapadnoj Rumuniji i zapadnoj Bugarskoj tretiraju kao *Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Heuff. (Dodoš i sar., 2019).

U literaturi postoji veliki broj podataka o fitohemijskom sastavu ove biljke, međutim do sada je pretežno analiziran sastav njenog etarskog ulja, pri čemu su *p*-cimen, terpinen, linalol, borneol, timol, kariofilen i karvakrol najčešće identifikovana jedinjenja (Vidović i sar., 2014; Maccelli i sar., 2020). U ekstraktima ove biljke su najčešće prisutne fenolne kiseline, i to posebno galna, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, hlorogena, vanilinska, kafena, kafeoilhina, siringinska, sinapinska, salicilna, rozmarinska i ferulinska, kao i sledeći flavonoidi: luteolin, luteolin-*O*-glukuronid, rutin, apigenin i kemferol (Ćavar Zeljković i sar., 2015; Gião i sar., 2012; López-Cobo i sar., 2015). Najčešće je ispitana njena antimikrobna aktivnost (kako antibakterijska, tako i antifungalna), međutim utvrđeni su i njeni antioksidativni, antineurodegenerativni, antitumorski, antiproliferativni i citotoksični efekti (Serrano i sar.,



Slika 20. Morfološke karakteristike biljke *Satureja montana* L.

Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Satureja_montana_-_Deutschlands_flora_in_abbildungen_nach_der_natur_-_vol._20_-_t._17.jpg

2011; Marin i sar., 2012; Mihajilov-Krstev i sar., 2014; Čavar Zeljković i sar., 2015; Elgndi i sar., 2017; Vitanza i sar., 2019; Vladić i sar., 2020). Od ove biljke se u narodnoj medicini pravi čaj za lečenje anemije i čišćenje krvi (Šarić-Kundalić i sar., 2010). Ranije su opisana njena antiseptična, aromatična, karminativna, digestivna i ekspektorantna dejstva, a takođe se koristi i za tretiranje uboda insekata (Pérez-González i sar., 2019).

1.5.14. *Sideritis scardica* L. (šarplaninski čaj)

Sideritis scardica L. (Slika 21) je jednogodišnja biljka sa slabo razgranatom stabljikom koja je visoka 20-30 cm i pokrivena gustim dlakama. Listovi su elipsasti ili lancetasti, sa kratkom lisnom drškom. Gornji listovi su više ili manje sedeći, celog oboda, jedino na vrhu liske sa nekoliko trnolikih sitnih zubaca. Cvetovi imaju kratku čvrstu dršku, većinom ih je po šest složeno u pazuhu listova. Čašica je čvrsta, cevasto zvonasta, sa 10 istaknutih nerava i pokrivena dugačkim dlakama. Krunica je mala, svetložute boje, a kada je procvetala ili suva postaje mrka. Gornja usna krunice je prava, cela ili na vrhu neznatno usečena i zasvođena, dok je donja trorežnjevita, sa vrlo malim bočnim režnjevima. Prašnici su skriveni u krunici. Plodići su dugački oko 1,5 mm, jajasto trouglastog oblika, sivomrke boje, na zaobljenoj površini rupičavi, na ostalim delovima glatki (Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974).



Slika 21. *Sideritis scardica* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sideritis_scardica.jpg

Biljka raste na sušnim, siromašnim livadama, pašnjacima, kamenjarima, na peskovitim staništima, često i u usevima. Zastupljena je u mnogim asocijacijama na oskudnom, toplom sušnom zemljištu. Rasprostranjena je u Evropi, Sredozemlju, centralnoj i jugozapadnoj Aziji i severnoj Africi (Diklić, 1974), mada se ipak smatra endemičnom vrstom Balkana (Ognyanov i sar., 2021). Na Balkanu je rasprostranjena u Srbiji (na pojedinim lokalitetima Šar planine), Albaniji, Bugarskoj, Severnoj Makedoniji, Grčkoj i Turskoj (Petrova i Vladimirov, 2010).

Literaturni podaci o fitohemijskom sastavu ove biljke su relativno oskudni, mada je pokazano da su među isparljivim komponentama *S. scardica* u najvećem procentu zastupljeni diterpeni (Karapandzova i sar., 2013) i oksidovani monoterpeni (Tadić i sar., 2012a), u zavisnosti od lokaliteta sa kog je uzorkovan biljni materijal. S druge strane, nađeno je da ekstrakti ove biljke sadrže protokatehinsku, *p*-hidroksibenzojevu, hlorogenu, vanilinsku, kafenu, siringinsku, *p*-kumarinsku, ferulinsku i cimetnu kiselinu, izoskutelarein i njegove derivate, hipoletin, apigenin, lavandulifoliozid i verbaskozid (Janeska i sar., 2007; Tsibranska i sar., 2011; Irakli i sar., 2018), a česte su i masne kiseline poput palmitinske i laurinske kiseline (Tadić i sar., 2012a). Opisane su njene biološke aktivnosti, između ostalog, antioksidativna, anti-inflamatorna, gastroprotektivna, citotoksična i antimikrobna, kao i diuretična i analgetska svojstva (Tadić i sar., 2012b; Irakli i sar., 2018; Uritu i sar., 2018). Takođe, u narodnoj medicini se od nadzemnih delova ove biljke pravi dekoka, koji se koristi za lečenje bronhitisa, kašlja, prehlade i gripa (Kültür, 2007).

1.5.15. *Teucrium chamaedrys* L. (podubica)

Teucrium chamaedrys L. (Slika 22) je polužbun prijatnog mirisa i gorkog ukusa. Koren je delimično drvenast, a razvijaju se i podzemne stolone. Stabljika je uspravna, razgranata, crvenkaste boje, okrugla na poprečnom preseku, pokrivena dugačkim sivim dlakama. Listovi su sa kratkom lisnom drškicom, gusto raspoređeni na stablu, rombično jajasti do elipsasti. Naličje liske je svetlije, sa istaknutom perastom nervaturom. Cvetovi stoje uspravno na srazmerno dugačkim drškama, po dva do šest ih je složeno u pazuhu brakteja. Čašica je cevasto zvonasta, često crveno-ljubičaste boje, pokrivena kratkim dlakama. Čašičnih zubaca ima pet, trouglasti su i duž oboda dlakavi. Krunica je većinom bledo crvena, ređe bela. Donja usna krunice je pokrivena dlakama, srednji režanj većinom okrugao, bočni su šiljati i savijeni naviše. Prašnici i stubić dužinom daleko nadmašuju krunicu. Plodići su jajasti, dugački 1,5-2 mm (Šävulescu i Nyárády, 1961; Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974).

Podubica živi na sušnim kamenjarima, naročito na krečnjaku, na pašnjacima, u svetlim hrastovim i borovim šumama, na osulinama, livadama i drugim mestima. Rasprostranjena je u srednjoj Aziji, Sredozemnoj oblasti, zapadnoj Aziji i severnoj Africi (Diklić, 1974). U Srbiji je najčešće nalažen predstavnik roda *Teucrium* i to na kamenitim, krečnjačkim ili peskovitim površinama, pri čemu je zabeleženo da može da naseljava širok opseg nadmorskih visina – od ravnica do 1.500, a nekada čak i do 2.100 m n.v. (Lakušić i sar., 2010).

Ranija istraživanja su pokazala da je etarsko ulje podubice sa teritorije Crne Gore bogato pre svega *trans- α* -bergamotonom, germakrenom D, kariofilen oksidom, α -pinenom i limonenom-(Kovačević i sar., 2001), dok ulje ove biljke poreklom iz Turske pored nabrojanih jedinjenja sadrži i velike količine β -kariofilena, δ -kadinena i biciklogermakrena (Bagci i sar., 2010). Fitohemijaska analiza je pokazala da su nadzemni delovi ove biljke bogati flavonoidima i fenolnim kiselinama, poput izokvercitrina, kvercitrina, rutina, luteolina i *p*-kumarinske kiseline (Vlase i sar., 2014), kao i terpenima (Hao i sar., 2013). Takođe, analizom hemijskog sastava ekstrakata je ustanovljeno da je *T. chamaedrys* bogat izvor sekundarnih metabolita poput teukrina A, dihidroteugina, teukroksida, sispirensina A, verbaskozida, teurinozida, kao i teuhamedrina D (Elmastas i sar., 2015). Istraživanja su pokazala da ova biljka poseduje antioksidativni, antimikrobni, anti-inflamatorni, analgetski, genotoksični i antimutageni potencijal (Pourmotabed i sar., 2010; Stanković i sar., 2010; Milošević-Đorđević i sar., 2013; Vlase i sar., 2014; Faiku i sar., 2019). U narodnoj medicini se čaj od podubice koristi za lečenje spazama i dijareje (Šarić-Kundalić i sar., 2010), kamena u mokraćnoj bešici i dispepsije. Pokazano je da ingestija infuza ove biljke dovodi do pozitivnog efekta u lečenju akutnog hepatitisa (Naghibi i sar., 2005). S druge strane, u Srbiji se koristi kao antipiretik i za lečenje digestivnih tegoba (Šavikin i sar., 2013; Jarić i sar., 2014).



Slika 22. Morfološke karakteristike biljke *Teucrium chamaedrys* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Teucrium_chamaedrys_-_English_botany,_or,_Coloured_figures_of_British_plants_-_vol._7_-_t._1094.jpg

1.5.16. *Teucrium montanum* L. (trava iva)

Teucrium montanum L. (Slika 23) je višegodišnja biljka sa snažnim, vretenastim korenom (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Stabljika sa granama je tanka, visine 5-25 cm, na poprečnom preseku okrugla, sivomrka. Listovi su nenazubljeni, duž oboda uvijeni. Lice lista je tamno zeleno, glatko ili gusto pokriveno dlakama, dok je naličje uvek gusto pokriveno belim dlakama (Diklić, 1974). Brakteje liče na listove (Tutin i sar., 1972). Cvetovi su sa kratkom cvetnom drškom, grupisani po jedan do tri u pazuhu listova. Čašica je cevasto zvonasta, pri osnovi neznatno trbušasto proširena, sa pet više-manje jednakih zubaca. Krunica je žućkasta, oko dva puta duža od čašice. Krunična cev je iste dužine ili nešto duža od čašice, u vršnom delu je proširena. Srednji režanj donje usne je jajast, ceo ili na vrhu neznatno urezan, više ili manje nazubljen, povijen naniže. Prašnici su duži od krunice, prašnice su žute do ljubičasto-mrke boje. Plodići su dugački oko 2 mm (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974).



Slika 23. Morfološke karakteristike biljke *Teucrium montanum* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Teucrium_montanum_0074.jpg

Trava iva raste na kamenitim područjima, sušnim krečnjačkim stenama, osulinama, nanosima, na pašnjacima, u borovim šumama na krečnjaku, u brdskom i planinskom pojasu (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Rasprostranjena je u Evropi i Maloj Aziji, dok je u Srbiji zabeležena u mnogim biljnim asocijacijama (Diklić, 1974) na kamenitim, krečnjačkim podlogama, posebno južno od Dunava. Kao i *T. chamaedrys*, može da nastani visoke nadmorske visine, čak do 2.100 m n.v (Lakušić i sar., 2010).

U etarskom ulju ove biljke su predominantni isparljivi seskviterpeni, poput δ -kadinena, β -selinena, kariofilena i α -kalakorena (Vuković i sar., 2008), a fenolna jedinjenja su takođe u velikoj meri rasprostranjena u ovoj biljci (Stanković i sar., 2011b). Tako, ispitivanjem hemijskog sastava *T. montanum* nađeno je da je bogata luteolinom, rutinom, naringeninom, rozmarinskom, kafenom, hlorogenom, ferulinskom, galnom, protokatehinskom, siringinskom, *p*-kumarinskom, *p*-hidroksicimetnom, vanilinskom i 2,5-dihidroksibenzojevom kiselinom (Tumbas i sar., 2004; Kadifkova Panovska i sar., 2005; Čanadanović-Brunet i sar., 2006; Nastić i sar., 2018). Jedna od najčešće proučavanih bioloških aktivnosti ove biljke jeste antimikrobna, mada je pokazano da ova biljka poseduje i antioksidativni, antimutageni, antitumorski, apoptotski i genotoksični potencijal (Čanadanović-Brunet i sar., 2006; Vuković i sar., 2008; Stanković i sar., 2011a; 2011b; Milošević-Đorđević i sar., 2013; Nikodijević i sar., 2016; Nastić i sar., 2018). Čaj od ove biljke se u narodnoj medicini koristi za lečenje spazama i čišćenje krvi (Šarić-Kundalić i sar., 2010). Kao i *T. chamaedrys*, u Srbiji se koristi za lečenje digestivnih tegoba i kao antipiretik, a takođe se koristi i u etnoveterini (Šavikin i sar., 2013; Jarić i sar., 2014).

1.5.17. *Thymus serpyllum* L. (majkina dušica)

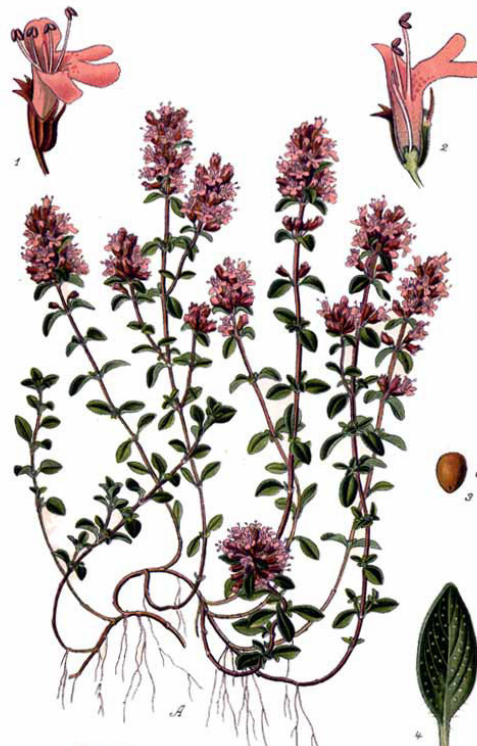
Thymus serpyllum L. (Slika 24) je višegodišnja zeljasta biljka visine 20-30 cm (Čančarević i sar., 2013), sa dugačkom, pri osnovi odrvenelom stabljikom u vidu izduženih stolona, koja razvija adventivne korenove. Listovi su mali, čvrsti, kruti, uzano elipsasti, na vrhu zaokrugljeni. Na licu i naličju listova odsustvuju dlake, dok se duž oboda listova nalaze dugačke dlake. Cvetne grane su pokrivene dlakama i razvijaju se duž položenog stabla u nizovima. Cvetovi su složeni na vrhu grana u okruglaste, ređe izdužene cvasti (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Čašica je zvonasta, pokrivena dlakama, a krunica je ljubičaste boje (Tutin i sar., 1972).

Majkina dušica raste na peskovitim mestima, osunčanim padinama i brežuljcima, kao i po ivici šuma (Sāvulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Za rast joj je potrebno dosta toplote i sunčeve svetlosti, te se zato često pronalazi na kamenitim površinama (Čančarević i sar., 2013). *Th. serpyllum* je kontinentalno-evropska vrsta, rasprostranjena u severnoj i centralnoj Evropi, a takođe se pominje u flori Velike Britanije, Španije, Bugarske, Srbije i zemljama skandinavskog regiona. U Srbiji je rasprostranjena u Vojvodini, posebno na Fruškoj gori (Diklić, 1974; Čančarević i sar., 2013).

Fitohemijski sastav ove biljke je dobro izučavan. Njeno etarsko ulje je bogato fenolnim monoterpenima, predominantno timolom i karvakrolom (Čančarević i sar., 2013; Nikolić i sar., 2014; Jarić i sar., 2015). S druge strane, najčešće detektovana fenolna jedinjenja u ovoj biljci su flavonoli poput kvercetina, apigenina, luteolina, luteolin-7-*O*-glukozida, luteolin-*O*-glukuronida, eriocitrina i fenolne kiseline poput rozmarinske, kafene, kafeoilhine, hlorogene, *p*-kumarinske, *p*-hidroksibenzojeve kiseline, kao i salvianolinske kiseline I i K (Kulišić i sar., 2006; Miron i sar., 2011; Jovanović i sar., 2017). Zahvaljujući bogatom fitohemijskom sastavu, ova biljka poseduje značajan farmakološki potencijal pri čemu su u brojnim naučnim radovima pokazana njena antioksidativna, antimikrobna, anti-inflamatorna, antitumorska i citotoksična dejstva (Algieri i sar., 2014; Nikolić i sar., 2014; Jarić i sar., 2015). Majkina dušica je jedna od najčešće korišćenih lekovitih biljaka u Srbiji (Dajić Stevanović, 2011), ali i u drugim delovima sveta, pri čemu je još u drugom veku nove ere Dioskorid napisao: „svi znaju za majkinu dušicu“ (Jarić i sar., 2015). Ova biljka se koristi u formi infuza, dekokta, tinktura i sirupa kao ekspektorans, dezinfekciono sredstvo, sedativ, protiv prehlada i nadimanja. Poboljšava cirkulaciju krvi i često se koristi za lečenje bolesti i problema gastrointestinalnog i respiratornog sistema (Naghbi i sar., 2005; Čančarević i sar., 2013; Šavikin i sar., 2013; Jarić i sar., 2015).

1.5.18. *Thymus vulgaris* L. (timijan)

Thymus vulgaris L. (Slika 25) je polužbun visine 20-30 cm. Grane su debele i odrvenele, uspravne ili položene, veoma razgranate (Sāvulescu i Nyárády, 1961). Cvetne grane su



Slika 24. Morfološke karakteristike biljke *Thymus serpyllum* L.

Izvor:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:255_Thymus_serpyllum_L.jpg

ravnomerno pokriveno sa svih strana kratkim dlakama. Donji listovi na cvetnim granama su povijeni unazad i izgledaju linearno. Ostali listovi imaju kratku lisnu dršku, na licu su goli, dok na naličju imaju kratke dlake (Diklić, 1974). Brakteje su slične listovima, ali su nešto šire i nekada sa ravnim obodom, sivo-zelene boje (Tutin i sar., 1972). Cvasti su izdužene, a cvetovi su mali, ružičasti, veoma aromatični (Sävulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Čašica je nazubljena: zupci na gornjoj usni čašice su kratko trouglasti. Gornja usna krunice je dvorežnjevita, donja trorežnjevita (Sävulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974). Orašice su male, mrke boje (Sävulescu i Nyárády, 1961).

Timijan je biljka poreklom sa Mediterana (Španija, Portugal, Grčka i Francuska), mada je introdukovana i u ostale delove Evrope, u Aziju, Afriku i Severnu Ameriku (Tutin i sar., 1972; Diklić, 1974; Čančarević i sar., 2013). U Srbiji je najrasprostranjenija na teritoriji Vojvodine. Budući da je biljka toplog podneblja, timijan je dobro prilagođen na visoke letnje temperature, a relativno je otporan i na mrazeve u toku zime, dok slabo podnosi vlažnu sredinu. Najviše mu odgovara osunčana površina koja je zaklonjena od vetra (Čančarević i sar., 2013).

Fitohemijski sastav timijana je detaljno izučavan, pri čemu je pokazano da poseduje veliku raznovrsnost fenolnih jedinjenja, ali i drugih sekundarnih metabolita. U etarskom ulju ove biljke se nalaze značajne količine isparljivih jedinjenja poput timola, γ -terpinena, p -cimena, δ -karena i kariofilena (Borugă i sar., 2014). Eriocitrin, luteolin i njegovi derivati, apigenin, rutin, kvercetin, rozmarinska, kafena, kafeoilhina, hlorogena, ferulinska, cimetna, galna, p -kumarinska, p -hidroksibenzojeva, siringinska i vanilinska kiselina su samo neke od najčešće identifikovanih fenolnih jedinjenja u nadzemnim delovima ove biljke (Zgórka i Głowniak, 2001; Kulišić i sar., 2006; Kivilompolo i Hyötyläinen 2007; 2009; Roby i sar., 2013; Pereira i sar., 2016). Takođe, dokazane su brojne biološke aktivnosti timijana poput antioksidativne, antimikrobne, antitumorske, anti-inflamatorne, antidijabetične, hepato- i neuroprotektivne, kao i imunomodulatorne aktivnosti (Čančarević i sar., 2013; Borugă i sar., 2014; Nikolić i sar., 2014; Abdelli i sar., 2017; Aljarah i Hameed, 2018; El-Boshy i sar., 2019). Timijan ima jaku, prepoznatljivu aromu i koristi se kao začim (Sävulescu i Nyárády, 1961; Diklić, 1974), a odbor Evropske Agencije za hranu i lekove (engl. *Herbal Medicinal Product Committee*) svrstava herbu i etarsko ulje timijana u biljne lekove koji se koriste kao ekspektorans kod kašlja udruženog sa prehladom (Čančarević i sar., 2013). U mediteranskim zemljama se za ekstrakciju etarskog ulja upotrebljava nadzemni deo biljke koji se zatim u narodnoj medicini koristi kao tonik, adstringens i stimulans (Sävulescu i Nyárády, 1961). Preparati timijana imaju primenu u lečenju poremećaja digestivnog i respiratornog sistema, bakterijskih infekcija, bolesti desni, zuba, inflamatornih procesa usne duplje, kao i za zarastanje rana (Čančarević i sar., 2013; Janačković i sar., 2019).



Slika 25. Morfološke karakteristike biljke *Thymus vulgaris* L.

Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thymus_vulgaris_-_K%C3%B6hler%E2%80%93Medizinal-Pflanzen-271.jpg

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Biljke familije Lamiaceae imaju širok areal rasprostranjenja, a etnobotaničke studije su pokazale da su pojedini predstavnici ove familije od davnina cenjeni i korišćeni u tradicionalnoj medicini (pretežno kao tinkture i čajevi) i kulinarstvu kako u svetu, tako i u Srbiji. Iako su one do sada već bile predmet mnogih savremenih naučnih istraživanja, pretragom literature je ustanovljeno da su lekovite biljke familije Lamiaceae sa teritorije Srbije samo delimično ispitane sa aspekta fitohemije i biološke aktivnosti.

U skladu sa navedenim, ciljevi ovog rada su bili određivanje hemijskog sastava i biološke aktivnosti metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata 18 vrsta familije Lamiaceae koje se komercijalno gaje i tradicionalno upotrebljavaju u Srbiji.

Za realizaciju navedenih ciljeva, definisani su sledeći istraživački zadaci:

- ⊗ fitohemijska karakterizacija biljnih ekstrakata:
 - spektrofotometrijski, određivanjem ukupnog sadržaja fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, flavonola, kumarina i triterpena,
 - kvantifikacija fenolnih jedinjenja primenom HPLC-DAD analize;
- ⊗ određivanje antioksidativnog potencijala biljnih ekstrakata:
 - spektrofotometrijski, primenom DPPH, ABTS, FRAP, URP i β -karoten/linolna kiselina testova;
- ⊗ određivanje genoprotektivnog potencijala biljnih ekstrakata:
 - primenom testa relaksacije plazmidne DNK, korišćenjem pUC19 *Escherichia coli* XL1-blue,
- ⊗ određivanje antigenotoksičnog potencijala biljnih ekstrakata:
 - na prokariotskom modelu, primenom SOS/*umuC* testa na *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002,
 - na eukariotskom modelu, primenom alkalnog komet testa na MRC-5 ćelijskoj liniji;
- ⊗ određivanje antidijabetičnog potencijala biljnih ekstrakata:
 - spektrofotometrijski, primenom testova za ispitivanje inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze;
- ⊗ određivanje antineurodegenerativnog potencijala biljnih ekstrakata:
 - spektrofotometrijski, primenom testova za ispitivanje inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze i tirozinaze;
- ⊗ određivanje antineuroinflamatornog potencijala biljnih ekstrakata:
 - na modelu LPS-om aktiviranih BV2 ćelija procenjivano vijabilnošću i sposobnošću produkcije reaktivnih vrsta kiseonika od strane tretiranih ćelija, kao i količinom nitrata u supernatantima, indirektnim pokazateljem sposobnosti produkcije azot oksida od strane tretiranih ćelija;
 - ispitivanjem vijabilnosti SH-SY5Y neurona tretiranih supernatantima aktiviranih i ekstraktima tretiranih BV2 ćelija primenom modela transfera supernatanata;

- ⊗ određivanje antitumorskog potencijala biljnih ekstrakata:
 - ispitivanjem njihovog uticaja na vijabilnost ćelijske linije kolorektalnog kancera (HCT-116 ćelija) i sposobnost produkcije reaktivnih vrsta kiseonika i nitrita od strane ovih ćelija;
- ⊗ određivanje antibakterijskog potencijala biljnih ekstrakata:
 - utvrđivanjem minimalne inhibitorne koncentracije, primenom mikrodilucione metode na četiri gram-pozitivne i tri gram-negativne bakterije,
 - ispitivanjem uticaja ekstrakata na adheziju i invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća (MRC-5 ćelija),
 - ispitivanjem uticaja ekstrakata na formiranje biofilma od strane *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,
 - ispitivanjem uticaja ekstrakata na već formirani biofilm *Pseudomonas aeruginosa* PAO1;
- ⊗ određivanje uticaja biljnih ekstrakata na zarastanje rane primenom *Scratch* testa na MRC-5 ćelijama.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen u eksperimentalnom radu je nabavljen iz žive kolekcije Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ (IPLB) i komercijalno je dostupan. Obuhvata 18 lekovitih, aromatičnih i začinskih biljaka iz familije Lamiaceae gajenih u Srbiji, sakupljenih u proleće 2018. godine. Vaučeri za svaku biljnu vrstu su deponovani u herbaru IPLB (Tabela 3).

Tabela 3. Biljne vrste korišćene u eksperimentalnom radu i brojevi vaučera herbara IPLB.

Naziv biljne vrste	Broj vaučera
<i>Glechoma hederacea</i> L.	302181
<i>Hyssopus officinalis</i> L.	302211
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	300071
<i>Leonurus cardiaca</i> L.	302221
<i>Marrubium vulgare</i> L.	302241
<i>Melissa officinalis</i> L.	301121
<i>Mentha × piperita</i> L.	301131
<i>Ocimum basilicum</i> L.	302061
<i>Origanum majorana</i> L.	302231
<i>Origanum vulgare</i> L.	302291
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	301211
<i>Salvia officinalis</i> L.	301241
<i>Satureja montana</i> L. s.l.	302311
<i>Sideritis scardica</i> L.	302331
<i>Teucrium chamaedrys</i> L.	302091
<i>Teucrium montanum</i> L.	302351
<i>Thymus serpyllum</i> L.	302321
<i>Thymus vulgaris</i> L.	302361

3.2. Hemikalije i reagensi

Borna kiselina je nabavljena od Moss & Hemoss, Srbija. Etanol, glacijalna sirćetna kiselina, glicerol, hloroform, hlorovodonična kiselina (HCl) i metanol su nabavljeni od Zorka Pharma, Srbija. Vodonik-peroksid (H₂O₂) je nabavljen od Farmanea Galenska Laboratorija, Srbija, a natrijum hidroksid (NaOH) od Superlab, Srbija. Rifampicin je nabavljen od Hemofarm, Srbija, a streptomycin od Galenika, Srbija.

Acetilholinesteraza iz *Electrophorus electricus* (AChE), acetilholin-jodid (AChI), 2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijum so (ABTS), agaroz, akarboza, akridin oranž, aluminijum-nitrat nonahidrat (Al(NO₃)₃×9H₂O), askorbinska kiselina, BaP (benzo[α]piren), BHA (2(3)-t-butyl-4-hidroksianizol), BHT (3,5-di-tert-butyl-4-hidroksitoluen), bromfenol plavo, dibazni natrijum-fosfat (Na₂HPO₄), dimetilsulfoksid (DMSO), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), DTNB (5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoeva kiselina)), EDTA (etilendiamin tetraacetatna kiselina), etidijum bromid, Folin-Ciocalteu fenolni reagens, galantamin, galna kiselina, gvožđe(II)-sulfat heptahidrat (FeSO₄×7H₂O), gvožđe(III)-hlorid (FeCl₃), izo-propanol, kafena kiselina, kalijum dihidrogen fosfat, kalijum acetat (C₂H₃KO₂),

kalijum klorid (KCl), kalijum persulfat ($K_2S_2O_8$), kojična kiselina, kristal violet, ksilen cijanol, kvercetin, L-DOPA (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin), linolna kiselina, LMP (engl. *low melting point agarose*), Lugolov rastvor, monobazni natrijum fosfat (NaH_2PO_4), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid), magnezijum sulfat ($MgSO_4$), N-1-naftiletilendiamin-dihlorid, natrijum bikarbonat ($NaHCO_3$), natrijum dodecil sulfat (SDS), natrijum klorid (NaCl), natrijum karbonat (Na_2CO_3), natrijum acetat (CH_3COONa), NMP (engl. *normal melting point agarose*), ONPG (*orto*-nitrofenil-b-galaktozid), pNPG (*p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozid), RPMI 1640 (engl. *Roswell Park Memorial Institute*), rozmarinska kiselina, sulfanilamid, tirozinaza iz *Agaricus bisporus*, TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin), tripton, Trizma baza, Triton X-100, Tween 40, α -amilaza, α -glukotidaza tip I iz *Saccharomyces cerevisiae* i β -karoten su kupljeni od Sigma Chemicals Co., SAD. LMP je nabavljen od Bio-Rad Laboratories, SAD, a DMEM 5523 (engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), FBS (engl. *Fetal Bovine Serum*) i PBS (engl. *Phosphate-Buffered Saline*) su nabavljeni od Gibco, Invitrogen, SAD. Dikalijum fosfat, dinatrijum hidrogen fosfat dodekahidrat, natrijum fosfat dihidrat dibazni i perhlorna kiselina su nabavljeni od VWR, SAD. Fosforna kiselina je nabavljena od Honeywell, SAD. RNaza A je nabavljena od Thermo Fisher Scientific, SAD.

Natrijum nitrit ($NaNO_3$) je nabavljen od Dispochem, Velika Britanija. Agar, Brain-Heartinfusion (BHI) i ekstrakt kvasca su nabavljeni od Lab M Limited, Neogen, Velika Britanija.

Penicilin/streptomycin je kupljen od PAA Laboratories GmbH, Austrija.

Rastvor skroba (1%) je nabavljen od Carl Roth, Nemačka, NBT (engl. *Nitro Blue Tetrazolium*) i resazurin natrijumova so (>90% (LC) $C_{12}H_6NaO_4$) od Serva Electrophoresis GmbH, Nemačka, a acetonitril i mravlja kiselina su nabavljeni od Merck, Nemačka.

NMP je nabavljen od Eurobio, Francuska, a hlorogena kiselina, luteolin-7-O-glukozid, naringin i rutin su nabavljeni od Extrasynthese, Francuska.

Kalijum dihidrogen fosfat (KH_2PO_4) je nabavljen od Carl Roth, Španija. Mueller-Hintonbroth (Himedia) (MHB) je nabavljen od Biomedics, Španija.

3.2.1. Rastvori

3.2.1.1. Pufferi korišćeni za antidijabetičnu i antineurodegenerativnu aktivnost

Natrijum-fosfatni puffer (0,1 M, pH 6,8, sa 6 mM NaCl):

$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	1,123 g
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	1,002 g
NaCl.....	35,01 mg
Destilovana voda.....	do 100 mL

Natrijum-fosfatni puffer (0,1 M, pH 7):

$NaH_2PO_4 \times 2H_2O$	0,965 g
$Na_2HPO_4 \times 12H_2O$	1,365 g
Destilovana voda.....	do 100 mL

Kalijum-fosfatni puffer (0,1 M, pH 6,8):

K_2HPO_4	0,865 g
KH_2PO_4	0,685 g
Destilovana voda.....	do 100 mL

Tris-HCl (20 mM, pH 7,5):

Trizma baza.....	0,24 g
Destilovana voda.....	do 100 mL

pH je podešena uz pomoć koncentrovane HCl.

3.2.1.2. Enzimi korišćeni za antidijabetičnu i antineurodegenerativnu aktivnost **α -amilaza (0,5 mg/mL):**

α -amilaza.....	1 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8, sa 6 mM NaCl).....	2 mL

 α -glukozidaza (0,5 U/mL):

α -glukozidaza.....	1 mg
Kalijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8).....	37,037 mL

Acetilholinesteraza (5 U/mL):

Acetilholinesteraza.....	1 mg
Tris-HCl pufer (20 mM, pH 7,5).....	11,765 mL

Tirozinaza (46 U/mL):

Tirozinaza.....	1 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7).....	21,739 mL

3.2.1.3. Supstrati korišćeni za antidijabetičnu i antineurodegenerativnu aktivnost**Skrob (0,2%):**

1% skrob.....	1 mL
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8, sa 6 mM NaCl).....	4 mL

pNPG (5 mM):

pNPG.....	15 mg
Kalijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 6,8).....	10 mL

DTNB (0,01 M):

DTNB.....	7,92 mg
NaHCO ₃	3 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7).....	2 mL

AChI (0,075 M):

AChI.....	21,67 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7).....	1 mL

L-DOPA (2,5 M):

L-DOPA.....	1,96 mg
Natrijum-fosfatni pufer (0,1 M, pH 7).....	4 mL

3.2.1.3. Rastvori i medijumi korišćeni za rast bakterija**BHI – Brain-Heartinfusion:**

BHI.....	37 g
Destilovana voda.....	1000 mL

MHB – Mueller-Hinton Broth:

MHB.....	21 g
Destilovana voda.....	1000 mL

MHA – Mueller-Hinton Agar:

MHB.....	21 g
Agar.....	15 g
Destilovana voda.....	1000 mL

LB – Luria Broth:

Tripton.....	10 g
Ekstrakt kvasca.....	5 g
NaCl.....	5 g
Destilovana voda.....	1000 mL

LA – Luria Agar:

Agar.....	15 g
LB.....	1000 mL

Streptomycin – stok 20 mg/mL rastvoren u destilovanoj vodi, finalni stok od 1 mg/mL pravljen u MHB medijumu

Rifampicin – stok 100 mg/mL rastvoren u destilovanoj vodi, finalni stok od 10 mg/mL pravljen u BHI medijumu

3.2.1.4. Rastvori korišćeni za test relaksacije plazmida**Rastvor I** (sterilan, za izolovanje plazmida)

1 M Tris pufer (pH 7,5).....	1 mL (finalna koncentracija 100 mM)
0,5 M EDTA (pH 8,0).....	200 µL (finalna koncentracija 10 mM)
RNK-aza (50 mg/mL).....	80 µL (finalna koncentracija 400 µg/mL)
Destilovana voda.....	8,8 mL

Rastvor II (sterilan, za izolovanje plazmida)

1 M NaOH.....	2 mL (finalna koncentracija 1 M)
10% SDS.....	1,17 mL (finalna koncentracija 1%)
Destilovana voda.....	6,83 mL

Rastvor III (sterilan, za izolovanje plazmida)

Natrijum-acetat.....	2,9 g
Glacijalna sirćetna kiselina.....	1,15 mL
Destilovana voda.....	8,85 mL

TE pufer (sterilan, za izolovanje plazmida)

Tris – HCl.....	10 mM
EDTA.....	1 mM (pH 8,0)

1% agaroz (za elektroforezu plazmidne DNK)

Agaroz.....	0,5 g
TBE pufer.....	50 mL

0,5 × TBE pufer

Trizma baza.....	54 g
Borna kiselina.....	27,5 g
0,5 M EDTA (pH 8,0).....	20 mL
Destilovana voda.....	1000 mL

Bromfenol plavo

Glicerol.....	3 mL
Bromfenol plavo.....	25 mg
Ksilen cijanol.....	25 mg
Destilovana voda.....	7 mL

3.2.1.5. Rastvori i medijumi korišćeni za gajenje, održavanje i brojanje ćelija**DMEM 5523 hranljivi medijum**

DMEM 5523.....	1 pakovanje
NaHCO ₃	3,7 g
Dejonizovana voda.....	do 1000 mL
pH je podešena na 7,1-7,4 uz pomoć koncentrovane HCl	
osmolalnost medijuma je oko 300 mmol/kg	

DMEM 5523 kompletni hranljivi medijum

DMEM 5523 hranljivi medijum.....	88 mL
FBS.....	10 mL
1,95 M glukoza.....	1 mL
Antibiotik (penicilin/streptomycin).....	1 mL

RPMI 1640 hranljivi medijum

RPMI 1640.....	1 pakovanje
NaHCO ₃	2 g
Dejonizovana voda.....	do 1000 mL
pH je podešena na 7,1-7,4 uz pomoć koncentrovane HCl	
osmolalnost medijuma je oko 300 mmol/kg	

RPMI 1640 kompletni hranljivi medijum

RPMI 1640 hranljivi medijum.....	88 mL
FBS.....	10 mL
1,95 M glukoza.....	712 µL
Antibiotik (penicilin/streptomycin).....	1 mL

Trypan blue 0,4%

Trypan blue.....	4 mg
1×PBS.....	1 mL

Slani rastvor fosfatnog pufera (1×PBS, pH 7,4, 270-280 mOsm/L)

NaCl.....	4 g
KCl.....	0,1 g
Na ₂ HPO ₄	0,575 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Destilovana voda.....	do 500 mL

3.2.1.6. Rastvori korišćeni za Komet test**Rastvor I (za lizu, pH 10)**

NaCl.....	146,6 g
EDTA.....	37,2 g
Trizma baza.....	1,21 g
Destilovana voda.....	1000 mL

Nakon podešavanja pH dodat je 1% Triton X-100 i rastvor je snažno promešan.

Rastvor II (za denaturaciju i elektroforezu, pH 13)

10 M NaOH.....	30 mL
0,2 M EDTA.....	5 mL
Destilovana voda.....	965 mL

Nije bilo potrebe podesiti pH.

10 M NaOH

NaOH.....	40 g
Destilovana voda.....	do 100 mL

0,2 M EDTA

EDTA.....	7,44 g
Destilovana voda.....	100 mL

Rastvor III (za neutralizaciju, pH 7,5)

Trizma baza.....	48,44 g
Destilovana voda.....	1000 mL

Nakon podešavanja pH rastvor je čuvan u frižideru.

1% NMP za prvi sloj

NMP.....	1 g
Destilovana voda.....	99 mL

1% NMP za drugi sloj

NMP.....	1 g
1×PBS.....	99 mL

1% LMP

LMP.....	1 g
1×PBS.....	99 mL

3.3. Priprema ekstrakata

Ekstrakti su pripremljeni tako što je već usitnjeni biljni materijal (10 g) ekstrahovan metodom klasične maceracije tokom 24 sata na sobnoj temperaturi (10% w/v). Ekstrakcija je vršena korišćenjem tri rastvarača: 70% metanola, 70% etanola i ključale destilovane vode (100°C). Mešavina biljnog materijala i rastvarača je izložena ultrazvučnom kupatilu (30°C) sat vremena pre i sat vremena nakon maceracije. Nakon toga, ekstrakti su dva puta proceđeni kroz filter papir (Whatman No. 1) i višak rastvarača je uparen pod smanjenim pritiskom pomoću rotacionog Büchi rotavapor R-114 evaporatora. Nakon uparavanja, dobijeni sirovi ekstrakti su čuvani na +4°C.

Masa suvog ekstrakta je izmerena za svaki uzorak, a prinos ekstrakcije je iznačunat na osnovu sledeće jednačine i predstavljen u procentima:

$$\text{Prinos (\%)} = [(m_1 - m_0) / M] \times 100\%$$

gde m_0 predstavlja masu prazne vijale, m_1 predstavlja masu vijale sa ekstraktom, $(m_1 - m_0)$ predstavlja masu suvog ekstrakta, a M – masu suvog biljnog materijala korišćenog za ekstrakciju.

3.4. Priprema bakterijskih sojeva

U eksperimentalnom radu su korišćeni gram-pozitivni i gram-negativni bakterijski sojevi koji su deo laboratorijske kolekcije Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu (Tabela 4).

Tabela 4. Bakterijski sojevi korišćeni u eksperimentalnom radu.

Gram-pozitivni sojevi	Gram-negativni sojevi
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15692 i PAO1
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028

Kolonija odgovarajućih bakterija je prebačena u epruvetu sa 5 mL podloge MHB temperirane na 37°C i ostavljena preko noći na 37°C da bi se dobila prekonoćna bakterijska kultura.

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) ekstrakata, bakterije iz Tabele 4 su gajene do određene OD₆₀₀ u kojoj su kulture odabranih bakterija u eksponencijalnoj fazi rasta, da bi se za svaki soj dobio odgovarajući broj bakterija po mililitru (Kolarević i sar. 2016b):

1. za *B. subtilis* (2×10^7 /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,2;
2. za *E. faecalis* ($2,5 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,2;
3. za *L. innocua* ($2,2 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,2;
4. za *S. aureus* ($1,1 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,2;
5. za *E. coli* ($1,2 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,3;
6. za *P. aeruginosa* ($1,7 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,4;
7. za *P. aeruginosa* PAO1 (2×10^7 /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,08;
8. za *S. typhimurium* ($1,5 \times 10^8$ /mL) odgovara OD₆₀₀ 0,3.

Potom je za svaki soj pripremljeno razblaženje kako bi finalna koncentracija bakterija u inokulumu iznosila 1×10^6 /mL.

Preostala bakterijska kultura koncentracije oko 1×10^8 /mL je centrifugirana (4000 rpm 10 minuta), odliven je supernatant, a talog je resuspendovan u istom volumenu 0,01 M magnezijum sulfata. Ovako pripremljene kulture su zaleđene i čuvane za naredne eksperimente.

Efekat na formiranje biofilma i degradaciju postojećeg biofilma je ispitan na soju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Da bi se dobio odgovarajući broj bakterija za dalji rad, takođe je spektrofotometrijski izmerena optička gustina na talasnoj dužini od 600 nm i podešena na OD = 0,4 MHB medijumom, kako bi se dobilo oko 1×10^8 bakterija po mililitru.

3.5. Izolacija plazmida alkalnom lizom

Plazmid pUC19 (veličine 2686 baznih parova) izolovan je iz *Escherichia coli* XL1-blue prema protokolu Birnboim (1983) i Đorđević i sar. (2020).

U dve ependorf tubice (zapremine 2 mL) je centrifugirano $2 \times 1,5$ mL prekonocne kulture soja *E. coli* XL1-blue 1 minut na 14.000 obrtaja/min (19.000×g). Kako bi se dodatno povećala količina izolovanog plazmida, po odlivanju supernatanta, preko taloga je dodato još po 1,5 mL kulture i postupak centrifugiranja je ponovljen dva puta. Zatim je supernatant uklonjen pasterovom pipetom i vakuumom, a talog je resuspendovan u 200 µL Rastvora I (opisan u poglavlju 3.1.1.4.) vorteksovanjem ili višestrukim uvlačenjem i izbacivanjem tečnosti iz nastavka. Rastvor I sadrži Tris-HCl i EDTA i ima ulogu u razbijanju ćelija. EDTA vezuje Ca^{2+} i Mg^{2+} jone, što destabilizuje membranu i dovodi do pucanja ćelija. Da bi razbijanje ćelija bilo efikasnije, u ovom koraku se može najpre dodati 150 µL Rastvora I, vorteksovati, a zatim dodati 50 µL lizozima (8 mg/mL, rastvorenog u Rastvoru I).

Tubice sa reakcionom smešom su inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi (ili na 37°C ukoliko je dodat lizozim).

Nakon toga je dodato 200 µL rastvora II (NaOH i SDS), a zatim je pažljivo promešano nekoliko puta okretanjem tubica i inkubirano na ledu 5 minuta. Rastvor II je veoma alkalni i vrši kompletnu lizu ćelija, oslobađa citoplazmu i dovodi do oslobađanja proteinskih kompleksa i razdvajanja hromozomske DNK na pojedinačne lance.

Nakon inkubacije na ledu, dodato je 200 µL Rastvora III (glacijalna sirćetna kiselina i natrijum-acetat), a tubice su ponovo okretane nekoliko puta gore-dole i inkubirane još 5 minuta na ledu. Rastvor III ima ulogu da pokupi proteine i druge nečistoće.

Nakon centrifugiranja (5 minuta na 14.000 obrtaja/min) supernatant je pažljivo prebačen u sterilnu tubicu. Ovim postupkom dolazi do taloženja ćelijskih ostataka i nečistoća precipitiranih u prethodnim koracima, pri čemu plazmidna DNK ostaje u supernatantu. U supernatant je dodato 420 µL izo-propanola kako bi plazmid precipitirao, nakon čega je tubica vorteksovana i ostavljena 10 minuta na sobnoj temperaturi. Zatim su tubice centrifugirane još 10 minuta na 14.000 obrtaja/min, kako bi se u talogu izdvojio plazmid. Supernatant je nakon toga oprezno uklonjen pasterovom pipetom i vakuumom, bez mućkanja, kako ne bi došlo do povlačenja taloga.

Talog je zatim ispran sa 1 mL 70% etanola i pažljivo promućkan lupkanjem prstima. Uloga dodatog etanola je u rastvaranju zaostalih soli, s obzirom na to da je plazmidna DNK nerastvorna u njemu i to dodatno prečišćava izolovani plazmid. Nakon centrifugiranja (5 minuta na 14.000 obrtaja/min) supernatant je odstranjen, a talog osušen na sobnoj temperaturi (10-15 minuta). Suvi talog u kome se nalaze plazmidi, resuspendovan je u 30 µL TE pufera, i ova suspenzija je korišćena za elektroforezu ili čuvana u zamrzivaču na -20°C do daljih istraživanja.

Izolovani plazmid je proveren nakon 1 h elektroforeze na 1% agaroznom gelu (0,5 × TBE, 80 V, 300 mA). Proverom je utvrđeno da je oko 80% izolovanog plazmida bilo u zatvorenoj formi, dok je oko 20% bilo u otvorenoj formi.

3.6. Priprema ćelijskih linija

U eksperimentalnom radu su korišćene sledeće ćelijske linije:

1. Normalne ćelije:

- fibroblasti pluća, MRC-5 ćelijska linija (ECACC no. 84101801);
- mikroglija, BV2 ćelijska linija;

2. Tumorske ćelije:

- neuroni, SH-SY5Y ćelijska linija (model za ispitivanje neuronskih funkcija i njihove diferencijacije) i
- ćelije kolorektalnog kancera, HCT-116 ćelijska linija.

3.6.1. Održavanje ćelijske kulture

Odmrzavanje ćelijskih linija je izvedeno na sledeći način: kriotuba sa ćelijama je izvađena iz tečnog azota i brzo odmrznuta temperiranjem u vodenom kupatilu na 37°C. Zatim su ćelije pažljivo resuspendovane u 10 mL DMEM (ili RPMI) kompletnog hranljivog medijuma i prebačene u epruvetu za centrifugiranje sa konusnim dnom. Ćelije su zatim centrifugirane 5 minuta na 1640 rpm, kako bi se uklonio krioprotektant DMSO zajedno sa medijumom za krioprezervaciju. Nakon centrifugiranja, supernatant je uklonjen mikropipetom, a ćelijski talog je resuspendovan u 5 mL hranljivog medijuma. Ćelije su potom prebačene u plastične posude za kultivaciju, flaskove. U T25 flask (25 cm²) je zasejano 6,5×10⁵ ćelija i dopunjeno do 5 mL medijumom, dok je u T75 flask (75 cm²) zasejano 1-5×10⁶ ćelija i dopunjeno do 10 mL medijumom.

U cilju praćenja opšteg izgleda kulture, morfoloških karakteristika ćelija i prisustva kontaminacije bakterijama i gljivicama, tokom gajenja ćelijske kulture su redovno pregledane na svetlosnom mikroskopu. U slučaju pojave žute boje medijuma, izvršena je njegoza zamena svežim sterilnim medijumom. U slučaju pojave zamućenosti medijuma, što je pokazatelj kontaminacije, ćelijska kultura je isključena iz dalje kultivacije.

Ćelijske kulture su gajene u inkubatoru, na temperaturi od 37°C, sa 5% CO₂, do pojave konfluentnog monosloja (80-90% površine flaska). Nakon formiranja konfluentnog ćelijskog monosloja, kulture su tripsinizirane i dobijene su suspenzije pojedinačnih ćelija. Veći deo suspenzije ćelija korišćen je za eksperimente, a manji deo je zasejavan u nove flaskove (pasažiranje), radi dalje kultivacije ćelija.

3.6.2. Tripsinizacija

Po formiranju konfluentnog ćelijskog monosloja, kada su ćelije pokrivalo gotovo kompletnu površinu za rast u flasku, rađena je tripsinizacija. Iz flaska sa konfluentnim monoslojem je uklonjen medijum za kultivaciju, nakon čega je pažljivo dodat PBS (5 mL za T25 i 10 mL za T75) kako bi se isprale mrtve ćelije i kako bi se dalje eliminisali ćelijski debris i serumski proteini koji mogu da neutrališu tripsin. Nakon ispiranja monosloja, uklonjen je PBS i dodat je tripsin (2 mL za T25 ili 4 mL za T75 flaskove) i inkubirano je 3 minuta na 37°C. Zatim je dodata dvostruko veća zapremina hranljivog medijuma koji je sadržao FBS kako bi se neutralisao tripsin (4 mL za T25 ili 8 mL za T75 flaskove), nakon čega su ćelije pažljivo sprane sa zida posude mlazom hranljivog medijuma za kultivaciju. Sadržaj je prebačen u epruvete i centrifugiran na 1800 rpm 5 minuta. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendovan u 5 mL hranljivog medijuma, uzastopnim uvlačenjem i izbacivanjem sadržaja mikropipetom nakon čega je određivan broj ćelija.

3.6.3. Određivanje broja ćelija

Za brojanje ćelija u ćelijskoj suspenziji korišćen je hemocitometar, odnosno Bürker komora. Za razlikovanje živih i neživih ćelija korišćena je boja tripan plavo, koja ne prolazi kroz ćelijsku membranu očuvanog integriteta, te žive ćelije ostaju nebojene, odnosno na svetlosnom mikroskopu se vide kao svetli kružići (Strober, 2001).

Uzorak suspenzije ćelija (20 μ L) je pomešan sa rastvorom tripan plavog (180 μ L da bi ćelije bile razbažene 10 puta) u mikrotubi i 20 μ L je dodato na Bürker komoru koja je prethodno pokrivena pokrovnim staklom i ćelije su prebrojane pod svetlosnim mikroskopom.

Brojanjem su obuhvaćene ćelije pozicionirane u unutrašnjosti polja, kao i ćelije na levoj i donjoj ugraviranoj liniji, a koje su se nalazile unutar 4 najmanja kvadrata. Broj ćelija po mililitru suspenzije je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{Broj ćelija u 1 mL} = n \times 10^4 \times R,$$

gde n predstavlja srednju vrednost broja ćelija u svim pregledanim komoricama (ukupno četiri), a R predstavlja faktor razblaženja u rastvoru za bojenje.

3.6.4. Zasejavanje ćelija i tretman ekstraktima za određivanje antineuroinflamatorne, citotoksične i antitumorske aktivnosti

Alikvot ćelija (100 μ L) je zasejan na mikrotitracionu ploču sa 96 bunarića (1 \times 10⁴ po bunariću za MRC-5, BV2 i SH-SY5Y ćelije i 5 \times 10⁴ po bunariću za HCT-116 ćelije). Nakon 24-časovne inkubacije, preko formiranog konfluentnog monosloja ćelija je pažljivo u svaki bunarić dodato 100 μ L DMEM ili RPMI kompletnog hranljivog medijuma sa ekstraktima odgovarajuće koncentracije (50 μ L medijuma + 50 μ L duplo veće koncentracije ekstrakta). Za BV2 ćelije u svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči je dodato 100 μ L LPS i etanolnih ekstrakata odgovarajuće koncentracije (50 μ L LPS finalne koncentracije 1 μ g/mL + 50 μ L duplo veće koncentracije ekstrakta). Na svakoj ploči su postavljene negativne kontrole koje su sadržale samo hranljivi medijum, a postavljene su i kontrole alkoholnih rastvarača tako da je njihova finalna koncentracija u bunariću bila 0,7%, što je odgovaralo njihovoj koncentraciji u bunarićima sa test supstancom.

Inkubacija je nastavljena još 24 sata. Netretirane ćelije su korišćene kao negativna kontrola.

3.6.5. Priprema ćelijske kulture za određivanje uticaja na adheziju i invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1

MRC-5 ćelije su gajene u flaskovima od 75 cm², odakle je u mikrotitracione ploče sa 12 bunarića prebačeno oko 1 \times 10⁵ ćelija. Ćelije su inkubirane u DMEM kompletnom hranljivom medijumu, na 37°C u prisustvu 5% CO₂ 48 sati, da bi se dobio konfluentni monosloj.

3.7. Određivanje fitohemijskog sastava ekstrakata

3.7.1. Ukupni sadržaj fenolnih jedinjenja

Za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja korišćena je procedura opisana od strane Singleton i Rossi (1965). Ovaj test se zasniva na redukciji Folin-Ciocalteu reagensa u prisustvu uzorka sa visokim sadržajem fenola, čime dolazi do formiranja molibden-volframovog plavog, čiji intenzitet linearno raste sa koncentracijom fenola u reakcionoj smeši, što se može meriti spektrofotometrijski.

U svaku test epruvetu je odmereno po 100 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nakon čega je dodato po 0,5 mL 10% rastvora Folin-Ciocalteu reagensa i epruvete su postavljene na šestominutnu inkubaciju u mraku. Nakon inkubacije, u test epruvete je dodato još 400 μL 7,5% rastvora natrijum karbonata. Apsorbanca je očitavana na 740 nm nakon inkubacije u trajanju od 120 minuta na sobnoj temperaturi, pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD. Negativna kontrola je sadržala sve gore navedene komponente, s tim da je umesto uzorka sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu). Svaki uzorak je ispitan u triplikatu. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je galna kiselina (GK) rastvorena u destilovanoj vodi u opsegu koncentracija 10 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Ukupan sadržaj fenola u ekstraktima je izračunat iz jednačine prave kalibracione krive za galnu kiselinu ($y = 10,219x + 0,0059$, $R^2 = 0,9994$) i izražen je u ekvivalentima galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg EGK/g). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.2. Ukupni sadržaj fenolnih kiselina

Metoda za određivanje ukupnog sadržaja fenolnih kiselina rađena je prema proceduri koju su opisali Mihailović i sar. (2016), sa određenim modifikacijama. U test epruvete je odmereno po 100 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nakon čega je dodato po 200 μL Arnovog reagensa (10% w/v natrijum-molibdata i 10% w/v natrijum-nitrita), 200 μL 0,1 M hlorovodonične kiseline i 200 μL 1 M natrijum-hidroksida. Nakon što su sve prethodne komponente dodate, dodato je još 1 mL destilovane vode. Negativna kontrola je sadržala sve komponente, s tim da je umesto uzorka sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovana voda). Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je kafena kiselina (KK) rastvorena u 50% etanolu u opsegu koncentracija od 7,8 – 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Svaki uzorak je ispitan u triplikatu. Apsorbanca je očitavana na 490 nm odmah po dodavanju svih komponenti, pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD.

Ukupan sadržaj fenolnih kiselina u uzorcima je izračunat iz jednačine prave kalibracione krive za kafenu kiselinu ($y = 0,0009x + 0,0239$, $R^2 = 0,9899$) i izražen je u ekvivalentima kafene kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg EKK/g suvog ekstrakta). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.3. Ukupni sadržaj flavonoida

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonoida je korišćena procedura koju su razvili Park i sar. (1997). U test epruvete je odmereno po 0,5 mL uzorka koncentracije 100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, zatim je dodato 2,05 mL 80% etanola, 0,05 mL 10% aluminijum nitrata nonahidrata i 0,05 mL 1 M rastvora kalijum-acetata. Negativna kontrola je sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu) umesto uzorka. Za konstruisanje kalibracione krive je korišćen rastvor kvercetina (K) u 96% etanolu, u opsegu koncentracija od 10 do 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Apsorbanca je očitavana nakon inkubacije u trajanju od 40 minuta na sobnoj temperaturi, na 415 nm pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD.

Sadržaj flavonoida u ekstraktima je izračunat iz jednačine kalibracione krive za kvercetin ($y = 10,731x + 0,0043$, $R^2 = 0,9996$) i izražen u ekvivalentima kvercetina po gramu suvog ekstrakta (mg EK/g). Svaki uzorak je ispitan u triplikatu, a rezultati su prezentovani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.4. Ukupni sadržaj flavonola

Za određivanje ukupnog sadržaja flavonola korišćena je procedura koju su opisali Mihailović i sar. (2016), sa određenim modifikacijama. U test epruvete je odmereno 200 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) rastvorenih u 100% metanolu, zatim je dodato 200 μL metanolnog rastvora aluminijum hlorida (20 mg/mL) i 600 μL metanolnog rastvora natrijum acetata (50 mg/mL). Negativna kontrola je sadržala sve komponente, a umesto uzorka je sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu). Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćen je kvercetin (K) rastvoren u 100% metanolu, u koncentracijama od 10 – 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Apsorbanca je očitavana na 440 nm nakon inkubacije u trajanju od 150 minuta, pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD.

Ukupan sadržaj flavonola u ekstraktima je izračunat iz jednačine kalibracione krive za kvercetin ($y = 0,0173x + 0,0278$, $R^2 = 0,9966$) i izražen u ekvivalentima kvercetina po gramu suvog ekstrakta ($\text{mg EK}/\text{g suvog ekstrakta}$). Svaki uzorak je ispitan u triplikatu, a rezultati su prezentovani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.5. Ukupni sadržaj kumarina

Metoda za određivanje ukupnog sadržaja kumarina je rađena prema proceduri opisanoj od strane de Amorim i sar. (2012), sa određenim modifikacijama, u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića. U bunarić sa test supstancom na mikrotitracionoj ploči je odmereno 2 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nakon čega je dodato 8 μL destilovane vode i 2 μL rastvora olovo-acetata (5% w/v). U svaki bunarić je zatim dodato 28 μL destilovane vode i 160 μL 0,1 M hlorovodonične kiseline. Slepna proba je pripremljena tako da sadrži sve komponente, a umesto uzorka odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu). Mikrotitraciona ploča sa reakcionim smešama i slepom probom je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su izmerene apsorbance. Apsorbance su merene na 320 nm, korišćenjem čitača mikrotitracionih ploča Multiskan Sky Thermo Scientific, Finska.

Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćen je kumarin (Ku) rastvoren u metanolu u sledećem opsegu koncentracija: 5 do 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Svi uzorci su ispitan u triplikatu. Ukupan sadržaj kumarina u uzorcima je izračunat iz jednačine kalibracione krive ($y = 0,2440x + 0,0093$; $R^2 = 0,9983$) i predstavljen je u ekvivalentima kumarina kao $\text{mg EKu}/\text{g suvog ekstrakta}$. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.6. Ukupni sadržaj triterpena

Metoda za određivanje ukupnog sadržaja triterpena je rađena prema proceduri koja je opisana u radu Chang i sar. (2012), sa određenim modifikacijama, u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića. U bunarić sa test supstancom na mikrotitracionoj ploči je odmereno 10 μL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), nakon čega je dodato 15 μL rastvora vanilin-glacijalne kiseline (5% w/v) i 50 μL perhlorne kiseline. Mikrotitraciona ploča sa reakcionim smešama je inkubirana u periodu od 45 minuta na 60°C, nakon čega je ohlađena na ledu do temperature od 25°C. Zatim je u svaki bunarić dodato po 225 μL glacijalne sirćetne kiseline. Slepna proba je pripremljena tako da sadrži sve komponente, a umesto uzorka odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu). Apsorbance su merene na 548 nm, korišćenjem čitača mikrotitracionih ploča Multiskan Sky Thermo Scientific, Finska. Za konstruisanje kalibracione krive umesto ekstrakta korišćena je

ursolna kiselina (UK) rastvorena u 100% metanolu, u koncentraciji od 5 do 1000 µg/mL. Svaki uzorak je ispitan u triplikatu.

Ukupan sadržaj triterpena u uzorcima je izračunat iz jednačine kalibracione krive ($y = 0,0008x + 0,0082$, $R^2 = 0,995$) i predstavljen je u ekvivalentima ursolne kiseline kao mg EUK/g suvog ekstrakta. Rezultati su prezentovani kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.7.7. HPLC-DAD analiza

Fenolna jedinjenja u ispitivanim ekstraktima su identifikovana upoređivanjem retencionih vremena i spektra apsorpcije (200-400 nm) nepoznatih pikova sa referentnim standardima. HPLC-DAD analiza je izvedena na aparatu serije Agilent 1200 (Agilent Technologies, SAD) opremljenom Lichrospher® 100 RP 18e kolonom (5 mm, 250 × 4 mm). Mravlja kiselina u vodi (0,17%) predstavljala je mobilnu fazu A, dok je mobilna faza B bila acetonitril. Zapremina injekcije je iznosila 10 µL, a brzina protoka je bila 0,8 mL/min sa programom gradijenta (0-53 min 0-100% B). Vreme trajanja analize je bilo podešeno na 55 minuta. Analiza je sprovedena u tri ponavljanja, a rezultati su prikazani kao miligrami po gramu (mg/g) suvog ekstrakta \pm standardna devijacija.

3.8. Određivanje biološke aktivnosti ekstrakata

3.8.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae je ispitana korišćenjem pet različitih testova: DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijum so) i FRAP (engl. *Ferric-Reducing Ability of Plasma*) testom, testom određivanja ukupnog redukcionog potencijala, kao i β -karoten/linolna kiselina testom.

3.8.1.1. DPPH test

U DPPH testu se kolorimetrijski prati redukcija DPPH radikala promenom boje DPPH rastvora od tamno ljubičaste (DPPH radikal) do žute (redukovani DPPH), do koje se dolazi u prisustvu antioksidanasa koji deluju kao donori elektrona i prevode DPPH radikal u hidrazin. Dakle, test se zasniva na redukciji rastvora obojenih stabilnih slobodnih radikala DPPH redukcionim sredstvom. Kada antioksidativna supstanca redukuje DPPH radikal u prisustvu vodonika kao donora elektrona, dolazi do obezbojavanja, koje je proporcionalno prisutnim elektronima u rastvoru, pri čemu je redukciona sposobnost testirane supstance veća što je veći stepen obezbojavanja rastvora (Yeo i Shahidi, 2019).

Za određivanje inhibicije DPPH radikala korišćena je procedura koju je razvio Blois (1958), sa određenim modifikacijama. Metanolni rastvor DPPH (40 µg/mL) je pripremljen neposredno pre eksperimenta. Prvo je u svaku test epruvetu dodato po 100 µL ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 µg/mL) i 900 µL radnog rastvora DPPH. Negativna kontrola je sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu) umesto uzorka. BHA, BHT i askorbinska kiselina (AK) su korišćeni kao pozitivne kontrole (referentni antioksidanti ili standardi). Uzorci, negativna i pozitivna kontrola su pripremljeni u triplikatu. Nakon inkubacije u trajanju od 30 minuta u mraku, na sobnoj temperaturi, pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD, je merena apsorbanca na 517 nm.

Inhibicija DPPH radikala u prisustvu testiranog uzorka je izračunata na osnovu sledeće jednačine i izražena u procentima (%):

$$\text{Inhibicija DPPH radikala (\%)} = (A_c - A_{uz})/A_c \times 100,$$

gde je A_c apsorbanca negativne kontrole i A_{uz} je apsorbanca reakcije DPPH radikala sa uzorkom različite koncentracije. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.8.1.2. ABTS test

ABTS test je kolorimetrijski test koji se zasniva na gubitku boje ABTS rastvora uzrokovanog prisustvom antioksidativnog agensa, koji deluje kao donor elektrona i prevodi ABTS katjon (plavozelene boje) u neutralni, molekulski oblik (bezbojan). Kao i u prethodnom testu, redukciona sposobnost testirane supstance je veća ukoliko je stepen obezbojavanja rastvora veći (Erel, 2004).

Inhibicija ABTS radikala ekstraktima je određena korišćenjem procedure koju su opisali Miller i sar. (1993) sa određenim modifikacijama. Dvanaest do šesnaest sati pre početka eksperimenta je izvršena aktivacija ABTS⁺ radikala tako što je napravljen 7 mM štok rastvaranjem ABTS u 2,46 mM rastvora kalijum-persulfata. Neposredno pre eksperimenta je štok rastvor razblažen destilovanom vodom do postizanja sledeće apsorbance radnog rastvora: $0,70 \pm 0,02$ na 734 nm. U 25 μ L odgovarajuće koncentracije ekstrakta (100, 250 i 500 μ g/mL) ili rastvora AK (pozitivna kontrola) dodato je 1000 μ L radnog rastvora ABTS i epruvete su inkubirane 30 minuta na 30°C. Negativna kontrola je sadržala odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovanu vodu) umesto uzorka. Uzorci, negativna i pozitivna kontrola su pripremljeni u triplikatu. Apсорbanca je merena na 734 nm pomoću Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometra, SAD.

Inhibicija ABTS radikala u prisustvu testiranog uzorka je izračunata na osnovu sledeće jednačine i predstavljena je u procentima (%):

$$\text{Inhibicija ABTS radikala (\%)} = (A_c - A_{uz})/A_c \times 100,$$

gde je A_c apsorbanca negativne kontrole, a A_{uz} je apsorbanca ABTS rastvora sa uzorkom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.8.1.3. FRAP test

FRAP testom se meri ukupni antioksidativni potencijal uzorka koristeći redukciju feri tripiridiltriazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ) u fero tripiridiltriazin (Fe(II)-TPTZ) na niskoj pH vrednosti. Dakle, test meri redukciju feri (Fe³⁺) u fero (Fe²⁺) jon u reakcionoj smeši u prisustvu antioksidativne supstance, pri čemu se reakcija odigrava na niskim vrednostima pH. Ova metoda koristi antioksidante kao redukujuće agense, odnosno donore elektrona u kolorimetrijskim reakcijama gde se, u kiseloj sredini, izaziva formiranje obojenog fero-kompleksa iz bezbojnog feri-kompleksa (Benzie i Strain, 1996).

FRAP test je izveden prema proceduri koju su opisali Benzie i Strain (1996), sa određenim modifikacijama. FRAP reagens je pripremljen neposredno pre eksperimenta tako da sadrži natrijum acetatni pufer (300 mmol/L, pH 3,6), 10 mmol/L TPTZ u 40 mmol/L hlorovodonične kiseline i 20 mmol/L rastvor gvožđe (III)-hlorida heksahidrata u odnosu 10:1:1 (v/v/v). Reagens je pre upotrebe ugrevan do 37°C. U 3 mL radnog FRAP rastvora dodato je 100 μ L uzorka (koncentracije 100, 250 i 500 μ g/mL) i nakon inkubacije od 4 minuta, merena je apсорbanca na 593 nm koristeći Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometar, SAD. Odgovarajući rastvarač (70% metanol, 70% etanol ili destilovana

voda) je bio korišćen umesto uzorka da bi se pripremila negativna kontrola. AK, BHA i BHT su korišćeni kao pozitivne kontrole.

Za konstrukciju kalibracione krive za Fe(II) korišćen je rastvor gvožđe sulfat heptahidrata (200-1600 $\mu\text{mol/L}$) umesto uzorka ($y = 0,803x + 0,003$, $R^2 = 0,999$), dok su rezultati izraženi kao $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ suvog ekstrakta i predstavljeni kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.8.1.4. Ukupni redukcionni potencijal

Ukupni redukcionni potencijal (URP) ekstrakata je određen metodom koju je razvio Oyaizu (1986), a po proceduri uvedenoj od strane Tusevski i sar. (2014), sa pojedinim modifikacijama. Kao i prethodna metoda, i ova metoda se zasniva na praćenju redukcionnog potencijala ispitivanog uzorka na redukciju Fe^{3+} (feri) u Fe^{2+} (fero) jon, usled čega se razvija plavo-zelena boja čiji se intenzitet meri spektrofotometrijski (Jamuna i sar., 2010).

U reakcionu smešu je dodato 100 μL uzorka (koncentracije 100, 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$) rastvorenog u odgovarajućem rastvaraču, 200 μL fosfatnog pufera (0,2 M, pH 6,6) i 200 μL 1% kalijum heksacijanoferata(III). Nakon inkubacije od 20 min (vodeno kupatilo, 50°C) dodato je 200 μL 10% trihlorsirćetne kiseline, 200 μL destilovane vode i 40 μL 0,1% gvožđe(III) hlorida. Negativna kontrola je pripremljena na isti način kao i reakciona smeša, s tim da je umesto uzorka dodato 100 μL odgovarajućeg rastvarača (70% metanola, 70% etanola ili destilovana voda). Apsorbanca je izmerena nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi.

URP uzoraka je izračunat pomoću kalibracione krive AK (0-1 mg/L) ($y = 0,0011x + 0,0577$, $R^2 = 0,9949$) i rezultati su predstavljeni kao μmol ekvivalenata askorbinske kiseline po gramu suvog ekstrakta ($\mu\text{mol EAK/g}$). Uzorci i standardi su pripremljeni u triplikatu, dok su rezultati prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

3.8.1.5. β -karoten/linolna kiselina test

Princip β -karoten/linolna kiselina testa se bazira na inhibiciji dekolorizacije rastvora β -karotena od strane produkata oksidacije linolne kiseline, u prisustvu antioksidativnog agensa, budući da antioksidanti mogu reagovati sa slobodnim radikalima nastalim u procesu oksidacije linolne kiseline ili drugim slobodnim radikalima prisutnim u sistemu. Lipidni peroksilni radikali (koji mogu biti radikali linolne kiseline) dovode do prekida π -konjugacije C=C dvostruke veze β -karotena, čime dolazi do obezbojavanja narandžasto-žute emulzije β -karotena. Linolna kiselina se dodaje reakcionoj smeši jer porast temperature u sistemu dovodi do formiranja radikala linolna kiseline, koji napadaju β -karoten, što ima za posledicu pomenuto obezbojavanje β -karotena. Dakle, dodatkom antioksidativne supstance u reakcionu smešu za posledicu ima usporavanje obezbojavanja β -karotena (Ueno i sar., 2014; Chou i sar., 2019).

Ovaj test je izveden prema modifikovanoj proceduri koja je opisana od strane Dapkevicius i sar. (1998). Emulzija je pripremljena rastvaranjem β -karotena (2 mg), linolne kiseline (50 μL) i Tween 40 (400 mg) u 2 mL hloroforma, nakon čega je hloroform uparen pomoću rotacionog vakuum uparivača na 40°C, a suvi ostatak je rastvoren u 200 mL destilovane vode. U svaku test epruvetu je dodato 1000 μL emulzije i 140 μL ekstrakata (koncentracije 100, 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$). Kontrola je sadržala odgovarajući rastvarač umesto uzorka. Ekstrakti i pozitivne kontrole, BHA, BHT i AK su takođe pripremljeni u tri koncentracije, 100, 250 i 500 $\mu\text{g/mL}$. Apsorbanca reakcione smeše je izmerena na 490 nm, i to apsorbanca negativne kontrole neposredno nakon dodavanja svih komponenti ($t = 0$ min) i 2 sata nakon inkubacije ($t = 120$ min), dok je apsorbanca uzoraka izmerena samo u $t = 120$ min,

Perkin Elmer Lambda Bio UV/VIS spektrofotometrom, SAD. Antioksidativna aktivnost uzoraka je određena praćenjem inhibicije dekolizacije β -karotena, korišćenjem sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija obezbojavanja } \beta\text{-karotena (\%)} = [(A_{120}-K_{120}) / (K_0-K_{120})] \times 100,$$

gde su A_{120} i K_{120} apsorbance merene u $t = 120$ minuta za uzorke (A) i negativnu kontrolu (K), dok je K_0 apsorbance negativne kontrole na početku eksperimenta ($t = 0$ minuta). Dobljene vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost tri ponavljanja \pm standardna greška.

3.8.2. Genoprotektivna aktivnost

Protektivni efekat ekstrakata na zaštitu super-namotane DNK proučavani su u acelularnom sistemu primenom testa relaksacije plazmida, koji je ranije opisan od strane Russo i sar. (2006), pri čemu je praćen efekat uzoraka protiv hidroksil radikala (generisanog fotolizom vodonik-peroksida).

3.8.2.1. Priprema gela i šema eksperimenta

Eksperiment je prilagođen kadici za elektroforezu, pri čemu je korišćen češalj sa 20 bunarića. Bunarići na gelu za elektroforezu su popunjavani prema redosledu prikazanom na Slici 26 (za svaku grupu ekstrakata, metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti korišćena je ista šema):

	E1			E2			E3			E4			E5			E6				
<u>P</u>	<u>PZ</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	
E7			E8			E9			E10			E11			E12					
<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>
E13			E14			E15			E16			E17			E18					
<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>0,1</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>

Slika 26. Šema popunjavanja bunarića u gelu za elektroforezu.

P – neozračeni plazmid; PZ – ozračeni plazmid; E – ekstrakt.

3.8.2.2. Priprema razblaženja ekstrakata

Kao što je prikazano na Slici 26, ekstrakti su bili testirani na tri koncentracije: 100, 500 i 1000 $\mu\text{g/mL}$. Razblaženja ekstrakata su pripremljena u mikrotitracionoj ploči sa 96 bunarića, a $1 \times \text{PBS}$ je korišćen kao medijum. U prvih 6 bunarića na ploči je dodato 9 μL PBS-a, potom u 6 bunarića u drugom redu je dodato po 5 μL PBS-a, dok u trećem redu nije dodat PBS.

U svaki od 6 bunarića u prvom redu je zatim dodato po 1 μL odgovarajućeg ekstrakta u koncentraciji 10 mg/mL , potom u svaki od 6 bunarića u drugom redu je dodato po 5 μL uzorka iste koncentracije (10 mg/mL), a u trećem redu je dodato po 10 μL ekstrakta koncentracije 10 mg/mL . Na ovaj način bunarići u prvom redu su sadržali ekstrakt u koncentraciji 1 mg/mL , u drugom 5 mg/mL , a u trećem 10 mg/mL , a njihova finalna koncentracija je bila 100, 500 i 1000 $\mu\text{g/mL}$.

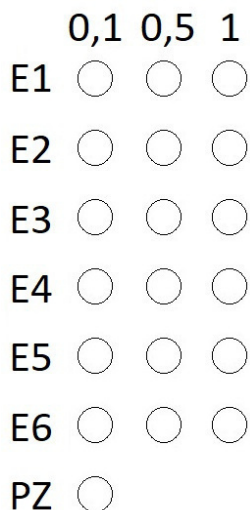
3.8.2.3. Priprema reakcione smeše

Reakciona smeša se sastojala od PBS-a, vodonik-peroksida i plazmida. Vodonik-peroksid (3 mM) je imao ulogu u produkciji slobodnih radikala prilikom UV zračenja. Koncentracija plazmida u smeši 20%, a vodonik-peroksid je dodat plazmidima pre zračenja.

Za 56 bunarića (Slika 26) bilo je potrebno ukupno 900 μL smeše koja je napravljena tako što se dodalo je 840 μL PBS, 60 μL plazmida i 10 μL vodonik-peroksida (kupovni hidrogen je razblažen 10 \times u PBS-u, a potom je u smešu dodato 10 μL pripremljenog razblaženja).

3.8.2.4. Zračenje

Pripremljena reakciona smeša (po 15 μL) je nanescena na poklopac mikrotitracione ploče od 96 bunarića prema Slici 27 (dat je primer za 6 ekstrakata):



Slika 27. Šema za dodavanje pripremljene reakcione smeše za ispitivanje genoprotektivne aktivnosti na mikrotitracionu ploču.

E predstavlja ekstrakate, a PZ je ozračeni plazmid, odnosno tretman bez ekstrakata.

U reakcionu smešu (15 μL 1 \times PBS koji sadrži 800 ng plazmida pUC19) dodato je po 1,5 μL ekstrakta koncentracije 100, 500 i 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (opisano u poglavlju 3.8.2.2.; u PZ nije dodat ekstrakt) i rastvarača (metanola i etanola) u finalnoj koncentraciji 7%, nakon čega je čitava smeša izložena UV zračenju (540 J/m^2) (3 minuta, UV lampa na 254 nm). Po isteku zračenja, na slobodno mesto na poklopcu je dodato još 15 μL reakcione smeše koja je služila kao negativna kontrola. Interakcija ekstrakata sa plazmidnom DNK prekinuta je dodavanjem 5 μL 6 \times loading boje (30% (v/v) glicerola, 0,25% (w/v) bromofenol plave i 0,25% (w/v) ksilen cijanola).

Elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu od 80 V, 300 mA oko sat vremena, dok bromfenol plavo nije prelazilo 75% gela. Gelovi su posmatrani na UV transiluminatoru pod ultraljubičastim svetlom na 312 nm i fotografisani digitalnim fotoaparatom, nakon čega su fotografije analizirane pomoću softvera ImageJ (National Institutes of Health, SAD). Svi tretmani su postavljeni i analizirani u tri pojedinačna eksperimenta.

3.8.3. Antigenotoksična aktivnost

3.8.3.1. Prokariotski model sistem

Inhibicija oštećenja DNK izazvana vodonik-peroksidom u ko-tretmanu sa odabranim ekstraktima procenjena je u SOS/*umuC* testom, prema protokolu opisanom u Kolarević i sar. (2018). Bakterija *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 je često korišćeni model sistem za ispitivanje (anti)genotoksičnih agenasa, a služi za praćenje niva ekspresije fuzionisanih *umuC* i *lacZ* gena koji se aktiviraju kao odgovor na indukovano oštećenje DNK.

Razlog zbog čega je *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 odabran kao model sistem za ove eksperimente jeste taj što ovaj soj sadrži plazmid pSK1002 sa *umuC* operonom koji je spojen sa *lacZ* genom, odgovornim za aktivnost β-galaktozidaze, te se ekspresija *umuC* gena može pratiti merenjem aktivnosti ovog enzima (Žegura i sar., 2006). U ovom testu, intenzitet indukcije SOS odgovora je kvantifikovan stepenom promene boje u sistemu koji korelira sa količinom oštećene DNK u ćeliji izazvanom njenim izlaganjem vodonik-peroksidu. Drugim rečima, intenzitet razvoja boje u bunaru je indirektan pokazatelj proizvedene β-galaktozidaze, što je dalje direktno povezano sa količinom indukovanog oštećenja DNK. Ipak, potrebno je naglasiti da je ova studija imala kao cilj merenje antigenotoksične aktivnosti ekstrakata porodice Lamiaceae nakon indukovanog oštećenja DNK, gde je očekivano smanjenje stope indukcije SOS odgovora, koje je takođe praćeno preko intenziteta boje u test sistemu.

Pre početka eksperimenata, izvedena je serija preliminarnih tretmana vodonik-peroksidom i koncentracija od 1,68 mM je izabrana kao najprikkladnija za dalja ispitivanja (visoka stopa indukcije SOS odgovora i niska inhibicija rasta bakterija). Tretman vodonik-peroksidom u finalnoj koncentraciji od 1,68 mM je izveden tokom 2 sata na 37°C u smešama koje su sadržale 10 μL ekstrakta (koncentracija 125, 250 i 500 μg/mL, prethodno tretirani vodonik-peroksidom) i 90 μL bakterijske kulture *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 u eksponencijalnoj fazi rasta. Sterilna bidestilovana voda je korišćena kao negativna kontrola, dok su metanol ili etanol (finalne koncentracije 3,5%) bili kontrola rastvarača. Nakon inkubacije, smeše su razblažene 10 puta, inkubirane 2 sata na 37°C i utvrđena je brzina rasta bakterija merenjem apsorbance na 600 nm, na čitaču mikrotitarskih ploča (Multiskan FC Thermo Scientific, SAD). Aktivnost β-galaktozidaze određena je korišćenjem ONPG kao supstrata nakon inkubacije na sobnoj temperaturi (25°C) u trajanju od 30 minuta. Dalje, apsorpcija je izmerena na 405 nm primenom referentnog rastvora bez bakterija. Brzina rasta bakterija (*G*, engl. *Growth*) izračunata je pomoću sledeće jednačine:

$$G = OD_{600} \text{ uzorka} / OD_{600} \text{ kontrole}$$

Odnos rasta koji je manji od 0,75, a koji predstavlja 25% inhibicije biomase, smatran je indikacijom citotoksičnosti.

Brzina indukcije (*IR*, engl. *Induction Rate*) izračunata je prema sledećoj jednačini:

$$IR = (OD_{405} \text{ uzorka} / OD_{405} \text{ kontrole}) \times G.$$

Svi tretmani su izvedeni u tri ponavljanja, u tri individualna eksperimenta.

3.8.3.2. Eukariotski model sistem

3.8.3.2.1. Tretman ćelija ekstraktima i priprema za SCGE komet test

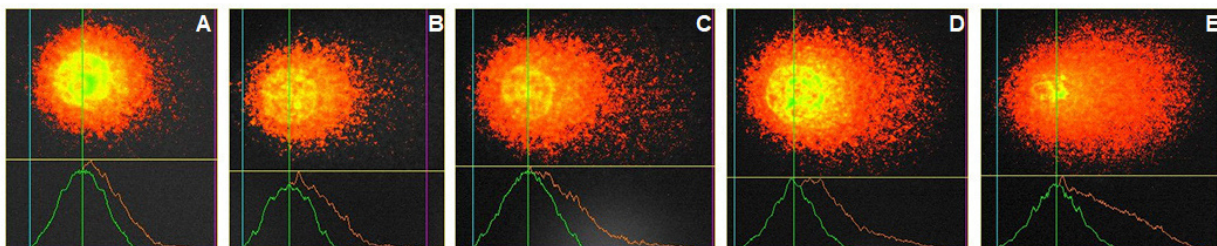
MRC-5 (10⁵ ćel./mL) su zasejane u bunariće mikrotitracionih ploča i gajene su na 37°C (5% CO₂, 24 h) da bi se postigao monosloj. Nakon ispranja 1×PBS-om ćelijama je dodat DMEM hranljivi medijum sa ekstraktima (finalnih koncentracija 25, 50 i 100 μg/mL) prethodno

tretiranih vodonik-peroksidom. Takođe, dodat je rastvarač (kao kontrola rastvarača) (0,7%), 50 mM vodonik-peroksida kao pozitivna kontrola, dok su u negativnoj kontroli bile netretirane ćelije. Ćelije su gajene sa 5% CO₂ na 37°C 24 h.

Nakon tretmana, iz svakog bunarića je odliven medijum, a ćelije su ponovo isprane 1×PBS i zatim su tripsinizovane. Ćelijska suspenzija je centrifugirana dva puta na 1000 rpm tokom 10 minuta, a ćelije resuspendovane u istom volumenu medijuma, izbrojane i razblažene do 3×10⁵ ćel./mL. Ovako pripremljene ćelije su korišćene za komet test.

3.8.3.2. Komet test

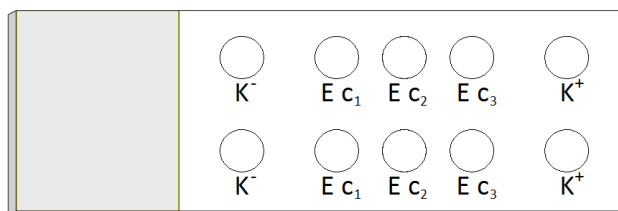
Komet test je priznata standardna metoda za procenu jednolančanih ili dvolančanih prekida DNK na nivou pojedinačne ćelije, kao i za procenu sposobnosti različitih supstanci da potpomognu reparaciju oštećenog DNK molekula (Azqueta i sar., 2014; Beedanagari, 2017). U ovom testu se prati kretanje negativno naelektrisanih fragmenata DNK, kroz gel za elektroforezu, ka pozitivnoj elektrodi, anodi. Budući da se manji fragmenti oštećene DNK brže kreću ka pozitivnoj elektrodi, nakon fluorescentnog bojenja i softverske vizuelizacije, može se primetiti da se oštećena DNK („rep“) razdvaja od intaktne DNK („glava“) (Beedanagari, 2017) i oštećena ćelijska jedra podsećaju na komete (Slika 28), te je tako ovaj test dobio svoj naziv. Za određivanje stepena oštećenja DNK u ovom testu važno je pratiti oblik, veličinu, kao i količinu „DNK kometa“.



Slika 28. Karakterističan oblik MRC-5 ćelija u komet testu.

Slika A predstavlja MRC-5 ćeliju koja je pripadala kontrolnoj, netretiranoj grupi, dok je na slici E prikazana MRC-5 ćelija koja pripada kontrolnoj grupi koja je bila tretirana samo vodonik-peroksidom. Na slikama B-D su predstavljene MRC-5 ćelije koje ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae na različitim koncentracijama (25, 50 i 100 µg/mL, respektivno) (foto: M. M. Oalđe Pavlović).

Korišćena je alkalna verzija SCGE (engl. *single cell gel electrophoresis*) komet testa prema protokolu opisanom u radu Kolarević i sar. (2016a), sa određenim modifikacijama. Na prethodno dobro oprane i odmašćene mikroskopske pločice naneta su tri sloja agaroze. Prvo je nanet 1% rastvor NMP, a nakon sušenja 24 h sobnoj temperaturi ponovo je naneta 1% NMP agarosa i ostavljena 5 min na 4°C. Na pločice je potom ponovo nanet 1% rastvor NMP agarose i ostavljene su 5 min na 4°C, kako bi se agarosa stegla. Po 30 µL prethodno pripremljenih suspenzija ćelija (sa tretmanima, pozitivnim i negativnim kontrolama) je pomešano sa 70 µL LMP agarose temperirane na 30°C, nakon čega je 15 µL ove suspenzije dodato na mikroskopske pločice prema Slici 29:



Slika 29. Šema organizacije uzoraka za Komet test na mikroskopskoj pločici.

K⁻ predstavlja negativnu kontrolu, bez vodonik-peroksida i ekstrakata, E označava ekstrakt, c₁-c₃ su različite (opadajuće) koncentracije ekstrakata, a K⁺ predstavlja pozitivnu kontrolu, sa vodonik-peroksidom, ali bez ekstrakata.

Nakon toga, pločice su potopljene u hladan rastvor za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1,5% Triton X-100, pH = 10) tokom 60 minuta. Nakon ovog koraka, pločice su poređane u kadicu za elektroforezu i potopljene u hladan rastvor (4°C) za denaturaciju i elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH = 13). Nakon denaturacije u trajanju od 20 minuta urađena je elektroforeza (0,5 – 0,75 V/cm, 300 mA) u istom rastvoru koji je korišćen i za denaturaciju. Nakon elektroforeze, pločice su potopljene 15 minuta u hladan rastvor za neutralizaciju (0,4 M Tris, pH = 7,5). Fiksacija je izvršena u hladnom metanolu (15 minuta). Nakon fiksacije, pločice su sušene 24 sata u mraku na 4°C. Fiksirane pločice su čuvane u kutiji na sobnoj temperaturi do analize. Neposredno pre analize, pločice su potopljene u hladnu destilovanu vodu 15 minuta kako bi se agaroza rehidrirala. Za bojenje pločica korišćen je akridin oranž (2 µg/mL). Na svaki gel je nanoseno po 20 µL rastvora boje i pokriven je pokrovnim staklom. Pločice su posmatrane na fluorescentnom mikroskopu (Leica, DMLS, Austrija), na uvećanju 400, uz korišćenje ekscitacionog filtera 510-560 nm i graničnog filtera 590 nm. Za analizu pločica, korišćen je softver Comet IV Computer Software (Perceptive Instruments, Velika Britanija). U svakoj kupoli je prebrojen uzorak od 50 kometa, pri čemu je po uzorku analizirano ukupno 100 kometa. Nivo oštećenja je procenjen korišćenjem parametra TI% (engl. *tail intensity*), koji predstavlja procenat DNK u repu komete.

3.8.4. Antidijabetična aktivnost ekstrakata

Antidijabetična aktivnost ekstrakata je određena korišćenjem dva testa: testa inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze i testa inhibicije aktivnosti enzima α -glukozidaze.

3.8.4.1. Inhibicija aktivnosti α -amilaze

Princip inhibicije enzima α -amilaze se zasniva na prekidanju dejstva α -amilaze na skrob pod uticajem biljnih ekstrakata, tako da dolazi do zaustavljanja njegove digestije u maltozu. Reakcija je kolorimetrijska, pri čemu jači uzorak dovodi do tamno plave boje reakcione smeše nakon dodavanja Lugolovog rastvora (jodin/kalijum jodid, koji služi kao indikator), dok reakciona smeša koja sadrži uzorak sa slabijom sposobnošću inhibicije α -amilaze slabije boji reakcionu smešu nakon dodavanja Lugolovog rastvora.

Za određivanje inhibicije α -amilaze koristi se metoda Caraway-Somogy jodin/kalijum jodid, opisana od strane Zengin i sar. (2014), sa pojedinim modifikacijama. U svaki test bunarić na mikrotitracionoj ploči sa 96 bunarića je odmereno po 25 µL uzorka (U) odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 µg/mL), nakon čega je dodato po 50 µL rastvora enzima (0,5 mg/mL) u natrijum-fosfatnom puferu (0,1 M, pH 6,8, sa 6 mM natrijum hlorida). Nakon inkubacije od 10 minuta na 37°C dodato je 50 µL 0,2% skroba i inkubirano još 10 minuta na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 25 µL 1 M hlorovodonične kiseline, nakon čega je dodato 100 µL Lugolovog rastvora. Kontrola aktivnosti enzima (K₁) je sadržala pufer umesto uzorka, kontrola supstrata (K₂) je sadržala pufer umesto enzima, dok je kontrola

obojenosti uzoraka (B) sadržala pufer umesto enzima, skroba i Lugolovog rastvora. Kao pozitivna kontrola korišćena je akarboza. Sva merenja su ponovljena tri puta.

Apsorbanca je očitana na 630 nm, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiskan Sky Thermo Scientific, Finska. Procenat inhibicije (% I) aktivnost α -amilaze je izračunat na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija } \alpha\text{-amilaze (\%)} = [(U-B)-K_1] / K_2 \times 100,$$

gde U predstavlja apsorbancu reakcione smeše sa uzorkom, B predstavlja kontrolu obojenosti uzorka, K_1 predstavlja kontrolu rada enzima, a K_2 predstavlja kontrolu supstrata.

3.8.4.2. Inhibicija aktivnosti α -glukozidaze

Princip testa inhibicije enzima α -glukozidaze se zasniva na zaustavljanju katalize konverzije supstrata *p*-nitrofenil- β -D-glukopiranozida (pNPG) do β -D-glukopiranozida i *p*-nitrofenola, koji je žute boje i čija se apsorbanca meri na 405 nm.

Test inhibicije α -glukozidaze je rađen prema proceduri koju su opisali Wan i sar. (2013). U bunarić sa uzorkom (U) je odmereno po 120 μ L ekstrakta odgovarajuće koncentracije (100, 250 i 500 μ g/mL) i po 20 μ L rastvora enzima (0,5 U/mL) u kalijum-fosfatnom puferu (0,1 M, pH 6,8). Nakon inkubacije od 5 minuta na 37°C dodato je 20 μ L 5 mM pNPG i inkubirano 20 minuta na 37°C. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 80 μ L 0,2 M natrijum karbonata u puferu. Negativna kontrola (K) je sadržala pufer umesto uzorka, dok je kontrola obojenosti (B) sadržala sve komponente osim enzima, umesto kog je dodat pufer. Akarboza je korišćena kao pozitivna kontrola. Sva merenja su ponavljena tri puta.

Apsorbanca je očitana na 405 nm, pomoću čitača mikrotitracionih ploča Multiskan Sky Thermo Scientific, Finska. Procenat inhibicije (%) aktivnosti α -glukozidaze je izračunat na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija } \alpha\text{-glukozidaze (\%)} = [K-(U-B)] / K \times 100,$$

gde K predstavlja negativnu kontrolu rada enzima, U predstavlja apsorbancu reakcione smeše sa uzorkom, a B predstavlja kontrolu obojenosti uzorka.

3.8.5. Antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna aktivnost

Antineurodegenerativna aktivnost ekstrakata je određena korišćenjem dva biohemijska testa: testa inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze i testa inhibicije aktivnosti enzima tirozinaze.

S druge strane, antineuroinflamatorna aktivnost ekstrakata su ispitane korišćenjem BV2 ćelijske linije i modela transfera supernatanata BV2 ćelija na SH-SY5Y ćelije u MTT (engl. *Methyl-Thiazol-Tetrazolium*), NBT (engl. *Nitro Blue Tetrazolium*) i Gris (Greiss) testovima.

3.8.5.1. Antineurodegenerativna aktivnost

3.8.5.1.1. Inhibicija aktivnosti acetilholinesteraze

Test inhibicije enzima acetilholinesteraze (AChE) se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji hidrolize acetilholin-jodida, gde dolazi do formiranja žute boje 5-tio-2-nitrobenzoatnog anjona koji nastaje kao produkt reakcije DTNB sa tiholinima u prisustvu AChE.

Aktivnost uzoraka u inhibiciji AChE je merena spektrofotometrijski na osnovu procedure koju su opisali Ellman i sar. (1961), sa pojedinim modifikacijama. Reakciona smeša

(U) je pripremljena dodavanjem sledećih komponenti u svaki bunarić mikrotitracione ploče sa 96 bunarića: 140 µL natrijum-fosfatnog pufera (0,1 M, pH 7), 20 µL rastvora DTNB, 20 µL rastvora uzorka u natrijum-fosfatnom puferu koji sadrži 5% DMSO (koncentracija uzoraka 100, 250 i 500 µg/mL) i 20 µL rastvora AChE (5 U/mL) u Tris-HCl puferu (20 mM, pH 7,5). Smeša bez uzoraka je obeležena kao negativna kontrola (K), a galantamin je korišćen kao pozitivna kontrola. Nakon inkubacije (15 min, 25°C), reakcija je inicirana dodavanjem 10 µL acetilholin-jodida. Apsorbanca je očitavana na talasnoj dužini od 412 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Tecan Sunrise SN, Švajcarska, opremljenim Xfluo4 softverom.

Procenat inhibicije AChE (%) je izračunat na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija AChE (\%)} = [K-U / K] \times 100,$$

gde je K – apsorbanca negativne kontrole, a U – apsorbanca reakcione smeše sa uzorkom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost iz tri ponavljanja ± standardna greška.

3.8.5.1.2. Inhibicija aktivnosti tirozinaze

Tirozinaza je ključni enzim u prva dva koraka biosinteze melanina, katalizujući hidrosilaciju L-tirozina u 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) i oksidaciju L-DOPA u dopakinon.

Aktivnost tirozinaze je izmerena korišćenjem dopahrom metode, opisane od strane Masuda i sar. (2005), sa pojedinim modifikacijama.

Različite koncentracije uzoraka (100, 250 i 500 µg/mL) su rastvorene u natrijum-fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) sa 5% DMSO, dok je kojična kiselina rastvorena u natrijum fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) u istim koncentracijama kao i biljni ekstrakti. Reakciona smeša je pripremljena dodavanjem 80 µL natrijum-fosfatnog pufera, 40 µL rastvora tirozinaze (46 U/L) i 40 µL uzorka. Smeša bez uzoraka je korišćena kao negativna kontrola (K), a kojična kiselina kao pozitivna kontrola. Nakon dodavanja 40 µL rastvora L-DOPA u puferu i inkubacije (30 min, 25°C), apsorbanca je merena na talasnoj dužini od 475 nm pomoću čitača mikrotitracionih ploča Tecan Sunrise SN, Švajcarska, opremljenim Xfluo4 softverom. Procenat inhibicije tirozinaze je izračunat na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Inhibicija tirozinaze (\%)} = [K-U / K] \times 100,$$

gde je K – apsorbanca negativne kontrole, a U – apsorbanca reakcione smeše sa uzorkom. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost iz tri ponavljanja ± standardna greška.

3.8.5.2. Antineuroinflamatorna aktivnost

3.8.5.2.1. Određivanje vijabilnosti BV2 ćelija (MTT test)

Uticaj etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae je ispitana primenom MTT testa nakon 24 sata tretmana (Mosmann, 1983). MTT test je kolorimetrijski test za procenu ukupne mitohondrijske aktivnosti kojom se može izraziti i ćelijska vijabilnost. Zasniva se na sposobnosti metabolički aktivnih ćelija da redukuju žutu tetrazolijumovu so (MTT) u ljubičaste kristale formazana zahvaljujući prisustvu NAD(P)H-zavisnih enzima, oksidoreduktaze.

Nakon 24 h inkubacije ćelija sa ekstraktima (finalne koncentracije 10 µg/mL) u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića, uklonjeno je 100 µL medijuma i u svaki bunarić je dodato 10 µL rastvora MTT (finalne koncentracije 5 mg/mL u PBS) i inkubirano 3 sata na 37°C i 5% CO₂. Nakon toga je dodato 100 µL SDS-HCl (10% SDS u 0,1% 1 M hlorovodonične

kiseline) i ćelije su ostavljene na inkubaciju preko noći u mraku, kako bi se kristali formazana rastvorili.

Apsorbanca redukovanog MTT-a je izmerena na 540 nm pomoću čitača mikroploča (LKB 5060-006, LKB Instruments, Austrija). Rezultati su izraženi kao procenat vijabilnih ćelija, i izračunati su na osnovu sledeće jednačine:

$$\text{Vijabilnost ćelija (\%)} = [T / K] \times 100,$$

pri čemu T predstavlja apsorbancu tretiranih ćelija, a K apsorbancu netretiranih ćelija, odnosno negativne kontrole.

3.8.5.2.2. Određivanje produkcije reaktivnih oblika kiseonika (NBT test)

Koncentracija superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$) u ćelijama je određena NBT testom (Auclair i Voisin, 1985), koja se zasniva na redukciji NBT $O_2^{\cdot-}$ radikalima, pri čemu se formira diformazan, ljubičasti nerastvorljivi talog, koji se može koristiti za kvantifikaciju nivoa produkovanog $O_2^{\cdot-}$ od strane ćelija.

Nakon inkubacije ćelija sa ekstraktima (finalne koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$) u trajanju od 24 sata, uklonjeno je 100 μL hranljivog medijuma i u svaki bunarić je dodato 10 μL rastvora NBT (5 mg/mL u dejonizovanoj vodi), nakon čega su ćelije inkubirane 3 h na 37°C i 5% CO_2 . Kako bi se kvantifikovala produkcija formazana, dodato je 100 μL SDS-HCl (10% SDS u 0,1% 1 M hlorovodonične kiseline) i ostavljeno na 24-časovnu inkubaciju u mraku, nakon čega su izmerene apsorbance na 540 nm na čitaču mikrotitracionih ploča LKB 5060-006, LKB Instruments, Austrija. Rezultati su izraženi kao NBT indeks, izračunat kao odnos između apsorbanci tretiranih ćelija i netretirane kontrole.

3.8.5.2.3. Određivanje produkcije nitrita (Grisov test)

Određivanje nitrita (NO_2^-) kao pokazatelja nivoa NO izvršeno je spektrofotometrijskom metodom opisanoj od strane Griess (1879), sa određenim modifikacijama. Grisov reagens se sastoji od dve komponente: N-(1-naftil) etilendiamin dihidrohlorida (10 mg) rastvorenog u dejonizovanoj vodi (10 mL) i 1% sulfanilamida (100 mg) rastvoren u 5% fosfornoj kiselini (10 mL), koje su pomešane u jednakim zapreminama neposredno pre nanošenja na mikrotitracionu ploču sa 96 bunarića. Grisova reakcija se zasniva na dvostepenoj reakciji u kojoj zakiseljeni NO_2^- produkuje nitrozujući agens, koji potom reaguje sa sulfanilamidom dajući diazonijum jon. Ovaj jon se kasnije vezuje za N-(1-naftil) etilendiamin da bi se dobio hromoforni azo-derivat koji apsorbuje svetlost na 540 nm.

Nakon 24 sata inkubacije ćelija sa ekstraktima (finalne koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$), 50 μL supernatanta iz svakog bunarića je prebačeno na praznu mikrotitracionu ploču. Nakon toga, u svaki bunarić je dodato 50 μL sveže pripremljenog Grisovog reagensa i ploče su inkubirane 10 minuta u mraku. Nakon inkubacije je izmerena apsorbanca reakcione smeše na 540 nm, na čitaču mikrotitracionih ploča LKB 5060-006, LKB Instruments, Austrija. Koncentracija nitrita je izračunata iz standardne krive natrijum nitrita i izražena u $\mu\text{mol/L}$ (μM).

3.8.5.2.4. Model transfera supernatanta

Nakon tretmana BV2 ćelija LPS-om i etanolnim ekstraktima predstavnika porodice Lamiaceae opisan u poglavlju 3.8.5.2.1., a prema modelu transfera supernatanta (Pišlar i sar., 2017) prebačeno je 100 μL supernatanta BV2 ćelija tretiranih LPS-om (i biljnim ekstraktima finalne koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$) iz svakog bunarića mikrotitracione ploče sa 96 bunarića na mikrotitracionu ploču u kojoj su SH-SY5Y ćelije dostigle konfluentan rast. Mikrotitracione

ploče su ostavljene na inkubaciju tokom 24 sata (37°C, 5% CO₂), nakon čega je urađen MTT test po istom principu kao što je opisano u poglavlju 3.8.5.2.1.

3.8.6. Antitumorska aktivnost

Antitumorski potencijal etanolnih ekstrakata (finalne koncentracije 25, 50 i 100 µg/mL) je ispitan na HCT-116 ćelijama korišćenjem MTT (opisan u poglavlju 3.8.5.2.1.), NBT (opisan u poglavlju 3.8.5.2.2.), Grisovog (opisan u poglavlju 3.8.5.2.3.) i komet testa (opisan u poglavlju 3.8.6.2.2., pri čemu je finalna testirana koncentracija ekstrakata bila 50 µg/mL), dok je etopozid korišćen kao pozitivna kontrola.

Za MTT, NBT i Grisov test, HCT-116 ćelije (1×10⁵ ćel./mL) su zasejane u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića i gajene su na 37°C (5% CO₂, 24 h) kao što je opisano u poglavlju 3.6.4.

Za komet test, HCT-116 ćelije (1×10⁵ ćel./mL) su zasejane u pločama sa 24 bunarića, u zapremini od 500 µL. Ćelije su inkubirane 24 sata na 37°C, 5% CO₂, nakon čega je dodato 500 µL odgovarajuće koncentracije etanolnih ekstrakata. Nakon inkubacije u trajanju od 24 sata (37°C, 5% CO₂), odvađeno je 1 mL medijuma iz svakog bunarića, a ćelije su isprane sa 500 µL 1×PBS. Zatim je dodato 100 µL 0,25% tripsina i inkubirano 3 minuta (37°C, 5% CO₂), nakon čega je dodato 300 µL DMEM kompletnog hranljivog medijuma (da bi se neutralisao tripsin), a sadržaj svakog bunarića (400 µL) je prebačen u epruvete, nakon čega je rađen komet test, istom principu kao što je opisano u poglavlju 3.8.3.2.2. Rezultati su prikazani kao nivo oštećenja DNK u netretiranim ćelijama koje su služile kao negativna kontrola, kao i nakon tretmana ekstraktima i etopozidom, poznatim hemoterapeutikom koji je služio kao pozitivna kontrola.

3.8.7. Antibakterijska aktivnost

Antibakterijska aktivnost ekstrakata je određena korišćenjem testom minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), ispitivanjem uticaja ekstrakata na adheziju i invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća, kao i ispitivanjem uticaja uzoraka na formiranje biofilma i na već formirani biofilm.

3.8.7.1. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK test)

Minimalne inhibitorne koncentracije metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata određivane su mikrodilucionom metodom, u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića, korišćenjem serije dvostrukih razblaženja testirane supstance. Kao indikator bakterijskog rasta korišćen je vodeni rastvor resazurina (finalne koncentracije 675 µg/mL).

Štokovi uzoraka su napravljeni tako da sadrže 400 µL medijuma¹ i 100 µL ispitivanih metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata koncentracije 10 mg/mL (finalna koncentracija 2 mg/mL). Iz tih štokova je potom dodato po 200 µL u svaki bunarić koji je bio namenjen za testiranje najviše koncentracije uzorka. Svi ostali bunarići su sadržali po 100 µL medijuma. U sledećem koraku je napravljen gradijent koncentracije ispitivanih supstanci, tako što se multikanalnom pipetom prebacilo po 100 µL zapremine iz svakog bunarića sa višom koncentracijom uzorka u sledeće bunariće namenjene za testiranje niše koncentracije uzorka, i tako sve do poslednjeg bunarića, odakle se izbacilo 100 µL zapremine. Nakon ovog koraka se u svim bunarićima nalazila jednaka zapremina (100 µL) i svaki red je bio dvostruko razblažen

¹ MHB medijum je korišćen za sve bakterijske sojeve, osim za *L. innocua* i *E. faecalis*, za koje je korišćen BHI medijum

u odnosu na prethodni. Potom je u svaki bunarić dodato po 80 μL medijuma i po 20 μL bakterija. S obzirom na to da rezultate nije bilo moguće očitati na čitaču mikrotitracionih ploča zbog zamućenosti ekstrakata, resazurin (22 μL) je dodat istog dana.

Pored mikrotitracionih ploča sa metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima, paralelno su rađene i kontrole sterilnosti medijuma, rasta bakterija (negativna kontrola), rastvarača (za metanol i etanol), kao i odgovarajući antibiotik za svaki bakterijski soj (pozitivna kontrola). Mikrotitracione ploče su inkubirane 24 h na 37°C.

Kako bi se odredio bakteriostatički ili baktericidni efekat ispitane supstance, iz svih bunarića u kojima nije bilo rasta (ljubičasto-plava boja) izvršilo se presejavanje na čvrste hranjive podloge (MHA), nakon čega su podloge inkubarane 24 h na 37°C. Nakon toga, na osnovu prisustva ili odsustva rasta bakterija, bilo je moguće utvrditi da li test supstanca pokazuje bakteriostatičko ili baktericidno dejstvo i na kojoj koncentraciji. Najmanja koncentracija na kojoj nije bilo rasta bakterija označena je kao baktericidna (MBK), a koncentracija na kojoj je došlo do rasta bakterija kao bakteriostatička (MIK).

3.8.7.2. Uticaj ekstrakata na adheziju i invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća

3.8.7.2.1. Ispitivanje adhezije

Konfluentni monosloj MRC-5 ćelija je ispran temperiranim PBS-om i u svaki bunarić na mikrotitracionoj ploči sa 24 bunarića je dodat 1 mL svežeg DMEM kompletnog hranljivog medijuma. Zatim je dodat alikvot svake bakterijske kulture tako da je postignut multiplicitet infekcije (MOI) od 5:1 (bakterije:ćelije) i ploče su inkubirane 3 sata na 37°C. Nakon inkubacije je uklonjen medijum iz zaraženih ćelija i ćelije su isprane 3 puta temperiranim PBS-om. Da bi se lizirale ćelije i odvojile adherirane bakterije, dodato je 100 μL 1% Triton X-100 u svaki bunarić. Nakon ovog koraka, ćelije su inkubirane 10 minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je dodato 900 μL LB medijuma. Suspenzije su bile pažljivo homogenizovane mikropipetom. Bunarići bez ćelija koji su sadržali samo inokulum bakterija su bili homogenizovani na isti način kao što je objašnjeno za bunariće koji su sadržali suspenzije ćelija.

Odgovarajuća razblaženja suspenzija adherentnih bakterija i bakterijskih inokuluma zasejana su na LA podlogu i inkubirana preko noći na 37°C. Nakon inkubacije su prebrojene izrasle kolonije i urađen je t-test u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržala etanol umesto uzorka.

3.8.7.2.2. Ispitivanje invazije

Mikrotitracione ploče u kojima su gajene MRC-5 ćelije do konfluentnog rasta su isprane temperiranim PBS-om i u svaki od 24 bunarića je dodat 1 mL svežeg DMEM kompletnog hranljivog medijuma. Nakon toga je dodat alikvot svake bakterijske kulture tako da je postignut MOI od 5:1 (bakterije:ćelije) i ploče su inkubirane 3 sata na 37°C. Adherirane ćelije su isprane medijumom sa 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicina i ploče su inkubirane sat vremena na 37°C. Nakon uklanjanja medijuma i ćelije su isprane PBS-om kako bi se uklonile bakterije i lizirane 1% Triton X-100. Sakupljeni lizat je centrifugiran na 4000 rpm (5 minuta) i ćelije su isprane sa 1 \times PBS kako bi se uklonile bakterije. Po 10 μL razblaženja bakterija (1×10^{-1} , 1×10^{-2} , 1×10^{-3} i 1×10^{-4} u 1 \times PBS) je zasejano na TSA podlogu i inkubirano 24 sata na 37°C. Nakon toga su prebrojene kolonije, izračunat je broj bakterija po mililitru i urađen je t-test u odnosu na negativnu kontrolu koja je sadržala etanol umesto uzorka.

3.8.7.2.3. Ispitivanje efekta ekstrakata na formiranje biofilma

Efekat odabranih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 je ispitan prema metodi opisanoj od strane Spoering i Lewis (2001). U prve bunariće na mikrotitracionoj ploči je dodato 200 μ L MIK koncentracije ekstrakata (osim za *H. officinalis* i *O. basilicum*, gde su korišćene $\frac{1}{4}$ MIK), a u sve ostale bunariće je dodato po 100 μ L MHB medijuma. Zatim je 100 μ L sadržaja iz prvih bunarića prebačeno u druge, iz drugih u treće, da bi na kraju iz poslednjeg reda bunarića bilo uklonjeno 100 μ L sadržaja, pri čemu su bile testirane MIK i sub-MIK koncentracije. Zatim je u sve bunariće dodato po 100 μ L kulture *P. aeruginosa* PAO1 (1×10^7 ćelija po mL), čime su dobijena dvostruka razblaženja ekstrakata. Nakon inkubacije od 24 sata na 37°C, odliven je medijum, te je u bunarićima ostao formirani biofilm. Kako bi se uklonile zaostale planktonske bakterije, biofilm je ispran sterilnom destilovanom vodom dva puta, nakon čega su ploče ostavljene da se osuše na sobnoj temperaturi 15 minuta. Ćelije u biofilmu su potom fiksirane metanolom (10 minuta), osušene i obojene 0,1% kristal violetom (15 minuta), kako bi se omogućilo određivanje mase biofilma. Nakon bojenja ploče su isprane destilovanom vodom dva puta i ostavljene su da se suše (10 minuta). Kako bi se zaostala boja u potpunosti rastvorila, u svaki bunarić je dodato 200 μ L apsolutnog etanola, sadržaj bunara je promešan pomoću nastavaka, a 10 minuta nakon toga je očitana apsorbanca na 570 nm na čitaču mikrotitracionih ploča Multiskan FC (Thermo Scientific, SAD).

Dobijene vrednosti su upoređene sa vrednostima dobijenim za pozitivnu kontrolu (streptomycin) i rezultati su predstavljeni kao procenat vijabilnih bakterija u novoformiranom biofilmu.

3.8.7.2.4. Ispitivanje efekta ekstrakata na već formirani biofilm

Efekti ekstrakata na već formirani biofilm *P. aeruginosa* PAO1 su ispitani prema protokolu opisanom od strane Aleksić i sar. (2017). Nakon inkubacije, mikrotitraciona ploča je isprana dva puta sterilnim PBS puferom, kako bi se uklonile planktonske bakterije. Nakon toga je osušena i u bunariće je dodavano po 100 μ L MHB hranljive podloge koja je sadržala biljne ekstrakte (u koncentracijama $2 \times$ MIK, osim za *H. officinalis* i *O. basilicum*, gde su korišćene $\frac{1}{2}$ MIK), čija je smeša prethodno pripremljena (korišćene su iste koncentracije i u eksperimentu opisanom u poglavlju 3.8.7.2.3.). Nakon 24-časovne inkubacije na 37°C, sadržaj ploča je uklonjen i ploče su bojene 0,1% kristal violet 15 minuta. Rezultati su evaluirani prema istoj proceduri kao što je opisano u poglavlju 3.8.7.2.3.

3.8.8. Uticaj na migraciju ćelija u *in vitro* modelu zarastanja rana

Uticaj biljnih ekstrakata na migratorni potencijal MRC-5 ćelija ispitan je *Wound healing* odnosno *Scratch* testom (Liang i sar., 2007), koji je poslužio kao model za praćenje „zarastanja rane“ u konfluentnom ćelijskom monosloju. Ova metoda je jednostavna za izvođenje, a omogućava analizu pokretljivosti ćelija u različitim eksperimentalnim uslovima. Istovremeno, ovaj model predstavlja i model mehaničke povrede.

Ćelijska suspenzija MRC-5 ćelija, koncentracije 1×10^5 ćel./mL je (gajena u DMEM medijumu sa dodatkom 10% FBS) i zasejana u mikrotitracione ploče sa 6 bunarića (3 mL/bunariću). Ploče su ostavljene u inkubatoru na 37°C, sa 5% CO₂ do formiranja konfluentnog monosloja. Nakon formiranja monosloja, iz ploča je uklonjen hranljivi medijum, a zatim je vrhom sterilnog nastavka za mikropipetu (nastavak od 200 μ L) provučena prava linija kroz ćelijski monosloj pod uravnoteženim nagibom, pritiskom o podlogu i brzinom povlačenja, kako bi ogrebotine međusobno bile što ujednačenijih dimenzija, a ćelijske ivice

oko ogrebotine ravne. Na ovakav način su u bunarićima formirane prazne zone konstantne širine, ovičene konfluentnim ćelijskim monoslojem. Monosloj je nakon povlačenja linije ispran DMEM medijumom. Biljni ekstrakti (100 µg/mL) su pripremljeni u hranljivom medijumu bez dodatka FBS, kako bi se izbegla dalja proliferacija ćelija. Ćelijama koje nisu tretirane ekstraktima, umesto ekstrakata dodat je medijum bez dodatka FBS, i one su označene kao negativna kontrola.

Neposredno nakon formiranja ogrebotine u ćelijskom monosloju, kao i posle 24 h inkubacije, ćelije su fotografisane digitalnim fotoaparatom, a vidno polje je obuhvatalo napravljeni prerez i njegovu okolinu. Tokom eksperimenta, a u cilju što preciznije komparacije, fotografisana su uvek ista vidna polja za odgovarajući tretman, što je omogućeno time što je na donjem delu bunarića markerom obeleženo mesto gde je napravljena ogrebotina. Ispitivanje je izvedeno u triplikatu, a u svakom eksperimentu procenjena je migracija ćelija u tri vidna polja. Naknadno je sa fotografija vidnog polja utvrđen migratorni potencijal fibroblasta pod uticajem biljnih ekstrakata, pomoću ImageJ softvera (National Institutes of Health, SAD). Na osnovu dobijenih vrednosti je preračunat broj i stopa migracije ćelija. Rezultati su prikazani na ova dva načina iz razloga što je njihovo očitavanje subjektivno budući da ne postoje standardizovani načini njihovog preračunavanja, već se obrada mikrofografija, kao i merenja rade ručno u ImageJ softveru, te je različitim načinima prikazivanja rezultata smanjena greška ljudskog faktora procene brzine zarastanja ćelijskog monosloja. Vrednosti su prikazane kao srednje vrednosti u odnosu na kontrolne, netretirane ćelije, preračunate iz tri nezavisne ogrebotine po bunariću.

Iako je ovaj test veoma jednostavan za primenu, poseduje određene nedostatke na koje bi trebalo posebno obratiti pažnju tokom njegovog izvođenja (Hulkower i Herber, 2011; Nyegaard i sar., 2016; Pitz i sar., 2016): (i) materijal od kog je napravljen predmet koji se koristi za povlačenje linija u bunariću mikrotitracione ploče može ogrebat dno bunarića na kom rastu ćelije; (ii) širina pomenutog predmeta kojim se povlači linija u ćelijskom monosloju mora biti ista, zbog čega je najbolje koristiti isti predmet za povlačenje linija; (iii) ugao pod kojim se drži predmet, kao i sila pritiska koja se upotrebljava za povlačenje linija u monosloju značajno utiču na širinu ogrebotine u monosloju; (iv) mikrotitracione ploče se pregledaju u određenim vremenskim razmacima, te se mikrofografije koje se koriste za obradu podataka mogu razlikovati u zavisnosti od vidnog polja koje se pregleda; (v) proces obrade rezultata ovog testa je subjektivan budući da zavisi od podešavanja parametara u softveru za obradu, zbog čega je najbolje da se slike vidnog polja naprave uz pomoć kamere koja je integralni deo mikroskopa da ne bi došlo do razlike u osvetljenju na različitim slikama; (vi) širinu zarasle ogrebotine na delovima na kojima je došlo do veće migracije ćelija je često teško odrediti, zbog čega se razlikuju rezultati dobijeni izračunavanjem broja ćelija u ogrebotini i stope migracija.

3.9. Obrada podataka

Korelacije između rezultata testova za određivanje antioksidativne, antidijabetične i antineurodegenerativne aktivnosti, kao i fitohemijskog sadržaja ekstrakata su predstavljene Pirsonovim koeficijentima korelacije (r), koji su interpretirani prema Taylor (1990). Prema ovom autoru, za vrednosti r niže od 0,35, korelacija se definiše kao slaba; za vrednosti između 0,36 i 0,67 korelacija se definiše kao umerena, dok se za vrednosti u opsegu od 0,68 do 1, korelacija definiše kao jaka. Pozitivna korelacija predstavlja linearan odnos između ispitanih varijabli, odnosno slučaj kada se povećanje jedne varijable poklapa sa povećanjem druge varijable, dok negativna korelacija podrazumeva obrnut linearan odnos, odnosno slučaj kada jedna varijabla raste, a druga opada.

Jednofaktorska ANOVA i Tukey post-hoc test su korišćeni kako bi se procenili efekti rastvarača na fitohemijski sadržaj koji je određivan spektrofotometrijski i HPLC-DAD analizom, kao i na vrednosti dobijenih testovima za određivanje antioksidativne, antidijabetične i antineurodegenerativne aktivnosti.

T-test je korišćen za procenu značaja inhibicije oštećenja DNK u SOS/*umuC* testu, za tretman sa ekstraktima u poređenju sa pozitivnom kontrolom, vodonik-peroksidom, kao i za određivanje značajnosti antineuroinflamatorne, antitumorske i antibakterijske (u testovima adhezije i invazije) aktivnosti uzoraka. Softver Statistica 10 je korišćen za obavljanje statističkih analiza rezultata Komet testa. Zatim, Kolmogorov-Smirnoff test je korišćen kako bi se utvrdilo da li podaci imaju normalnu distribuciju. S obzirom na to da je na osnovu ovog testa pokazano da je potrebno koristiti neparametrijske testove, urađena je Kruskal-Wallis neparametarska jednosmerna ANOVA. Mann-Whitney U test je primenjen sa ciljem da se uporedi tretman ekstraktima sa negativnom kontrolom i kontrolom rastvarača. Nivo značajnosti za sve odnose postavljen je na $p < 0,05$.

Kako bi se preračunale IBR (engl. *integrated biomarker response*) vrednosti, rezultati za svaki od primenjenih testova pojedinačno su pre svega standardizovani korišćenjem sledeće jednačine:

$$Y_i = (X_i - X_{SV}) / S.$$

U gornjoj jednačini, Y_i predstavlja standardizovanu vrednost rezultata dobijenu za pojedinačni uzorak, X_i označava realnu vrednost rezultata dobijenu za pojedinačni uzorak, X_{SV} je srednja vrednost svih rezultata dobijenih za jedan rastvarač, dok S predstavlja standardnu devijaciju za isti rastvarač. U zavisnosti od toga da li je određena biološka aktivnost rasta ili opala sa povećanjem vrednosti X_i , vrednosti Y se dodaje predznak plus (+) ili minus (-):

$$Z_i = Y_i \text{ (u slučaju da aktivnost raste sa porastom } X_i \text{ vrednosti rezultata)}$$

ili

$$Z_i = - Y_i \text{ (u slučaju da aktivnost opada sa porastom } X_i \text{ vrednosti rezultata).}$$

Standardizovana vrednost Z_i se dalje koristi za izračunavanje S_i :

$$S_i = Z_i + | \min |$$

pri čemu $S_i \geq 0$, a $| \min |$ predstavlja apsolutnu minimalnu vrednost S_i koja je zabeležena u okviru jedne grupe uzoraka. Dobijene vrednosti S_i su zatim korišćene za konstrukciju radijalnih grafika, pri čemu one ukazuju na to koji od korišćenih testova u najvećoj meri doprinosi povećanju ili smanjenju ukupne IBR vrednosti, odnosno u kom testu je određeni biljni ekstrakt imao najvišu ili najnižu aktivnost.

Površina polja između dve koordinate na radijalnom grafiku (A_i) je dobijena primenom sledeće jednačine:

$$A_i = (S_i \times S_{i+1} \times \sin \alpha) / 2,$$

pri čemu α predstavlja ugao koje zaklapaju dve susedne koordinate (S_i i S_{i+1}).

Ukupna IBR vrednost pojedinačnog ekstrakta je preračunata sabiranjem svih (n) vrednosti A_i :

$$IBR = A_1 + A_2 + \dots + A_n.$$

IBR analiza ekstrakata biljaka familije Lamiaceae je urađena iz nekoliko koraka:

- uključivanjem samo testova za određivanje antioksidativne aktivnosti (metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti testirani primenom pet testova),
- uključivanjem samo testova za određivanje imunomodulatorne aktivnosti (etanolni ekstrakti testirani primenom 11 testova),
- uključivanjem samo testova za određivanje antibakterijske aktivnosti (etanolni ekstrakti testirani primenom osam testova).

Finalno preračunavanje IBR vrednosti je podrazumevalo:

- korišćenje rezultata za metanolne, etanolne i vodene ekstrakte iz 17 testova, kao i
- korišćenje rezultata samo za etanolne ekstrakte iz 28 testova.

IBR metoda se koristi kako bi se objedinio odgovor različitih biomarkera koji se prate u ekotoksikološkim studijama. U ovoj doktorskoj disertaciji je ispitivanje biološke aktivnosti ekstrakata rađeno na velikom broju testova koji se ne mogu nazivati biomarkerima u pravom smislu reči. Međutim, budući da će se u ovoj doktorskoj studiji princip IBR metode koristiti kako bi se objedinile aktivnosti dobijene u različitim testovima, iz poštovanja prema autorima IBR metodologije (Beliaeff i Burgeot, 2002), zadržaće se originalni naziv metode.

REZULTATI I DISKUSIJA

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Prinos ekstrakata

Ekstrakti proučavanih biljaka su dobijeni pomoću tri rastvarača (70% metanol, 70% etanol i ključala destilovana voda) u cilju ekstrakcije komponenti različite polarnosti. Procenat prinosa ekstrakata varirao je u odnosu na rastvarač korišćen za ekstrakciju, što je prezentovano u Tabeli 5.

Vodeni ekstrakti sledećih biljnih vrsta: *H. officinalis*, *L. angustifolia*, *M. officinalis*, *O. majorana*, *R. officinalis*, *S. montana*, *T. chamaedrys*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* su imali veći prinos od metanolnih i etanolnih ekstrakata odgovarajućih biljaka. S druge strane, metanolni ekstrakti *G. hederacea*, *M. vulgare*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *S. scardica* i *T. montanum* su imali najveći prinos u odnosu na ekstrakte ovih biljnih vrsta dobijene drugim rastvaračima, dok su etanolni ekstrakti *L. cardiaca* i *S. officinalis* imali veći prinos u odnosu na njihove metanolne i vodene ekstrakte. Etanolni ekstrakt *M. vulgare* je imao najveći prinos od svih ispitivanih biljaka (34,1%), dok je najmanji prinos dobijen za vodeni ekstrakt *G. hederacea* (9,07%).

Tabela 5. Prinos ekstrakata ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae.

Biljna vrsta	Prinos ekstrakata (%)		
	metanolni	etanolni	vodeni
<i>G. hederacea</i>	16,88	13,11	9,07
<i>H. officinalis</i>	14,12	10,59	16,63
<i>L. angustifolia</i>	20,11	18,05	31,06
<i>L. cardiaca</i>	14,27	32,09	18,15
<i>M. vulgare</i>	34,10	16,77	14,70
<i>M. officinalis</i>	16,10	16,70	23,60
<i>M. piperita</i>	30,88	18,20	28,27
<i>O. basilicum</i>	28,52	9,92	17,80
<i>O. majorana</i>	13,48	14,28	19,68
<i>O. vulgare</i>	21,68	13,93	20,73
<i>R. officinalis</i>	12,15	10,74	17,98
<i>S. officinalis</i>	18,01	21,91	21,84
<i>S. montana</i>	11,43	11,31	15,32
<i>S. scardica</i>	12,44	10,58	11,25
<i>T. chamaedrys</i>	15,43	16,20	16,75
<i>T. montanum</i>	15,50	13,64	14,66
<i>Th. serpyllum</i>	9,62	9,39	9,72
<i>Th. vulgaris</i>	10,82	11,27	12,42

Iako postoje brojni literaturni navodi koji su u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u Tabeli 5 (Orhan i sar., 2010; Vidović i sar., 2014; Duletić-Laušević i sar., 2018a; Angeloni i sar., 2021; Mićović i sar., 2021), pojedina istraživanja sugerišu varijacije u prinosu ekstrakcije za istraživane biljne ekstrakte (Triantaphyllou i sar., 2001; El-Maati i sar., 2012; Amessis-Ouchemoukh i sar., 2014a; Duletić-Laušević i sar., 2019). Studije su pokazale da na pomenutu razliku u dobijenim vrednostima prinosa ekstrakcije umnogome mogu uticati izbor ekstracionog protokola, vreme ekstrakcije, polarnost rastvarača, a pre svega biljna vrsta (Do i sar., 2014; Jovanović i sar., 2017). Pored navedenih faktora koji utiču na krajnji ishod

prinosa ekstrakcije, jedan od značajnijih jeste i temperatura primenjena u ekstrakcionoj proceduri, odnosno temperatura rastvarača. Kivilompolo i Hyötyläinen (2007) su potvrdili da povišena temperatura utiče na povećanje prinosa ekstrakcije, te se bolji rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije za vodene ekstrakte (Tabela 5) mogu objasniti time što je u ekstrakcionoj proceduri korišćena ključala umesto hladne destilovane vode.

Nakon ekstrakcije biljnog materijala, pojedini autori tvrde da treba voditi računa o dužini čuvanja ekstrakata na +4°C, budući da je dužim skladištenjem ekstrakata na ovoj temperaturi moguća delimična promena fitohemijskog sastava ekstrakta (Chua i sar., 2018) kao što je konverzija iz jednog fenolnog jedinjenja u drugo (Huynh i sar., 2014; Oyama i sar., 2018). Ipak, Hudz i sar. (2020) su pokazali da se ukupan sadržaj flavonoida u etanolnom ekstraktu *S. montana* nije značajno promenio čak ni nakon sedam meseci stajanja na +4°C.

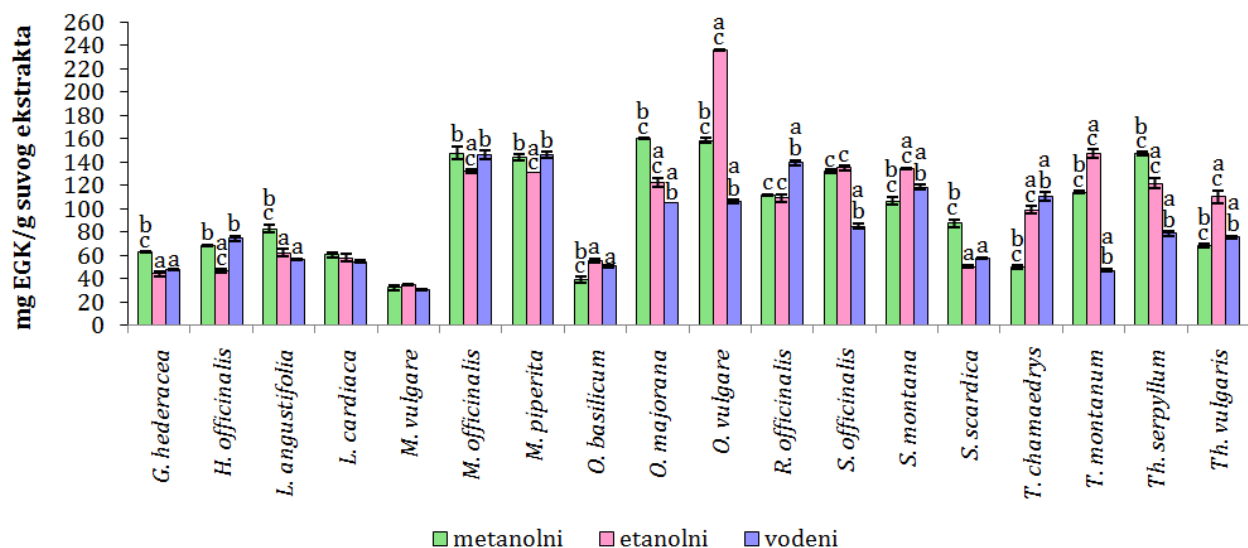
4.2. Sadržaj i hemijski sastav pojedinih fitokonstituenata ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae

4.2.1. Spektrofotometrijski određen sadržaj pojedinih fitokonstituenata

U ovom radu, sadržaj ukupnih fenola, fenolnih kiselina, flavonoida, flavonola, kumarina i triterpena u odabranim predstavnicima familije Lamiaceae je ispitivan spektrofotometrijski korišćenjem tri koncentracije ekstrakata: 100, 250 i 500 µg/mL. Rezultati svih primenjenih testova za kvantifikaciju ukupnog hemijskog sastava ekstrakata su pokazali da postoji zavisnost sadržaja fitokonstituenata od koncentracije ekstrakata (Prilog 1). Međutim, u nekim slučajevima na srednjoj i najnižoj testiranoj koncentraciji pojedina jedinjenja nisu ni bila detektovana (Prilog 1 – ukupne fenolne kiseline, ukupni flavonoli i ukupni kumarini). Zbog toga će u narednim poglavljima biti predstavljeni samo rezultati dobijeni testiranjem najviše koncentracije ekstrakata (500 µg/mL), na Grafcima 1-5.

4.2.1.1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja

Etanolni ekstrakti ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae koncentracije 500 µg/mL su imali najviše ukupnih fenolnih jedinjenja (opseg vrednosti od 34,55 do 236,38 mg EGK/g). S druge strane, umeren nivo ukupnih fenolnih jedinjenja je detektovan u metanolnim (opseg vrednosti od 32,17 do 160,69 mg EGK/g), dok je najmanje ukupnih fenola izmereno u vodenim ekstraktima (opseg vrednosti od 30,21 do 144,3 mg EGK/g). Etanolni ekstrakt *O. vulgare* je imao najviše ukupnih fenola u odnosu na sve ispitivane biljke, i to u svim testiranim koncentracijama ekstrakta. Takođe je pokazano da je ovaj ekstrakt koncentracije 500 µg/mL imao značajno više fenolnih jedinjenja u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt iste biljke. U vodenom ekstraktu *M. vulgare*, s druge strane, detektovano je najmanje ukupnih fenolnih jedinjenja, i to u ekstraktima u svim ispitivanim koncentracijama, pri čemu se vrednosti dobijene za metanolni, etanolni i vodeni ekstrakt u koncentraciji 500 µg/mL nisu međusobno značajno razlikovale. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae je prikazan u Prilogu 1, dok su rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka na najvišoj koncentraciji prikazani na Grafiku 1.



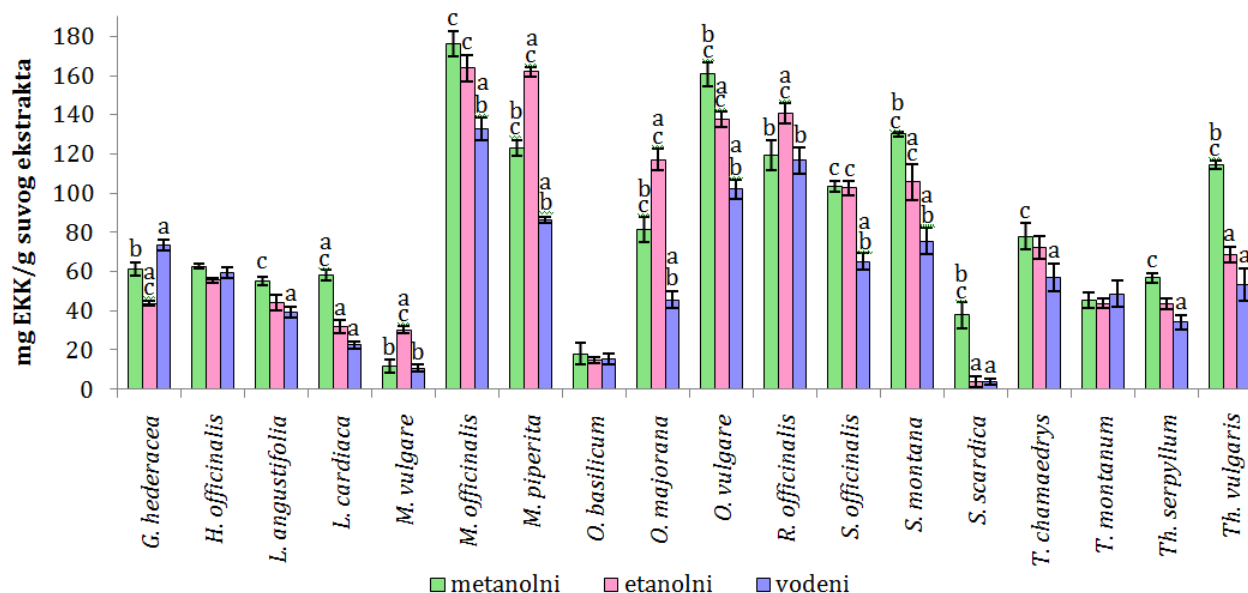
Grafik 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao mg EGK/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

4.2.1.2. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina

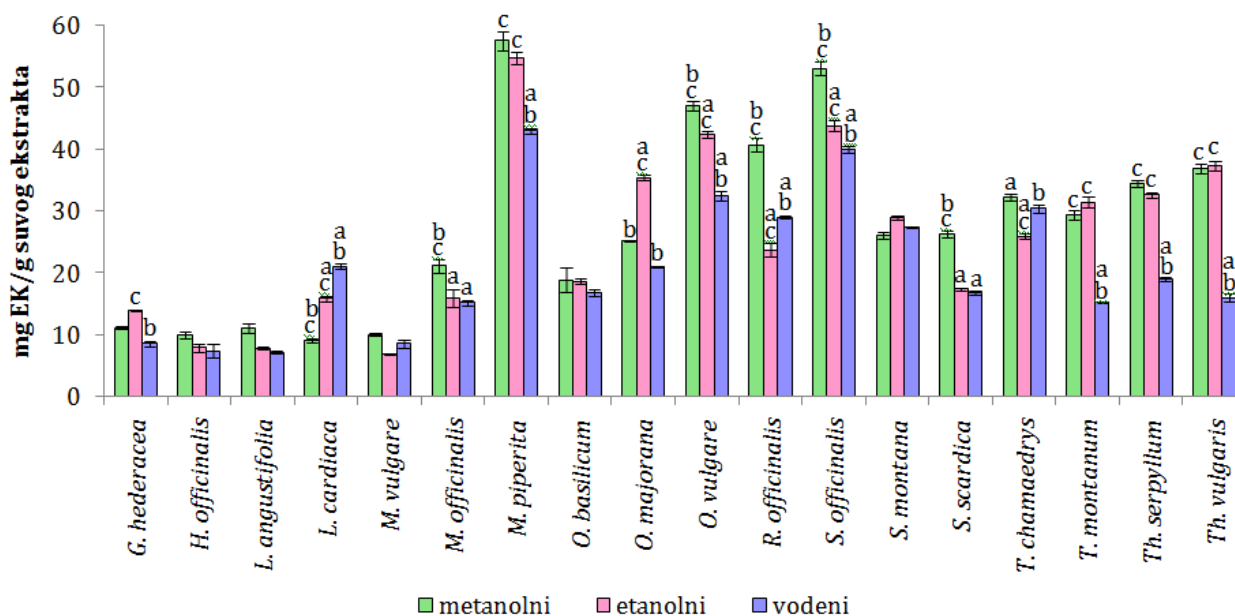
Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ispitivanim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae su prikazane u Prilogu 1, dok su rezultati dobijeni ispitivanjem uzoraka u najvišoj koncentraciji prikazani na Grafiku 2. Najviše ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima koncentracije 500 µg/mL je detektovano u metanolnim ekstraktima (opseg od 11,96 do 176,04 mg EKK/g), umeren nivo je detektovan u etanolnim (opseg od 3,81 do 163,81 mg EKK/g), dok je najmanje ukupnih fenolnih kiselina detektovano u vodenim ekstraktima (3,81 – 132,7 mg EKK/g). U najvišoj testiranoj koncentraciji, najveći sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je posedovao metanolni ekstrakt *M. officinalis*, slično kao i etanolni ekstrakt, dok je vodeni ekstrakt imao značajno niži sadržaj fenolnih kiselina. Međutim, u koncentracijama 250 µg/mL i 100 µg/mL, najviši nivo ovih jedinjenja je imao *O. vulgare* (Prilog 1). Etanolni i vodeni ekstrakti *S. scardica* u najvišoj testiranoj koncentraciji su imali najniži nivo ukupnih fenolnih kiselina od svih ispitivanih uzoraka, 3,81 mg EKK/g, što je ujedno i značajno niže u odnosu na metanolni ekstrakt ove biljke. S druge strane, u pojedinim ekstraktima, u nižim koncentracijama, fenolne kiseline nisu detektovane (Prilog 1).



Grafik 2. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao mg EKK/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)



Grafik 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao mg EK/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

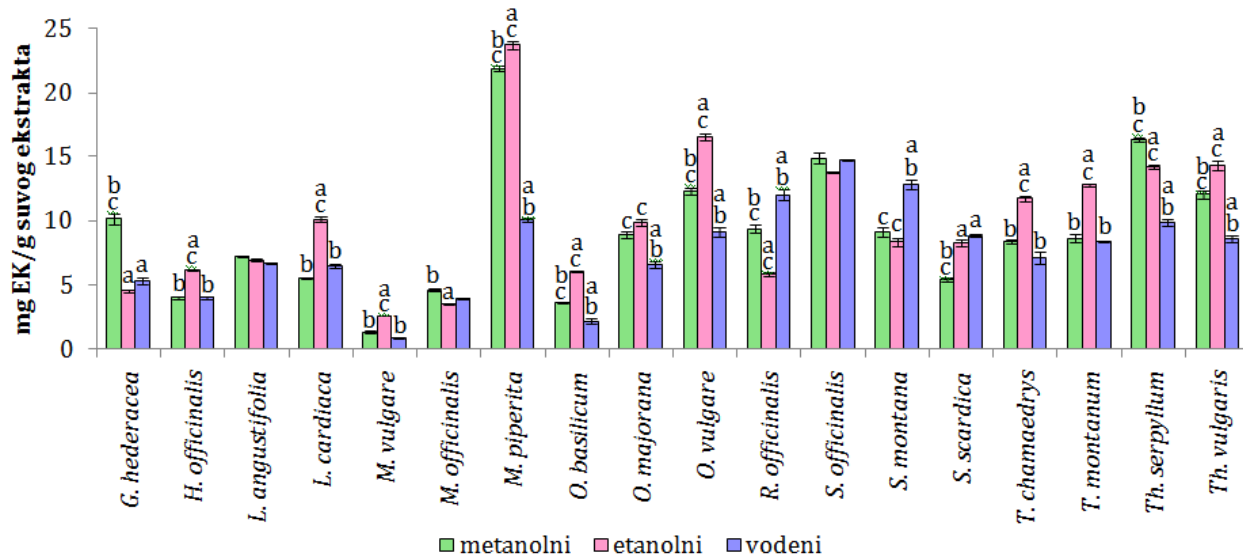
4.2.1.3. Sadržaj ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae prikazani su u Prilogu 1, dok su rezultati za ekstrakte koncentracije 500 µg/mL prikazani i na Grafiku 3. Najveći nivo ukupnih flavonoida u ekstraktima koncentracije 500 µg/mL je izmeren u metanolnim ekstraktima (opseg od 9,1 do 57,56 mg EK/g), umeren u etanolnim (opseg od 6,96 do 54,8 mg EK/g), dok je najmanji nivo detektovano u vodenim ekstraktima (7,21 – 43,02 mg EK/g). U svim ispitivanim koncentracijama, u etanolnom ekstraktu biljke *M. piperita* je

izmeren najveći sadržaj ukupnih flavonoida, dok je najmanje izmereno u etanolnom ekstraktu biljke *M. vulgare* (6,96 mg EK/g na 500 µg/mL).

4.2.1.4. Sadržaj ukupnih flavonola

Sadržaj ukupnih flavonola u ispitivanim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae su prikazani u Prilogu 1, dok su rezultati dobijeni korišćenjem ekstrakata koncentracije 500 µg/mL prikazani na Grafiku 4. Najviše ukupnih flavonola u ispitivanim ekstraktima koncentracije 500 µg/mL izmereno je u etanolnim ekstraktima (opseg od 2,57 do 23,75 mg EK/g), nešto manji u metanolnim (opseg od 1,3 do 21,9 mg EKK/g), a najmanje u vodenim ekstraktima ispitivanih biljaka (0,08 – 14,73 mg EKK/g). Etanolni ekstrakt biljke *M. piperita* je sadržao najviše flavonola i to u svim testiranim koncentracijama, dok su sva tri ekstrakta biljke *M. vulgare* koncentracije 500 µg/mL sadržali najmanje ukupnih flavonola u odnosu na sve ispitivane uzorke. S druge strane, u pojedinim ekstraktima u nižim koncentracijama flavonoli nisu ni detektovani.



Grafik 4. Sadržaj ukupnih flavonola u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

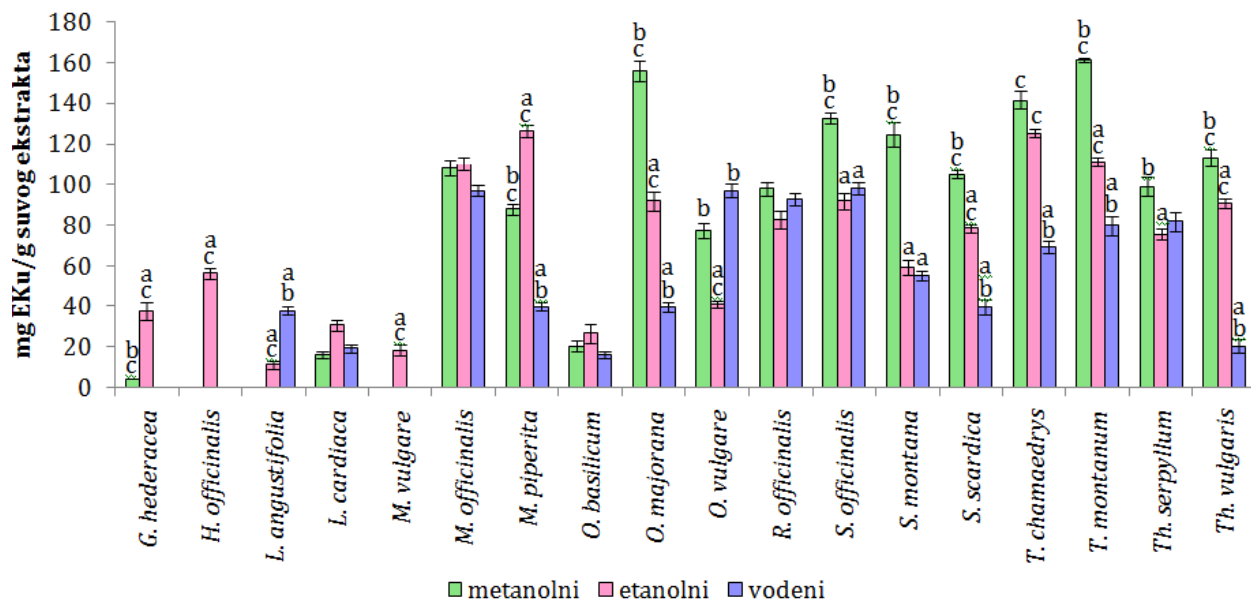
Rezultati su prikazani kao mg EK/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

4.2.1.5. Sadržaj ukupnih kumarina

Većina ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae poseduje znatne količine ukupnih kumarina (Prilog 1). U najvišoj testiranoj koncentraciji alkoholnih ekstrakata (etanolni i metanolni) izmeren je najviši nivo kumarina: metanolni u opsegu od <1 do 161,22 mg EKu/g, etanolni od 11,22 do 126,53 mg EKu/g, dok su vodeni ekstrakti imali manje kumarina od alkoholnih: u opsegu od <1 do 97,96 mg EKu/g (Grafik 5). Na osnovu analize rezultata ovog testa se može videti da metanolni ekstrakt *T. montanum* sadrži najviše kumarina u odnosu na sve ispitivane ekstrakte (161,22 mg EKu/g na 500 µg/mL), nakon čega slede metanolni ekstrakti *O. majorana*, *T. chamaedrys* i *S. officinalis*. S druge strane, u etanolnom ekstraktu pojedinih biljaka, poput *G. hederacea*, *H. officinalis* i *M. vulgare*, izmereno je znatno više ovih jedinjenja nego u odgovarajućim metanolnim i vodenim ekstraktima, dok su vodeni ekstrakti *L. angustifolia* i *O. vulgare* sadržali znatno više kumarina u odnosu na ekstrakte pripremljene primenom druga dva rastvarača. Takođe, potrebno je napomenuti da u pojedinim ekstraktima kumarini nisu detektovani čak ni u najvišoj testiranoj koncentraciji (metanolni ekstrakti *H.*

officinalis, *L. angustifolia* i *M. vulgare*, kao i vodeni ekstrakti *G. hederacea*, *H. officinalis* i *M. vulgare*).



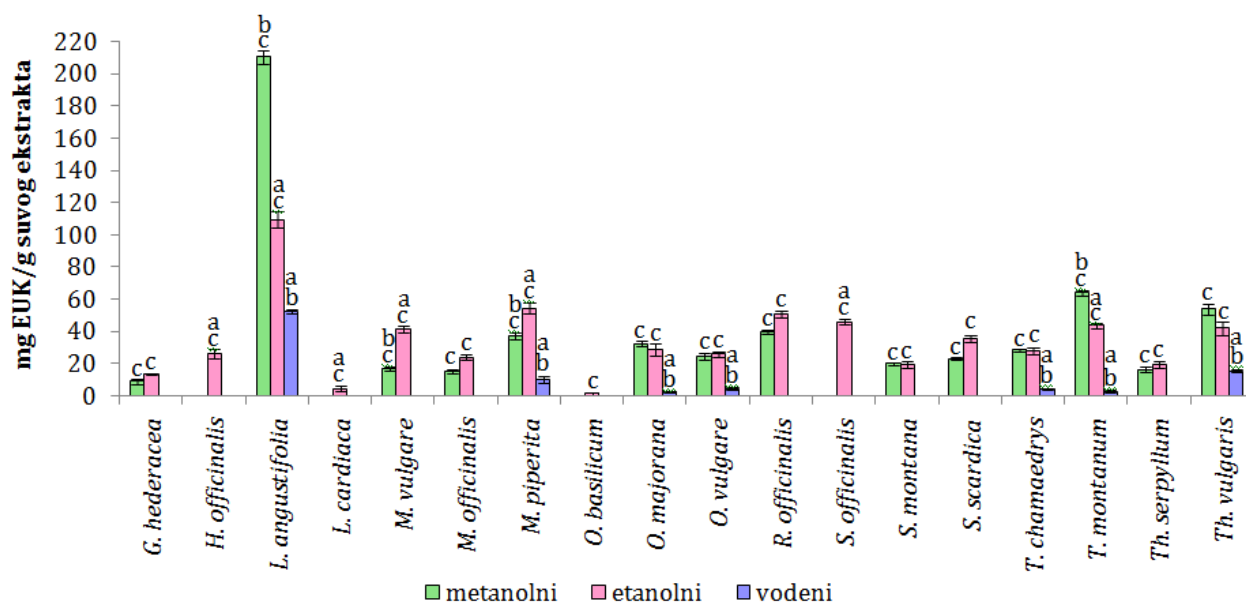
Grafik 5. Sadržaj ukupnih kumarina u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao mg Eku/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt ($p < 0,05$)

4.2.1.6. Sadržaj ukupnih triterpena

Sadržaj ukupnih triterpena su ispitivani u ekstraktima odabranih predstavnika familije Lamiaceae u koncentracijama 100, 250 i 500 µg/mL. Kao i u prethodnim testovima, i u ovom testu je pokazano da se sadržaj ovih sekundarnih metabolita povećava sa povećanjem koncentracije ekstrakta (Prilog 2), međutim kod određenog broja ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae triterpeni nisu detektovani čak ni u ekstraktima najviše testirane koncentracije. U ekstraktima koncentracije 500 µg/mL, najviše triterpena je detektovano u metanolnom (opseg od <1 do 210,42 mg EUK/g), a najmanje u vodenom ekstraktu (<1 – 52,12 mg EUK/g). Svi etanolni ekstrakti su imali merljivu količinu triterpena, a opseg se kretao od 1,61 – 109,4 mg EUK/g (Grafik 6). Najviše triterpena je nađeno u ekstraktima *L. angustifolia*, posebno u metanolnom ekstraktu (210,42 mg EUK/g), koji je sadržao gotovo dva puta više triterpena od etanolnog i četiri puta više od vodenog ekstrakta. S druge strane, najmanji sadržaj triterpena je nađen u ekstraktima *O. basilicum*.



Grafik 6. Sadržaj ukupnih triterpena u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao mg EUK/g, za koncentraciju 500 µg/mL.

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

4.2.2. HPLC-DAD analiza ekstrakata odabranih predstavnika familije Lamiaceae

Rezultati HPLC-DAD analize ispitivanih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae su prikazani u Tabelama 6 i 7. Na osnovu ove analize jasno je da je najzastupljenije fenolno jedinjenje u ispitivanim ekstraktima rozmarinska kiselina (Tabela 6). Dobijeni rezultati ukazuju na to da su generalno metanolni ekstrakti bili najbogatiji ovom fenolnom kiselinom, dok je u vodenim ekstraktima nađeno najmanje rozmarinske kiseline. Najveće količine rozmarinske kiseline su izmerene u metanolnom ekstraktu *M. officinalis* (86,76 mg/g suvog ekstrakta), mada je vodeni ekstrakt biljke *M. piperita* takođe imao visok sadržaj rozmarinske kiseline (84,48 mg/g suvog ekstrakta).

Pored rozmarinske kiseline, određen je i nivo kafene i hlorogene kiseline (Tabela 6). Najveća količina kafene kiseline je prisutna u etanolnom ekstraktu *T. montanum* (6,94 mg/g suvog ekstrakta), međutim kada se porede različiti ekstrakti iste biljke, može se primetiti da su vodeni ekstrakti 11 biljaka (*G. hederacea*, *L. cardiaca*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *S. montana*, *S. scardica*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*) sadržali više kafene kiseline u odnosu na odgovarajuće alkoholne ekstrakte. U svim ispitivanim ekstraktima *H. officinalis*, ova fenolna kiselina je detektovana samo u tragovima, odnosno u količinama koje su manje od koncentracija standarda korišćenih za izradu kalibracione krive.

S druge strane, najveći sadržaj hlorogene kiseline je detektovan u metanolnom ekstraktu *S. scardica* (5 mg/g suvog ekstrakta). I za ovu fenolnu kiselinu se primećuje da je najprisutnija u vodenim ekstraktima (kod osam od 18 biljaka: *G. hederacea*, *L. cardiaca*, *M. piperita*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *S. officinalis*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*).

Kvercetin je najzastupljeniji u metanolnim ekstraktima (kod osam od 18 biljaka: *G. hederacea*, *L. cardiaca*, *M. officinalis*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *S. officinalis*, *S. montana* i *T. chamaedrys*). U etanolnom ekstraktu *S. scardica* je ovaj flavonol pronađen u najvećoj količini (17,95 mg/g suvog ekstrakta), dok je u pojedinim metanolnim i vodenim ekstraktima pronađen u tragovima (Tabela 7).

Među kvantifikovanim jedinjenjima, rutin je bio dominantan u metanolnim ekstraktima 10 od 18 ispitivanih biljnih vrsta: *G. hederacea*, *L. angustifolia*, *M. vulgare*, *O. vulgare*, *S. officinalis*, *S. montana*, *S. scardica*, *Th. serpyllum*, *Th. vulgaris* i *T. chamaedrys*. Metanolni ekstrakt *T. chamaedrys* je imao najviši nivo ovog flavonolnog glikozida (23,4 mg/g suvog ekstrakta), dok su pojedini vodeni i etanolni ekstrakti sadržali rutin samo u trgovima.

Najviši nivo flavanona naringina je detektovan u ekstraktima *S. officinalis*, i to u metanolnom ekstraktu (12,83 mg/g suvog ekstrakta). Ovaj flavonoidni glikozid je generalno bio najzastupljeniji u metanolnim ekstraktima 12 od 18 ispitivanih biljnih vrsta: *G. hederacea*, *H. officinalis*, *M. vulgare*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *S. officinalis*, *S. montana*, *T. chamaedrys*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*. S druge strane, u vodenim ekstraktima je izmerena najmanja količina naringina. Generalno, naringin je ujedno i flavonoid koji je generalno najmanje zastupljen u svim ispitivanim ekstraktima, u odnosu na preostala tri.

Luteolin-7-*O*-glukozid je jedino identifikovano jedinjenje iz grupe flavona. Kao i naringin, luteolin-7-*O*-glukozid je predominantan u ekstraktima *S. officinalis*, i to posebno u metanolnom ekstraktu (22,82 mg/g suvog ekstrakta). Za razliku od prethodno opisanih flavonoida, ovaj glukozid je generalno najprisutniji u etanolnim ekstraktima ispitivanih biljaka familije Lamiaceae, što je slučaj kod osam od 18 ispitivanih biljnih vrsta: *L. cardiaca*, *M. piperita*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. scardica*, *T. chamaedrys* i *Th. vulgaris*.

Tabela 6. Fenolne kiseline detektovane pomoću HPLC-DAD analize u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Biljna vrsta	Fenolne kiseline (mg/g)												
	Rozmarinska kiselina			Kafena kiselina			Hlorogena kiselina			vodeni			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	24,10±1,68 ^c	23,98±1,05 ^c	13,50±1,25 ^{ab}	tr	tr	1,27±0,06	0,10±0,00	tr	tr	tr	0,46±0,03 ^{bc}	1,07±0,06 ^{ac}	2,48±0,06 ^{ab}
<i>H. officinalis</i>	13,25±0,78 ^c	15,11±0,82 ^c	6,28±0,25 ^{ab}	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	3,17±0,33 ^c	3,52±0,28 ^c	2,37±0,10 ^{ab}
<i>L. angustifolia</i>	4,94±0,32	5,80±0,47	2,79±0,15	0,22±0,05	0,14±0,01	tr	0,14±0,01	tr	tr	tr	1,17±0,09 ^c	1,40±0,08 ^c	0,65±0,11 ^{ab}
<i>L. cardiaca</i>	0,75±0,02	0,99±0,02	0,99±0,08	tr	tr	0,43±0,04	tr	tr	tr	tr	0,09±0,00 ^c	tr ^c	2,58±0,43 ^{ab}
<i>M. vulgare</i>	24,52±2,90 ^{bc}	14,82±0,87 ^a	12,79±0,68 ^b	0,75±0,04	0,70±0,03	0,66±0,05	0,70±0,03	0,13±0,01	0,13±0,01	0,31±0,03	0,23±0,01 ^b	0,31±0,03	0,17±0,02
<i>M. officinalis</i>	86,76±4,69 ^{bc}	61,77±3,58 ^{ac}	52,32±3,18 ^{ab}	1,33±0,08	2,54±0,10	2,87±0,14	2,54±0,10	0,23±0,01 ^b	0,23±0,01 ^b	1,11±0,04 ^{ac}	0,23±0,01 ^c	1,11±0,04 ^{ac}	0,60±0,01 ^b
<i>M. piperita</i>	63,30±3,21 ^{bc}	36,81±1,15 ^{ac}	84,45±4,15 ^{ab}	tr	tr	0,69±0,02	tr	tr	tr	tr	0,35±0,01 ^c	0,22±0,01 ^c	1,09±0,05 ^{ab}
<i>O. basilicum</i>	13,85±0,42 ^c	12,02±0,28 ^c	4,36±0,11 ^{ab}	1,33±0,03	tr	0,78±0,02	tr	tr	tr	tr	0,83±0,01 ^c	0,62±0,01 ^c	tr ^{ab}
<i>O. majorana</i>	48,57±2,47 ^{bc}	37,71±1,98 ^{ac}	23,31±1,02 ^{ab}	5,94±0,13	5,28±0,11	4,95±0,21	5,28±0,11	tr	tr	tr	tr	tr	0,24±0,01
<i>O. vulgare</i>	58,68±2,51 ^c	63,66±3,18 ^c	35,61±1,52 ^{ab}	0,04±0,00	0,70±0,03	1,20±0,04	0,70±0,03	tr ^{bc}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	0,67±0,02 ^{ac}	0,67±0,02 ^{ac}	1,36±0,04 ^{ab}
<i>R. officinalis</i>	63,48±3,87 ^{bc}	49,44±2,90 ^a	45,87±2,64 ^a	2,14±0,09 ^b	0,08±0,00 ^{ac}	2,40±0,11 ^b	0,08±0,00 ^{ac}	4,75±0,27 ^{bc}	4,75±0,27 ^{bc}	0,06±0,00 ^{ac}	0,06±0,00 ^{ac}	0,06±0,00 ^{ac}	2,61±0,13 ^{ab}
<i>S. officinalis</i>	55,62±2,52 ^{bc}	42,35±2,66 ^{ac}	29,01±1,13 ^{ab}	1,97±0,06 ^c	2,38±0,09 ^c	3,47±0,13 ^{ab}	2,38±0,09 ^c	0,17±0,00 ^{bc}	0,17±0,00 ^{bc}	0,60±0,02 ^{ac}	0,60±0,02 ^{ac}	0,60±0,02 ^{ac}	1,39±0,06 ^{ab}
<i>S. montana</i>	51,96±2,41 ^{bc}	39,60±1,78 ^{ac}	13,44±0,62 ^{ab}	1,61±0,05 ^{bc}	2,79±0,09 ^{ac}	4,02±0,19 ^{ab}	2,79±0,09 ^{ac}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	0,79±0,03 ^a	0,79±0,03 ^a	0,66±0,02 ^a
<i>S. scardica</i>	9,24±0,66 ^c	2,71±0,31	1,89±0,13 ^{ab}	0,19±0,00 ^c	0,22±0,01 ^c	1,37±0,23 ^{ab}	0,22±0,01 ^c	5,00±0,21 ^{bc}	5,00±0,21 ^{bc}	4,15±0,28 ^{ac}	4,15±0,28 ^{ac}	4,15±0,28 ^{ac}	0,16±0,00 ^{ab}
<i>T. chamaedrys</i>	4,22±0,68	0,07±0,00	1,51±0,45	tr	0,45±0,09	0,34±0,02	0,45±0,09	0,33±0,02 ^{bc}	0,33±0,02 ^{bc}	1,39±0,09 ^a	1,39±0,09 ^a	1,39±0,09 ^a	1,31±0,22 ^a
<i>T. montanum</i>	0,51±0,07	0,07±0,00	0,15±0,01	5,67±0,23 ^{bc}	6,94±0,54 ^{ac}	3,65±0,08 ^{ab}	6,94±0,54 ^{ac}	1,41±0,05 ^b	1,41±0,05 ^b	tr ^{ac}	tr ^{ac}	tr ^{ac}	1,18±0,05 ^b
<i>Th. serpyllum</i>	44,76±2,32 ^c	50,94±2,85 ^c	25,41±1,53 ^{ab}	1,62±0,04 ^c	1,45±0,05 ^c	5,07±0,19 ^{ab}	1,45±0,05 ^c	0,77±0,03 ^{bc}	0,77±0,03 ^{bc}	1,23±0,05 ^{ac}	1,23±0,05 ^{ac}	1,23±0,05 ^{ac}	2,39±0,11 ^{ab}
<i>Th. vulgaris</i>	60,12±3,19 ^c	63,48±3,22 ^c	30,03±1,48 ^{ab}	0,88±0,04 ^{bc}	2,36±0,11 ^{ac}	3,87±0,17 ^{ab}	2,36±0,11 ^{ac}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	tr ^{bc}	0,90±0,02 ^a

tr – u tragovima

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

Tabela 7. Flavonoidi detektovani uz pomoć HPLC-DAD analize u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Biljna vrsta	Flavonoidi (mg/g)											
	Kvercetin			Rutin			Naringin			Luteolin-7-O-glukozid		
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni
<i>G. hederacea</i>	1,90±0,09 ^c	1,57±0,08	1,13±0,04 ^a	2,41±0,11 ^c	2,21±0,05	1,84±0,08 ^a	1,54±0,09 ^{bc}	0,91±0,05 ^{ac}	0,16±0,02 ^{ab}	1,95±0,04	1,86±0,03	0,69±0,02
<i>H. officinalis</i>	tr ^b	1,33±0,08 ^{bc}	tr ^b	0,56±0,04 ^c	0,57±0,04 ^c	tr ^{ab}	1,42±0,11 ^c	1,30±0,09 ^c	0,36±0,02 ^{ab}	0,81±0,03	0,81±0,04	0,57±0,04
<i>L. angustifolia</i>	0,66±0,07 ^{bc}	1,68±0,06 ^{ac}	tr ^{ab}	2,07±0,16 ^c	1,63±0,12	1,41±0,21 ^a	0,91±0,03	1,02±0,04	0,75±0,04	0,54±0,02	tr	0,48±0,02
<i>L. cardiaca</i>	1,62±0,15 ^c	1,43±0,10 ^c	tr ^{ab}	3,81±0,19 ^{bc}	4,54±0,48 ^{ac}	1,19±0,05 ^{ab}	0,70±0,05	0,86±0,03	0,74±0,05	2,49±0,06	2,61±0,05	1,77±0,08
<i>M. vulgare</i>	1,43±0,15 ^{bc}	1,45±0,12 ^{ac}	1,12±0,18 ^{ab}	4,13±0,21 ^{bc}	3,25±0,19 ^{ac}	1,94±0,25 ^{ab}	0,61±0,01 ^c	0,43±0,02	0,27±0,01 ^a	1,14±0,04	0,72±0,03	0,72±0,03
<i>M. officinalis</i>	12,43±0,48 ^c	11,56±0,59 ^c	7,75±0,35 ^{ab}	1,64±0,05 ^{bc}	3,38±0,15 ^a	3,40±0,18 ^a	3,36±0,13 ^{bc}	2,94±0,11 ^{ac}	1,44±0,07 ^{ab}	2,55±0,15	1,34±0,10	1,64±0,08
<i>M. piperita</i>	2,94±0,17 ^c	3,36±0,15 ^c	11,05±0,42 ^{ab}	tr ^{bc}	0,56±0,29 ^{ac}	6,40±0,31 ^{ab}	2,42±0,09 ^b	1,20±0,05 ^{ac}	2,41±0,10 ^b	5,07±0,28	5,09±0,29	4,41±0,18
<i>O. basilicum</i>	3,03±0,05 ^c	2,62±0,09	2,19±0,07 ^a	2,70±0,08 ^c	3,09±0,10 ^c	1,97±0,05 ^{ab}	3,26±0,09 ^c	3,15±0,18 ^c	1,83±0,13 ^{ab}	1,25±0,02	0,99±0,01	1,11±0,02
<i>O. majorana</i>	5,18±0,19 ^{bc}	3,46±0,13 ^a	3,17±0,09 ^a	3,75±0,18 ^c	3,94±0,12 ^c	0,58±0,21 ^{ab}	4,15±0,21 ^c	3,91±0,13 ^c	2,68±0,11 ^{ab}	12,04±0,52 ^c	12,76±0,61 ^c	5,41±0,31 ^{ab}
<i>O. vulgare</i>	3,58±0,10	2,99±0,11 ^c	4,11±0,15 ^b	2,69±0,08 ^{bc}	2,11±0,09 ^a	2,07±0,10 ^{ab}	1,93±0,03 ^{bc}	2,28±0,05 ^a	2,35±0,11 ^a	15,91±1,08 ^{bc}	19,64±1,69 ^{ac}	6,99±0,28 ^{ab}
<i>R. officinalis</i>	tr ^b	1,95±0,05 ^{ac}	tr ^b	10,04±0,58 ^b	8,09±0,32 ^{ac}	10,84±0,48 ^b	1,08±0,05	0,92±0,03	1,10±0,03	8,04±0,46	8,46±0,42 ^c	7,02±0,31 ^b
<i>S. officinalis</i>	3,28±0,23 ^b	2,35±0,10 ^a	2,58±0,11	8,82±0,31 ^{bc}	tr ^a	tr ^a	12,83±0,56 ^{bc}	9,88±0,38 ^a	9,84±0,41 ^a	22,82±1,05 ^{bc}	18,65±0,53 ^{ac}	16,97±0,69 ^{ab}
<i>S. montana</i>	3,37±0,14 ^{bc}	2,03±0,10 ^a	2,22±0,08 ^a	1,65±0,07 ^{bc}	tr ^a	tr ^a	1,62±0,09	1,48±0,06	1,54±0,40	5,18±0,19 ^{bc}	6,97±0,32 ^a	7,00±0,38 ^a
<i>S. scardica</i>	15,66±0,68 ^{bc}	17,95±0,73 ^{ac}	3,57±0,15 ^{ab}	0,81±0,06	0,28±0,03	tr	4,70±0,28 ^c	5,07±0,42 ^c	3,45±0,40 ^{ab}	2,85±0,05 ^c	3,54±0,05 ^c	0,84±0,04 ^{ab}
<i>T. chamaedrys</i>	6,07±0,38 ^{bc}	3,00±0,17 ^a	2,18±0,07 ^a	23,40±0,48 ^{bc}	20,01±0,59 ^{bc}	13,71±0,64 ^{ab}	2,90±0,06	2,30±0,05	2,84±0,04	3,93±0,15 ^b	5,40±0,19 ^{ac}	3,87±0,11 ^b
<i>T. montanum</i>	3,78±0,38 ^{bc}	5,71±0,32 ^{ac}	2,18±0,12 ^{ab}	7,01±0,16 ^{bc}	8,08±0,25 ^{ac}	0,99±0,06 ^{ab}	1,38±0,08 ^c	1,95±0,11 ^c	tr ^{ab}	1,53±0,04 ^c	1,23±0,03 ^c	3,27±0,21 ^{ab}
<i>Th. serpyllum</i>	5,62±0,28 ^{bc}	tr ^{ac}	6,59±0,28 ^{ab}	1,39±0,06 ^{bc}	tr ^a	0,19±0,01 ^a	4,95±0,28 ^{bc}	2,75±0,08 ^a	2,49±0,09 ^a	5,18±0,21 ^{bc}	6,97±0,34 ^a	7,00±0,31 ^a
<i>Th. vulgaris</i>	5,43±0,31 ^{bc}	6,95±0,34 ^{ac}	3,00±0,14 ^{ab}	4,91±0,21 ^{bc}	1,90±0,09 ^a	2,29±0,11 ^a	8,84±0,41 ^{bc}	7,88±0,35 ^{ac}	6,92±0,33 ^{bc}	14,19±0,04 ^{bc}	16,89±0,09 ^{ac}	7,98±0,33 ^{ab}

tr – u tragovima

^a vs. metanolni, ^b vs. etanolni i ^c vs. vodeni ekstrakt (p<0,05)

Fenolna jedinjenja su među najčešće identifikovnim jedinjenjima u biljkama familije Lamiaceae. Pored toga, često se nailazi na podatak da su terpeni biljaka ove familije, posebno triterpeni nalaženi u metanolnim ekstraktima, od izuzetnog značaja za razvoj novih bioaktivnih proizvoda, i to zahvaljujući činjenici da su farmakološki veoma aktivna grupa jedinjenja (Etsassala i sar., 2021). Međutim, oni su u znatno manjoj meri proučavani i opisani u ekstraktima biljaka familije Lamiaceae. Prethodna činjenica može takođe biti objašnjena time što, zbog prisustva nezasićenih ugljenikovih veza, terpeni lako reaguju sa oksidansima iz atmosfere poput OH⁻, O₃ i NO₃, zbog čega imaju kratak vek trajanja (od nekoliko minuta do nekoliko sati), te ih je veoma teško identifikovati i pravilno kvantifikovati u biljnom materijalu (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020).

U nastavku ovog poglavlja će biti dat prikaz rezultata za svaku od ispitivanih biljnih vrsta familije Lamiaceae zajedno sa pregledom dostupnih literaturnih podataka. Spektrofotometrijski određen sadržaj svih konsituenata je prikazan i diskutovan samo za najvišu testiranu koncentraciju od 500 µg/mL

Glechoma hederacea

Među ekstraktima *G. hederacea* detektovano je značajno više ukupnih fenola u metanolnom ekstraktu (63,23 mg EGK/g), u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt (Grafik 1).

Sličan trend kao za sadržaj ukupnih fenola pronađen je i nakon kvantifikacije fenolnih kiselina. Naime, vodeni ekstrakt *G. hederacea* je imao najviše fenolnih kiselina (73,44 mg EKK/g), za kojim slede metanolni i etanolni ekstrakti (Grafik 2).

Kvantifikacija ukupnog sadržaja flavonoida je pokazala suprotan trend u odnosu na ukupan sadržaj fenolnih kiselina, pri čemu je etanolni ekstrakt sadržao značajno više flavonoida (13,98 mg EK/g) od vodenog ekstrakta ove biljne vrste (Grafik 3). Rezultati Barros i sar. (2010) nisu u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u okviru ove doktorske disertacije, budući da metanolni ekstrakt *G. hederacea* iz Portugala korišćen u studiji ovih autora, u koncentraciji 50 mg/mL ima duplo veći sadržaj ukupnih fenola od flavonoida, dok je u ovoj doktorskoj disertaciji za metanolni ekstrakt *G. hederacea* na 500 µg/mL dobijen odnos od oko 6:1 za ukupna fenolna jedinjenja i flavonoide.

Metanolni ekstrakt *G. hederacea* ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji je sadržao značajno više ukupnih flavonola (10,13 mg EK/g) od odgovarajućeg vodenog i etanolnog ekstrakta (Grafik 4).

Za razliku od prethodnog navedenog, u etanolnom ekstraktu *G. hederacea* je nađeno značajno više ukupnih kumarina (37,76 mg EK/g) u odnosu na metanolni ekstrakt, dok u vodenom ekstraktu kumarini nisu detektovani (Grafik 5).

Sličan trend je primećen i u slučaju triterpena, gde je etanolni ekstrakt imao najviše triterpena (13,19 mg EUK/g). Ipak, statističkom analizom je ustanovljeno da ne postoji značajna razlika između sadržaja ovih jedinjenja u etanolnom i metanolnom ekstraktu (Grafik 6).

HPLC-DAD analizom je ustanovljeno da je metanolni ekstrakt *G. hederacea* bio najbogatiji rozmarinskom kiselinom (24,1 mg/g) (Tabela 6), nakon čega slede kvercetin, rutin, naringin i luteolin-7-O-glukozid (Tabela 7), dok su u vodenom ekstraktu hlorogena i kafena kiselina detektovane u najvišoj količini (Tabela 6). Detaljnija analiza Varga i sar. (2016) je pokazala da vodeni ekstrakt *G. hederacea* poreklom iz Mađarske ima 0,1 mg/g suvog ekstrakta hlorogene kiseline, dok rutin nije detektovan u ovim uzorcima. Njihovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima predstavljenim u okviru ove doktorske disertacije budući da su autori pronašli

značajno niži sadržaj hlorogene kiseline ispitivanom ekstraktu, što može biti posledica razlike u ekološkim i geografskim uslovima u kojima su biljke rasle. Dodatno, za razliku od studije Varga i sar. (2016), ekstrakti ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji i u studiji Xie i sar. (2014) su sadržali rutin. Pored toga, Cho i sar. (2020) su ustanovili da vodeni ekstrakt ove biljke poreklom iz Južne Koreje sadrži rozmarinsku i *trans*-kafenu kiselinu, kao i glukuronide apigenina i luteolina, za koje je poznato da poseduju značajnu biološku aktivnost.

Hyssopus officinalis

Najviši sadržaj ukupnih fenola među ekstraktima *H. officinalis*, detektovan je u vodenom ekstraktu (74,28 mg EGK/g), dok je etanolni ekstrakt imao značajno manje ukupnih fenola u odnosu na vodeni i metanolni ekstrakt (Grafik 1). Studija sprovedena u Poljskoj pokazala je slične rezultate kao i naša u pogledu distribucije ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim i vodenim ekstraktima *H. officinalis* (Ulewicz-Magulska i Wesolowski, 2019).

U istraživanju sprovedenom u okviru ove doktorske disertacije je pokazano da su svi ekstrakti *H. officinalis* imali sličnu količinu ukupnih fenolnih kiselina (Grafik 2) i ukupnih flavonoida (Grafik 3), dok je u studiji Vlase i sar. (2014) pokazano da etanolni ekstrakt *H. officinalis* poreklom iz Rumunije ima veći sadržaj fenolnih kiselina u poređenju sa sadržajem flavonoida.

Etanolni ekstrakt *H. officinalis* ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je imao značajno viši sadržaj ukupnih flavonola (6,12 mg EK/g) u odnosu na vodeni i metanolni ekstrakt ove biljne vrste (Grafik 4), dok su kumarini i triterpeni identifikovani jedino u etanolnom ekstraktu (56,12 mg EKu/g i 26,06 mg EUK/g, ukupni kumarini i triterpeni, redom) (Grafici 5 i 6).

HPLC-DAD analizom je ustanovljeno da je u etanolnom ekstraktu *H. officinalis* detektovano najviše rozmarinske (15,11 mg/g) i hlorogene kiseline (3,52 mg/g) (Tabela 6), kao i kvercetin (11,33 mg/g). Metanolni ekstrakt je sadržao najviše naringina, dok su oba alkoholna ekstrakta *H. officinalis* sadržala višu količinu rutina i luteolin-7-*O*-glukozida u odnosu na vodeni ekstrakt ove biljke (Tabela 7). Važno je istaći da je u ekstraktima *H. officinalis* kafena kiselina nađena u tragovima (Tabela 6), što je u skladu sa studijom Vlase i sar. (2014). Hemijska analiza ekstrakata *H. officinalis* Vlase i sar. (2014) je pokazala da je ferulinska kiselina najzastupljenije jedinjenje, što je pokazano i u studiji Proestos i sar. (2005). Dodatno, autori su u ovoj studiji, u metanolnom ekstraktu *H. officinalis*, takođe identifikovali i kafenu, siringinsku, 2,5-dihidroksibenzojevu i *p*-hidroksibenzojevu kiselinu. Među flavonoidima su autori izdvojili katehin, kao i apigenin, dok su u studiji Vlase i sar. (2014) izdvojeni izokvercitrin i rutin. S druge strane, Abdel-Megeed i sar. (2020) su prijavili da u etanolnom ekstraktu *H. officinalis* poreklom iz Egipta dominiraju hlorogena i galna kiselina, kao i kvercetin i apigenin-7-*O*-glukozid. Naši rezultati ukazuju na to da je u metanolnom i etanolnom ekstraktu *H. officinalis* dominantna rozmarinska kiselina, dok je među flavonoidima najviše zastupljen naringin (i kvercetin u etanolnom uzorku). Babich i sar. (2021) su pokazali da sadržaj ferulinske kiseline, izokvercetina, kvercetina, kvercetin-7-*O*-glukozida, rutina i luteolina u metanolnim ekstraktima *H. officinalis* značajno variraju u odnosu na supstrat u kom je biljka gajena, što su takođe uočili Mićović i sar. (2021) za rozmarinsku i hlorogenu kiselinu.

Lavandula officinalis

U metanolnom ekstraktu *L. angustifolia* je detektovan najviši sadržaj ispitivanih sekundarnih metabolita. Naime, ovaj ekstrakt je imao značajno viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (82,44 mg EGK/g) u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt iste koncentracije

(Grafik 1), dok se sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu (55,3 mg EKK/g) značajno razlikovao samo od sadržaja fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu (Grafik 2).

S druge strane, sadržaj ukupnih flavonoida i flavonola nije značajno varirao u odnosu na korišćeni rastvarač (Grafici 3 i 4). Zenão i sar. (2017) su u etanolnom ekstraktu *L. angustifolia* poreklom iz Portugala otkrili 34,54 mg EGK/g ukupnih fenola i 14,25 mg ekvivalenata katehina/g ukupnih flavonoida. Etanolni ekstrakt *L. angustifolia* iz Rumunije imao je slične količine ukupnih fenolnih jedinjenja (12,44 – 18,16 mg EGK/g) i flavonola (3,37 – 4,85 mg KE/g) što je slučaj i sa ekstraktom ispitivanim u ovoj doktorskoj disertaciji (Duda i sar., 2015).

Među ispitivanim ekstraktima *L. angustifolia*, metanolni ekstrakt je imao najviši sadržaj kafene kiseline (Tabela 6), rutina i luteolin-7-*O*-glukozida (Tabela 7). S druge strane, etanolni ekstrakt ove biljke je bio najbogatiji rozmarinskom i hlorogenom kiselinom (Tabela 6), kao i kvercetinom i naringinom (Tabela 7), u odnosu na ostale ekstrakte *L. angustifolia*. Među najdominantnijim fenolnim kiselinama u ekstraktu *L. angustifolia* iz Portugala, Zenão i sar. (2017) su identifikovali ferulinsku i rozmarinsku kiselinu, dok je njihov ekstrakt bio bogatiji rutinom nego kvercetinom. Interesantno je da u uzorku biljke iz Srbije ispitivanim u ovoj doktorskoj disertaciji luteolin-7-*O*-glukozid identifikovan u tragovima, dok je u uzorku biljke poreklom iz Portugala nađen u većoj količini. Osim toga, njihova HPLC analiza je sugerisala da ovaj ekstrakt ima značajnu količinu fenolnih kiselina, što se takođe poklapa sa našim rezultatima. Duda i sar. (2015) su otkrili veću količinu rozmarinske kiseline u poređenju sa kafenom kiselinom, što je u skladu sa rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji, međutim kvercetin i luteolin-7-*O*-glukozid nisu detektovani u uzorcima koji su pomenuti autori ispitivali.

S druge strane, zanimljivo je da u metanolnom ekstraktu ove biljke ispitivan u okviru ove doktorske disertacije nisu nađeni kumarini, dok je u vodenom ekstraktu nađen najviši sadržaj ovih sekundarnih metabolita (37,76 mg EK/g) (Grafik 5). Za razliku od ovih rezultata, u literaturi je pronađeno da su i metanolni ekstrakti *L. angustifolia* bogati kumarinima. Najčešće detektovani kumarini u *L. angustifolia* su kumarin i 7-metoksikumarin (herniarin) (Héral i sar., 2020), a nedavno su iz etil-acetatnog ekstrakta *L. angustifolia* izolovana još dva kumarina, lavnadupiron A i B (Yadikar i sar., 2018).

Pored fenolnih jedinjenja, vrste roda *Lavandula* su bogate i terpenima. Zbog toga nije iznenađujuće da je u ovoj studiji nađeno da su ekstrakti *L. angustifolia* najbogatiji triterpenima od svih ispitivanih ekstrakata: 210,42, 109,4 i 52,12 mg EUK/g u metanolnom, etanolnom i vodenom ekstraktu *L. angustifolia*, redom (Grafik 6). U studiji Héral i sar. (2020) je prijavljeno da je u biljkama roda *Lavandula* prisutno preko 30 različitih triterpena, uključujući tetraciklične, pentaciklične i steroidne derivate. Među najčešće nalaženim triterpenima su betulin, 2 α -hidroksiursolna, 2,3-hidroksitormentična, 3-epiursolna, betulinična, mikromerična, oleanolna i ursolna kiselina, α -amirin, β -amirin i uvaol.

Leonurus cardiaca

Među različitim ekstraktima *L. cardiaca* nije pokazana značajna razlika u ukupnom sadržaju fenolnih jedinjenja, mada je metanolni ekstrakt imao najviši sadržaj ovih jedinjenja (60,16 mg EGK/g) (Grafik 1). Međutim, u testu u kom je određen ukupni sadržaj fenolnih kiselina primećen je značajan uticaj rastvarača u ekstraktima *L. cardiaca*, pri čemu je metanolni ekstrakt sadržao najviše ukupnih fenolnih kiselina (58,26 mg EKK/g), nakon čega slede etanolni i vodeni ekstrakti (Grafik 2).

Zanimljivo je da je vodeni ekstrakt ove biljke sadržao značajno više flavonoida (21,13 mg EK/g) od etanolnog i metanolnog ekstrakta (Grafik 3), što nije bio slučaj sa ukupnim flavonolima. Naime, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da etanolni ekstrakt sadrži značajno više flavonola (10,09 mg EK/g) od vodenog i metanolnog ekstrakta, u kojima je nađen sličan nivo ovih jedinjenja (Grafik 4).

Literaturni podaci o spektrofotometrijski određenom fitohemijskom sadržaju ekstrakata *L. cardiaca* ukazuju na to da ova biljka ima visok sadržaj ukupnih fenola i fenolnih kiselina, a nizak sadržaj ukupnih flavonola (Sadowska i sar., 2017), što su pokazali i naši rezultati. S druge strane, prema drugoj studiji (Ebrahimzadeh i sar., 2010), razlika između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida u metanolnom ekstraktu *L. cardiaca* nije bila izražena. Wong i sar. (2014) su u ekstraktu *L. cardiaca* detektovali 12,13 mg EGK/g ukupnih fenola, 9,86 mg EK/g ukupnih flavonoida i 2,01 mg EKK/g ukupnih fenolnih kiselina. U ovoj doktorskoj disertaciji je takođe dobijen sličan trend sadržaja ovih fitokonstituentata, mada u ekstraktima koncentracija nižih od 500 µg/mL, fenolne kiseline nisu bile nađene (Prilog 1). Ipak, Angeloni i sar. (2021) su pokazali da je etanolni ekstrakt ove biljke relativno bogat fenolnim kiselinama.

Etanolni ekstrakt ove biljke koncentracije na 500 µg/mL ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je takođe imao najviši sadržaj ukupnih kumarina (30,61 mg EK/g) u odnosu na ostale ekstrakte (Grafik 5), dok su triterpeni pronađeni jedino u etanolnom ekstraktu (4,5 EUK/g) (Grafik 6).

Vodeni ekstrakt *L. cardiaca* ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je imao najviši sadržaj hlorogene kiseline (2,58 mg/g), a kafena kiselina je prisutna jedino je u vodenom ekstraktu, dok je u vodenom i etanolnom ekstraktu detektovana ista količina rozmarinske kiseline (Tabela 6). Za razliku od toga, u alkoholnim ekstraktima je detektovan veći broj flavonoida u poređenju sa vodenim ekstraktom: metanolni je imao najviše kvercetina, dok je etanolni imao najviše luteolin-7-*O*-glukozida, rutina i naringina (Tabela 7). Generalno, malo je literaturnih podataka dostupno o hemijskoj analizi *L. cardiaca*, međutim Bernatoniene i sar. (2009) su objavili da etanolni ekstrakt *L. cardiaca* sadrži ursolnu kiselinu, rutin, hlorogenu kiselinu i kvercetin. Prema našim rezultatima, rutin je najzastupljeniji od svih identifikovanih jedinjenja. Angeloni i sar. (2021) su pored ursolne i hlorogene kiseline, rutina, kvercetina, u etanolnom ekstraktu *L. cardiaca* indentifikovali i kafenu, kafeoilmalnu i *trans*-ferulinsku kiselinu, leonurid, verbaskozid, harpagid i forskolin.

Marrubium vulgare

Među svim ispitivanim ekstraktima *M. vulgare* etanolni ekstrakt je generalno sadržao najviše ispitivanih sekundarnih metabolita i najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja (34,55 mg EGK/g). Na osnovu dobijenih rezultata primećeno je da rastvarač nema uticaj na količinu ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *M. vulgare* (Grafik 1).

Za razliku od ukupnih fenola, sadržaj fenolnih kiselina je bio tri puta viši u etanolnom ekstraktu (30,48 mg EKK/g) u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt (Grafik 2). S druge strane, u testu određivanja ukupnih flavonoida nije pokazan uticaj rastvarača na nivo ukupnih flavonoida (Grafik 3).

Etanolni ekstrakt *M. vulgare* je takođe imao viši sadržaj flavonola (2,57 mg EK/g) od metanolnog i vodenog ekstrakta (Grafik 4), dok kumarini nisu nađeni u metanolnom i vodenom ekstraktu, već samo u etanolnom (18,37 mg EK/g) (Grafik 5).

Wojdiło i sar. (2007) su pomoću HPLC analize potvrdili da metanolni ekstrakt *M. vulgare* ima veći sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide, što je bio slučaj i sa

rezultatima našeg rada. Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014b) su pokazali da je metanolni ekstrakt *M. vulgare* iz Alžira imao četiri puta veći ukupni sadržaj fenola od flavonoida i flavonola, međutim, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je razlika između ukupnog sadržaja fenola i flavonoida bila manja, a ukupni sadržaj flavonola je bio 23 puta niži u poređenju sa sadržajem fenolnih jedinjenja.

Etanolni ekstrakt *M. vulgare* je sadržao značajno više triterpena (41,18 mg EUK/g) od metanolnog ekstrakta, dok u vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani čak ni pri najvišoj testiranoj koncentraciji (Grafik 6). Ranije sprovedena istraživanja uključujući Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014a) su ukazala da ekstrakti *M. vulgare* uglavnom sadrže triterpene, ali su diterpeni poput marubiina, marubenola i drugih bili prisutni u znatno većoj meri.

Metanolni ekstrakt *M. vulgare* je najbogatiji rozmarinskom i kafenom kiselinom (Tabela 6), rutinom, luteolin-7-*O*-glukozidom i naringinom (Tabela 7) u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke. S druge strane, etanolni ekstrakt je imao najviši sadržaj hlorogene kiseline (Tabela 6) i kvercetina (Tabela 7) u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt *M. vulgare*. Amessis-Ouchemoukh i sar. (2014a) su identifikovali derivate kafene kiseline, apigenin- i luteolin-*O*-glukozida u metanolnom ekstraktu *M. vulgare*, dok naši rezultati sugerišu da je u ovom ekstraktu dominantna rozmarinska kiselina. S druge strane, Aćimović i sar. (2020) su prijavili da se od monoterpenskih derivata nalaze marubinska kiselina, sakranozid A, od sesviterpenskih laktona – vulgarin, od diterpena pored onih detektovanih u studiji Amensis-Ouchemoukh i sar. (2014a) prisutni su i derivati marubiina, marubil-acetala, peregrinin, vulgarol, karnozol, i drugi. Od triterpena identifikovani su samo lupeol i oleanolna kiselina. Na kraju, Al-Zaban i sar. (2021) su u metanolnom ekstraktu *M. vulgare* takođe identifikovali ferulinsku kiselinu, premarubiin i luteolin-7-*O*-*D*-glukozid kao predominantna jedinjenja, a pored toga i terniflorin, marubozid, cirzimaritin, galnu kiselinu i amentoflavon.

Melissa officinalis

Metanolni ekstrakt *M. officinalis* ima sličan sastav ukupnih fenolnih jedinjenja kao i vodeni ekstrakt ove biljke (oko 146 mg EGK/g), dok se njihov sadržaj značajno razlikuje od sastava ukupnih fenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu (Grafik 1). Mabrouki i sar. (2018) su u poređenju sa našim rezultatima detektovali niži sadržaj ukupnih fenola etanolnog ekstrakta *M. officinalis* iz Portugala.

S druge strane, alkoholni ekstrakti *M. officinalis* ispitivani u našoj studiji imaju značajno viši nivo preostalih grupa fenolnih jedinjenja, osim kumarina, u odnosu na vodeni ekstrakt. Tako, metanolni ekstrakt *M. officinalis* je imao viši sadržaj fenolnih kiselina (176,04 mg EKK/g) (Grafik 2), flavonoida (21,16 mg EK/g) (Grafik 3) i flavonola (4,58 mg EK/g) (Grafik 4) u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt. Za razliku od toga, etanolni ekstrakt je sadržao sličan nivo kumarina kao i metanolni ekstrakt, i nešto viši sadržaj kumarina u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 5).

Što se tiče detaljnijeg fitohemijskog sastava ekstrakata *M. officinalis*, primećeno je da imaju veoma visok sadržaj rozmarinske kiseline, posebno metanolni ekstrakt (86,76 mg/g) (Tabela 6), zatim kvercetina, naringina i luteolin-7-*O*-glukozida (Tabela 7). S druge strane, etanolni ekstrakt ima najviši sadržaj hlorogene kiseline u odnosu na ostale ekstrakte, vodeni ekstrakt ima najviši sadržaj kafene kiseline (Tabela 6), dok je u etanolnom i vodenom ekstraktu nađen najviši sadržaj rutina (Tabela 7). Rezultati Ramanauskienė i sar. (2016) i Kianersi i sar. (2022) su u skladu sa našim rezultatima budući da su pokazali da je u ekstraktima *M. officinalis* dominantna rozmarinska kiselina. S druge strane, Proestos i sar. (2005) su identifikovali ferulinsku kiselinu kao dominantnu fenolnu kiselinu, a katehin kao

dominantan flavonoid u metanolnom ekstraktu *M. officinalis*, dok je kafene, *p*-hidrobenzojeve i 2,5-dihidroksibenzojeve kiseline, kao i eriodikciona takođe bilo u značajnoj količini.

Pored pomenutih grupa jedinjenja, etanolni ekstrakt *M. officinalis* sadržao je oko 50% više triterpena u odnosu na metanolni ekstrakt, dok u vodenom ekstraktu, triterpeni nisu bili detektovani (Grafik 6). Podaci o ukupnom sastavu triterpena u ekstraktima ove biljke ne postoje u dostupnoj literaturi.

Mentha × piperita

Ekstrakti *M. piperita* su imali visok sadržaj fitokonstituenata. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji, među ekstraktima *M. piperita*, vodeni ekstrakt je imao najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja, 146,01 mg EGK/g, nakon čega sledi etanolni ekstrakt, 130,75 mg EGK/g (Grafik 1).

Ekstrakti *M. piperita* ispitivani u okviru ove doktorske disertacije su, pored ekstrakata *M. officinalis*, imali najviše fenolnih kiselina u odnosu na sve ekstrakte ostalih biljnih vrsta, i to posebno etanolni ekstrakt (161,96 mg EKK/g) (Grafik 2). Ove rezultate je potvrdila i studija Vladimir-Knežević i sar. (2014), gde je pokazano da etanolni ekstrakt *M. piperita* ima visok sadržaj fenolnih kiselina.

U ekstraktima *M. piperita* je utvrđen najviše ukupnih flavonoida i fenola u odnosu na sve ostale ekstrakte predstavnika porodice Lamiaceae. Takođe je generalno pokazano da izbor rastvarača ima značajan uticaj na količinu ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima. Generalno, alkoholni ekstrakti *M. piperita* su imali sličan sadržaj ukupnih flavonoida i flavonola, što je bilo značajno više u odnosu na vodeni ekstrakt ove biljke (Grafici 3 i 4).

Pretragom literature je ustanovljeno da je fitohemijski sastav ekstrakata *M. piperita* često proučavan. Molan i Mahdy (2016) su u vodenom ekstraktu *M. piperita* poreklom iz Iraka pronašli značajno manje ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na naše rezultate (Grafik 1, Prilog 1). S druge strane, Rababah i sar. (2015) su pokazali da su u metanolnom ekstraktu *M. piperita* iz Jordana flavonoidi činili veliki udeo ukupnih fenolnih jedinjenja, dok je u našem radu pokazano da od ukupnih fenola, manje od 50% su flavonoidi. Značajno je napomenuti da treba uzeti u obzir da su u ove dve studije rezultati predstavljeni različitim jedinicama.

HPLC-DAD analizom je takođe pokazano da ekstrakti *M. piperita* imaju značajnu količinu identifikovanih fenolnih jedinjenja. Naime, vodeni ekstrakt *M. piperita* ima najviše rozmarinske (84,45 mg/g), kafene i hlorogene kiseline (Tabela 6), kao i kvercetin i rutina u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. S druge strane, u metanolnom i vodenom ekstraktu je nađena slična količina naringina, dok je u metanolnom i etanolnom ekstraktu nađena slična količina luteolin-7-*O*-glukozida (Tabela 7). Vladimir-Knežević i sar. (2014) su pokazali da je u etanolnom ekstraktu predominantna rozmarinska kiselina, nakon čega slede kafena, hlorogena i ferulinska, što se načelno poklapa sa našim rezultatima. Pored pomenutih fenolnih kiselina, galna, vanilinska, siringinska, *p*-kumarinska, sinapijska, *p*-hidroksibenzojeva, cimetna i druge se mogu naći u ekstraktima ove biljke (Riachi i De Maria, 2015). U ekstraktima *M. piperita* testiranih u okviru naše studije, identifikovani su kvercetin, luteolin-7-*O*-glukozid, naringin i rutin, što se poklapa sa postojećim literaturnim podacima (Mahdavia i Saharkhiz, 2015; Riachi i De Maria, 2015).

Za razliku od našeg istraživanja koje je pokazalo visok sadržaj kumarina u etanolnom ekstraktu (126,53 mg EK_u/g) (Grafik 5), Patil i sar. (2016) su pokazali da je vodeni ekstrakt *M. piperita* poreklom iz Indije, imao viši sadržaj kumarin od etanolnog ekstrakta.

Etanolni ekstrakt *M. piperita* je imao i značajno viši sadržaj triterpena (54,38 mg EUK/g) u poređenju sa drugim ekstraktima, što još jednom jasno potvrđuje uticaj rastvarača na količinu, u ovom konkretnom slučaju, triterpena (Grafik 6).

Ocimum basilicum

U poređenju sa ostalim testiranim biljnim vrstama, ekstrakti *O. basilicum* su imali relativno nisku zastupljenost spektrofotometrijski određenih sekundarnih metabolita. Naime, etanolni i vodeni ekstrakti su sadržali sličnu količinu ukupnih fenolnih jedinjenja (55,14 i 50,5 mg EGK/g, respektivno), i to značajno više od metanolnog ekstrakta (Grafik 1). S druge strane, Vlase i sar. (2014) su pokazali znatno viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u etanolnom ekstraktu *O. basilicum* poreklom iz Rumunije u odnosu na naše rezultate, međutim autori nisu naglasili koje koncentracije ekstrakta su ispitivali. Pored toga, u studiji Aburigal i sar. (2017) je pokazano da lokalitet u velikoj meri utiče na količinu ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *O. basilicum*.

Svi ekstrakti *O. basilicum* su imali sličan sadržaj ukupnih fenolnih kiselina (Grafik 2), flavonoida (Grafik 3), kao i kumarina (Grafik 5).

U našoj studiji je ustanovljeno da je rastvarač imao značajan uticaj na ukupan sadržaj flavonola u ekstraktima *O. basilicum*, pri čemu je pokazano da etanolni ekstrakt ima značajno viši sadržaj flavonola u odnosu na ostale ekstrakte (Grafik 4). Osim podatka Lee i sar. (2011), koji su pokazali da acetonski ekstrakt *O. basilicum* ima više ukupnih flavonola od *R. officinalis* i *S. officinalis*, što nije u skladu sa rezultatima naše studije, ne postoje drugi dostupni literaturni podaci o spektrofotometrijski utvrđenim vrednostima ukupnih flavonola za većinu ispitivanih biljnih vrsta familije Lamiaceae.

HPLC-DAD analiza je pokazala da metanolni ekstrakt *O. basilicum* sadrži najviši nivo rozmarinske, kafene i hlorogene kiseline (Tabela 6), naringina, kvercetina i luteolin-7-*O*-glukozida, dok je etanolni ekstrakt bio najbogatiji rutinom (Tabela 7). Iako su se pojedina jedinjenja izdvojila kao dominantna u ekstraktima, pregledom literature je ustanovljeno da se pored njih, u metanolnom ekstraktu ove biljke takođe mogu detektovati ferulinska, kafena, 2,5-dihidroksibenzojeva i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, kao i katehin (Proestos i sar., 2005). U etanolnom ekstraktu su dodatno identifikovane i *p*-kumarinska kiselina, izokvercetin, rutin, kvercitrin, kvercetin i luteolin, dok su 2,5-dihidroksibenzojeva, kafena, hlorogena i rozmarinska kiselina nađene u malim količinama (Vlase i sar., 2014), što nije u potpunosti u saglasnosti sa našim rezultatima (osim za kafenu kiselinu).

Od svih ispitivanih ekstrakata, ekstrakti *O. basilicum* su imali najniži nivo triterpena. Naime, u etanolnom ekstraktu je pronađeno 1,61 mg EUK/g, dok u metanolnom i vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani čak ni pri najvišoj koncentraciji (Grafik 6). Iako do sada nije bio ispitivan sadržaj ukupnih triterpena u ekstraktima *O. basilicum*, pronađen je podatak da je njegov etil-acetatni ekstrakt imao visok sadržaj ukupnih terpena (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020). Ovi rezultati nisu u skladu sa rezultatima naše studije, što se može pripisati tome da su autori kvantifikovali ukupne terpene, u koje spadaju i druge klase, poput mono-, di- i triterpena. Takođe je značajno napomenuti da je i izbor rastvarača korišćen za ekstrakciju biljnog materijala mogao imati značajan uticaj na sadržaj ovih sekundarnih metabolita u uzorku.

Origanum majorana

U svim spektrofotometrijskim testovima za određivanje sadržaja fitokonstituenata ustanovljeno je da rastvarač ima značajan uticaj na zastupljenost određenih klasa ovih jedinjenja u ekstraktima *O. majorana*. Metanolni ekstrakt ima značajno viši sadržaj ukupnih

fenola (160,69 mg EGK/g) u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke (Grafik 1). El-Maati i sar. (2012) su pokazali da etanolni ekstrakt *O. majorana* poreklom iz Egipta ima gotovo dvostruko više fenola u odnosu na vodeni ekstrakt, što je u skladu sa našim rezultatima. Roby i sar. (2013) su takođe ispitivali metanolne i etanolne ekstrakte *O. majorana* poreklom iz Egipta i ustanovili da je metanolni ekstrakt imao više ukupnih fenola u poređenju sa etanolnim ekstraktom. U pomenutoj studiji je takođe pokazano da ovi ekstrakti imaju manje ukupnih fenola u odnosu na metanolne i etanolne ekstrakte *Th. vulgaris* i *S. officinalis*, što je delimično skladu sa našim rezultatima. S druge strane, Ulewicz-Magulska i Wesolowski (2019) su pokazali da je metanolni ekstrakt *O. majorana* imao viši sadržaj ukupnih fenola od vodenog ekstrakta, što je takođe u skladu sa našim rezultatima.

Etanolni ekstrakt *O. majorana* ima značajno više ukupnih fenolnih kiselina (117,15 mg EKK/g) (Grafik 2), flavonoida (35,41 mg EKK/g) (Grafik 3) i flavonola (9,88 mg EK/g) (Grafik 4) u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke, što potvrđuje nalaze prethodne studije El-Maati i sar. (2012) rađene na biljkama poreklom iz Egipta, gde je pokazano da etanolni ekstrakti imaju viši sadržaj ukupnih flavonoida u odnosu na odgovarajuće vodene ekstrakte. Prema njihovim rezultatima, etanolni ekstrakt je sadržao 50% više flavonoida od vodenog ekstrakta, što predstavlja trend koji takođe prate i naši rezultati (Grafik 3). Osim podatka da je acetonski ekstrakt *O. majorana* iz Kine imao viši nivo flavonola od *Th. serpyllum* (Lee i sar., 2011), što nije u skladu sa našim rezultatima, ne postoje dostupni literaturni podaci o spektrofotometrijski određenim ukupnim flavonolima za ovu biljnu vrstu.

HPLC-DAD analizom je ustanovljeno da metanolni ekstrakt *O. majorana* ima najviše rozmarinske (48,57 mg/g) i kafene kiseline (Tabela 6), kvercetina i naringina (Tabela 7) u poređenju sa detektovanim vrednostima u ostalim ekstraktima ove biljke. S druge strane, u etanolnom ekstraktu je otkriveno najviše luteolin-7-*O*-glukozida i rutina (Tabela 7), dok je hlorogena kiselina detektovana u vodenom ekstraktu (Tabela 6). Proestos i sar. (2005) su hemijskom analizom metanolnog ekstrakta detektovali najviše ferulinske kiseline, a dodatno su nađene još i kafena, *p*-hidroksibenzojeva i 2,5-dihidroksibenzojeva kiselina, kao i apigenin i katehin.

Ekstrakti *O. majorana* imaju veoma visok sadržaj ukupnih kumarina, posebno metanolni ekstrakt (156,12 mg EKu/g) (Grafik 5). Pored toga, metanolni i etanolni ekstrakti su imali oko 10 puta viši sadržaj triterpena u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 6). Pretragom literature je ustanovljeno da ukupan sadržaj kumarina i triterpena u ekstraktima ove biljke vrste do sada nisu ispitivani.

Origanum vulgare

Među ekstraktima *O. vulgare*, etanolni je imao najviši sadržaj fenolnih jedinjenja, 236,38 mg EGK/g, što je 1,5 puta više u odnosu na metanolni ekstrakt, i 2,2 puta više u odnosu na vodeni ekstrakt iste biljke (Grafik 1). Ovaj nalaz je u skladu sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da metanolni ekstrakt *O. vulgare* ima značajno viši sadržaj fenolnih jedinjenja u poređenju sa vodenim ekstraktom (Skendi i sar., 2017).

Ekstrakti *O. vulgare*, i to posebno alkoholni ekstrakti, imaju visok sadržaj fenolnih kiselina (Grafik 2), flavonoida (Grafik 3) i flavonola (Grafik 4). Parra i sar. (2021) su pokazali da etanolni ekstrakt *O. vulgare* sadrži preko 2,5 puta više fenolnih kiselina u odnosu na flavonoide, što je u skladu sa našim rezultatima. Takođe, pokazano je da su ekstrakti *O. vulgare* iz Rumunije imali viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja i flavonoida u poređenju sa ekstraktima iste biljke poreklom iz Grčke, što implicira da lokalitet, klimatski uslovi, ali i faza rasta u kojoj je biljka prikupljena značajno utiču na sastav fenolnih jedinjenja u njihovim ekstraktima (Spiridon i sar., 2011; Skendi i sar., 2017). Dodatno, spektrofotometrijska analiza

ukupnih fenola i flavonoida je pokazala da su metanolni i vodeni ekstrakti *O. vulgare* bogatiji ovom grupom fenolnih jedinjenja od *Thymus capitatus* (Skendi i sar., 2017). Pretragom dostupne literature je pokazano da ne postoje podaci o spektrofotometrijski određenom sastavu ukupnih flavonola za ovu biljku.

Skendi i sar. (2019) su pokazali da metanolni ekstrakt *O. vulgare* ima više fenolnih kiselina (posebno rozmarinske, 4-hidroksibenzojeve, galne, protokatehinske, siringinske, vanilinske, kafene, ferulinske, sinapijske i *p*-kumarinske kiseline) u odnosu na flavonoide (naringenin, luteolin, rutin, kempferol i katehin), pri čemu su rozmarinska kiselina i naringenin dominantna jedinjenja, dok hlorogena kiselina i kvercetin nisu bili detektovani. U našoj studiji je vodeni ekstrakt *O. vulgare* sadržao najviše hlorogene i kafene kiseline (Tabela 6), kao i kvercetin i naringina (Tabela 7). Sa druge strane, etanolni ekstrakt je pretežno sadržao rozmarinsku kiselinu i luteolin-7-*O*-glukozid (Tabele 6 i 7), dok je metanolni ekstrakt pretežno sadržao rutin (Tabela 7).

Pored fenolnih kiselina i flavonoida, u ekstraktima *O. vulgare* je pronađen visok sadržaj ukupnih kumarina, posebno u vodenom ekstraktu (96,94 mg Eku/g) (Grafik 5).

Spektrofotometrijskom analizom je utvrđeno da alkoholni ekstrakti *O. vulgare* imaju do 5,5 puta više triterpena u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 6). Parra i sar. (2021) su pokazali da je sadržaj fenolnih monoterpena u etanolnom ekstraktu nizak, međutim njihov zaključak jeste da ova jedinjenja ipak mogu imati krucijalnu ulogu u ispoljenoj bioaktivnosti pomenutog ekstrakta.

Rosmarinus officinalis

Vodeni ekstrakt *R. officinalis* je sadržao nešto više ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na alkoholne ekstrakte (Grafik 1). Ovi rezultati su potvrdili prethodna istraživanja El-Maati i sar. (2012), gde je pokazano da vodeni ekstrakt *R. officinalis* sadrži više ukupnih fenola u odnosu na etanolni ekstrakt. U poređnom analizom sastava metanolnih ekstrakata većeg broja vrsta familije Lamiaceae, ustanovljeno je da *R. officinalis* ima najviši sadržaj ukupnih fenola, dok je za ostale ispitivane vrste pronađen sledeći trend: *Th. vulgaris* > *M. officinalis* > *O. majorana* > *S. officinalis* > *T. chamaedrys* > *O. basilicum* > *Lavandula vera* > *H. officinalis* (Proestos i sar., 2005), međutim ovi nalazi nisu u saglasnosti sa našim rezultatima.

Etanolni ekstrakt *R. officinalis* ima značajno više fenolnih kiselina (140,85 mg EKK/g) u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt (Grafik 2), međutim pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje raniji podaci o spektrofotometrijski određenom ukupnom sadržaju fenolnih kiselina u ekstraktima ove biljke.

Metanolni ekstrakt *R. officinalis* je sadržao 50-70% više ukupnih flavonoida u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke (Grafik 3). S druge strane, vodeni ekstrakt je sadržao nešto više flavonola u odnosu na metanolni ekstrakt, i oko dva puta više u odnosu na etanolni ekstrakt (Grafik 4). Ovi rezultati sugerišu da u metanolnom ekstraktu ima više drugih klasa flavonoida nego u ostalim ekstraktima. Istraživanja su pokazala da su ekstrakti *R. officinalis* bogati flavonoidima (Hossain i sar., 2011; Kontogianni i sar., 2013; De Macedo i sar., 2020), a El-Maati i sar. (2012) su objavili da etanolni ekstrakt ove biljke sadrži oko 50% veće količine flavonoida u odnosu na vodeni ekstrakt, što nije u skladu sa našim rezultatima.

Pored fenolnih kiselina i flavonoida, u ekstraktima *R. officinalis* otkriven je visok sadržaj kumarina, pri čemu je statističkom analizom pokazano da rastvarač nije imao značajan uticaj na ukupan sadržaj kumarina u ekstraktima ove biljke (Grafik 5).

HPLC-DAD analiza otkriva da metanolni ekstrakt *R. officinalis* u svom sastavu ima više rozmarinske i hlorogene kiseline od etanolnog i vodenog ekstrakta (Tabela 6). Etanolni ekstrakt, sa druge strane, sadrži najviše luteolin-7-*O*-glukozida, a kvercetin je detektovan jedino u etanolnom ekstraktu (Tabela 7). Za razliku od toga, vodeni ekstrakt je najbogatiji kafenom kiselinom (Tabela 6), rutinom i naringinom (Tabela 7). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Sofic i sar. (2010), koji su identifikovali visok nivo rutina u vodenom ekstraktu *R. officinalis*. Sa druge strane, Proestos i sar. (2005) su otkrili da se u metanolnom ekstraktu *R. officinalis* najviše nalazi ferulinske kiseline, nakon čega slede 2,5-dihidroksibenzojeva, kafena, vanilinska, siringinska i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, dok su se među flavonoidima izdvojili luteolin i katehin, a rutin, apigenin, naringenin i kvercetin nisu identifikovani.

Iako je u našem istraživanju ustanovljeno da među ekstraktima *R. officinalis*, etanolni ekstrakt ima najmanji sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, flavonola i kumarina, ovaj ekstrakt ima više ukupnih triterpena u odnosu na metanolni ekstrakt, dok u vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani (Grafik 6). Pretragom literature je ustanovljeno da ukupni sadržaj triterpena u ekstraktima ove biljke do sada nije ispitivan.

Salvia officinalis

U spektrofotometrijskim testovima za određivanje fitohemijskog sadržaja ekstrakata *S. officinalis* pokazano je da rastvarač ima značajan uticaj na ekstrakciju testiranih grupa jedinjenja, pri čemu su u ovim testovima alkoholni ekstrakti imali značajno viši sadržaj ispitivanih sekundarnih metabolita u odnosu na vodeni ekstrakt.

Etanolni ekstrakt ima sličan nivo ukupnih fenolnih jedinjenja kao i metanolni ekstrakt (više od 130 mg EGK/g), što je približno 50% više u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 1). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Stagos i sar. (2012).

Metanolni ekstrakt je sadržao najviše ukupnih fenolnih kiselina (103,44, mg EKK/g) (Grafik 2), flavonoida (53,09 mg EK/g) (Grafik 3) i flavonola (14,87 mg EK/g) (Grafik 4) u odnosu na preostale ekstrakte.

HPLC-DAD analiza je pokazala da metanolni ekstrakt sadrži pretežno rozmarinsku kiselinu (55,62 mg/g), dok vodeni ekstrakt sadrži pretežno kafenu i hlorogenu kiselinu (Tabela 6). Takođe, metanolni ekstrakt *S. officinalis* ima najviši sadržaj luteolin-7-*O*-glukozida i naringina u odnosu na ispitivane ekstrakte ostalih predstavnika familije Lamiaceae, a pored toga i najviši sadržaj rutina i kvercetina u odnosu na ostale ekstrakte *S. officinalis* (Tabela 7). Proestos i sar. (2005) su pokazali da je u metanolnom ekstraktu ove biljke predominantna ferulinska kiselina, nakon čega slede 2,5-dihidroksibenzojeva i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, dok se među identifikovanim flavonoidima izdvojio katehin, zatim apigenin i luteolin. U etanolnom ekstraktu *S. officinalis* iz Rumunije, Mocan i sar. (2020) su identifikovali epikatehin kao dominantno jedinjenje, nakon čega slede rutin, katehin, kvercetin, naringin, karvakrol i benzojeva kiselina, dok hlorogena i *p*-kumarinska kiselina, kao i naringenin nisu bili nađeni.

Metanolni ekstrakt *S. officinalis* je sadržao približno 50% više kumarina u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 5), dok su pri istoj koncentraciji, triterpeni detektovani samo u etanolnom ekstraktu (Grafik 6). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Mahdi i sar. (2020), gde je dokazano prisustvo kumarina i terpena u etanolnom ekstraktu *S. officinalis*.

Satureja montana

Ekstrakti *S. montana* su bogati fenolnim jedinjenjima, posebno fenolnim kiselinama i kumarinima, dok je flavonoida i triterpena znatno manje. Pored toga, u ovoj studiji je

pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ekstrakciju fenolnih jedinjenja (osim flavonoida) i triterpena iz ekstrakata *S. montana*.

Među ispitivanim ekstraktima, etanolni ekstrakt je sadržao značajno više ukupnih fenolnih jedinjenja (134,32 mg EGK/g) (Grafik 1) i kumarina (124,49 mg Eku/g) (Grafik 5), dok je metanolni ekstrakt sadržao značajno više fenolnih kiselina (130,11 mg EKK/g) u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt (Grafik 2).

Ekstrakti *S. montana* sadržali su sličnu količinu flavonoida (od 26,16 do 28,92 mg EK/g) (Grafik 3), dok je vodeni ekstrakt sadržao oko 50% više flavonola u odnosu na alkoholne ekstrakte (Grafik 4). Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima Čavar Zeljković i sar. (2015), koji su pokazali da iako je metanolni ekstrakt ove biljke generalno bogat fenolima, mali udeo sačinjavaju flavonoidi.

Za razliku od fenolnih jedinjenja, alkoholni ekstrakti *S. montana* sadržali su slične količine triterpena, dok u vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani (Grafik 6).

HPLC-DAD analiza ekstrakata je pokazala da je u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke, metanolni ekstrakt *S. montana* bogatiji rozmarinskom kiselinom (Tabela 6), kvercetinom, rutinom i naringinom (Tabela 7). S druge strane, etanolni ekstrakt je najbogatiji hlorogenom kiselinom, dok vodeni sadrži najviše kafene kiseline (Tabela 6) i luteolin-7-*O*-glukozida (Tabela 7). U ranijim studijama je rutin bio kvantifikovan u najvećoj količini u ekstraktima *S. montana* (López-Cobo i sar., 2015; Hudz i sar., 2020), što je u skladu sa rezultatima našeg istraživanja. S druge strane, Vladimir-Knežević i sar. (2014) su identifikovali visok sadržaj rozmarinske kiseline u etanolnom ekstraktu, što je u saglasnosti sa analizom sprovedenom u okviru naše studije. Međutim, nepoklapanje dobijenih rezultata sa rezultatima ranijih studija se primećuje kada se porede količine kafene i hlorogene kiseline. Naime, nađeno je da etanolni ekstrakt *S. montana* poreklom iz Hrvatske sadrži više hlorogene kiseline, dok uzorak biljke ispitan u okviru ove doktorske disertacije sadrži više kafene kiseline, što se može pripisati razlici u ekološkim uslovima staništa. Pored navedenih, Čavar Zeljković i sar. (2015) su u metanolnom ekstraktu ove biljke identifikovali i vanilinsku, siringinsku, ferulinsku, sinapijsku, 4-hidroksibenzojevu i galnu kiselinu, pri čemu su oni otkrili znatno manje rozmarinske kiseline u odnosu na preostale nabrojene.

Sideritis scardica

Ekstrakti *S. scardica* sadrže relativno malo fenolnih jedinjenja, osim flavonoida i kumarina. S druge strane, među ispitivanim ekstraktima ove biljke, najviše fenolnih kiselina je sadržao metanolni ekstrakt. Naime, metanolni ekstrakt je sadržao značajno više ukupnih fenolnih jedinjenja (87,3 mg EGK/g) (Grafik 1), flavonoida (26,28 mg EK/g) (Grafik 3) i kumarina (105,1 mg EK/g) (Grafik 5) u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke. Fenolne kiseline su nađene samo pri najvišoj testiranoj koncentraciji, pri čemu ih je bilo gotovo 10 puta više u metanolnom nego u etanolnom i vodenom ekstraktu (Grafik 2). Analizom ekstrakata makedonske samonikle *S. scardica* ustanovljeno je da metanolni ekstrakt ove biljke ima gotovo tri puta veću količinu ukupnih fenola u poređenju sa vodenim ekstraktom. Pored toga, u studiji Petreska i sar. (2011) su ukupni sadržaj fenolnih kiselina i flavonoida bili najveći u metanolnom ekstraktu, što je u skladu sa našim rezultatima.

Flavonola je, s druge strane, u vodenom i etanolnom ekstraktu *S. scardica* bilo oko 50% više nego u metanolnom ekstraktu (Grafik 4). Pri istoj koncentraciji, u etanolnom ekstraktu je pronađeno i oko 50% više triterpena nego u metanolnom ekstraktu, dok u vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani (Grafik 6).

Među svim ispitivanim ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae, metanolni ekstrakt *S. scardica* je sadržao najviše hlorogene kiseline (5 mg/g) (Tabela 6), a etanolni ekstrakt je sadržao najviše kvercetina (17,95 mg/g) (Tabela 7). Metanolni ekstrakt je imao više rutina u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke, etanolni ekstrakt je imao najviši sadržaj rozmarinske kiseline, naringina i luteolin-7-*O*-glukozida, dok je vodeni ekstrakt imao značajno viši sadržaj kafene kiseline u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke (Tabele 6 i 7). Prema rezultatima naše studije, ekstrakti *S. scardica* su uglavnom sadržali kvercetin, dok su Petreska i sar. (2011) otkrili da se metanolni ekstrakt pretežno sadrži fenil etanoidne glukozide, a vodeni ekstrakt pretežno flavonoidne 7-*O*-diglikozide. S druge strane, Tadić i sar. (2012b) su istraživali hemijski sastav različitih ekstrakata *S. scardica*, međutim u etanolnom ekstraktu nisu pronašli nijedno od fenolnih jedinjenja koja su bila identifikovana u dietil-etarskom (bogat flavonoidnim aglikonima), etil-acetatnom i butanolnom ekstraktu (bogat polarnijim fenolnim jedinjenjima). Rezultati ukupnog sadržaja fenolnih jedinjenja predstavljeni u okviru naše studije su bili niži od toga što su autori prijavili, a uprkos tome, nađene su hlorogena i kafena kiselina, kao i luteolin-7-*O*-glukozid, koji nisu nađeni u uzorcima koji su autori ispitivali, međutim, u studiji Žyželewicz i sar. (2020) je pokazano da su ova fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima *S. scardica*. Značajno je napomenuti da je biljni materijal za potrebe istraživanja Tadić i sar. (2012b) sakupljen u blizini Ljubotena na Šar planini, odakle je sakupljen i materijal koji je analiziran u ovoj doktorskoj disertaciji. Međutim, uočene razlike u količini pomenutog fitohemijskog sadržaja ekstrakata se mogu objasniti time da su Tadić i sar. (2012b) sakupljali materijal u fazi cvetanja biljke, dok je materijal sakupljen za potrebe naše studije sakupljen pre cvetanja, što je u skladu sa studijom Fernando i sar. (2013).

Interesantno je da je u našem istraživanju otkriveno da su ekstrakti *S. scardica* veoma bogati kumarinima, međutim pretragom literature je ustanovljeno da ova grupa fenolnih jedinjenja u ekstraktima *S. scardica* ranije nije ispitana, dok je za druge vrste roda *Sideritis* pokazano da imaju visok sadržaj kumarina (Faiella i sar., 2014; Ognyanov i sar., 2021).

Teucrium chamaedrys

Statistička analiza rezultata je pokazala da rastvarač ima značajan uticaj na ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u ekstraktima *T. chamaedrys*.

Vodeni ekstrakt je imao neznatno viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na etanolni ekstrakt, i dvostruko viši u odnosu na metanolni ekstrakt (Grafik 1), što je u saglasnosti sa rezultatima studije Proestos i sar. (2005). U komparativnoj studiji sprovedenoj od strane Vlase i sar. (2014), pokazano je da etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* ima značajno više ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ekstrakte *O. basilicum* i *H. officinalis*, što je takođe u saglasnosti sa našim rezultatima.

Alkoholni ekstrakti sadržali su oko 20-30% više fenolnih kiselina (Grafik 2), flavonoida (Grafik 3) i flavonola (Grafik 4), i gotovo duplo više kumarina (Grafik 5), dok je sadržaj triterpena bio približno sedam puta viši u odnosu na vodeni ekstrakt ove biljke (Grafik 6). Vlase i sar. (2014) su pokazali da etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* sadrži više ukupnih fenolnih kiselina i flavonoida u odnosu na etanolne ekstrakte *O. basilicum* i *H. officinalis*, što je u skladu sa rezultatima naše studije. S druge strane, etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* iz Severne Makedonije je imao nešto viši ukupni sadržaj flavonoida u poređenju sa *T. montanum* (Kadifkova Panovska i sar., 2005), što nije u skladu sa našim rezultatima. Vladimir-Knežević i sar. (2014) su pokazali da etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* L sadrži oko 20% više ukupnih fenolnih kiselina u odnosu na ekstrakt *T. montanum*.

HPLC-DAD analiza je pokazala da je metanolni ekstrakt *T. chamaedrys* generalno najbogatiji rutinom (23,4 mg/g) u odnosu na sve ostale ispitivane ekstrakte predstavnika

familije Lamiaceae (Tabela 7). Takođe, među ekstraktima *T. chamaedrys*, metanolni ekstrakt je najbogatiji rozmarinskom kiselinom (Tabela 6), kvercetinom i naringinom, dok je etanolni ekstrakt najbogatiji luteolin-7-*O*-glukozidom, hlorogenom i kafenom kiselinom (Tabele 6 i 7). Pored toga, generalno je primećeno da su ovi ekstrakti veoma bogati rutinom u odnosu na ispitivane ekstrakte ostalih predstavnika familije Lamiaceae. Analizom literaturnih podataka, s druge strane, pronađeno je da su Vladimir-Knežević (2014) u etanolnom ekstraktu *T. chamaedrys* identifikovali hlorogenu, ferulinsku i rozmarinsku kiselinu, dok su dodatno u metanolnom identifikovane i kafena i galna kiselina, kao i luteolin, apigenin i kvercetin (Proestos i sar., 2005).

Teucrium montanum

Za razliku od ekstrakata *T. chamaedrys*, etanolni ekstrakt *T. montanum* je imao nešto viši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja od metanolnog ekstrakta, i tri puta viši od vodenog ekstrakta (Grafik 1). S druge strane, svi ekstrakti *T. montanum* sadržali su sličan nivo ukupnih fenolnih kiselina (oko 45 mg EKK/g) (Grafik 2), dok je u etanolnom ekstraktu pronađeno najviše ukupnih flavonoida (31,47 mg EK/g) i flavonola (12,81 mg EK/g) (Grafici 3 i 4). Ovi rezultati su u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima istraživanja ukupnog sadržaja fenola i flavonoida metanolnog i vodenog ekstrakta *T. montanum* poreklom iz Srbije (Stanković i sar., 2011b). Tumbas i sar. (2004) pokazali da je vodeni ekstrakt bogatiji fenolnim kiselinama od metanolnog, što je takođe bio slučaj sa našom studijom, dok je pretragom literature ustanovljeno da nema podataka o spektrofotometrijski određenom sastavu ukupnih flavonola za ekstrakte *T. montanum*.

HPLC-DAD analizom je pokazano da su ekstrakti *T. montanum* imali najniži sadržaj rozmarinske kiseline u odnosu na sve ispitivane ekstrakte predstavnika familije Lamiaceae, ali ujedno i najviši sadržaj kafene kiseline. Među ispitivanim ekstraktima *T. montanum*, metanolni je imao najviše hlorogene i rozmarinske kiseline (Tabela 6), dok je vodeni ekstrakt imao najviše luteolin-7-*O*-glukozida (Tabela 7). Sa druge strane, etanolni ekstrakt je sadržao najviše kafene kiseline (Tabela 6), rutina, kvercetina i naringina u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke (Tabela 7). U dostupnoj literaturi ne postoje detaljni podaci o hemijskom sastavu ekstrakata *T. montanum*, ali je uočeno da je u vodenom ekstraktu ove biljke sa teritorije Srbije dominantna galna kiselina, zatim protokatehinska, hlorogena, kafena, ferulinska, dok vanilinske ima najmanje (Nastić i sar., 2018), međutim, vodeni ekstrakt ispitivan u našoj studiji je imao više kafene nego hlorogene kiseline. U studiji Nastić i sar. (2018) je pokazano da je u vodenom ekstraktu *T. montanum*, među flavonoidima dominantan naringin, nakon čega slede rutin, epikatehin i katehin, što je u skladu sa našim rezultatima za prva dva pomenuta flavonoida.

Pored fenolnih kiselina i flavonoida, u ekstraktima *T. montanum* pronađen je veoma visok sadržaj ukupnih kumarina i triterpena, posebno u metanolnom ekstraktu: 161,22 mg EK/g (Grafik 5) i 64,03 mg EUK/g, redom (Grafik 6). Statističkom analizom je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ukupan sadržaj kumarina i triterpena u ekstraktima ove biljke.

Thymus serpyllum

Ekstrakti *Th. serpyllum* su sadržali visok udeo ukupnih fenolnih jedinjenja, od kojih su se najviše izdvojili kumarini, dok je udeo fenolnih kiselina i flavonoida bio sličan. U metanolnom ekstraktu *Th. serpyllum* pronađen je najviši sadržaj ispitivanih grupa fenolnih jedinjenja, dok je u etanolnom ekstraktu nađeno najviše triterpena u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke.

Statističkom analizom je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ekstrakciju ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima *Th. serpyllum*, pri čemu je metanolni ekstrakt sadržao nešto više ukupnih fenolnih jedinjenja od etanolnog, a gotovo dva puta puta više od vodenog ekstrakta (Grafik 1).

U slučaju ukupnih fenolnih kiselina, metanolni ekstrakt je sadržao najviše fenolnih kiselina (56,78 mg EKK/g) u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt (Grafik 2).

Ukupan sadržaj flavonoida u ekstraktima *Th. serpyllum* prati i sadržaj flavonola, pri čemu je pokazano da alkoholni ekstrakti imaju oko viši sadržaj flavonoida u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 3). Rastvarač je imao značajan uticaj na sadržaj flavonola u ovim ekstraktima, pri čemu se sastav flavonola u ekstraktima ove biljke međusobno značajno razlikovao (Grafik 4). Ovi rezultati su potvrdili prethodnu studiju Đukić i sar. (2017), gde je pokazano da vodeni ekstrakt *Th. serpyllum* poreklom iz Srbije ima relativno nizak udeo flavonoida (16,52%) u odnosu na ukupna kvantifikovana fenolna jedinjenja.

Do sada nisu nađene studije u kojima su kvantifikovani kumarini u ekstraktima *Th. serpyllum*, dok je u našoj studiji pokazano da je najviše kumarina imao metanolni ekstrakt (98,98 mg EK/g), nakon čega slede vodeni i etanolni (Grafik 5).

HPLC-DAD analizom je ustanovljeno da metanolni ekstrakt *Th. serpyllum* ima najviše naringina i rutina u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke (Tabela 7). S druge strane, u etanolnom ekstraktu *Th. serpyllum* pronađena je veća količina rozmarinske kiseline, a vodeni ekstrakt ima najviše kafene i hlorogene kiseline (Tabela 6), luteolin-7-*O*-glukozida i kvercetina (Tabela 7). Jovanović i sar. (2017) su u etanolnom ekstraktu identifikovali rozmarinsku, kafenu i salvianolinsku kiselinu, dok je hlorogena nađena samo u tragovima, što nije u potpunosti u skladu sa našim rezultatima. U vodenom ekstraktu *Th. serpyllum* iz Hrvatske, Kulišić i sar. (2006) su otkrili veću količinu kvercetina nego u vodenom ekstraktu *Th. vulgaris*, dok je u vodenom ekstraktu *O. vulgare* nađena još veća količina, što je delimično u skladu sa našim rezultatima, budući da je u uzorcima poreklom iz Srbije, kvercetin bio najzastupljeniji u ekstraktima *Th. serpyllum*, nakon čega slede *O. vulgare* i *Th. vulgaris*. Naši rezultati takođe podržavaju literaturne podatke koji sugerišu da su pored kvercetina, u ekstraktima ove biljke takođe prisutni rutin i luteolin-7-*O*-glukozid (Milevskaya i sar., 2017).

Pretragom literature je ustanovljeno da ukupan sadržaj triterpena u ekstraktima *Th. serpyllum* do sada nije bio istraživan, međutim naši rezultati ukazuju na to da alkoholni ekstrakti sadrže sličnu količinu triterpena, dok u vodenom ekstraktu triterpeni nisu detektovani (Grafik 6).

Thymus vulgaris

U alkoholnim ekstraktima *Th. vulgaris* je nađeno više fenolnih jedinjenja i triterpena nego u vodenom ekstraktu. Najviši sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja je nađen u etanolnom ekstraktu (110 mg EGK/g), nakon čega slede vodeni i metanolni ekstrakt (Grafik 1), što nije u saglasnosti sa rezultatima studije Roby i sar. (2013) i Ulewicz-Magulska i Wesolowski (2019), u kojima je pokazano da metanolni ekstrakt ima najviši sadržaj ovih jedinjenja. S druge strane, naši rezultati su u skladu sa rezultatima El-Maati i sar. (2012), gde je nađeno da je etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* iz Egipta imao najviše ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na ostale ispitivane predstavnike familije Lamiaceae, dok je njegov vodeni ekstrakt imao približno dva puta manje fenola od etanolnog ekstrakta.

Metanolni ekstrakt je imao >50% viši sadržaj fenolnih kiselina u odnosu na etanolni ekstrakt, i dvostruko viši sadržaj u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 2). Metanolni ekstrakt ove biljke je takođe imao najviši sadržaj flavonoida u odnosu na ostale ekstrakte ove biljke

(Grafik 3), kumarina (Grafik 5) i triterpena (Grafik 6), posebno u odnosu na vodeni ekstrakt koji je pokazao znatno niže vrednosti u odnosu na metanolni.

Za razliku od prethodno navedenog, u etanolnom ekstraktu pronađen je najviši sadržaj ukupnih flavonola, što sugerira da rastvarač ima značajan uticaj na sadržaj flavonola u ekstraktima *Th. vulgaris* (Grafik 4). El-Maati i sar. (2012) su takođe pokazali da etanolni ekstrakt ove biljke poreklom iz Egipta ima više flavonoida od vodenog ekstrakta, mada je ta razlika kod njih bila znatno manja u odnosu na naše rezultate.

HPLC-DAD analiza je pokazala da metanolni ekstrakt *Th. vulgaris* među ispitanim jedinjenjima dominantno sadrži naringin i rutin, etanolni ekstrakt ima najviše rozmarinske kiseline, dok vodeni ekstrakti sadrži najviše luteolin-7-*O*-glukozida, kafene i hlorogene kiseline (Tabele 6 i 7). Roby i sar. (2013) su ispitivali hemijski sastav metanolnog ekstrakta i identifikovali su cimetnu, rozmarinsku, kafenu, hinu, ferulinsku i *p*-kumarinsku kiselinu, dok su među flavonoidima najprisutniji bili apigenin, naringin i luteolin-7-*O*-rutinozid. U metanolnom ekstraktu ove biljke su dodatno identifikovane siringinska, 2,5-dihidroksibenzojeva i *p*-hidroksibenzojeva kiselina, dok je među flavonoidima dominantan luteolin, nakon čega slede apigenin i epikatehin (Proestos i sar., 2005).

Na osnovu prikaza fitohemijskog sastava predstavnika familije Lamiaceae može se zaključiti da različiti uslovi uzgoja biljaka (uključujući lokalitet, klimatske uslove, insolaciju i druge klimatske faktore), faza rasta, ali i odabir rastvarača i protokola pripreme ekstrakata, kao i vremenski period skladištenja gotovih ekstrakata (na +4°C ili na nižoj temperaturi) igraju važnu ulogu u finalnom hemijskom sastavu ovih biljaka (Proestos i sar., 2005; Spiridon i sar., 2011; Roby i sar., 2013; Vladimir-Knežević i sar., 2014; Jovanović i sar., 2017; Skendi i sar., 2017; Chua i sar., 2018).

4.3. Antioksidativna aktivnost

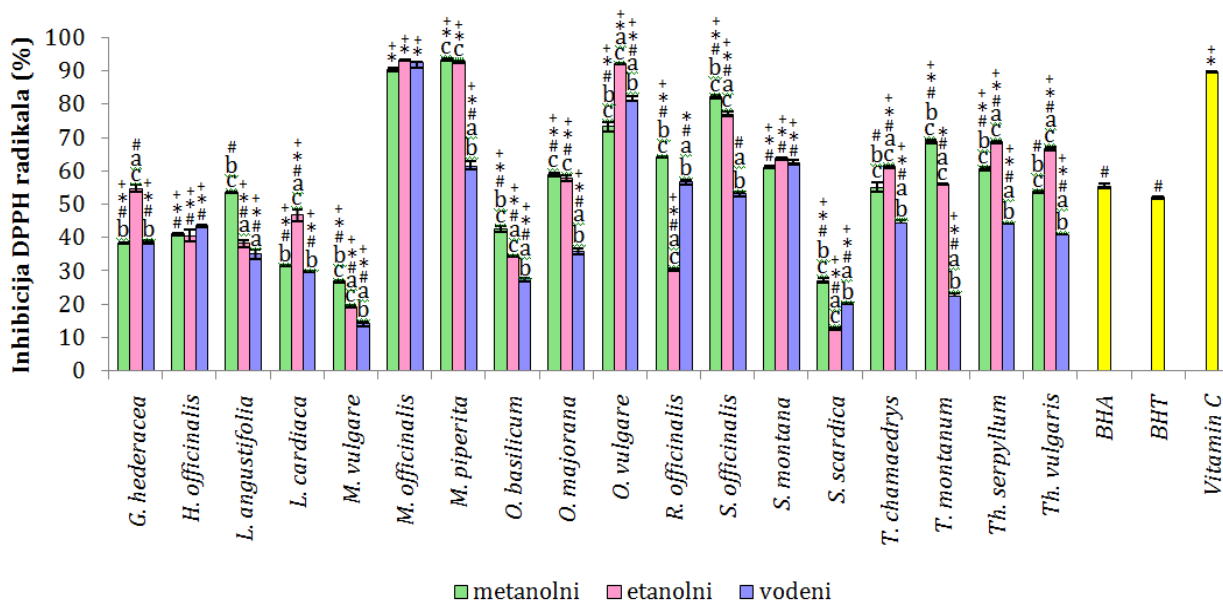
Tokom metabolizma aerobne respiracije, čovek na dnevnom nivou koristi oko 250 g kiseonika, od čega se 2–5% pretvara u reaktivne vrste kiseonika (RVK). U ovu kategoriju spadaju sve RVK koje imaju veći oksidativni potencijal (veću reaktivnost) od molekularnog kiseonika: singlet kiseonik, superoksid anjon, vodonik peroksid i hidroksilni radikal. U biološkim sistemima je neophodno održavanje balansa između količine prooksidanasa i antioksidanasa kako bi se sprečilo oksidativno oštećenje ćelija i tkiva. Sposobnost ćelija da održe homeostazu sprečavanjem akumulacije viška prooksidanasa naziva se redoks homeostaza (Soneja i sar., 2005), koju je nekada potrebno dodatno regulisati primenom egzogenih antioksidativnih agenasa.

U okviru ove doktorske disertacije, za ispitivanje antioksidativne aktivnosti su primenjene tri grupe testova koje detektuju različite mehanizme antioksidativnog delovanja biljnih ekstrakata. U prvu grupu spadaju DPPH i ABTS testovi, kojima se procenjuje sposobnost antioksidanasa da izvrše prenos atoma vodonika ili sposobnost za prenos pojedinačnog elektrona (Erel, 2004; Yeo i Shahidi, 2019). U drugu grupu spada β-karoten/linolna kiselina test ili test izbeljivanja β-karotena. β-karoten predstavlja prirodni antioksidativni pigment koji, između ostalog, ima sposobnost da ublaži posledice oksidativnog stresa na nivou biomolekula i tkiva (Ueno i sar., 2014; Chou i sar., 2019). Treći tip testova su FRAP test i test određivanja URP, kojima se prati redukcija feri (Fe³⁺) u fero (Fe²⁺) kompleksa, pri čemu se antioksidanti koriste kao redukujući agensi (Benzie i Strain, 1996; Jamuna i sar., 2010).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata odabranih predstavnika familije Lamiaceae je ispitivana u tri koncentracije: 100, 250 i 500 µg/mL. Svim testovima je potvrđena zavisnost

ispoljene antioksidativne aktivnosti od primenjene koncentracije uzoraka. Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae su predstavljeni u Prilogima 5 i 6. Budući da je uočeno da testirani ekstrakti pri najvišoj koncentraciji ispoljavaju visok stepen antioksidativnog dejstva u DPPH, ABTS i β -karoten/linolna kiselina testu (>90%), te poređenje na ovoj koncentraciji nije moguće, na Graficima 7-11 su predstavljeni rezultati dobijeni pri koncentraciji od 250 μ g/mL.

Većina ispitivanih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae je pri najvišoj testiranoj koncentraciji pokazala veoma visoku sposobnost hvatanja DPPH radikala (>90%) (Prilog 5), zbog čega pri ovoj koncentraciji ekstrakata nisu uočene razlike u sposobnosti hvatanja DPPH radikala između različitih biljnih vrsta. Pojedini ekstrakti biljnih vrsta poput *M. officinalis*, *M. piperita* i *O. vulgare* inhibirali su >90% DPPH radikala čak i pri srednjoj testiranoj koncentraciji (Grafik 7).



Grafik 7. Inhibicija DPPH radikala ekstraktima predstavnika porodice Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao procenti inhibicije \pm standardna greška, za koncentraciju 250 μ g/mL. BHA, BHT i vitamin C su korišćeni kao pozitivne kontrole.

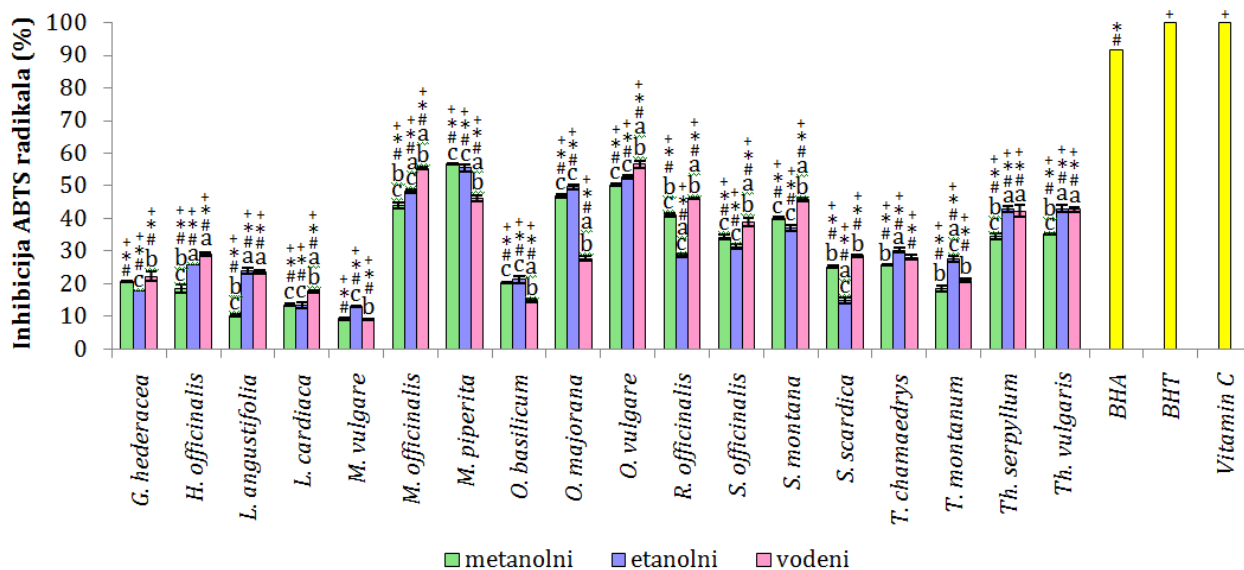
^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, ⁺ vs. BHA, ^{*} vs. BHT, [#] vs. vitamin C ($p < 0,05$)

Na osnovu uočenih razlika u sposobnosti inhibicije DPPH među različitim tipovima ekstrakata za sve ispitivane biljne vrste, jasno je da rastvarač korišćen za ekstrakciju biljnog materijala ima značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Generalno je primećeno da najjaču antioksidativnu aktivnost u DPPH testu imaju alkoholni ekstrakti ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae, dok vodeni ekstrakti ispoljavaju slabiju aktivnost. Izuzetak predstavljaju vodeni ekstrakti *H. officinalis*, *R. officinalis* i *S. scardica*, koji su pokazali višu aktivnost u odnosu na alkoholne ekstrakte, posebno etanolne (Grafik 7).

Ekstrakti *M. officinalis* (metanolni i vodeni ekstrakti), *M. piperita* (metanolni i etanolni ekstrakti), kao i *O. vulgare* (svi ekstrakti) su pri najnižoj testiranoj koncentraciji inhibirali >40% DPPH radikala, što je više nego sintetički antioksidanti, BHA i BHT, koji su korišćeni kao pozitivne kontrole (Prilog 5). Ovi rezultati jasno ukazuju na to da su ekstrakti *M. officinalis*, *M. piperita* i *O. vulgare* najefikasniji antioksidativni agensi u inhibiciji DPPH radikala među ispitivanim ekstraktima. Nakon ovih biljaka, prema jačini antioksidativne aktivnosti (>50% inhibicije DPPH radikala u koncentraciji 250 μ g/mL, odnosno više ili jednako kao sintetički antioksidanti, BHA i BHT) slede *R. officinalis* i *S. officinalis* (posebno metanolni i vodeni

ekstrakt), svi ekstrakti *S. montana*, kao i alkoholni ekstrakti *O. majorana*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*. Sa druge strane, ekstrakti *M. vulgare* i *S. scardica* su najslabije inhibirali DPPH radikale (Grafik 7).

Kao i u prethodnom testu, svi ekstrakti *M. officinalis*, *O. vulgare*, kao i alkoholni ekstrakti *M. piperita* i *O. majorana*, su na najvišoj testiranoj koncentraciji pokazali veoma visoku sposobnost inhibicije ABTS radikala (>90%) (Prilog 5), što je onemogućilo njihovo rangiranje prema jačini. S druge strane, analizom rezultata dobijenih testiranjem ekstrakata koncentracija 100 i 250 µg/mL, mogle su se uočiti razlike u aktivnosti ispitanih biljnih vrsta (Grafik 8).



Grafik 8. Inhibicija ABTS radikala ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao procenti inhibicije \pm standardna greška, za koncentraciju 250 µg/mL. BHA, BHT i vitamin C su korišćeni kao pozitivne kontrole.

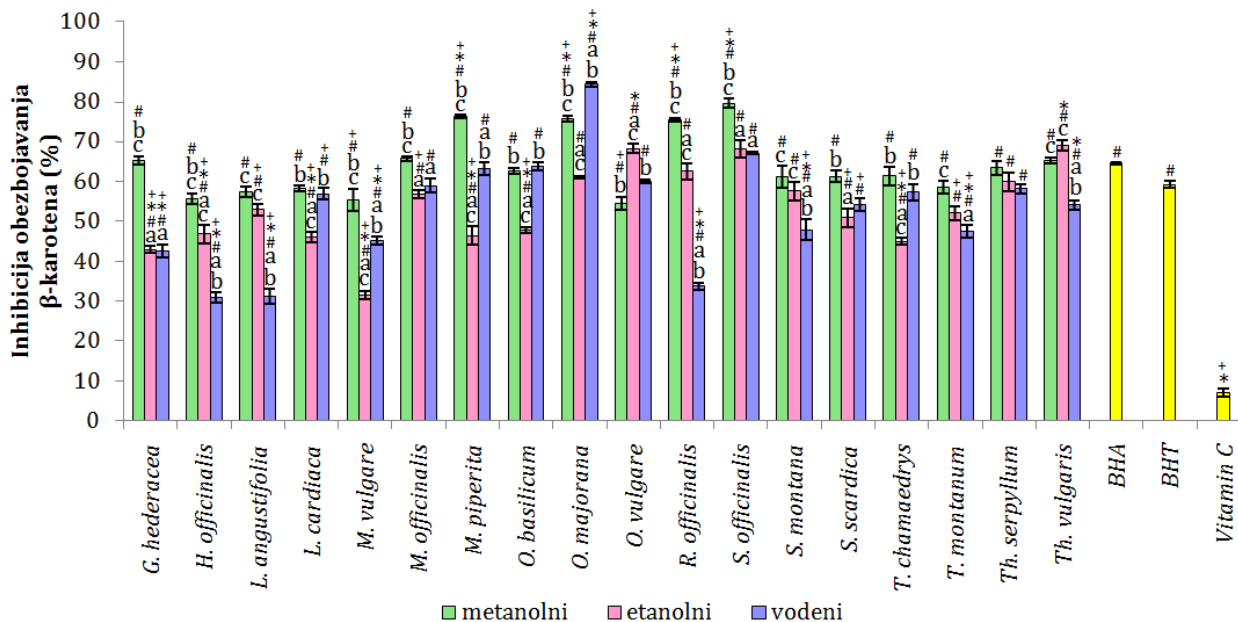
^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, ⁺ vs. BHA, ^{*} vs. BHT, [#] vs. vitamin C ($p < 0,05$)

Rezultati prikazani na Grafiku 8 ukazuju na činjenicu da je efekat antioksidativne aktivnosti ekstrakata zavisio od upotrebljenog rastvarača. Pri koncentraciji 250 µg/mL, svi ekstrakti su ispoljili značajno nižu aktivnost inhibicije ABTS radikala u odnosu na korišćene pozitivne kontrole. Ipak, vodeni ekstrakt *M. officinalis*, alkoholni ekstrakti *M. piperita*, kao i etanolni i vodeni ekstrakti *O. vulgare* inhibirali su >50% ABTS radikala, zbog čega se mogu smatrati jačim antioksidativnim agensima u odnosu na ostale ispitivane biljne ekstrakte. S druge strane, najmanja inhibicija ABTS radikala pronađena je za ekstrakte *M. vulgare*, kao i za metanolni ekstrakt *L. angustifolia*.

Kao i u prethodnim testovima korišćenim za ispitivanje antioksidativne aktivnosti, i u β -karoten/linolna kiselina testu je primećeno da je ova aktivnost u pozitivnoj korelaciji sa koncentracijom ekstrakta (Prilog 5). Ipak, na najvišoj testiranoj koncentraciji, aktivnost pojedinih biljnih ekstrakata premašuje 90% inhibicije obezbojavanja emulzije β -karotena, zbog čega nije bilo moguće jasno razlikovanje antioksidativnog potencijala, te su rezultati na Grafiku 9 prikazani samo za srednju testiranu koncentraciju.

U β -karoten/linolna kiselina testu, rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata. Među ekstraktima ispitivanim ovim testom, najjaču antioksidativnu aktivnost su imali metanolni ekstrakti, dok su svi ispitivani ekstrakti imali značajno višu aktivnost od vitamina C, koji je korišćen kao jedna od tri pozitivne kontrole. S

druge strane, sličan ili značajno viši antioksidativni potencijal u odnosu na druge dve pozitivne kontrole, BHA i BHT, pokazali su metanolni ekstrakti *M. officinalis*, *S. montana*, *S. scardica* i *T. montanum*, metanolni i etanolni ekstrakti *R. officinalis* i *Th. vulgaris*, metanolni i vodeni ekstrakti *M. piperita*, *O. basilicum* i *T. chamaedrys*, etanolni ekstrakt *O. vulgare*, kao i svi ekstrakti *O. majorana*, *S. officinalis* i *Th. serpyllum* (Grafik 9).



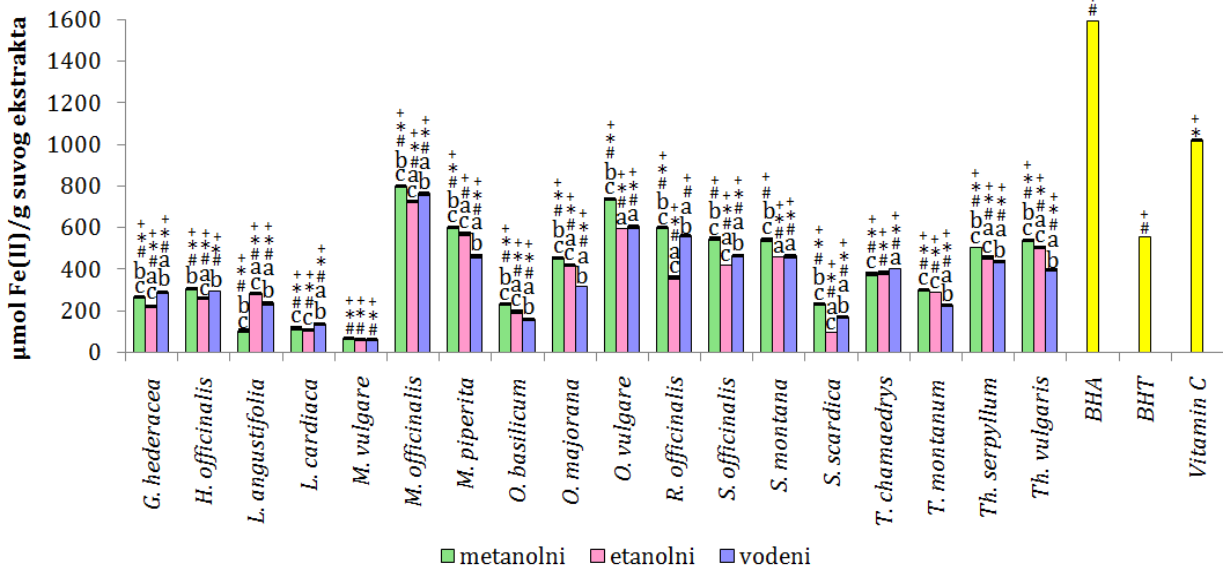
Grafik 9. Inhibicija obezbojavanja β -karotena ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao procenti inhibicije \pm standardna greška, za koncentraciju 250 μ g/mL. BHA, BHT i vitamin C su korišćeni kao pozitivne kontrole.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, ⁺ vs. BHA, ^{*} vs. BHT, [#] vs. vitamin C ($p < 0,05$)

Antioksidativni kapacitet ispitivanih ekstrakta je dodatno procenjen FRAP testom, pri čemu su rezultati pokazali da, kao i u prethodnim testovima, postoji zavisnost jačine antioksidativnog kapaciteta od testirane koncentracije ekstrakata (Prilog 6). Statističkom analizom je pokazano da rastvarač korišćen za ekstrakciju biljnog materijala ima značajan uticaj na njihov ispoljeni antioksidativni kapacitet. Iako nije bilo moguće odrediti koji je rastvarač ispoljio najjaču antioksidativnu aktivnost u ovom testu, pokazano je su metanolni ekstrakti bili aktivniji od etanolnih ekstrakata. S druge strane, u slučaju *G. hederacea*, *L. cardiaca* i *T. chamaedrys*, vodeni ekstrakti su ispoljili jaču aktivnost u odnosu na alkoholne ekstrakate.

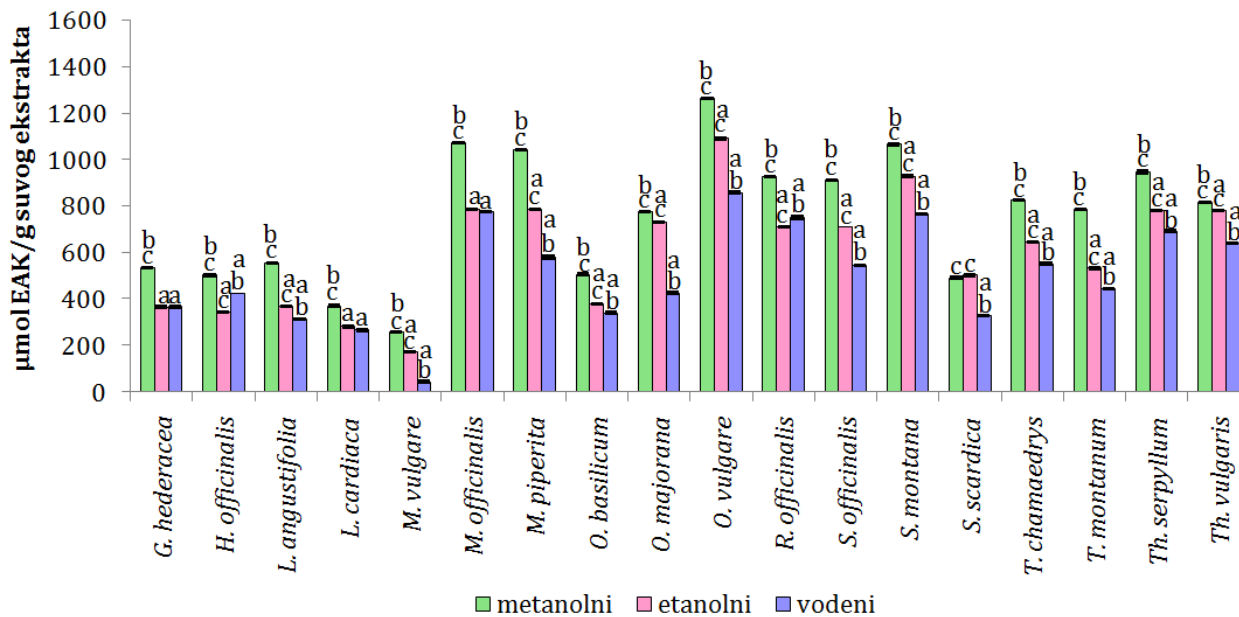
U FRAP testu, pri koncentraciji 250 μ g/mL, najvišu aktivnost su ispoljile pozitivne kontrole BHA i vitamin C, dok su pojedini predstavnici familije Lamiaceae, poput *M. officinalis*, *M. piperita* i *O. vulgare* imali sličan antioksidativni kapacitet kao i BHT. Za razliku od toga, najslabiju aktivnost su imali ekstrakti *M. vulgare* (Grafik 10).



Grafik 10. Ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae meren FRAP testom.

Rezultati su prikazani kao $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ suvog ekstrakta \pm standardna greška, za koncentraciju 250 $\mu\text{g/mL}$. BHA, BHT i vitamin C su korišćeni kao pozitivne kontrole.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, ⁺ vs. BHA, ^{*} vs. BHT, [#] vs. vitamin C ($p < 0,05$)



Grafik 11. Ukupni redukcionni potencijal ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani kao $\mu\text{mol EAK/g}$ suvog ekstrakta \pm standardna greška, za koncentraciju 250 $\mu\text{g/mL}$.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt ($p < 0,05$)

Antioksidativna aktivnost ekstrakata je finalno procenjena na osnovu njihovog URP-a, pri čemu je takođe primećeno da najveća koncentracija ekstrakata ima najviši URP (Prilog 6).

Kao i u slučaju prethodna četiri testa korišćena za određivanje antioksidativne aktivnosti, ukupni URP je generalno zavisio od rastvarača koji korišćen za ekstrakciju biljnog materijala.

U URP testu su se izdvojili metanolni ekstrakti, posebno ekstrakt *O. vulgare*, *M. officinalis*, *M. piperita* i *S. montana*, kao i etanolni ekstrakti *O. vulgare* i *S. montana*, u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. Sa druge strane, generalno najslabiju antioksidativnu aktivnost u ovom testu imali su ekstrakti *M. vulgare* (posebno vodeni ekstrakt) (Grafik 11).

Na osnovu rezultata opisanih spektrofotometrijskih testova može se zaključiti da ekstrakti ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae svoju antioksidativnu aktivnost ostvaruju kombinacijom različitih mehanizama, kao što je „hvatanje“ slobodnih radikala doniranjem vodonikovog atoma ili samo jednog elektrona slobodnim radikalima, pružanjem zaštite drugim antioksidativnim supstancama, kao i formiranjem helatnih kompleksa sa metalima, što odražava njihov URP.

Glechoma hederacea

Ekstrakti *G. hederacea* su pokazali antioksidativni potencijal u svim korišćenim testovima. U DPPH testu, etanolni ekstrakt je imao viši antioksidativni efekat u poređenju sa vodenim i metanolnim ekstraktima, pri čemu je imao slično dejstvo kao i pozitivne kontrole, BHA i BHT, ali značajno slabije od vitamina C (Grafik 7).

U ABTS testu, vodeni i metanolni ekstrakti su ispoljili sličan inhibitorni efekat, dok je etanolni ekstrakt imao značajno slabije dejstvo od vodenog. Svi ekstrakti *G. hederacea* su imali značajno slabiju sposobnost inhibicije ABTS radikala u odnosu na pozitivne kontrole BHA, BHT i vitamin C (Grafik 8).

Za razliku od ABTS testa, metanolni ekstrakt pokazao je 50% jaču aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt. Metanolni ekstrakt je ispoljio jaču aktivnost i u odnosu na vitamin C, dok je njegov nivo inhibicije bio sličan onome koji su ostvarili BHA i BHT pri istoj primenjenoj koncentraciji (Grafik 9).

U trećoj grupi primenjenih testova za određivanje antioksidativne aktivnosti pokazano je da je rastvarač imao značajan uticaj na ispoljenu aktivnost ekstrakata *G. hederacea*. U FRAP testu, najbolju aktivnost je imao vodeni ekstrakt, nakon čega slede metanolni i etanolni ekstrakti. Međutim, ova aktivnost je bila značajno slabija od korišćenih pozitivnih kontrola (Grafik 10).

S druge strane, metanolni ekstrakt *G. hederacea* je imao preko 50% viši ukupni URP u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt (Grafik 11).

Dobijeni rezultati za vodeni ekstrakt *G. hederacea* su u saglasnosti sa istraživanjima Chou i sar. (2012), koji su pokazali da je ovaj ekstrakt najbolju aktivnost ostvario inhibicijom DPPH radikala, zatim Fe^{2+} helatnim potencijalom, dok je inhibicija ABTS radikala bila slabija. Ipak, autori smatraju da je ovaj ekstrakt imao odličnu antioksidativnu aktivnost, zahvaljujući sposobnosti da deluje kao donor elektrona i da prekida lančanu reakciju slobodnih radikala. Takođe, ranije je potvrđena koncentraciona zavisnost ovog ekstrakta u β -karoten/linolna kiselina testu, koja je dovedena u vezu sa hemijskim sastavom ovog ekstrakta (Chou i sar., 2019), što je u skladu sa našim rezultatima.

Hyssopus officinalis

U testovima za određivanje antioksidativnog potencijala, ekstrakti *H. officinalis* su imali sličan efekat kao i ekstrakti *G. hederacea*. U DPPH testu nije pokazan uticaj rastvarača na antioksidativni potencijal ekstrakata *H. officinalis*, međutim primećeno je da je vodeni ekstrakt imao jači efekat u odnosu na metanolni i etanolni ekstrakt. Ipak, ova aktivnost je bila značajno niža od pozitivnih kontrola (Grafik 7).

Slični rezultati su dobijeni i u ABTS testu, gde je pokazano da je, najbolju aktivnost imao vodeni ekstrakt, za kojim slede etanolni i metanolni ekstrakti. Ipak, i u ovom slučaju su svi ekstrakti imali značajno slabiju aktivnost inhibicije ABTS radikala u odnosu na pozitivne kontrole (Grafik 8).

Za razliku od ABTS testa, u β -karoten/linolna kiselina testu je primećeno da je rastvarač imao značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata *H. officinalis*, pri čemu je najbolja aktivnost dobijena metanolnim ekstraktom, dok su etanolni i vodeni ekstrakti pokazali slabiju inhibiciju obezbojavanja β -karotena. Potrebno je naglasiti da su svi ekstrakti ove biljke imaju jaču antioksidativnu aktivnost u ovom testu u odnosu na vitamin C, dok je samo metanolni ekstrakt imao sličnu aktivnost kao BHA i BHT (Grafik 9).

U FRAP i URP testovima, za ekstrakte *H. officinalis* je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj, pri čemu je u ovim testovima primećen isti trend jačine antioksidativne aktivnosti – metanolni i vodeni ekstrakti su imali jaču aktivnost od etanolnog ekstrakta, a značajno slabiju aktivnost u odnosu na pozitivne kontrole. U FRAP testu, metanolni ekstrakt je ispoljio sličnu aktivnost kao i vodeni ekstrakt, dok je etanolni ekstrakt imao značajno slabije dejstvo (Grafik 10). Pri srednjoj testiranoj koncentraciji, metanolni ekstrakt ove biljke je imao viši URP u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt (Grafik 11).

Babich i sar. (2021) su pokazali da antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata *H. officinalis* zavisi od podloge na kojoj biljka raste, kao i da je antioksidativna aktivnost ovih ekstrakata merena DPPH testom snažno korelisana sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja i flavona u njima. Mićović i sar. (2021) su pokazali da DPPH aktivnost metanolnog ekstrakta ove biljke u zavisi od lokaliteta na kom je biljka gajena u Srbiji i Crnoj Gori. Pored toga, njihovi rezultati dobijeni za DPPH test su u korelaciji sa rezultatima FRAP testa. Ipak, autori su dobili znatno više vrednosti u FRAP testu od vrednosti prikazanih u ovoj doktorskoj disertaciji.

Lavandula angustifolia

U DPPH testu, metanolni ekstrakt *L. angustifolia* je imao višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt. Ispoljena aktivnost metanolnog ekstrakta je bila slična aktivnosti BHA i BHT, ali ipak značajno niža od aktivnosti vitamina C (Grafik 7).

Za razliku od DPPH testa, u ABTS testu inhibitorni potencijal metanolnog ekstrakta *L. angustifolia* bio je dva puta slabiji u poređenju sa etanolnim i vodenim ekstraktom. Pored toga, antioksidativna aktivnost sva tri ekstrakta je bila slabija od aktivnosti BHA, BHT i vitamina C (Grafik 8).

Rezultati ABTS testa su se razlikovali od rezultata β -karoten/linolna kiselina testa, gde su metanolni i etanolni ekstrakti ispoljili značajno viši potencijal za inhibiciju u odnosu na vodeni ekstrakt. Pored toga, metanolni ekstrakt je dostigao sličnu aktivnost kao i BHA i BHT, etanolni ekstrakt sličnu aktivnost kao i BHT, a sva tri ekstrakta *L. angustifolia* su imala značajno viši efekat u odnosu na vitamin C (Grafik 9).

U FRAP i URP testovima je pokazano da je rastvarač imao značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *L. angustifolia*, pri čemu su svi ekstrakti ove biljke imali značajno slabiju aktivnost u odnosu na pozitivne kontrole. U FRAP testu, najjaču aktivnost je imao etanolni ekstrakt, nakon čega slede vodeni i metanolni ekstrakti (Grafik 10). S druge strane, metanolni ekstrakt je imao jači URP u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt (Grafik 11).

Ferreira i sar. (2006) su pokazali da dekokt *L. angustifolia* ima višu antioksidativnu aktivnost od etanolnog ekstrakta, što nije u potpunosti u skladu sa našim rezultatima. U njihovoj studiji, etanolni ekstrakt koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$ je inhibirao 23% DPPH radikala;

dekoka *L. angustifolia* je ispoljio svega 10% inhibicije u β -karoten-linolna kiselina testu, a inhibirao je 94% DPPH radikala. Budući da su ekstrakti *L. angustifolia* imali visok sadržaj triterpena, može se pretpostaviti da je sastav ovih jedinjenja zaslužan za pokazanu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *L. angustifolia*, budući da je ranije pokazano da je antioksidativni kapacitet ekstrakata u korelaciji sa prisustvom terpena, za koje je dokazano da imaju antioksidativni potencijal (Mocan i sar., 2020). Duda i sar. (2015) su ispitujući *L. angustifolia* i *M. officinalis* pokazali da sezona, kao i doba dana branja biljnog materijala, dužina vremenskog perioda čuvanja skladištenih biljaka ili ekstrakata, geoklimatski i ekološki faktori, kao i primenjena metoda ekstrakcije, rastvarač, antioksidativna metoda i pozitivne kontrole u odnosu na koje se radi poređenje imaju značajan uticaj na dobijenu količinu bioaktivnih jedinjenja u ekstraktu, kao i na njihov antioksidativni efekat.

Leonurus cardiaca

U poređenju sa ostalim ispitivanim ekstraktima u ovom radu, ekstrakti *L. cardiaca* nisu pokazali značajan antioksidativni potencijal. U DPPH testu, etanolni ekstrakt je imao jaču aktivnost od metanolnog i vodenog ekstrakta, ali generalno su svi ekstrakti *L. cardiaca* imali značajno slabije antioksidativno dejstvo u poređenju sa pozitivnim kontrolama (Grafik 7).

Za razliku od DPPH testa, vodeni ekstrakt *L. cardiaca* je postigao višu inhibiciju ABTS radikala u odnosu na metanolni i etanolni ekstrakt. Ipak, i u ovom testu su svi ekstrakti ispoljili značajno nižu antioksidativnu aktivnost od BHA, BHT i vitamina C (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu, ekstrakti *L. cardiaca* su imali efikasnije antioksidativno dejstvo u odnosu na prethodna dva testa. Metanolni i vodeni ekstrakti ove biljke su ispoljili sličan efekat, dok je za etanolni ekstrakt zabeležena nešto niža antioksidativna aktivnost. Metanolni ekstrakt je postigao jednako efikasnu inhibiciju kao i BHA i BHT, dok je aktivnost vodenog ekstrakta bila slična samo aktivnosti BHT. Svi ekstrakti *L. cardiaca* su ispoljili značajno višu antioksidativnu aktivnost u β -karotenu u odnosu na vitamin C (Grafik 9).

Najbolju aktivnost među ekstraktima *L. cardiaca*, u FRAP testu je imao vodeni ekstrakt, dok je najbolji URP ispoljio metanolni ekstrakt (Grafik 11). Ispitivani ekstrakti *L. cardiaca* su imali značajno slabije dejstvo u FRAP testu u odnosu na korišćene pozitivne kontrole.

Antioksidativna aktivnost ekstrakta *L. cardiaca* je generalno do sada bila slabije istraživana. Wong i sar. (2014) su dobili 10 puta slabiji efekat inhibicije DPPH radikala vodenim ekstraktom *L. cardiaca* u odnosu na rezultat dobijen u okviru ove doktorske disertacije. S druge strane, Angeloni i sar. (2021) su dobili relativno slabu antioksidativnu aktivnost etanolnih ekstrakata *L. cardiaca*. Autori su ipak zaključili da je primena ove biljke u tradicionalnoj medicini opravdana jer su, pored antioksidativne, pokazali i značajnu inhibitornu aktivnost ekstrakata *L. cardiaca* na enzime koji se smatraju odgovornim za razvoj pojedinih neurodegenerativnih oboljenja i dijabetesa.

Marrubium vulgare

Ekstrakti *M. vulgare* ispitivani u ovom radu su imali najslabiji antioksidativni potencijal u poređenju sa ostalim ispitivanim pripadnicima familije Lamiaceae. U DPPH testu je primećeno da rastvarač ima značajan uticaj na antioksidativnu aktivnost ekstrakata *M. vulgare*. Najjaču aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt, nakon čega slede etanolni i vodeni ekstrakti. Ipak, svi testirani ekstrakti ove biljke su imali značajno slabiju aktivnost u inhibiciji DPPH radikala u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 7).

Za razliku od DPPH testa, etanolni ekstrakt je ispoljio bolje dejstvo u inhibiciji ABTS radikala u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt, mada su svi ekstrakti *M. vulgare* imali značajno slabije dejstvo u odnosu na pozitivne kontrole (Grafik 8).

Najjači antioksidativni potencijal, ekstrakti *M. vulgare* su ispoljili u β -karoten/linolna kiselina testu, pri čemu je metanolni ekstrakt pokazao najjaču inhibiciju. Ipak, svi ekstrakti *M. vulgare* su imali značajno slabiju aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu od sintetičkih antioksidanasa, ali jaču aktivnost od vitamina C (Grafik 9).

U FRAP testu, ekstrakti *M. vulgare* su ispoljili veoma nizak antioksidativni kapacitet, pri čemu se aktivnost ekstrakata nije značajno međusobno razlikovala, međutim bila je značajno niža od aktivnosti pozitivnih kontrola (Grafik 10).

U URP testu se izdvojio metanolni ekstrakt, koji je imao viši URP od etanolnog ekstrakta. U poređenju sa vodenim, etanolni ekstrakt je imao gotovo četiri puta viši URP, što ponovo ukazuje na značajan uticaj rastvarača u ovom testu (Grafik 11).

U poređenju sa našim rezultatima, inhibicija DPPH radikala etanolnim ekstraktom *M. vulgare* poreklom iz Alžira Hellal i sar. (2020) je bila 5,5 puta viša na koncentraciji koja je bila 10 puta niža. Al-Zaban i sar. (2021) su, sa druge strane, pokazali da metanolni ekstrakt *M. vulgare* poreklom iz Saudijske Arabije ima visok antioksidativni potencijal čak i na 10 puta nižim koncentracijama od onih testiranih u okviru ove doktorske disertacije.

Melissa officinalis

Ekstrakti *M. officinalis* su među najaktivnijim ekstraktima biljkama porodice Lamiaceae u testovima za određivanje antioksidativne aktivnosti. U DPPH testu, ekstrakti *M. officinalis* su imali veoma visoku antioksidativnu aktivnost, inhibirajući >90% DPPH radikala, što je slično aktivnosti vitamina C, a značajno više od BHA i BHT (Grafik 7).

Iako su u ABTS testu ovi ekstrakti imali značajno nižu aktivnost od pozitivnih kontrola, ipak su bili među najaktivnijim ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae. U ovom testu je primećeno da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *M. officinalis*, pri čemu je u koncentraciji ekstrakata od 250 $\mu\text{g/mL}$, među ekstraktima ove biljke najaktivniji bio vodeni ekstrakt, inhibirajući 55,35% ABTS radikala, a najmanje aktivan je bio metanolni ekstrakt (Grafik 8).

Ekstrakti ove biljke su takođe ispoljili veoma visoku inhibitornu aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu. Metanolni ekstrakt *M. officinalis* je ispoljio sličnu aktivnost kao i vodeni ekstrakt u β -karoten/linolna kiselina testu, dok je etanolni ekstrakt pokazao slabiju aktivnost od metanolnog ekstrakta. Pored toga, metanolni i vodeni ekstrakti *M. officinalis* su ispoljili sličnu aktivnost kao i BHA i BHT, a svi ekstrakti ove biljke su imali značajno višu aktivnost od vitamina C (Grafik 9).

Ekstrakti *M. officinalis* su ispoljili veoma visoku aktivnost u FRAP i URP testovima, pri čemu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na aktivnost ekstrakta. U FRAP testu, ekstrakti *M. officinalis* su imali najviši ukupni antioksidativni kapacitet u odnosu na ekstrakte ostalih biljaka porodice Lamiaceae. Među ekstraktima *M. officinalis*, najbolju aktivnost je ispoljio metanolni ekstrakt (800,33 $\mu\text{mol Fe(II)/g}$), nakon čega slede vodeni i etanolni ekstrakti. U ovom testu, svi ekstrakti ove biljke su imali značajno višu aktivnost od BHT, a značajno nižu od BHA i vitamina C (Grafik 10).

Metanolni ekstrakt *M. officinalis* je takođe ispoljio značajno viši URP (1070,88 $\mu\text{mol EAK/g}$) od etanolnog i vodenog ekstrakta ove biljke (Grafik 11).

Ferreira i sar. (2006) su pokazali da etanolni ekstrakt *M. officinalis* ima slabiju antioksidativnu aktivnost od dekokta, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji za etanolni i vodeni ekstrakt biljke poreklom iz Srbije. U studiji Kwon i sar. (2006) je pokazano da vodeni ekstrakt *M. officinalis* pokazuje značajno jaču inhibiciju DPPH radikala od vodenog-etanolnog ekstrakta (12% etanol), a u β -karoten/linolna kiselina testu su ova dva ekstrakta imala sličan efekat. Skotti i sar. (2014) su, s druge strane, pokazali da je među vodenim ekstraktima različitih biljaka porodice Lamiaceae (*H. officinalis*, *M. officinalis*, *Origanum dictamnus*, *O. vulgare* i *S. officinalis*), ekstrakt *M. officinalis* imao najvišu antioksidativnu aktivnost u DPPH i ABTS testovima, što se poklapa sa rezultatima dobijenim u našem radu.

Mentha × piperita

Antioksidativna aktivnost ispitivanih ekstrakata *M. piperita* je bila veoma visoka. U DPPH testu, alkoholni ekstrakti *M. piperita* koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su imali sličnu aktivnost kao vitamin C (>90%), značajno jaču od pozitivnih kontrola BHA i BHT, a 50% jaču aktivnost od vodenog ekstrakta (Grafik 7).

Oba alkoholna ekstrakta *M. piperita* su i u ABTS testu ispoljila jaču aktivnost od vodenog ekstrakta, međutim svi ekstrakti su značajno slabije inhibirali ABTS radikale od pozitivnih kontrola BHA, BHT i vitamina C (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu je, sa druge strane, pokazano da je rastvarač imao značajan uticaj u ispoljenoj aktivnosti ekstrakata, pri čemu je metanolni ekstrakt *M. piperita* ispoljio najvišu aktivnost (76,17%), nakon čega slede vodeni i etanolni ekstrakti. Svi ekstrakti *M. piperita* su dodatno ispoljili značajno jaču aktivnost od vitamina C, dok je metanolni ekstrakt imao značajno jaču aktivnost i od BHA i BHT. Sa druge strane, vodeni ekstrakt ove biljke je imao sličnu aktivnost kao BHA i BHT (Grafik 9).

Rastvarač je takođe imao značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata u FRAP i URP testovima. Metanolni ekstrakt *M. piperita* je imao značajno jači ukupni antioksidativni kapacitet u FRAP testu od etanolnog i vodenog ekstrakta, a takođe i značajno višu aktivnost od BHT. Etanolni ekstrakt je, s druge strane, imao sličnu aktivnost kao BHT, dok je vodeni ekstrakt imao značajno slabiju aktivnost od BHT. Takođe, svi ekstrakti su imali značajno slabiju aktivnost u FRAP testu od BHA i vitamina C (Grafik 10).

Metanolni ekstrakt *M. piperita* je ispoljio viši URP od etanolnog i vodenog ekstrakta (Grafik 11).

Literaturni podaci potvrđuju rezultate ove doktorske disertacije koji sugerišu da ekstrakti *M. piperita* imaju visok antioksidativni potencijal. Molan i Mahdy (2016) su pokazali visoku aktivnost vodenog ekstrakta *M. piperita* u FRAP i ORAC testovima, pri čemu je dobijena antioksidativna aktivnost imala visoku korelaciju sa ukupnim sadržajem fenolnih jedinjenja. U studiji Farnad i sar. (2014) je, međutim, pokazano da je etanolni ekstrakt *M. piperita*, u odnosu na metanolni, ima jaču inhibitornu aktivnost prema DPPH radikalima, što nije bio slučaj sa ekstraktima ispitanim u našem radu. Istraživanja su takođe pokazala da je visok sadržaj polifenolnih jedinjenja u korelaciji sa visokim antioksidativnim potencijalom (Pavlič i sar., 2021), što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Ocimum basilicum

Za razliku od ekstrakata *M. piperita*, ekstrakti *O. basilicum* su imali slabiji antioksidativni potencijal. Takođe, pokazano je da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost testiranog ekstrakata *O. basilicum*. U DPPH testu, metanolni

ekstrakt *O. basilicum* je imao značajno jači inhibitorni efekat od etanolnog i vodenog ekstrakta, mada su svi ekstrakti značajno slabije inhibirali DPPH radikale od pozitivnih kontrola (Grafik 7).

Etanolni i metanolni ekstrakti *O. basilicum* su ispoljili sličan potencijal u inhibiciji ABTS radikala, koji je bio nešto jači u odnosu na vodeni ekstrakt. Ipak, svi ekstrakti ove biljke su ispoljili značajno slabiji antioksidativni potencijal u ABTS testu od pozitivnih kontrola (Grafik 8).

Za razliku od prve grupe testova, u β -karoten/linolna kiselina testu, vodeni i metanolni ekstrakti *O. basilicum* su imali sličnu aktivnost, dok je etanolni imao nešto slabije antioksidativno dejstvo. U ovom testu, svi ekstrakti *O. basilicum* su ispoljili značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na vitamin C, međutim samo vodeni i metanolni ekstrakt su imali sličan efekat kao BHA i BHT (Grafik 9).

U trećoj grupi testova je rastvarač imao značajan uticaj na antioksidativni efekat ekstrakata *O. basilicum*, pri čemu je metanolni ekstrakt imao najvišu aktivnost, nakon čega slede etanolni i vodeni ekstrakti. U FRAP testu, ekstrakti *O. basilicum* su ipak ispoljili značajno slabiji efekat od pozitivnih kontrola (Grafici 10 i 11).

Pretragom literature je ustanovljeno da je antioksidativna aktivnost ekstrakata, ali i etarskog ulja *O. basilicum* često bila predmet istraživanja. Cazzola i sar. (2011) su pokazali su da je vodeni ekstrakt *O. basilicum* poreklom iz Italije imao jači inhibitorni efekat prema DPPH radikalima od metanolnog ekstrakta, što nije u saglasnosti sa rezultatima ove doktorske disertacije, međutim, u studiji Cazzola i sar. (2011) je vodeni ekstrakt imao viši sadržaj fenolnih jedinjenja od metanolnog, što objašnjava jaču aktivnost vodenog ekstrakta. Coelho i sar. (2018) su pokazali da iako metanolni ekstrakt *O. basilicum* niži sadržaj ukupnih fenola i flavonoida od etanolnog, metanolni ekstrakt ima bolju antioksidativnu aktivnost, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Slično, Vlase i sar. (2014) su pokazali da etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* najbolje inhibira DPPH radikale, dok *H. officinalis* i *O. basilicum* imaju sličnu jačinu inhibicije DPPH radikala.

Origanum majorana

O. majorana je poznat po svom antioksidativnom dejstvu, što je potvrđeno i u našem istraživanju. U DPPH testu, metanolni i etanolni ekstrakti ove biljne vrste su ispoljili viši antioksidativni potencijal od vodenog ekstrakta, a njihov efekat je takođe bio značajno viši i od BHA i BHT. Ipak, ovi alkoholni ekstrakti su ispoljili slabiju aktivnost prema DPPH radikalima od vitamina C (Grafik 7).

Sličan trend antioksidativnog dejstva je dobijen i u ABTS testu, pri čemu su etanolni i metanolni ekstrakti *O. majorana* imali značajno višu aktivnost od vodenog ekstrakta, mada nijedan od ovih ekstrakata nije imao višu aktivnost od korišćenih pozitivnih kontrola (Grafik 8).

Ekstrakti *O. majorana*, posebno vodeni ekstrakt, su ispoljili najvišu aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu u odnosu na ekstrakte ostalih ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae, kao i značajno višu inhibiciju u odnosu na pozitivne kontrole. Vodeni ekstrakt je imao višu aktivnost od metanolnog, dok je etanolni ekstrakt imao najslabiju aktivnost (Grafik 9).

U trećoj grupi testova je primećeno da antioksidativna aktivnost ekstrakata *O. majorana* značajno zavisi od korišćenog rastvarača. Među ekstraktima *O. majorana*, metanolni ekstrakt je ispoljio značajno najviši ukupni antioksidativni kapacitet u FRAP i URP testovima,

nakon čega slede etanolni i vodeni ekstrakt. Ipak, u odnosu na korišćene pozitivne kontrole, ovi ekstrakti su u FRAP testu ispoljili značajno nižu antioksidativnu aktivnost (Grafici 10 i 11).

Ranije je pokazano da ekstrakti, kao i etarsko ulje *O. majorana* imaju visok antioksidativni potencijal (Roby i sar., 2013; García-Risco i sar., 2017). Rezultati ove doktorske disertacije nisu u skladu sa rezultatima Duletić-Laušević i sar. (2018a), gde je pokazano da je vodeni ekstrakt *O. majorana* poreklom iz Srbije imao jaču antioksidativnu aktivnost u DPPH, ABTS i FRAP testovima u odnosu na etanolni ekstrakt ove biljke, međutim u skladu su sa rezultatima β -karoten/linolna kiselina testa koji su autori sprovedi. Razlog nepodudaranja rezultata može biti taj što biljni materijal nije ubran u istoj fenofazi, što se ranije pokazalo kao veoma važan faktor prilikom tumačenja i poređenja rezultata (Duda i sar., 2015; Jovanović i sar., 2017).

Origanum vulgare

Ekstrakti *O. vulgare* ispitivani u ovoj disertaciji su imali viši antioksidativni potencijal u odnosu na ekstrakte *O. majorana*. U DPPH testu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na jačinu inhibicije DPPH radikala ekstraktima *O. vulgare*. Najbolju aktivnost je ispoljio etanolni ekstrakt, nakon čega slede vodeni i metanolni ekstrakt. Svi ekstrakti su pokazali viši procenat inhibicije DPPH radikala od BHA i BHT, dok je samo etanolni ekstrakt imao sličnu DPPH inhibitornu aktivnost kao i vitamin C (Grafik 7).

Za razliku od DPPH testa, vodeni ekstrakt je ostvario značajno jaču inhibiciju ABTS radikala od etanolnog i metanolnog ekstrakta. Međutim, ipak su svi ekstrakti *O. vulgare* pokazali značajno niži procenat inhibicije DPPH radikala od korišćenih pozitivnih kontrola (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu pronađen je sličan trend aktivnosti ekstrakata kao i u DPPH testu, gde je najjaču aktivnost ispoljio etanolni ekstrakt, nakon čega slede vodeni i metanolni. Pored toga, primećeno je da jačina aktivnosti ekstrakata *O. vulgare* u β -karoten/linolna kiselina testu značajno zavisi od korišćenog rastvarača. Etanolni ekstrakt je ostvario značajno višu inhibiciju obezbojavanja β -karotena od pozitivnih kontrola. Pri istoj koncentraciji, vodeni ekstrakt je imao značajno jači efekat od vitamina C, ali sličnu aktivnost kao BHA i BHT. S druge strane, metanolni ekstrakt je imao značajno jači efekat od vitamina C, sličnu aktivnost kao i BHT, a značajno slabiju aktivnost od BHA (Grafik 9).

U FRAP testu, metanolni ekstrakt ove biljke je ispoljio nešto jaču inhibiciju u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt. U ovom testu, svi ekstrakti *O. vulgare* su imali značajno jaču aktivnost od BHT, međutim značajno slabiju aktivnost od BHA i vitamina C (Grafik 10).

U URP testu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljeni redukcionni potencijal ekstrakata *O. vulgare*. U odnosu na sve ostale testirane predstavnike familije Lamiaceae, u URP testu je metanolni ekstrakt *O. vulgare* ispoljio najviši antioksidativni potencijal. Pored toga, ovaj ekstrakt je ispoljio nešto viši URP od etanolnog ekstrakta, i približno 50% više od vodenog ekstrakta (Grafik 11).

Ranije je ustanovljeno da *O. vulgare* ima visok antioksidativni potencijal na koji pre svega, utiču fenolna jedinjenja, posebno flavonoidi (Sharifi-Rad i sar., 2020; Parra i sar., 2021). Prethodnu činjenicu potvrđuje i studija Moghrovyan i sar. (2019), u kojoj je pokazano da etanolni ekstrakt *O. vulgare* ima sličnu antioksidativnu aktivnost u DPPH testu kao i katehin. U studiji Martins i sar. (2014) je pokazano da je dekokt *O. vulgare* imao jaču antioksidativnu aktivnost u DPPH, β -karoten/linolna kiselina i URP testovima u odnosu na infuziju i etanolni ekstrakt ove biljke, što je delimično u saglasnosti sa rezultatima naše studije. Kao i rezultati Spiridon i sar. (2011), gde nije postojala značajna razlika između jačine inhibicije DPPH

radikala ekstraktima *O. vulgare* i *M. officinalis*, međutim ekstrakti *L. angustifolia* su u njihovoj studiji pokazali značajno slabiju antioksidativnu aktivnost.

Rosmarinus officinalis

Ekstrakti *R. officinalis* su imali sličan nivo antioksidativne aktivnosti kao i ekstrakti *S. officinalis*. Naime, u prvoj grupi testova je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu jačinu inhibicije DPPH radikala. Među ekstraktima *R. officinalis*, najjaču aktivnost u DPPH testu je ispoljio metanolni nakon čega sledi vodeni, dok je etanolni imao više od dva puta slabiju aktivnost od metanolnog ekstrakta. U ovom testu, svi ekstrakti su ispoljili značajno nižu inhibitornu aktivnost od vitamina C, a etanolni ekstrakt je ispoljio značajno nižu aktivnost od BHA i BHT. S druge strane, metanolni ekstrakt *R. officinalis* je ispoljio značajno više inhibiciju DPPH radikala od BHA i BHT, dok je vodeni ekstrakt ispoljio značajno više inhibiciju od BHT, a sličnu kao i BHA (Grafik 7).

U ABTS testu je pronađena donekle drugačija situacija među ekstraktima *R. officinalis*, budući da je najviša aktivnost postignuta vodenim ekstraktom ove biljke, nakon čega slede metanolni i etanolni ekstrakt. U ovom testu, svi ekstrakti su imali značajno nižu aktivnost u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu je takođe pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na jačinu ispoljene antioksidativne aktivnosti ekstrakata *R. officinalis*. Najjača aktivnost je postignuta metanolnim ekstraktom, dok je vodeni ekstrakt bio preko dva puta slabiji od metanolnog ekstrakta. Svi ekstrakti su ispoljili značajno više antioksidativnu aktivnost u odnosu na vitamin C. Metanolni ekstrakt je imao značajno više aktivnost i u odnosu na BHA i BHT, dok je etanolni ekstrakt ispoljio sličnu aktivnost kao BHA i BHT (Grafik 9).

U FRAP testu, metanolni ekstrakt je ispoljio značajno više aktivnost u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt. S druge strane, etanolni i vodeni ekstrakti su imali značajno niži efekat testu od korišćenih pozitivnih kontrola. Metanolni ekstrakt je imao sličnu aktivnost kao i BHT, mada značajno nižu od BHA i vitamina C (Grafik 10).

Metanolni ekstrakt *R. officinalis* je takođe imao značajno viši URP u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt, a vodeni ekstrakt značajno viši potencijal od etanolnog ekstrakta (Grafik 11).

Za razliku od rezultata ove doktorske disertacije, Cazzola i sar. (2011) su pokazali da metanolni i vodeni ekstrakti *R. officinalis* imaju sličnu jačinu inhibicije DPPH radikala. Autori su takođe pokazali da su ekstrakti *S. officinalis* imali jaču antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte *R. officinalis*, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije, kao i sa studijom Kwon i sar. (2006). Slično, metanolni ekstrakt *R. officinalis* je imao više antioksidativnu aktivnost u DPPH, β -karoten/linolna kiselina i FRAP testovima u odnosu na ekstrakt *O. basilicum* (Elansary i sar., 2020a). Autori su dodatno testirali pojedina jedinjenja koja su nađena u ovim ekstraktima i rezultati ukazuju na to da rozmarinska kiselina ima slično antioksidativno dejstvo kao i metanolni ekstrakt *R. officinalis*, zbog čega se može pretpostaviti da ova fenolna kiselina ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost. Ipak, pored rozmarinske kiseline, poznato je da na antioksidativnu aktivnost *R. officinalis* takođe značajno utiču i karnozol, karnozinska, oleanolna, kao i ursolna kiselina (Andrade i sar., 2018).

Salvia officinalis

U DPPH testu je pokazano da rastvarač korišćen za ekstrakciju ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *S. officinalis*. Metanolni ekstrakt je ispoljio značajno više antioksidativnu aktivnost od etanolnog i vodenog ekstrakta. Pored toga,

alkoholni ekstrakti su pokazali značajno višu inhibiciju DPPH radikala od BHA i BHT, dok je vodeni ekstrakt imao sličnu aktivnost kao i pomenute pozitivne kontrole. Ipak, svi ekstrakti *S. officinalis* su imali značajno slabiju DPPH inhibitornu aktivnost od vitamina C (Grafik 7).

U ABTS testu, sa druge strane, vodeni ekstrakt *S. officinalis* je imao višu inhibitornu aktivnost od metanolnog i etanolnog ekstrakata, dok su alkoholni ekstrakti imali sličnu aktivnost. Svi testirani ekstrakti su imali značajno nižu inhibitornu aktivnost ABTS radikala u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 8).

Među ekstraktima *S. officinalis* ispitivanim β -karoten/linolna kiselina testom, metanolni ekstrakt je ispoljio najvišu antioksidativnu aktivnost (79,51%), nakon čega slede etanolni i vodeni ekstrakt. Svi ekstrakti ove biljne vrste su ispoljili značajno višu antioksidativnu aktivnost u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 9).

U trećoj grupi testova primenjenih za određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata je utvrđeno da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu aktivnost ekstrakata *S. officinalis*. U FRAP testu, među ekstraktima *S. officinalis* najbolju aktivnost je imao metanolni ekstrakt, nakon čega sledi vodeni, dok je etanolni ekstrakt imao najslabiju aktivnost. Svi ekstrakti su pokazali značajno niži ukupni antioksidativni kapacitet od pozitivnih kontrola, dok je samo metanolni ekstrakt imao sličan efekat kao BHT (Grafik 10).

Među ispitivanim ekstraktima *S. officinalis*, metanolni ekstrakt je imao najvišu aktivnost u URP testu u poređenju sa etanolnim, a posebno vodenim ekstraktom (Grafik 11).

Ferreira i sar. (2006) su pokazali da je dekokt *S. officinalis* koncentracije poreklom iz Portugala bio aktivniji od etanolnog ekstrakta u DPPH testu i takođe je bio veoma aktivan u β -karoten/linolna kiselina testu. Ovi rezultati nisu u skladu sa našim rezultatima, budući da su etanolni ekstrakti biljke ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji imali jaču antioksidativnu aktivnost od vodenog ekstrakta. Cazzola i sar. (2011) su pokazali da je metanolni ekstrakt *S. officinalis* poreklom iz Italije jače inhibirao DPPH radikale od vodenog ekstrakta. Slične rezultate su dobili Pereira i sar. (2018) i Mocan i sar. (2020), koji su takođe pokazali da ekstrakti *S. officinalis* koriste različite mehanizme za ispoljavanje antioksidativne aktivnosti kao što su neutralisanje slobodnih radikala, formiranje helatnih kompleksa sa metalima i posedovanje visokog URP-a.

Satureja montana

Svi ekstrakti *S. montana* su imali sličan nivo antioksidativne aktivnosti u DPPH testu, dakle nije primećen uticaj rastvarača na ispoljenu jačinu inhibicije DPPH radikala. Što se tiče pozitivnih kontrola, ekstrakti su postigli značajno višu inhibiciju DPPH radikala u odnosu na BHA i BHT, ali značajno nižu inhibiciju u odnosu na vitamin C (Grafik 7).

Za razliku od DPPH testa, u ABTS testu je vodeni ekstrakt *S. montana* u poređenju sa alkoholnim ekstraktima, značajno više inhibirao ABTS radikale, dok su alkoholni ekstrakti pokazali sličnu jačinu inhibiciju. Ekstrakti *S. montana* su ostvarili značajno nižu inhibiciju ABTS radikala u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 8).

Alkoholni ekstrakti *S. montana* su i u β -karoten/linolna kiselina testu pokazali sličnu jačinu inhibicije obezbojavanja β -karotena, pri čemu je vodeni ekstrakt imao nešto slabiju antioksidativnu aktivnost od alkoholnih ekstrakata. Svi testirani ekstrakti *S. montana* su ispoljili značajno višu inhibiciju obezbojavanja β -karotena u odnosu na vitamin C, ali je vodeni ekstrakt pokazao značajno nižu inhibiciju u poređenju sa sintetičkim antioksidantima, BHA i BHT (Grafik 9).

U trećoj grupi testova metanolni ekstrakt *S. montana* je bio značajno aktivniji od druga dva ekstrakta. U FRAP testu, nije pronađena razlika u ukupnom antioksidativnom kapacitetu vodenog i etanolnog ekstrakta *S. montana*. Metanolni ekstrakt *S. montana* je ispoljio sličan efekat kao i BHT, dok je jačina njegovog ukupnog antioksidativnog kapaciteta niža od BHA i vitamina C. Sa druge strane, jačina antioksidativnog kapaciteta vodenog i etanolnog ekstrakta je značajno niža od jačine antioksidativnog kapaciteta svih pozitivnih kontrola (Grafik 10).

Za razliku od FRAP testa, u URP testu je jasno uočen različiti efekat testiranih ekstrakata *S. montana*, što podrazumeva značajan uticaj rastvarača. Metanolni ekstrakt *S. montana* je imao viši URP u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt. Među ispitivanim predstavnicima familije Lamiaceae, metanolni ekstrakt *S. montana* je bio treći u testu za određivanje URP-a, odmah nakon *O. vulgare* i metanolnog ekstrakta *M. officinalis* (Grafik 11).

U DPPH i FRAP testovima za ekstrakte *S. montana* nije uočen značajan efekat rastvarača, međutim Serrano i sar. (2011) su pokazali da je u vodeni ekstrakt ove biljke imao značajno višu aktivnost od etanolnog ekstrakta. U studiji Vidović i sar. (2014) je donet zaključak na antioksidativnu aktivnost ekstrakata *S. montana* ne utiču pojedinačna jedinjenja, već da su za ovu aktivnost najverovatnije odgovorne sinergističke i antagonističke interakcije različitih fitokonstituenata. Ipak, značajno je pomenuti da su jedinjenja sa visokim antioksidativnim potencijalom, kao što su fenolni monoterpeni (γ -terpinen, linalol, oleanolna i ursolna kiselina), u visokom procentu često prisutni u biljkama roda *Satureja* (Bahramnezhad i sar., 2021).

Sideritis scardica

Ekstrakti *S. scardica* su, u poređenju sa ostalim ispitanim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae, pripadali grupi sa slabijim antioksidativnim potencijalom. U DPPH testu je pokazano da rastvarač korišćen za ekstrakciju ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *S. scardica*. Najjača aktivnost je utvrđena za metanolni ekstrakt, nakon čega sledi vodeni, dok je etanolni ekstrakt pokazao dva puta slabije dejstvo od metanolnog ekstrakta. Međutim, svi testirani ekstrakti *S. scardica* su imali značajno nižu inhibiciju DPPH radikala u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 7).

U ABTS testu su vodeni i metanolni ekstrakti *S. scardica* imali sličnu aktivnost, dok je u poređenju sa njima, etanolni ekstrakt slabije inhibirao ABTS radikale. Svi testirani ekstrakti *S. scardica* su značajno slabije inhibirali ABTS radikale u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 8).

Metanolni ekstrakt *S. scardica* je ispoljio najviši kapacitet inhibicije u β -karoten/linolna kiselina testu, dok su etanolni i vodeni i etanolni ekstrakti imali sličan efekat. Pored toga, metanolni ekstrakt je ispoljio sličan nivo inhibicije kao i sintetički antioksidanti, BHA i BHT. Vodeni i etanolni ekstrakti *S. scardica* su pokazali sličnu inhibiciju kao i BHT, a značajno nižu od BHA. Svi ekstrakti su pokazali jaču inhibiciju u ovom na testu u poređenju sa vitaminom C (Grafik 9).

U trećoj grupi testova, ekstrakti *S. scardica* su imali značajno slabiju aktivnost u odnosu na korišćene pozitivne kontrole. U FRAP testu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakata *S. scardica*. U ovom testu, najjaču aktivnost je imao metanolni ekstrakt koji je bio nešto jači od vodenog i preko tri puta jači od etanolnog ekstrakta (Grafik 10).

U URP testu, za razliku od prethodnog testa, alkoholni ekstrakti *S. scardica* su ispoljili sličan efekat, dok je vodeni ekstrakt imao slabiji efekat u odnosu na alkoholne ekstrakte (Grafik 11).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. scardica* nije izučavana u tolikoj meri kao i antioksidativna aktivnost većine predstavnika porodice Lamiaceae ispitivanih u našem radu. Karapandzova i sar. (2013) su prijavili znatno slabiju aktivnost u hvatanju DPPH radikala etanolnim ekstraktom biljke *S. scardica* u odnosu na naše rezultate, iako su biljke skupljane u blizini Ljubotena, Srbija, a za analizu korišćeni nadzemni delovi. Studija Irakli i sar. (2018) je pokazala da je infuz *S. scardica* ispoljio različitu jačinu inhibicije DPPH radikala u zavisnosti od toga iz kog dela biljke je napravljen. Naime, infuz listova je ispoljio najjaču inhibiciju DPPH radikala, zatim su prema opadajućoj aktivnosti poređani sledeći delovi biljke: nadzemni delovi i cvetovi, dok je najslabiju aktivnost ispoljio infuz izdanaka *S. scardica*.

Teucrium chamaedrys

U prvoj grupi testova za određivanje antioksidativne aktivnosti je primećeno da je među ekstraktima *T. chamaedrys*, najjaču inhibitornu aktivnost imao etanolni ekstrakt. U DPPH testu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *T. chamaedrys*. Etanolni ekstrakt je inhibirao više DPPH radikala u odnosu na metanolni i vodeni ekstrakt i ispoljio značajno jaču inhibiciju DPPH radikala u odnosu na BHA i BHT. Metanolni ekstrakt je ostvario sličnu jačinu inhibicije kao i BHA i BHT, dok je vodeni ekstrakt imao značajnu slabiju aktivnost u odnosu na oba sintetička antioksidanta. Svi ekstrakti *T. chamaedrys* su imali značajno slabije antioksidativno dejstvo u poređenju sa vitaminom C (Grafik 7).

U ABTS testu je najbolju aktivnost ispoljio etanolni ekstrakt, koja se značajno razlikovala od aktivnosti metanolnog ekstrakta. Ipak, svi testirani ekstrakti *T. chamaedrys* su značajno slabije inhibirali ABTS radikale u odnosu na pozitivne kontrole (Grafik 8).

Slično kao i u ABTS testu, i u β -karoten/linolna kiselina testu je utvrđena značajna razlika između metanolnog i etanolnog ekstrakta *T. chamaedrys* kao i između vodenog i etanolnog ekstrakta ove biljke, pri čemu je metanolni ekstrakt imao najjaču aktivnost, a etanolni najslabiju. Metanolni i vodeni ekstrakti su ispoljili sličan antioksidativni efekat kao i BHA i BHT, dok je etanolni ekstrakt imao značajno slabiji efekat od ovih sintetičkih antioksidanasa. Svi ekstrakti *T. chamaedrys* su ispoljili viši protektivni efekat prema β -karotenu u odnosu na vitamin C (Grafik 9).

U FRAP i URP testovima, ekstrakti *T. chamaedrys* su imali značajno slabiji efekat u odnosu na pozitivne kontrole. U FRAP testu, vodeni ekstrakt *T. chamaedrys* je imao značajno jači ukupni antioksidativni kapacitet u odnosu na metanolni ekstrakt (Grafik 10).

Primenom URP testa je pokazano da je rastvarač imao značajan efekat na ispoljeni URP ekstrakata *T. chamaedrys*, pri čemu se URP svih testiranih ekstrakata ove biljne vrste međusobno značajno razlikovao: metanolni ekstrakt je ispoljio jaču aktivnost od etanolnog i vodenog ekstrakta (Grafik 11).

Stanković i sar. (2010) i Faiku i sar. (2019) su uočili sličan trend antioksidativne aktivnosti ekstrakata *T. chamaedrys* kao što je dobijen u našem radu. Naime, i u ovim studijama je etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* jače inhibirao DPPH radikale u odnosu na metanolni ekstrakt, dok je vodeni ekstrakt ostvario najslabije dejstvo. Slično, u studiji Vujanović i sar. (2019), pokazano je da etanolni ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* imaju sličnu aktivnost u ABTS testu, kao i to da ovi ekstrakti svoje antioksidativno dejstvo ostvaruju korišćenjem različitih mehanizama.

Teucrium montanum

Ekstrakti *T. montanum* su ostvarili generalno slabiju antioksidativnu aktivnost u odnosu na ekstrakte *T. chamaedrys*. U DPPH testu je pokazano da rastvarač ima značajan uticaj na inhibitorni efekat ekstrakata *T. montanum*, pri čemu je najjaču aktivnost ispoljio metanolni ekstrakt, dok je efekat vodenog ekstrakta bio tri puta slabiji. U poređenju sa pozitivnim kontrolama, BHA i BHT, metanolni ekstrakt je pokazao značajno višu inhibiciju, dok je etanolni ekstrakt značajno višu aktivnost pokazao u odnosu na BHT, a sličnu kao BHA. Oba alkoholna ekstrakta su pokazala značajno slabiju aktivnost u odnosu na vitamin C. Inhibitorni potencijal vodenog ekstrakta je bio znatno niži u odnosu na sve pozitivne kontrole (Grafik 7).

U ABTS testu, inhibitorni efekat etanolnog ekstrakta *T. montanum* je bio značajno viši u poređenju sa vodenim i metanolnim ekstraktima. Svi ekstrakti *T. montanum* su imali značajno slabiju inhibiciju ABTS radikala u odnosu na testirane pozitivne kontrole (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu metanolni ekstrakt *T. montanum* je ispoljio jači protektivni efekat u poređenju sa vodenim ekstraktom. Metanolni ekstrakt je imao sličan efekat kao i BHA i BHT, dok je etanolni ekstrakt imao sličan efekat kao BHT i značajno slabiji od BHA. Vodeni ekstrakt je, s druge strane, imao značajno slabiji protektivni efekat prema β -karotenu u odnosu na BHA i BHT. Svi ekstrakti ove biljne vrste su imali značajno jači inhibitorni efekat u odnosu na vitamin C (Grafik 9).

U FRAP testu, alkoholni ekstrakti *T. montanum* su ispoljili višu aktivnost u odnosu na vodeni ekstrakt. Svi ekstrakti ove biljne vrste su imali značajno nižu aktivnost u odnosu na testirane pozitivne kontrole (Grafik 10).

U URP testu je uočeno da je rastvarač imao značajan uticaj na redukcionni potencijal ekstrakata *T. montanum*, pri čemu se njihova aktivnost značajno razlikovala. U ovom testu je metanolni ekstrakt bio najaktivniji (Grafik 11).

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su u skladu sa rezultatima studije Vujanović i sar. (2019) za etanolni ekstrakt *T. montanum*, međutim razlikuju se od rezultata Stanković i sar. (2011b) budući da su autori pokazali da je metanolni ekstrakt, u poređenju sa vodenim, pokazao slabiju inhibiciju DPPH radikala. Pored toga, ustanovljeno je da ekstrakti *T. montanum* imaju visok antioksidativni potencijal, te da je njihovo antioksidativno dejstvo u korelaciji sa bogatim fitohemijskim sastavom (Čanadanović-Brunet i sar., 2006).

Thymus serpyllum

Rastvarač je imao značajan uticaj na aktivnost ekstrakata *Th. serpyllum* u inhibiciji DPPH radikala. Naime, etanolni je ispoljio nešto višu inhibiciju DPPH radikala od metanolnog ekstrakta, kao i do 50% višu aktivnost od vodenog ekstrakta. Alkoholni ekstrakti su imali značajno jaču inhibiciju DPPH radikala od BHA i BHT, dok je vodeni ekstrakt imao značajno slabiju antioksidativnu aktivnost sintetičkih antioksidanasa. Ekstrakti *Th. serpyllum* su ispoljili značajno slabiju inhibiciju DPPH radikala u poređenju sa vitaminom C (Grafik 7).

U ABTS testu je pokazan drugačiji trend aktivnosti pomenutih ekstrakata, pri čemu su etanolni i vodeni ekstrakti imali sličnu, ali višu aktivnost u poređenju sa metanolnim ekstraktom. Svi ekstrakti *Th. serpyllum* su značajno slabije inhibirali ABTS radikale u poređenju sa pozitivnim kontrolama (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu nije primećeno da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *Th. serpyllum*. Svi ekstrakti su imali sličan

efekat kao i BHA i BHT, međutim ostvarili su značajno višu inhibiciju u poređenju sa vitaminom C (Grafik 9).

U trećoj grupi testova je primećeno da rastvarač ima značajan efekat na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ekstrakata *Th. serpyllum*. U FRAP testu je najbolju aktivnost imao metanolni ekstrakt, pri čemu je imao za oko 30% višu aktivnost od vodenog ekstrakta. Svi ekstrakti su pokazali značajno slabiji ukupni antioksidativni kapacitet u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafik 10).

U URP testu je takođe primećeno da je metanolni ekstrakt *Th. serpyllum* ispoljio jači potencijal od etanolnog i vodenog ekstrakta (Grafik 11).

Iako su Đukić i sar. (2017) pokazali da ekstrakti *Th. serpyllum* pripremljeni prema različitim protokolima koriste brojne mehanizme antioksidativnog dejstva (lipidna peroksidacija, „hvatanje“ i redukcija slobodnih radikala), značajno je napomenuti da su ovi rezultati različiti od rezultata koji su predstavljeni u ovoj doktorskoj disertaciji. Naime, autori su dobili antioksidativni efekat na znatno višim koncentracijama u odnosu na koncentracije ekstrakata korišćene u našem radu. U studiji Kindl i sar (2015) je pokazano slično dejstvo etanolnih ekstrakata *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* na inhibiciju DPPH radikala kao i u ovoj doktorskoj disertaciji. Autori su, pored toga, pokazali i visok kapacitet ovih ekstrakata da neutrališu NO radikale, što je od izuzetnog značaja za borbu protiv oksidativnog stresa, budući da NO može reagovati sa superoksidom i formirati visoko reaktivne azotne vrste, a povećana proizvodnja NO takođe može doprineti patogenezi neurodegenerativnih bolesti i inflamatornih povreda tkiva.

Thymus vulgaris

Slično kao što je bio slučaj sa ekstraktima *Th. serpyllum* u prvoj grupi testova, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* ima značajno jači efekat na inhibiciju DPPH i ABTS radikala od metanolnog ekstrakta. U DPPH testu je primećeno da rastvarač ima značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost ovih ekstrakata. Najbolju aktivnost je pokazao etanolni ekstrakt, nakon čega slede metanolni i vodeni ekstrakti. Etanolni ekstrakt je imao značajno jaču inhibiciju DPPH radikala od BHA i BHT, inhibicija metanolnog ekstrakta bila je slična njihovoj, dok je vodeni ekstrakt pokazao značajno slabiju inhibitornu aktivnost u odnosu na BHA i BHT. Svi ekstrakti su ispoljili slabiju inhibiciju DPPH radikala u odnosu na vitamin C (Grafik 7).

Slično kao i ekstrakti *Th. serpyllum*, u ABTS testu je metanolni ekstrakt *Th. vulgaris* ostvario značajno slabiju inhibiciju ABTS radikala u odnosu na etanolni i vodeni ekstrakt. Svi ekstrakti su ispoljili značajno slabiju inhibiciju ABTS radikala od testiranih pozitivnih kontrola (Grafik 8).

U β -karoten/linolna kiselina testu, alkoholni ekstrakti *Th. vulgaris* su imali sličan nivo protektivnog efekta prema β -karotenu, dok je vodeni ekstrakt imao nešto slabiji efekat. Etanolni ekstrakt je ispoljio značajno viši efekat u odnosu na BHT, a sličan kao i BHA, dok je metanolni ekstrakt ispoljio sličan efekat kao i BHA i BHT. Za razliku od toga, vodeni ekstrakt je ostvario sličan stepen inhibicije kao i BHT, a značajno niži od BHA. Svi ekstrakti *Th. vulgaris* su ostvarili značajno viši protektivni efekat β -karotena u odnosu na vitamin C (Grafik 9).

U testovima iz treće grupe, rastvarač je imao značajan uticaj na ispoljenu antioksidativnu aktivnost *Th. vulgaris*. U oba testa je najvišu antioksidativnu ostvario metanolni ekstrakt, za kojim slede etanolni i vodeni ekstrakt. Ipak, u FRAP testu su svi ekstrakti *Th. vulgaris* ostvarili značajno niži efekat u odnosu na korišćene pozitivne kontrole (Grafici 10 i 11).

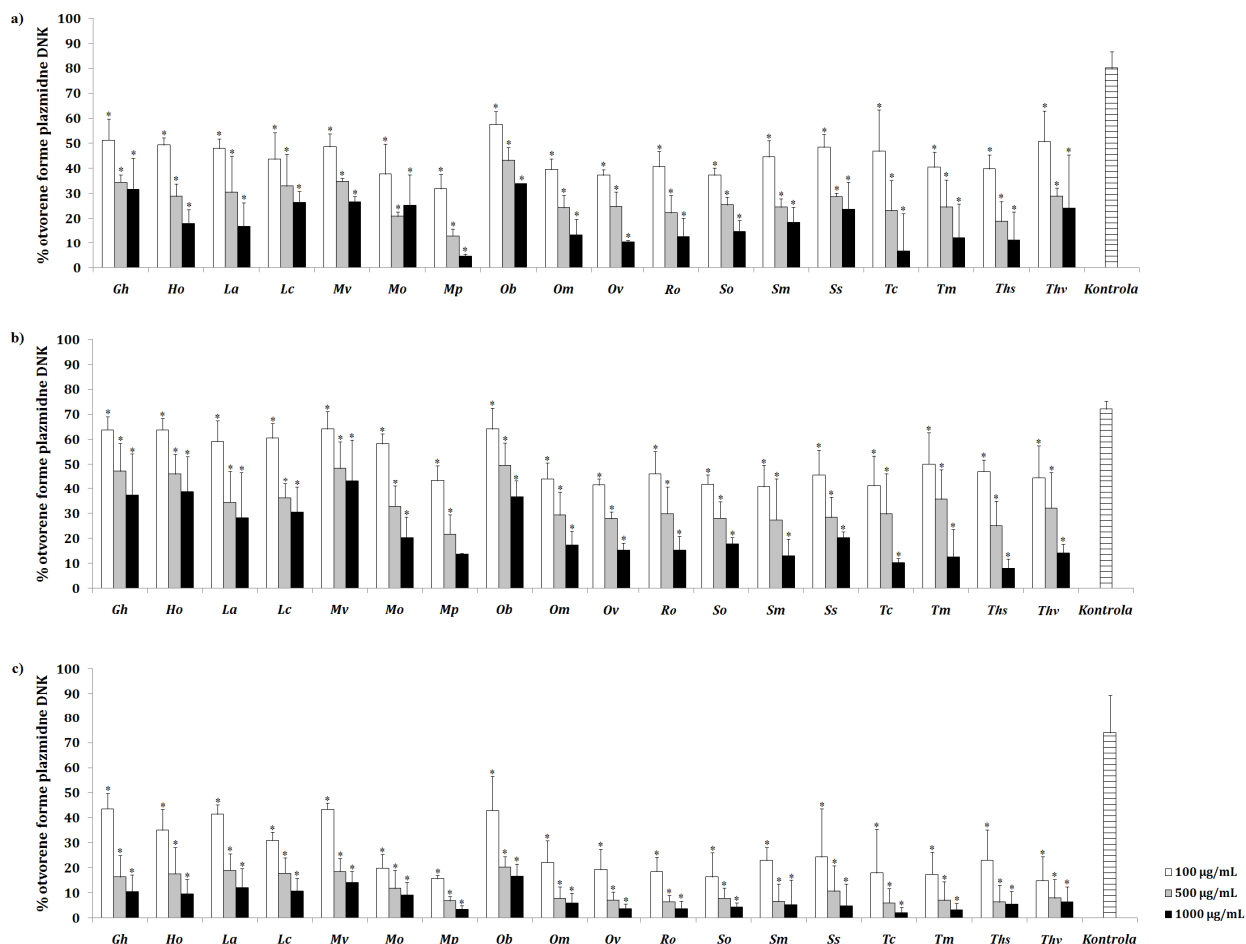
Antioksidativni potencijal ekstrakata, ali i etarskog ulja *Th. vulgaris* je veoma dobro izučavan u prethodnim studijama (Pićurić-Jovanović i sar., 1995; Čančarević i sar., 2013; Roby i sar., 2013; Nikolić i sar., 2014; Kindl i sar., 2015; Taghouti i sar., 2020), gde je pronađeno da ova biljka ostvaruje veoma zapažene antioksidativne efekte putem različitih mehanizama. Etarska ulja biljaka roda *Thymus* su češće bila proučavana od njihovih ekstrakata, pri čemu se glavnim nosiocima njihove biološke aktivnosti smatraju timol i karvakrol. Mnoge biljke porodice Lamiaceae sadrže specifične terpene poput α - i γ -terpinena, fenolne diterpene poput karnozinske kiseline, monoterpenske alkohole poput karvakrola, derivate fenolnih kiselina poput rozmarinske i kafene kiseline, flavonoide poput kvercetina i rutina, kao i kumarine (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020). Imajući u vidu da je oksidativni stres u osnovi mnogih bolesti čoveka, kao i činjenicu da u današnje vreme postoji tendencija sve češće zamene sintetičkih proizvoda prirodnim preparatima, tzv. funkcionalnom hranom (Zengin i sar., 2014; Nazir i Wani, 2021), neophodno je detaljno proučiti fitohemijski sadržaj ovih preparata i otkriti mrežu puteva i mehanizama kojima se smanjuju posledice oksidativnog stresa uz pomoć prirodnih proizvoda, a to podrazumeva i proučavanje drugih bioloških aktivnosti prirodnih preparata.

4.4. Genoprotektivna aktivnost

Sledeći korak ove studije je bio da se ispita da li ekstrakti biljaka porodice Lamiaceae ispoljavaju genoprotektivnu aktivnost prema acelularnoj, odnosno plazmidnoj DNK. Princip ove metode se zasniva na tome da hidroksilni radikal ($\text{OH}\cdot$), koji nastaje fotolizom vodonik-peroksida uz pomoć UV zraka, reaguje sa azotnim bazama, čime dovodi do prekida lanca DNK, što dalje rezultira cepanjem super-spiralizovane kružne plazmidne DNK u otvorenu kružnu/linearnu formu (Russo i sar., 2006; Yumrutas i Saygideger, 2010; Salehi i sar., 2019). Prekid dvolančanog molekula DNK pod uticajem oksidativnog stresa daje značajne informacije u vezi antioksidativnih i prooksidativnih svojstava supstanci na ćelijske komponente (Asadi i sar., 2019a).

Genoprotektivna aktivnost ekstrakata je testirana na plazmidnoj DNK u tri koncentracije (100, 500 i 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) i u tri nezavisna eksperimenta. Plazmidna DNK je tretirana vodonik-peroksidom i UV svetlom, kako bi se generisali hidroksilni radikali. Budući da jedino negativna kontrola nije tretirana ekstraktima, očekivalo se da će imati najveći procenat otvorenog oblika plazmida, odnosno da će plazmidna DNK biti najviše oštećena. Rezultati su pokazali da svi testirani ekstrakti imaju genoprotektivno dejstvo na modelu plazmida *E. coli*. Naime, ekstrakti su smanjili nivo oštećenja DNK, odnosno dobijen je niži procenat otvorenog oblika plazmidne DNK u poređenju sa negativnom kontrolom koja je tretirana samo vodonik-peroksidom i UV zracima, ali ne i ekstraktima. S druge strane, tretman metanolom i etanolom u koncentracijama u kojima su bili prisutni u ekstraktima nije pokazao efekat na plazmidnu DNK.

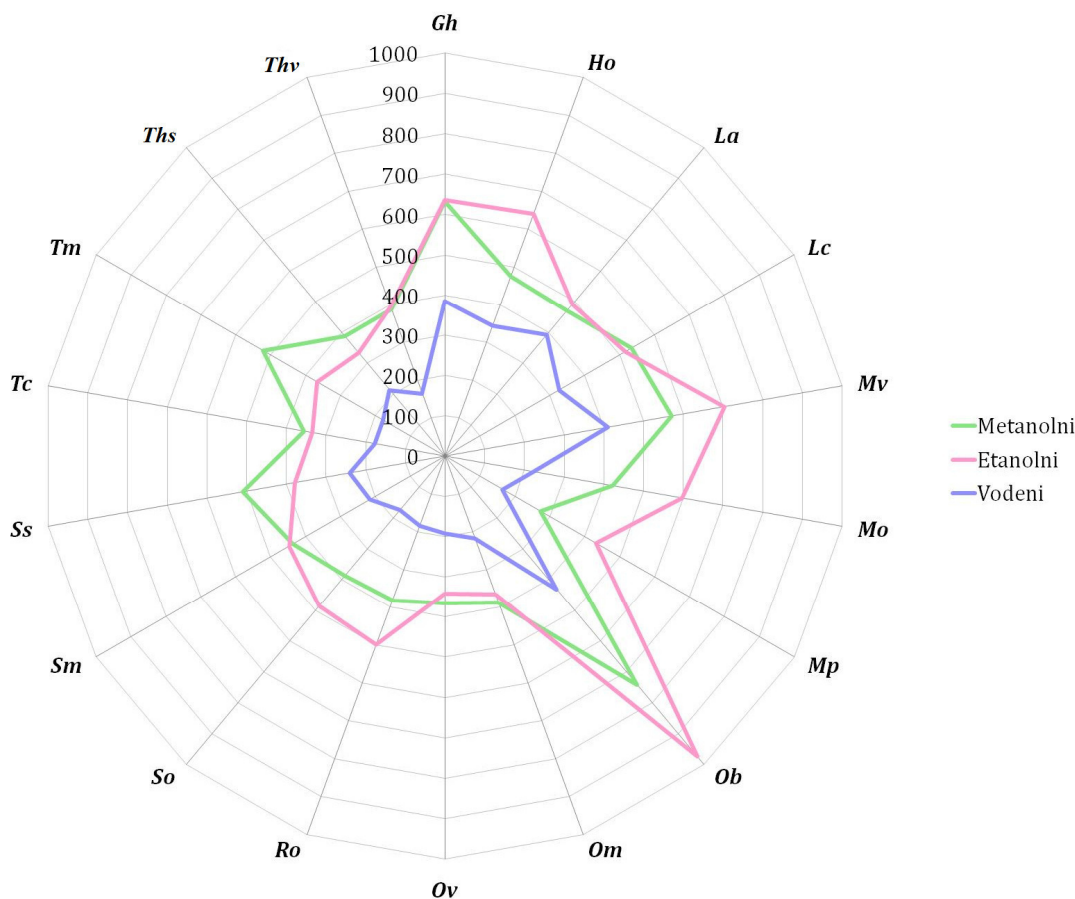
Rezultati ispitivanja genoprotektivne aktivnosti dobijeni za metanolne, etanolne i vodene ekstrakte biljaka porodice Lamiaceae prikazani su na Grafcima 12a-12c. Svi ispitivani ekstrakti pokazali su značajan efekat prema generisanim $\text{OH}\cdot$ u poređenju sa negativnom kontrolom. Najjači genoprotektivni efekat je dobijen za ekstrakte u najvišoj testiranoj koncentraciji, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a najslabiji za ekstrakte u najnižoj testiranoj koncentraciji, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Grafik 12. Genoprotektivna aktivnost ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae.

a) metanolni ekstrakti, b) etanolni ekstrakti, c) vodeni ekstrakti. Rezultati su predstavljani kao procenat (%) otvorene forme plazmidne DNK. * vs. kontrola ($p < 0,05$)

Iako su svi ekstrakti imali značajnu genoprotektivnu aktivnost prema plazmidnoj DNK, kada su rezultati izraženi kao IC_{50} vrednosti, primećeno je da su vodeni ekstrakti pružali najbolju zaštitu DNK (dobijen je manji procenat otvorene forme DNK), što je prikazano na Grafiku 13. IC_{50} vrednosti za genoprotektivnu aktivnost vodenih ekstrakata su varirale u opsegu od 164 do 432 µg/mL. Najjače genoprotektivno dejstvo u grupi vodenih ekstrakata su imali *M. piperita* i *Th. vulgaris*, nakon čega slede *S. officinalis*, *T. chamaedrys* i *T. montanum*, *R. officinalis* i *O. vulgaris*, dok su najslabije dejstvo imali ekstrakti *M. vulgaris* i *O. basilicum*.



Grafik 13. Genoprotektivna aktivnost ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae predstavljena kao IC₅₀ vrednosti (µg/mL).

Sledeća grupa ekstrakata prema stepenu ispoljene genoprotektivne aktivnosti su bili metanolni, čiji je opseg IC₅₀ vrednosti varirao od 273 do 742 µg/mL. Među metanolnim ekstraktima, najjače genoprotektivno dejstvo su ispoljili ekstrakti *M. piperita*, *T. chamaedrys*, *O. vulgare* i *R. officinalis*, *O. majorana*, *Th. serpyllum*, *Th. vulgaris* i *S. officinalis*, dok je najslabije dejstvo ispoljio ekstrakt *O. basilicum*.

Etanolni ekstrakti, s druge strane, su ispoljili najslabiju aktivnost, pri čemu su IC₅₀ vrednosti varirale od 330 do 970 µg/mL. Među njima, najsnažnije genoprotektivno dejstvo su imali ekstrakti *Th. serpyllum* i *T. chamaedrys*, *O. vulgare*, *O. majorana* i *T. montanum* i *S. scardica* dok je najslabije dejstvo ispoljio ekstrakt *O. basilicum*.

Kada se uzmu u obzir rezultati dobijeni za sva tri ekstrakta samo jedne biljke, na osnovu Grafika 13, može se zaključiti da su *M. piperita* i *T. chamaedrys* imale generalno najjače genoprotektivno dejstvo prema plazmidnoj DNK. S druge strane, najslabiji genoprotektivni potencijal su ispoljili ekstrakti *O. basilicum*.

Genoprotektivni efekat prema plazmidnoj DNK je do sada ispitivan samo za nekoliko predstavnika familije Lamiaceae, pri čemu su to mahom biljke koje nisu bile objekat istraživanja ove doktorske disertacije. Poređenjem metanolnih i vodenih ekstrakata šest vrsta roda *Salvia*, četiri vrste roda *Mentha* i dve roda *Sideritis*, pokazano je da postoji razlika u njihovoj genoprotektivnoj aktivnosti, pri čemu je pokazano da biljke roda *Sideritis* imaju najslabiju aktivnost (Stagos i sar., 2012), što nije u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u ovoj disertaciji. Istraživanje sprovedeno na *Teucrium polium* je pokazalo da su vodeni

ekstrakti u koncentraciji od čak 40 mg/mL pružili značajnu zaštitu za superspiralizovanu DNK (Tepe i sar., 2011). S druge strane, metanolni ekstrakt *T. ramosissimum* u koncentraciji 250 i 500 µg/mL je pokazao zaštitni efekat prema plazmidnoj DNK izloženoj vodonik-peroksidu i UV zračenju (Sghaier i sar., 2015).

Interesantno je da su vodeni ekstrakti pokazali najveći genoprotektivni potencijal u ovoj studiji, uprkos tome što su bili najmanje aktivni u *in vitro* testovima kojima je određena antioksidativna aktivnost. Ovi rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, budući da je u studiji Yumrutas i Saygideger (2010), gde su ispitivani metanolni i heksanski ekstrakti dve vrste Lamiaceae, *Marrubium parviflorum* i *Lamium amplexicaule* iz Turske. Heksanski ekstrakti su pokazali slabu aktivnost u DPPH testu, mada je njihov genoprotektivni potencijal bio veoma visok. Autori su pretpostavili da bi nepolarna jedinjenja u heksanskim ekstraktima mogla biti odgovorna za zaštitu plazmidne DNK. S druge strane, ova jedinjenja u vodenim ekstraktima 18 predstavnika porodice Lamiaceae poreklom iz Srbije koji su pokazali najbolju genoprotektivnu aktivnost nisu detektovana HPLC analizom. Moguće objašnjenje bi moglo da bude prisustvo drugih, aktivnih nefenolnih jedinjenja kao što su terpeni, posebno heterozidi glikozilovanih diterpena i triterpena sa većom molekulskom masom, koji se u poređenju sa drugim rastvaračima obično nalaze u većim količinama u vodenim ekstraktima. Pored toga, slabija aktivnost alkoholnih ekstrakata može biti posledica formiranja različitih kompleksa fenolnih jedinjenja koji poseduju više fenolnih grupa i/ili imaju manju molekulsku masu od jedinjenja koja se nalaze u vodenim ekstraktima (Do i sar., 2014).

Budući da su prethodne studije (Sevgi i sar., 2015), kao i ova doktorska disertacija, potvrdile da ispitivani ekstrakti efikasno uklanjaju slobodne radikale, što se može povezati sa njihovom sposobnošću uklanjanja slobodnih radikala nastalih UV fotolizom vodikovog peroksida, te bi stoga mogli imati važnu ulogu u zaštiti DNK. S obzirom na to da ne postoji dovoljno literaturnih podataka o genoprotektivnom efektu na plazmidnu DNK za ekstrakte predstavnika Lamiaceae koji su objekat istraživanja ove doktorske disertacije, dobijeni rezultati su od velikog značaja, posebno ako se ima u vidu da su njihovi ekstrakti pokazali visok genoprotektivni potencijal.

4.5. Antigenotoksična aktivnost

4.5.1. Prokariotski model sistem

Antigenotoksični efekat ekstrakata je prvenstveno ispitivan na model sistemu *S. typhimurium* TA1535/pSK1002, bakterijskom soju sa deficijencijom u nukleotidnoj eksciziji, gde je praćena indukcija SOS odgovora u reakciji na oštećenje DNK. SOS/*umuC* test je prepoznat kao osetljiv sistem za detekciju, kako genotoksičnih, tako i antigenotoksičnih agenasa (Kolarević i sar., 2018; 2019). Princip SOS/*umuC* testa je sledeći: ukoliko se u genomu bakterije proizvedu genotoksične lezije, dolazi do pokretanja SOS mehanizma popravke oštećenja, pri čemu će se eksprimirati gen *umuC*, kao deo opšteg SOS odgovora (Simić i sar., 1998).

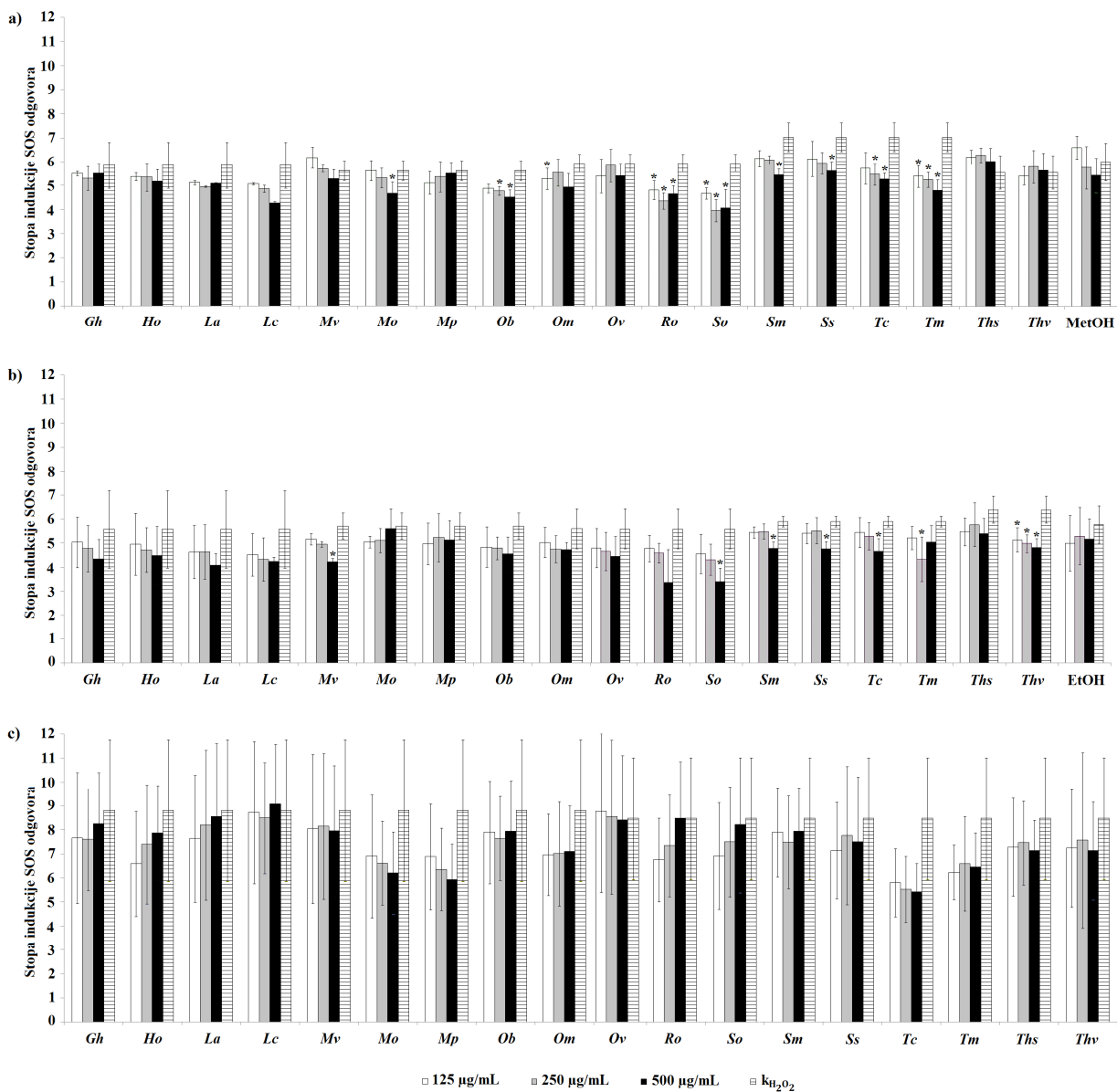
Rezultati ko-tretmana metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata sa vodonik-peroksidom prikazani su na Graficima 14a-14c, respektivno. Među metanolnim ekstraktima, *M. officinalis*, *O. majorana*, *S. montana* i *S. scardica* (500 µg/mL), *O. basilicum* i *T. chamaedrys* (250 i 500 µg/mL), *R. officinalis*, *S. officinalis* i *T. montanum* (125, 250 i 500 µg/mL) su doveli do značajnog smanjenja oštećenja DNK izazvanog vodonik-peroksidom u poređenju sa negativnom kontrolom (Grafik 14a).

Među etanolnim ekstraktima, *M. vulgare*, *S. officinalis*, *S. montanum*, *S. scardica* i *T. chamaedrys* (500 µg/mL), *T. montanum* (250 µg/mL) i *Th. vulgaris* (125, 250 i 500 µg/mL) su značajno smanjili oštećenje DNK izazvano vodonik-peroksidom u poređenju sa negativnom kontrolom (Grafik 14b).

Vodeni ekstrakti, kao ni kontrole rastvarača (70% metanol i 70% etanol) nisu značajno indukovali SOS odgovor u test sistemu (Grafik 14c).

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da su alkoholni ekstrakti, pored značajne antioksidativne aktivnosti, bili najefikasniji i u redukciji ekspresije gena *umuC*, što nije iznenađujuće budući da imaju visok sadržaj fenolnih jedinjenja. Takođe, ne može se odbaciti ni uloga drugih grupa metabolita, poput pojedinih grupa terpena za koje je ranije pokazana antioksidativna aktivnost (Aćimović i sar., 2020) u zaštiti prokariotskog genoma.

U ovoj disertaciji je po prvi put pokazana sposobnost ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae da, sa izuzetkom vodenog ekstrakta *G. hederacea*, za koga je pokazan dozno-zavisani antigenotoksični potencijal na *S. typhimurium* (Chou i sar., 2012), redukuju oksidativna oštećenja DNK u prokariotskom modelu. Izuzetak je jedino vodeni ekstrakt *G. hederacea*, koji je prethodno već pokazao dozno-zavisani antigenotoksični potencijal na različitim sojevima *S. typhimurium* (Chou i sar., 2012). Bez obzira na činjenicu da ne postoje raniji literaturni podaci o antigenotoksičnom efektu ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae u prokariotskom sistemu, važno je napomenuti da bi rezultati SOS/*umuC* testa mogli biti pogodni za fundamentalne studije o ulozi velikog broja supstanci prirodnog i veštačkog porekla, kao i enzima. Naime, ranije je pokazano da se sistemi za testiranje *umu* takođe mogu koristiti za validaciju (anti)-genotoksičnih testova i za analizu mehanizama biotransformacije agenasa koji mogu imati genotoksičan uticaj na ljude (Oda, 2016).



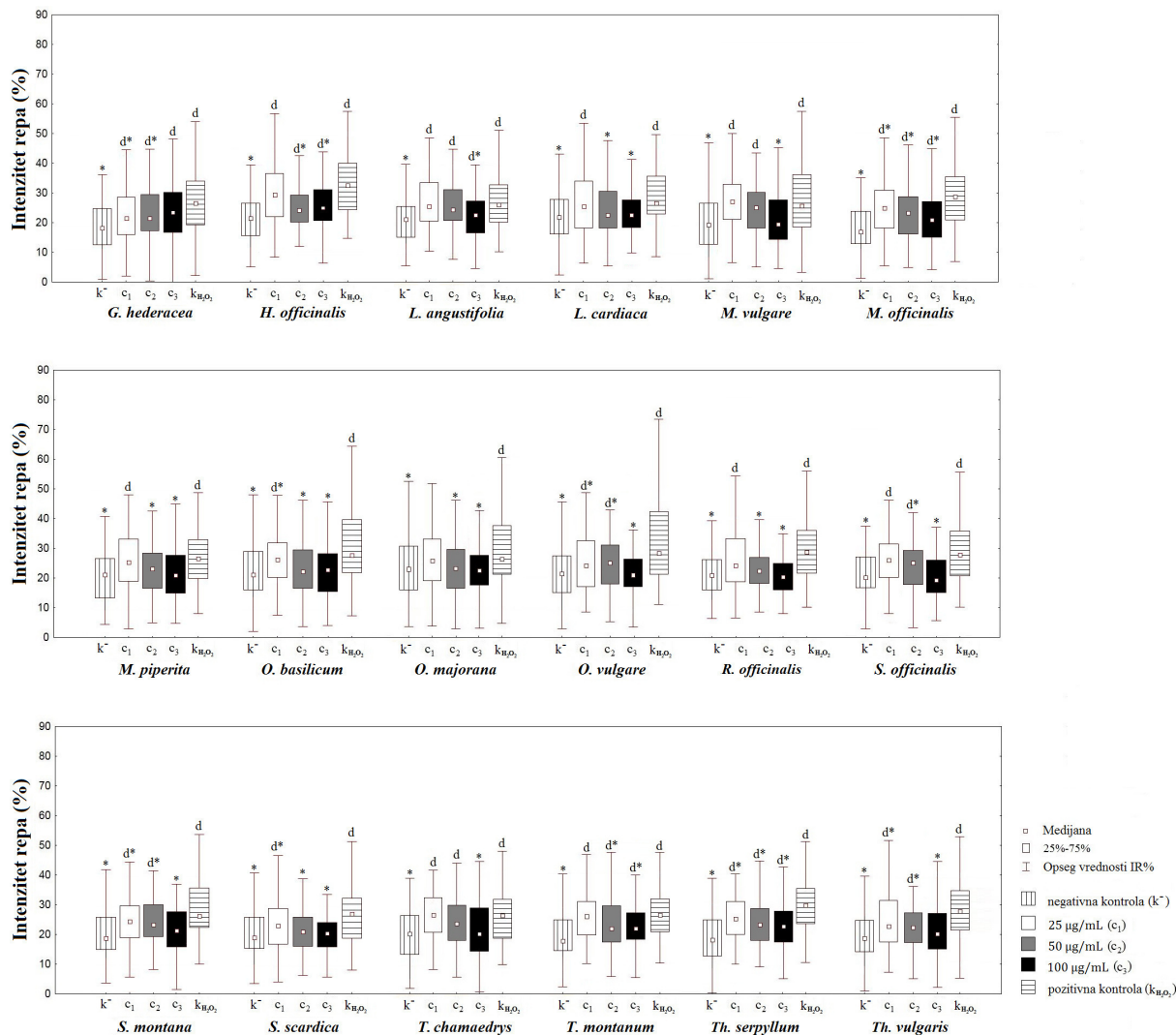
Grafik 14. Antigenotoksična aktivnost ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u prokariotskom modelu.

a) metanolni ekstrakt, b) etanolni ekstrakti, c) vodeni ekstrakti. Rezultati su predstavljani kao stopa indukcije SOS odgovora kod bakterije *S. typhimurium*. H_2O_2 predstavlja pozitivnu kontrolu, bakterije tretirane vodonik-peroksidom (H_2O_2). Metanol (MetOH) i etanol (EtOH) predstavljaju kontrole rastvarača.

* vs. H_2O_2 ($p < 0,05$)

4.5.2. Eukariotski model sistem

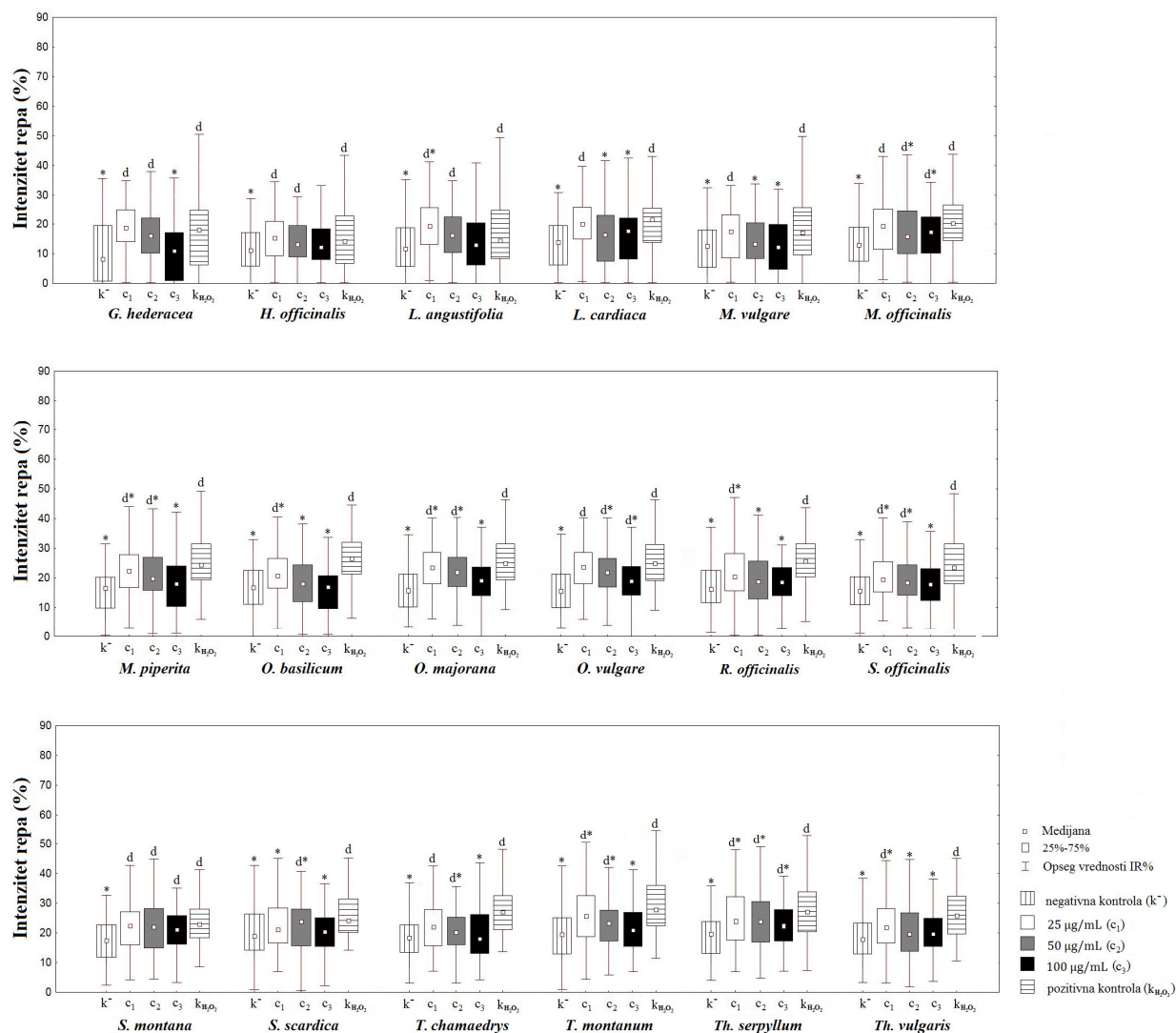
Pre ispitivanja antigenotoksičnog potencijala ekstrakata na humanim ćelijama, testiran je njihov efekat na vijabilnost, odnosno metaboličku aktivnost MRC-5 ćelija. Budući da nijedna od testiranih koncentracija ekstrakata (25, 50 i 100 µg/mL) nije u značajnoj meri uticala na metaboličku aktivnost ovih ćelija, antigenotoksični efekat istih koncentracija praćen je komet testom u kome je kao mutagen korišćen vodonik-peroksid.



Grafik 15. Antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.

Rezultati su predstavljani kao procenat intenziteta repa komete u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu. ^d vs. negativna kontrola, * vs. pozitivna kontrola

Antigenotoksična aktivnost metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata prikazana je na Graficima 15, 16 i 17. Većina ekstrakata je pokazala dejstvo zavisno od koncentracije, pri čemu je najveća antigenotoksična aktivnost dobijena na najvišim testiranim koncentracijama. Gotovo svi ekstrakti su pokazali značajnu antigenotoksičnu aktivnost u koncentraciji 100 µg/mL, većina njih je imala značajan antigenotoksični efekat u koncentraciji 50 µg/mL, dok je bilo i onih koji su i pri najmanjoj koncentraciji doveli do značajnog smanjenja oštećenja molekula DNK u poređenju sa pozitivnom kontrolom tretiranom vodonik peroksidom.

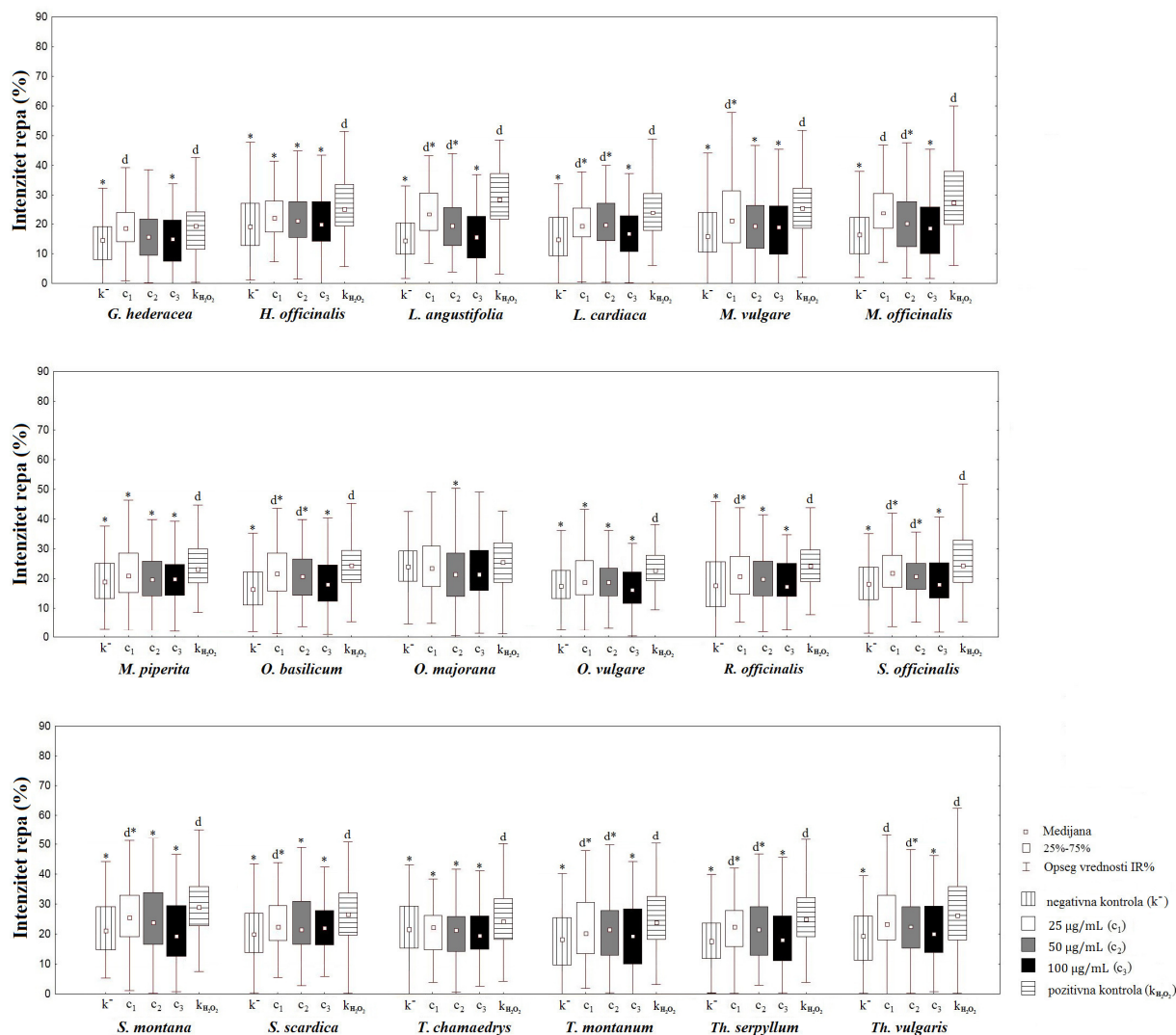


Grafik 16. Antigenotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.

Rezultati su predstavljeni kao procenat intenziteta repa komete u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu. ^d vs. negativna kontrola, * vs. pozitivna kontrola

Metanolni ekstrakti koji su značajno smanjili oštećenje DNK u odnosu na pozitivnu kontrolu tretiranu vodonik peroksidom su: *L. cardiaca*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *R. officinalis* i *S. scardica* (50 i 100 µg/mL), kao i *M. vulgare*, *O. vulgare*, *S. officinalis*, *S. montana*, *T. chamaedrys* i *Th. vulgaris* (100 µg/mL) (Grafik 15).

Etanolni ekstrakti koji su značajno smanjili oštećenje DNK u odnosu na pozitivnu kontrolu su: *S. scardica* (25 i 100 µg/mL), *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *O. basilicum*, *R. officinalis* i *Th. vulgaris* (50 i 100 µg/mL), kao i *G. hederacea*, *M. piperita*, *O. majorana*, *S. officinalis*, *T. chamaedrys* i *T. montanum* (100 µg/mL) (Grafik 16).



Grafik 17. Antigenotoksična aktivnost vodenih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.

Rezultati su predstavljeni kao procenat intenziteta repa komete u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu. ^d vs. negativna kontrola, * vs. pozitivna kontrola

Svi vodeni ekstrakti osim *O. majorana*, doveli su do značajnog smanjenja oštećenja DNK u odnosu na pozitivnu kontrolu na najvišoj testiranoj koncentraciji (100 µg/mL), a neki i na srednjoj i najmanjoj (50 i 25 µg/mL). Na osnovu iznetih podataka se može zaključiti da su rezultati dobijeni u ovom testu u korelaciji sa rezultatima dobijenim u testu kojim je određivana genoprotektivna aktivnost na plazmidnoj DNK. U komet testu su se posebno izdvojili vodeni ekstrakti *H. officinalis*, *O. vulgare* i *T. chamaedrys*, koji su doveli do značajnog smanjenja oštećenja DNK na nivo netretiranih ćelija, i to pri svim testiranim koncentracijama (Grafik 17).

Detaljnou pretragom literature je ustanovljeno da postoji ograničen broj studija koje ukazuju na antigenotoksičnu aktivnost biljaka čiji smo protektivni efekat prema MRC-5 ćelijama testirali u ovom radu, a koji bi mogli da budu upoređeni sa našim rezultatima. Antigenotoksični efekti nekih od predstavnika familije Lamiaceae su pokazani na humanim limfocitima (etarsko ulje cveta *L. angustifolia*), humanim leukocitima (metanolni ekstrakt *H.*

officinalis), humanim enterocitima (etanolni ekstrakt *H. officinalis*), kao i na ćelijama jajnika hrčaka (metanolni ekstrakt *Leonurus sibiricus*) (Sitarek i sar., 2016; Sabahi i sar., 2018; Borrelli i sar., 2019; Kalemba-Drożdż i Cierniak, 2019; Mićović i sar., 2021). Navedene studije su pokazale sposobnost ovih biljaka da stimulišu zdrave ćelije da izvrše popravku oštećenja DNK nastalih oksidativnim stresom i/ili da zaštite DNK od oksidativnih lezija.

Carvalho i sar. (2011) su pokazali da etanolni ekstrakt *M. officinalis* značajno smanjuje oštećenje DNK ćelija periferne krvi miša izazvano metil metansulfonatom, dok vodeni ekstrakt ove biljke nije pokazao antigenotoksičnu aktivnost. Pored toga, zabeleženo je da etanolni ekstrakti *O. basilicum* imaju sposobnost neutralisanja štetnih efekata vodonik-peroksida u nekim ćelijama sisara (Güez i sar., 2017). Takođe, Gateva i sar. (2015) su pokazali da tretman vodenim ekstraktom *S. officinalis* dovodi do značajnog smanjenja oštećenja DNK u humanim limfocitima. S druge strane, Razavi-Azarkhiavi i sar. (2014) su pokazali da etanolni ekstrakt *R. officinalis*, za razliku od vodenog, pruža zaštitu genetskom materijalu humanih limfocita od oštećenja izazvanih vodonik-peroksidom, dok su naši ekstrakti ispoljili sličan nivo aktivnosti prema humanim fibroblastima pluća. Takođe, tretman limfocita pacova etanolnim ekstraktima *Satureja hortensis* rezultirao je značajnim smanjenjem oštećenja DNK izazvanog vodonik-peroksidom (Mosaffa i sar., 2006), međutim u literaturi nema dostupnih podataka o efektima ekstrakata *S. montana*.

U studiji Kapiszewska i sar. (2005), *Thymus piperella* je pokazao bolju antigenotoksičnu sposobnost (zaštićeno oko 40% DNK humanih limfocita) u poređenju sa *Origanum heracleoticum* (zaštićeno svega oko 5% DNK). Međutim, rezultati ove doktorske disertacije sugerišu da ne postoji značajna razlika između efekata ekstrakata ispitivanih predstavnika roda *Thymus* i *Origanum*.

4.6. Antidijabetična aktivnost

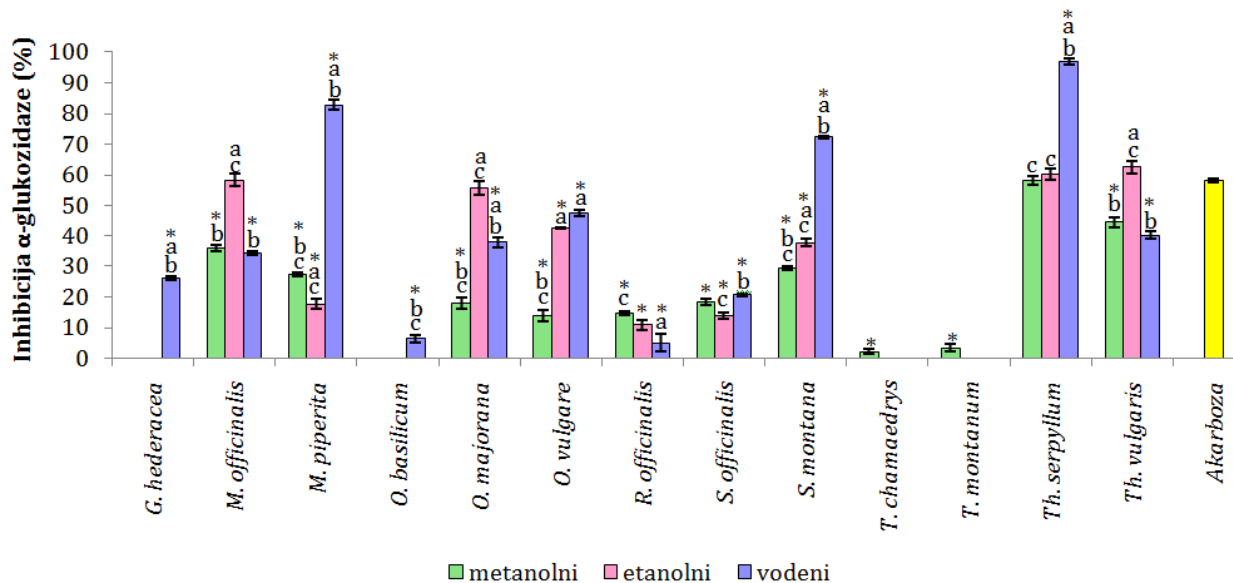
Oksidativni stres, čija je posledica povećana produkcija RVK-a, igra ključnu ulogu u patogenezi dijabetesa, a glavni molekularni mehanizmi uključeni u razvoj ove bolesti su povezani sa metabolizmom glukoze i lipida. U uslovima hiperglikemije, primećuje se prekomerna proizvodnja RVK-a tokom glikolize, što dalje dovodi do oštećenja DNK i naknadne aktivacije enzima za reparaciju DNK. Takođe, povišeni nivoi RVK-a dovode do oksidativnog oštećenja β -ćelija pankreasa¹, čime se utiče na kvantitet i kvalitet sekrecije insulina. Zbog toga je potrebno identifikovati glavne biohemijske markere reakcija slobodnih radikala, kao i odnos reakcija oksidativnog stresa sa infamacijom, koji predstavlja dodatni kriterijum za praćenje progresije bolesti (Darenskaya i sar., 2021).

Predstavnici familije Lamiaceae i njihovi sekundarni metaboliti su i ranije bili objekat kako *in vitro*, tako i *in vivo* istraživanja antidijabetičnog potencijala, međutim treba imati u vidu da su njihovi ekstrakti znatno manje istraživani od etarskih ulja, kao i činjenicu da za mnoge od ovih biljaka nije testirana aktivnost na inhibiciju α -amilaze i α -glukozidaze. Prema Etsassala i sar. (2021), samo je nekoliko biljaka familije Lamiaceae koje imaju i tradicionalnu primenu u terapiji dijabetesa bilo predmet ranijih naučnih studija, poput *Ajuga iva*, *Ballota nigra*, *Calamintha officinalis*, *Marrubium vulgare*, i pojedine vrste roda *Lavandula*, *Leonotis*, *Ocimum*, *Salvia* i *Teucrium*.

¹ ćelije koje se nalaze u pankreasnim ostrvcima, koje sintetišu i sekretuju insulin i amilin

Antidijabetični potencijal ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae je u ovoj doktorskoj disertaciji procenjen tako što je testirana njihova sposobnost da inhibiraju aktivnost α -amilaze i α -glukozidaze, dva ključna enzima zadužena za razgradnju ugljenih hidrata.

Efekti ovih ekstrakata na aktivnost enzima α -amilaze su prikazani u Prilogu 7. Na osnovu dobijenih rezultata se može primetiti da nijedan ekstrakt nije efikasno inhibirao aktivnost ovog enzima. Zapravo, od 54 ispitivanih ekstrakata, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* je pokazao najviši procenat inhibicije α -amilaze, koji je iznosio 2,27% na koncentraciji 500 μ g/mL, dok je pozitivna kontrola, akarboza, testirana pri istoj koncentraciji inhibirala 93,24% aktivnosti ovog enzima.



Grafik 18. Inhibicija aktivnosti enzima α -glukozidaze ekstraktima predstavnika porodice Lamiaceae.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 250 μ g/mL su predstavljeni kao procenti (%) \pm standardna greška u poređenju sa pozitivnom kontrolom, akarbozom.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, * vs. akarboza ($p < 0,05$)

S druge strane, u testu inhibicije α -glukozidaze, ekstrakti su pokazali znatno veću aktivnost prema ovom enzimu nego prema α -amilazi, ispoljavajući dejstvo zavisno od testirane koncentracije (Prilogu 7). Na osnovu rezultata prikazanih na Grafiku 18 se može videti da postoji statistički značajna razlika između ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae dobijenih različitim rastvaračima. Statistička analiza je pokazala da vodeni ekstrakti, poput *M. piperita*, *S. montana* i *Th. serpyllum* značajno više inhibiraju aktivnost α -glukozidaze u odnosu na akarbozu testiranu pri istoj koncentraciji. Za razliku od toga, svi ekstrakti *H. officinalis*, *L. angustifolia*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, metanolni i etanolni ekstrakti *G. hederacea*, etanolni ekstrakt *O. basilicum*, kao i etanolni i vodeni ekstrakti *S. scardica* nisu ispoljili efekat na aktivnost ispitanog enzima (Prilog 7).

Glechoma hederacea

Među ekstraktima *G. hederacea*, u testu inhibicije α -glukozidaze se jedino istakao vodeni ekstrakt, koji je pokazao koncentraciono-zavisnu inhibiciju, pri čemu je u koncentraciji 250 μ g/mL inhibirao 26,19% aktivnosti ovog enzima (Grafik 18). Aktivnost *G. hederacea* na inhibiciju α -amilaze i α -glukozidaze nije do sada istražena, dok su Ishihara i sar. (2007) pokazali da vodeni ekstrakt ove biljke može sprečiti porast nivoa postprandijalne glukoze u krvi pacova.

Hyssopus officinalis

Ranije je pokazano da jedinjenja izolovana iz ekstrakata *H. officinalis* imaju sposobnost inhibicije α -glukozidaze, čime se pretpostavlja da bi ekstrakti ove biljke mogli imati inhibični efekat na postprandijalnu hiperglikemiju (Fathiazad i Hamedeyazdan, 2011). Za etanolni ekstrakt ove biljke je dokazano da može dovesti do smanjenja niva glukoze u krvi pacova nakon pet nedelja primene na nivo izmeren u kontrolnoj grupi (Abdel-Megeed i sar., 2020). Autori smatraju da je ova aktivnost omogućena zahvaljujući visokom sadržaju apigenina i hlorogene kiseline, za koje se, između ostalog, zna da inhibiraju glukoneogene enzime jetre, što za posledicu ima modulaciju metabolizma glukoze. Pored toga, u pomenutoj studiji, ovaj ekstrakt je regulisao koncentraciju proinflamatornog citokina TNF- α (engl. *tumor necrosis factor* α), a za kafenu kiselinu, koja je takođe nađena u ovom ekstraktu u visokoj količini, je poznato da pored uticaja na smanjenje TNF- α može dovesti i do stimulacije enzima za razgradnju insulina (Chang i sar., 2015). S druge strane, analize naše studije pokazuju da ovaj ekstrakt sadrži kafenu kiselinu samo u tragovima, dok hlorogene kiseline ima malo. Budući da se ove fenolne kiseline smatraju nosiocima antidijabetične aktivnosti kod *H. officinalis*, nije iznenađujuće to što ovaj ekstrakt nije imao efekta na aktivnost enzima testiranu u okviru ove doktorske disertacije (Prilog 7).

Lavandula angustifolia

Inhibitorna aktivnost ekstrakata *L. angustifolia* prema α -amilazi i α -glukozidazi je retko proučavana, što korelira sa činjenicom da njeni ekstrakti nemaju efekta na aktivnost ovih enzima (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020; Prilog 7). S druge strane, metanolni ekstrakt *L. angustifolia* je pokazao sposobnost da reguliše dijabetičku dislipidemiju, koja dovodi do insulinske rezistencije i komplikacija kod DT2, inhibicijom aktivnosti hormon senzitivne lipaze i lipaze pankreasa u *in vitro* uslovima (Issa i sar., 2011). Autori su takođe ispitivali aktivnost rozmarinske i galne kiseline na ove enzime i ustanovljeno je da je galna kiselina pokazala znatno bolju aktivnost od rozmarinske kiseline, zbog čega se aktivnost metanolnog ekstrakta *L. angustifolia* pripisuje upravo galnoj kiselini.

Leonurus cardiaca

L. cardiaca je do sada bio objekat istraživanja antidijabetične aktivnosti u malom broju studija. U studiji Wong i sar. (2014) gde je ispitivan potencijal vodenih ekstrakata šest biljaka u inhibiciji aktivnosti α -glukozidaze, ekstrakt *L. cardiaca* nije pokazao antidijabetičnu aktivnost. Za razliku od toga, u studiji Angeloni i sar. (2021) je pokazano da etanolni ekstrakt ove biljke ispoljava inhibičnu aktivnost i prema α -amilazi i prema α -glukozidazi, međutim ova aktivnost je bila više od 4 puta slabija od aktivnosti koju je ispoljila akarboza. U navedenoj studiji je, međutim, primenjena viša koncentracija ekstrakta *L. cardiaca* od one testirane u ovom radu, što može biti razlog odsustva aktivnosti ekstrakata *L. cardiaca* u našoj studiji (Prilog 7).

Marrubium vulgare

Iako ekstrakti *M. vulgare* ispitivani u okviru ove doktorske disertacije nisu ispoljili antidijabetičnu aktivnost, brojna *in vitro*, ali i *in vivo* istraživanja su pokazala da ekstrakti *M. vulgare* poseduju ovu aktivnost, što nije iznenađujuće kada se ima u vidu da se ova biljka tradicionalno primenjuje u terapiji DT2 (Etsassala i sar., 2021). Hellal i sar. (2020) su pokazali da anti- α -glukozidazna aktivnost zavisi od koncentracije etanola koji je korišćen za ekstrakciju i da su ekstrakti pripremljeni primenom 80% etanola najefikasnije inhibirali aktivnost ovog enzima. Uočeni stepen inhibicije α -glukozidaze etanolnim ekstraktom *M. vulgare* nije u saglasnosti sa odsustvom aktivnosti etanolnog ekstrakta ispitivanog u našoj

studiji, što se može pripisati činjenici da su Hellal i sar. (2020) koristili 10 puta višu koncentraciju ekstrakta od one koju smo mi koristili (Prilog 7). Ipak, pokazano je da je primena metanolnih i vodenih ekstrakata *M. vulgare* dovela do značajnog smanjenja glukoze u krvi, kao i značajnog povećanja sadržaja insulina u plazmi i glikogena u tkivima dijabetičnih pacova (Boudjelal i sar., 2012; Elberry i sar., 2015). Pored toga, ekstrakti *M. vulgare* svoje antidijabetične efekte mogu ostvariti inhibicijom apsorpcije ugljenih hidrata iz creva (čime dovode do smanjenja postprandijalne glukoze u krvi), zatim smanjenjem nivoa interferona- γ i NO-a u pankreasu, ukupnog holesterola, lipoproteina niske gustine (LDL) i triglicerida kod miševa sa dijabetesom (Etsassala i sar., 2021).

Melissa officinalis

U ovoj studiji je pokazano da na testiranim koncentracijama, ekstrakti *M. officinalis* nemaju inhibitornu aktivnost prema α -amilazi. S druge strane, prema α -glukozidazi je uočena koncentraciono-zavisna inhibicija (Prilog 7), pri čemu je značajna aktivnost na koncentraciji 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zabeležena za etanolni ekstrakt (58,17%), nakon čega slede metanolni i vodeni ekstrakti, među kojima nije nađena statistički značajna razlika (Grafik 18). Rezultati istraživanja Kwon i sar. (2006) su, poput rezultata naše studije, pokazali da vodeni i vodenometanolni (12% etanol) ekstrakti *M. officinalis* nemaju efekta na aktivnost α -amilaze, mada su pri koncentraciji 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, etanolni ekstrakti jače inhibirali α -glukozidazu (oko 80%) od vodenih ekstrakata (oko 50%). Studija sprovedena na streptozotocinom² indukovanim dijabetesom kod pacova je pokazala da etanolni ekstrakt (70% etanol) *M. officinalis* poboljšava funkciju β -ćelija pankreasa tako što povećava gustinu i broj ovih ćelija, kao i gustinu i ukupnu zapreminu pankreasnih ostrvaca, a takođe dovodi i do smanjenja glukoze u krvi (Ashkani-Esfahani i sar., 2021). Pored toga, primena etanolnog ekstrakta (70% etanol) *M. officinalis* kod pacijenata sa dijabetesom je dovela do poboljšanja glikemijskog statusa, hiperlipidemije i hipertenzije, pri čemu nisu zapaženi nikakvi neželjeni efekti (Asadi i sar., 2019b).

Mentha × piperita

Nasuprot α -amilazi, ekstrakti *M. piperita* su uspešno inhibirali aktivnost α -glukozidaze. Pri koncentraciji 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, najbolju aktivnost prema ovom enzimu je ispoljio vodeni ekstrakt (82,55%), što je značajno veća inhibicija u poređenju sa efektom pozitivne kontrole akarboze. U poređenju sa vodenim ekstraktom, etanolni i vodeni ekstrakt su pokazali tri, odnosno 4,5 puta niži procenat inhibicije ovog enzima (Grafik 18). Pavlić i sar. (2021) su ispitivali antidijabetičnu aktivnost etarskog ulja i ekstrakata *M. piperita* poreklom iz Srbije i pokazali da je njihova aktivnost prema α -amilazi znatno niža nego prema α -glukozidazi, bez obzira na korišćenu metodu ekstrakcije i rastvarač, što je u skladu sa rezultatima naše studije. Sličan trend je primećen i u studiji Cam i sar. (2020), s tim da u njihovom istraživanju vodeni ekstrakt ove biljke nije imao aktivnost prema α -amilazi, dok se za inhibiciju α -glukozidaze ovim ekstraktom smatra da su zadužena pre svega fenolna jedinjenja poput rozmarinske i kafene kiseline i katehina. Za razliku od rezultata prethodno izloženih studija, Molan i Mahdy (2016) su za vodeni ekstrakt *M. piperita* koncentracije 5 mg/mL poreklom iz Iraka zabeležili 58,7% inhibicije aktivnosti α -amilaze i 84,7% inhibicije aktivnosti α -glukozidaze, što znači da ovaj ekstrakt ima znatno niži efekat u odnosu na ekstrakt biljke ispitivan u okviru ove doktorske disertacije.

² Streptozotocin je lek koji se koristi u hemioterapiji, a takođe specifično uništava β -ćelije pankreasa, čime dovodi do smanjenja nivoa insulina. Ovaj lek se često upotrebljava u istraživanjima za indukovanje dijabetesa kod glodara (Azimi i sar., 2021).

Ocimum basilicum

Ekstrakti *O. basilicum* ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji nisu pokazali značajnu antidijabetičnu aktivnost (Grafik 18). Ipak, brojne studije su pokazale hipoglikemijski, hipolipidemijski i hepatoprotektivni efekat ekstrakata *O. basilicum* kako *in vitro*, tako i *in vivo* (Etsassala i sar., 2021). U studiji El-Beshbishy i Bahashwan (2012), vodeni ekstrakt *O. basilicum* je inhibirao aktivnost α -glukozidaze na nižim koncentracijama nego aktivnost α -amilaze, međutim autori su koristili znatno veće koncentracije ekstrakta: IC₅₀ 21,31 do 42,5 mg/mL. Kao i u prethodnoj studiji, i u studiji Shanak i sar. (2021), metanolni ekstrakt ove biljke je ispoljio jaču inhibiciju α -glukozidaze u odnosu na α -amilazu. Za vodeni ekstrakt ove biljke je takođe pokazano da pored inhibicije ova dva enzima, dovodi i do značajnog smanjenja holesterola i triglicerida u plazmi, u akutnoj hiperlipidemiji izazvanoj korišćenjem Triton VR-1339 kod pacova (Ch i sar., 2015), dok je kod pacova sa streptozotocinom indukovanim dijabetesom doveo do hipoglikemijskog efekta (Purushothaman i sar., 2018).

Origanum majorana

Ekstrakti *O. majorana* su pokazali značajan inhibitorni potencijal prema α -glukozidazi, posebno etanolni ekstrakt, koji je u koncentraciji 250 μ g/mL inhibirao 55,52% aktivnosti ovog enzima, što se nije značajno razlikovalo u poređenju sa akarbozom. Metanolni i vodeni ekstrakti su, sa druge strane imali značajno slabiju aktivnost od etanolnog ekstrakta (Grafik 18).

Pretragom literature je ustanovljeno da ekstrakti *O. majorana* nisu često bili objekat istraživanja inhibitorne aktivnosti α -amilaze i α -glukozidaze. Ipak, za metanolni ekstrakt listova ove biljke je pokazano da inhibira aktivnost α -glukozidaze, pri čemu se smatra da su za tu aktivnost zaslužni flavonoidi izolovani iz ovog ekstrakta: skutelarein, 6-hidroksiapigenin-7-*O*- β -D-glukopiranozid, 6-hidroksiluteolin-7-*O*- β -D-glukopiranozid, 6-hidroksiapigenin-7-*O*-(6-*O*-feruloil)- β -D-glukopiranozid i 6-hidroksiluteolin-7-*O*-(6-*O*-feruloil)- β -D-glukopiranozid (Kawabata i sar., 2003). Za razliku od toga, *in vivo* istraživanja ove biljke su ipak češća i pokazano je da antidijabetična svojstva ekstrakata *O. majorana* potiču od fenolnih kiselina i flavonoida kao što su rozmarinska i ferulinska kiselina, apigenin, naringenin, hesperetin, luteolin, arbutin, kvercetin i katehin. Takođe, neke studije su pokazale da ferulinska kiselina ispoljava antidijabetični potencijal putem nekoliko mehanizama: povećanja insulina u plazmi, stimulacije sinteze glikogena poreklom iz jetre – glikoneolize, povećanja aktivnosti glukokinaze i smanjenja regulacije glukozo-6-fosfataze i fosfoenolpiruvat karboksikinaze (van Son i sar., 2011). Pored toga, za apigenin i naringenin je nađeno da značajno poboljšavaju homeostazu glukoze smanjenjem nivoa glukoze u krvi, serumskih lipida i indeksa rezistencije na insulin, poboljšavaju toleranciju na glukozu, a takođe poboljšavaju i vaskularnu endotelnu disfunkciju, povećavaju proizvodnju NO posredovanu insulinom i inhibiraju inflamatorni odgovor u endotelnim ćelijama posredstvom NF- κ B (Jung i sar., 2016; Ren i sar., 2016). Osim toga, pomenuta fenolna jedinjenja, kao i neki terpeni, efikasno smanjuju nivo RVK-a i obnavljaju β -ćelije pankreasa od efekata oksidativnog stresa (Bouyahya i sar., 2021; Etsassala i sar., 2021), čime se njihova antidijabetična aktivnost dovodi u direktnu vezu sa njihovim potentnim antioksidativnim sposobnostima.

Origanum vulgare

Među ispitivanim ekstraktima *O. vulgare*, najbolji antidijabetični potencijal su pokazali vodeni i etanolni ekstrakti koncentracije 250 μ g/mL, 47,35 i 42,33% inhibicije α -glukozidaze, što je preko tri puta viši nivo inhibicije u odnosu na metanolni ekstrakt (Grafik 18). Agatonović-Kuštrin i sar. (2020) su pokazali visok nivo inhibicije α -amilaze primenom etil-acetatnih ekstrakata *O. vulgare*, *S. officinalis* i *Th. vulgaris*. S druge strane, u studiji Parra i sar.

(2021), etanolni ekstrakt *O. vulgare* je imao šest puta slabiji efekat na aktivnost α -amilaze u odnosu na aktivnost α -glukozidaze, pri čemu je ekstrakt *O. vulgare* bio aktivniji od akarboze u testu inhibicije aktivnosti α -glukozidaze. Autori sugerišu da bi za pomenute aktivnosti mogli biti odgovorni sinergistički efekti terpena i fenolnih kiselina koje se nalaze u ovim ekstraktima. Pored inhibicije, pre svega, α -glukozidaze, pokazano je da ekstrakti *O. vulgare* mogu dovesti do smanjenja apsorpcije glukoze, inhibicije glukoneogeneze, poboljšanja metabolizma lipida, kao i pojačane ekspresije/funkcije glukoznog transportera 2, što se takođe povezuje sa visokim sadržajem flavonoida, fenolnih glikozida i fenolnih kiselina. Primena ekstrakata *O. vulgare* je takođe dovela do smanjenja oksidativnog oštećenja, što za posledicu ima smanjenje tolerancije na insulin i hipoglikemiju (Yu i sar., 2021).

Rosmarinus officinalis

Ekstrakti *R. officinalis* su imali značajno slabiju aktivnost u odnosu na akarbozu, pri čemu su vodeni i metanolni ekstrakti koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ ostvarili sličan procenat inhibicije α -glukozidaze (20,72 i 18,24%), dok je najslabiju aktivnost prema ovom enzimu ispoljio etanolni ekstrakt (Grafik 18). Ekstrakti *R. officinalis* su retko ispitivani u smislu inhibicije aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze. U studiji Cazzola i sar. (2011), vodeni ekstrakt *R. officinalis* koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ inhibirao je 30% aktivnosti α -amilaze. S druge strane, u studiji Kwon i sar. (2006), vodeni i etanolni ekstrakti *R. officinalis* nisu inhibirali aktivnost α -amilaze, već samo aktivnost α -glukozidaze, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Ispitivanjem aktivnosti frakcija ekstrakta *R. officinalis* bogatih flavonoidima, Belmouhoub i sar. (2017) su pokazali da je dietil-etarska frakcija ekstrakta efikasnija u inhibiciji α -glukozidaze od butanske frakcije, koja je ujedno bila aktivnija od akarboze. Ovaj rezultat je interesantan iz razloga što je ukupni sadržaj fenola i flavonoida u dietil-etarskoj frakciji bio niži nego u butanskoj frakciji, iz čega se može zaključiti da druge, nepolarne komponente poput flavonoidnih aglikona, mogu imati veći udeo u ispoljenoj aktivnosti prema α -glukozidazi. Ekstrakti *R. officinalis* i njihovi polifenoli i terpeni, pre svega rozmarinska i karnozinska kiselina imaju značajne antidijabetičke efekte u različitim *in vivo* modelima DT2 i efekte slične insulinu u *in vitro* modelima, što je takođe dovedeno u vezu sa njihovim jakim antioksidativnim dejstvima (Etsassala i sar., 2021).

Salvia officinalis

Sva tri ispitivana ekstrakta *S. officinalis* su ispoljila značajno slabiju inhibiciju α -amilaze i α -glukozidaze u odnosu na akarbozu. Ipak, metanolni i etanolni ekstrakti su pokazali sličnu inhibitornu aktivnost prema α -glukozidazi (14,78 i 10,9% inhibicije α -glukozidaze, respektivno), dok je vodeni ekstrakt imao značajno slabiju aktivnost (Grafik 18). Mahdi i sar. (2020) i Javid i sar. (2021) su pokazali da etanolni i metanolni ekstrakti ove biljke imaju jači inhibitorni efekat na aktivnost α -amilaze nego na aktivnost α -glukozidaze, što nije slučaj sa našim rezultatima, kao ni sa rezultatima studija Pereira i sar. (2018) i Mocan i sar. (2020). Pored inhibicije pomenutih enzima, u drugim studijama je pokazano da *S. officinalis* ima širok spektar primena, uključujući primenu u terapiji dijabetesa zahvaljujući svojim hipoglikemijskim i hipolipidemijskim efektima (Etsassala i sar., 2021). Metanolni ekstrakti *S. officinalis* značajno smanjuju nivo glukoze u serumu pacova sa dijabetesom tipa 1. S druge strane, u poređenju sa metforminom, poznatim antidijabetičnim lekom koji se koristi u terapiji DT2, je pokazano da ekstrakti ove biljke imaju sličan terapijski potencijal kao pomenuti lek. Vodeni ekstrakt *S. officinalis* smanjuje proizvodnju glukoze u jetri, povećava delovanje insulina, a pored toga ostvaruje i efekte slične insulinu (Eidi i Eidi, 2009).

Satureja montana

Među ekstraktima *S. montana*, vodeni ekstrakt je imao najbolju antidijabetičnu aktivnost izmerenu u testu inhibicije α -glukozidaze, pri čemu je inhibirao 72,11% aktivnosti ovog enzima, što je značajno više u odnosu na pozitivnu kontrolu. S druge strane, etanolni i metanolni ekstrakti pri istoj koncentraciji su postigli značajno niži procenat inhibicije aktivnosti α -glukozidaze (Grafik 18). U studiji Trifonova i sar. (2021), vodeni ekstrakt *S. kitaibelii* je pokazao čak šest puta veću inhibiciju α -glukozidaze od akarboze. Metanolni ekstrakt *S. tymbra*, s druge strane, je imao znatno slabiju aktivnost od akarboze i u testovima inhibicije α -amilaze i α -glukozidaze, pri čemu je bio jedan od retkih ekstrakata koji je jače inhibirao aktivnost α -amilaze od α -glukozidaze (Tundis i sar., 2010), što nije bio slučaj sa našim rezultatima. Mirazi i sar. (2016) su, s druge strane, povezali antioksidativni i anti-inflamatorni efekat etanolnog ekstrakta *S. montana*, sa njegovim antidijabetičnim dejstvom kod pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom. Ovi autori smatraju da, budući da streptozotocin oštećuje β -ćelije pankreasnih ostrvaca i ćelijsku DNK, ovaj ekstrakt može doprineti zaštiti ili regeneraciji oštećenog tkiva pankreasa od upale i nekroze povećanjem aktivnosti superoksid dismutaze i glutation peroksidaze, čime se utiče na tok ove bolesti i sprečava povećanje glikemije i insulina kod bolesnih pacova.

Sideritis scardica

Ekstrakti *S. scardica* nisu pokazali značajan antidijabetični potencijal u testiranim koncentracijama, dok je jedino metanolni inhibirao aktivnost α -glukozidaze, i to na najvišoj testiranoj koncentraciji (21,7% inhibicije) (Prilog 7). Efekti ekstrakata *S. scardica* na aktivnost α -amilaze i α -glukozidaze nisu do sada ispitivani, međutim ispitivani su efekti drugih vrsta roda *Sideritis*. Tundis i sar. (2010) su pokazali da je metanolni ekstrakt *S. perfoliata* imao slabiju aktivnost od heksanskog ekstrakta, mada su oba ekstrakta imali slabiju aktivnost prema α -amilazi nego prema α -glukozidazi. Za razliku od prethodne studije, metanolni ekstrakti *S. albiflora*, *S. leptoclada*, *S. pisidica* i *S. stricta*, su inhibirali aktivnost α -amilaze. Metanolni ekstrakti ovih biljaka nisu ispoljili efekat u testiranim koncentracijama prema α -glukozidazi, dok su heksanski imali bolju aktivnost (Deveci i sar., 2020). Pored ovih studija, antidijabetična aktivnost vrsta roda *Sideritis* nije detaljnije istražena.

Teucrium chamaedrys* i *T. montanum

Ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* nisu pokazali značajan antidijabetični potencijal, mada se može primetiti da su ekstrakti *T. montanum* koncentracije 500 $\mu\text{g/mL}$ ipak inhibirali aktivnost α -glukozidaze u nešto višem procentu (9,53 – 11,97%) u odnosu na ekstrakate *T. chamaedrys* (3,37 – 6,63%) (Prilog 7). Anti- α -amilazna i anti- α -glukozidazna aktivnost ekstrakata *T. chamaedrys* i *T. montanum* su do sada istraživane samo u okviru jedne studije, gde je pokazano da je etanolni ekstrakt *T. montanum* imao bolju inhibitornu aktivnost prema ovim enzimima od ekstrakta *T. chamaedrys*, pri čemu su oba ekstrakta ispoljili izuzetno slabu aktivnost prema α -amilazi (Vujanović i sar., 2019), što je u saglasnosti sa našim rezultatima. Autori sugerišu da je ispoljena, kako anti- α -amilazna, tako i anti- α -glukozidazna, aktivnost povezana sa visokim sadržajem fenolnih jedinjenja u ovim ekstraktima, kao i sa njihovom izraženom antioksidativnom aktivnošću, što se takođe pretpostavlja za druge vrste ovog roda koje imaju antidijabetični potencijal (Vujanović i sar., 2019; Etsassala i sar., 2021).

Pored toga, za ekstrakate *T. polium* je poznato da poseduje hipoglikemijski i hipolipidemijski potencijal, te se neretko predlaže za dalja istraživanja antidijabetične aktivnosti. Takođe, vodeni ekstrakt *T. cubense* dovodi do smanjenja nivoa glukoze u plazmi kod zdravih zečeva, dok u mišijim i humanim ćelijama osetljivim na insulin dovodi do

aktivacije apsorpcije glukoze, a u adipocitima rezistentnim na insulin dovodi do inkorporacije glukoze (Etsassala i sar., 2021).

Thymus serpyllum* i *Th. vulgaris

Među ispitivanim ekstraktima familije Lamiaceae koncentracije 250 µg/mL, ekstrakti *Th. serpyllum* su pokazali najviši antidijabetični potencijal, posebno vodeni, koji je inhibirao čak 96,73% aktivnosti α -glukozidaze, što je značajno više u odnosu na akarbozu pri istoj koncentraciji. Etanolni i metanolni ekstrakti ove biljke su imali sličan efekat za inhibiciju ovog enzima kao akarboza (59,92 i 57,86% za etanolni i metanolni ekstrakt, respektivno). Sa druge strane, ekstrakti *Th. vulgaris* su imali slabije antidijabetično dejstvo prema α -glukozidazi od ekstrakata *Th. serpyllum*. Ipak, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* je inhibirao ovaj enzim u sličnom procentu kao i akarboza (62,31% za etanolni ekstrakt), dok su metanolni i vodeni ekstrakti imali značajno slabije dejstvo (Grafik 18).

Za razliku od ekstrakata drugih vrsta roda *Thymus*, ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* nisu do sada bili objekat studija anti- α -amilazne i anti- α -glukozidazne aktivnosti, a za ekstrakte *Th. serpyllum* nisu ispitivani ni drugi aspekti antidijabetične aktivnosti. U studiji Azimi i sar. (2021) je pokazano da etanolni ekstrakti *Th. vulgaris* ne dovode do normalizacije hiperglikemije, što ukazuje na to da se delovanje ekstrakta ove biljke na disfunkciju jetre ne odnosi na sistemske parametre povezane sa metabolizmom glukoze, već je primećeno da ovaj ekstrakt nastoji da uravnoteži dislipidemiju kod pacova sa dijabetesom indukovanim streptozotocinom. Zapravo, pokazano je da etanolni ekstrakt ove biljke ima hipolipidemijski efekat time što dovodi do smanjenja triglicerida i LDL-holesterola i povećanja HDL-holesterola. Pored toga, utiče na smanjenje ekspresije *bcl-2*, *bax* i gena za kaspaze 3 i 9, čime ispoljava anti-apoptotske efekte i pomaže u održavanju ćelija tkiva jetre. Autori sugerišu da se ove aktivnosti povezuju sa visokim sadržajem fenolnih i terpenkih jedinjenja u ekstraktu ove biljke, a takođe i sa njenim antioksidativnim efektima.

Slab inhibitorni efekat prema α -amilazi, kao i jak inhibitorni efekat prema α -glukozidazi, kakav su ispoljile i ispitivane vrste familije Lamiaceae, predstavlja poželjnu strategiju u prevenciji i terapiji DT2. Naime, α -amilaza razlaže skrob na disaharide, a α -glukozidaza razlaže oligo- i disaharide na monosaharide, te se smatra da je inhibicija aktivnosti α -glukozidaze ipak značajnija od inhibicije aktivnosti α -amilaze zbog toga što se na takav način može efikasnije usporiti dostupnost ugljenih hidrata koji bi bili supstrat za produkciju glukoze u crevima (Kajaria i sar., 2013). Pored toga, treba naglasiti da antidijabetični lekovi koji funkcionišu na bazi inhibicije α -amilaze često dovode do nadimanja, abdominalnih bolova, dijareje i drugih tegoba gastrointestinalnog trakta kod pacijenata sa dijabetesom, čime se povećava bakterijska fermentacija nesvarenih ugljenih hidrata u crevima (Sales i sar., 2012).

Rezultati dobijeni u *in vitro* uslovima ipak ne mogu u potpunosti objasniti mehanizme koji utiču na digestiju ugljenih hidrata kod ljudi, posebno ako se ima u vidu činjenica da su gotovo sve dosadašnje studije rađene na α -glukozidazi poreklom iz kvasca, a pokazano je da se molekularna struktura ovog enzima u velikoj meri razlikuje od strukture humane α -glukozidaze, zbog čega se može očekivati da bi kod ljudi terapijski agensi imali drugačiji efekat (Dej-adisai i sar., 2021).

Za kraj, značajno je naglasiti da pored molekularnih mehanizama, na efikasnost inhibicije ovih enzima značajan uticaj imaju i biološka dostupnost ispitivanih agenasa, pH,

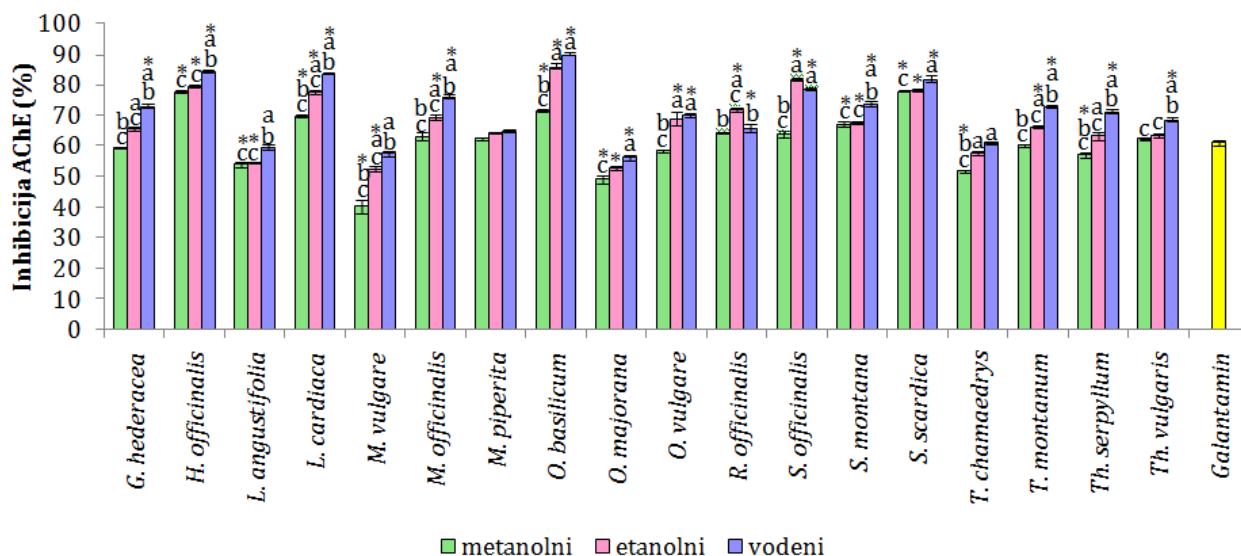
temperatura, odnos supstrata i enzima, kao i vreme odigravanja reakcije, odnosno aktivnost enzima u organizmu.

4.7. Antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna aktivnost

Nedavno je otkriveno da enzim α -amilaza ima značajnu ulogu u neuroinflamaciji koja je povezana sa Alchajmerovom bolešću. Naime, kako bi pravilno funkcionisale, moždane ćelije zahtevaju konstantno snabdevanje glukozom, a kako bi se sprečio rizik od nedostatka glukoze u slučaju povišene potrebe za energijom ili hipoglikemije, mozak koristi glikogenske polisaharide kao depo rezervne energije. Drugim rečima, aktivnost α -amilaze u mozgu predstavlja rezervni sistem koji primarno funkcionise u patološkim stanjima kada je astrocitima potrebna energija za brzo reagovanje (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020). Zbog toga se smatra da u slučaju Alchajmerove bolesti, nizak nivo aktivnosti ovog enzima može dovesti do progresivnog gubitka pamćenja (Byman i sar., 2021), te je značajno da primenjeni terapeutici ne vrše njegovu inhibiciju. S druge strane, poznato je da osobe obolele od dijabetesa imaju povećanu incidencu oboljevanja od Alchajmerove bolesti (Mittal i sar., 2016), a lekovi koje koriste pacijenti sa dijabetesom se često baziraju na inhibiciji aktivnosti α -amilaze (Sales i sar., 2012). Zbog toga je naredna istraživanja potrebno usmeriti ka detaljnijem definisanju uloge ovog enzima u fiziološkim uslovima u mozgu, posebno u mozgu osoba sa neurodegenerativnim bolestima. Budući da biljke familije Lamiaceae ispitivane u ovoj doktorskoj disertaciji nisu inhibirale α -amilazu, u narednim koracima ove studije je ispitan njihov neuroprotektivni efekat u biohemijskim, ali i biološkim modelima.

Antineurodegenerativna aktivnost ekstrakata ispitivanih biljaka familije Lamiaceae u ovom radu je određena korišćenjem dva testa – testa inhibicije enzima AChE i testa inhibicije enzima tirozinaze. Rezultati ovih istraživanja su pokazali da ispitivani ekstrakti nemaju dejstvo zavisno od koncentracije i prikazani su u Prilogu 8 i na Graficima 19 i 20.

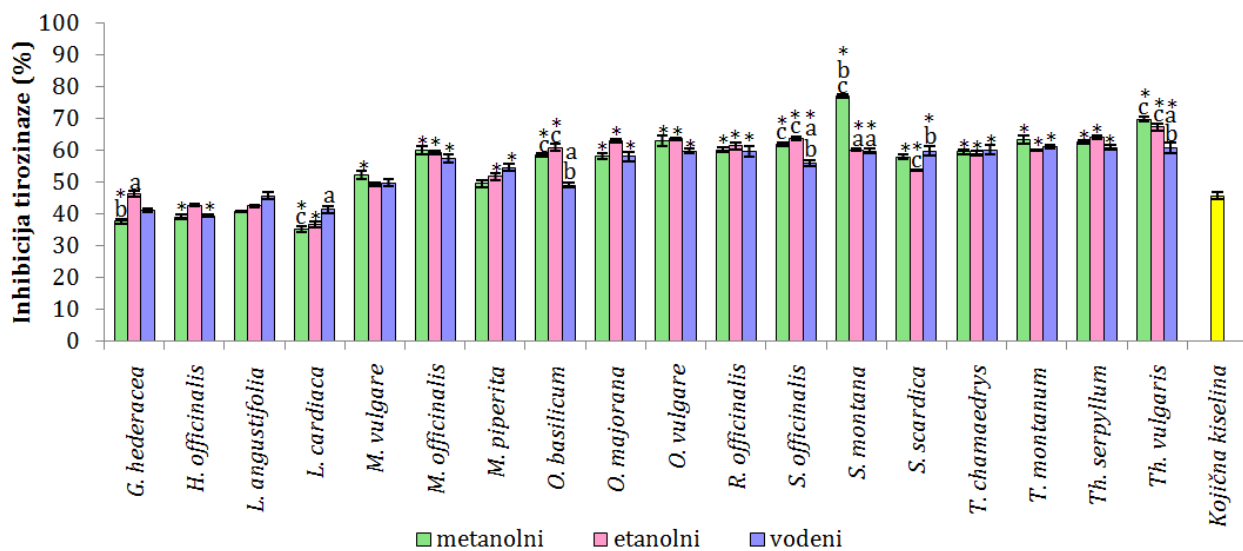
Rezultati testa inhibicije aktivnosti enzima acetilholinesteraze ekstraktima ispitivanih biljaka familije Lamiaceae koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su prikazani na Grafiku 19, pri čemu se može primetiti da su vodeni ekstrakti značajno više inhibirali aktivnost enzima AChE u odnosu na ostale tipove ekstrakata, osim u slučaju ekstrakata *R. officinalis* i *S. officinalis*, kod kojih su etanolni bili najaktivniji. Statistička analiza je takođe pokazala da je većina ekstrakata ispoljila aktivnost sličnu ili veću u poređenju sa pozitivnom kontrolom, galantaminom (60,97%), osim u slučaju alkoholnih ekstrakata *L. angustifolia*, *M. vulgare*, svih ekstrakata *O. majorana* i metanolnog ekstrakta *T. chamaedrys*. Najjaču aktivnost su pokazali ekstrakti *O. basilicum*, posebno vodeni i etanolni (86-90%), koji su bili oko 2,2 puta aktivniji od metanolnog ekstrakta *M. vulgare*, koji je pri istoj koncentraciji ispoljio najmanju sposobnost inhibicije aktivnosti AChE. Statistička analiza je pokazala da odabir rastvarača za ekstrakciju značajno utiče na ispoljenu aktivnost ekstrakata u inhibiciji AChE.



Grafik 19. Inhibicija aktivnosti enzima acetilholinesteraze ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su predstavljeni kao procenti (%) \pm standardna greška u poređenju sa pozitivnom kontrolom, galantaminom.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, * vs. galantamin ($p < 0,05$)



Grafik 20. Inhibicija aktivnosti enzima tirozinaze ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su predstavljeni kao procenti (%) \pm standardna greška u poređenju sa pozitivnom kontrolom, kojičnom kiselinom.

^a vs. metanolni ekstrakt, ^b vs. etanolni ekstrakt, ^c vs. vodeni ekstrakt, * vs. kojična kiselina ($p < 0,05$)

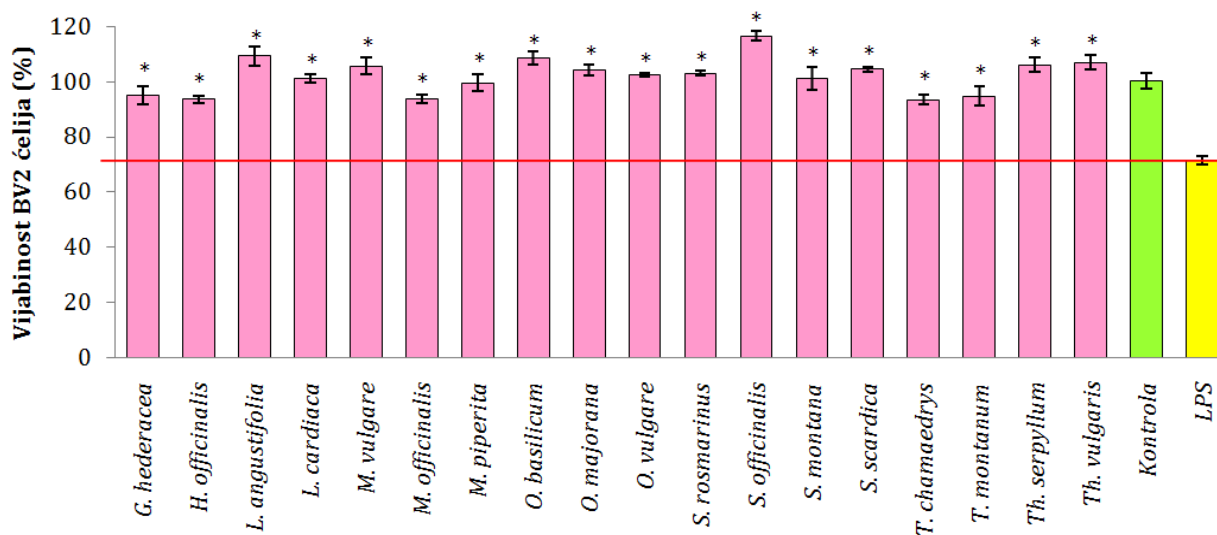
Inhibicija aktivnosti tirozinaze je procenjena u odnosu na kojičnu kiselinu, a rezultati ovog testa za ekstrakte koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su prikazani na Grafiku 20. U ovom testu odabir rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju u većini slučajeva nije igrao značajnu ulogu, osim u slučaju *G. hederacea*, *O. basilicum*, *S. officinalis*, *S. montana* i *Th. vulgare*, gde alkoholni ekstrakti imaju značajno veću aktivnost u odnosu na vodeni ekstrakt. S druge strane, u slučaju *L. cardiaca* i *S. scardica*, vodeni ekstrakt je pokazao najjaču aktivnost. Takođe, većina ekstrakata, osim metanolnog *G. hederacea*, metanolnog i vodenog *H. officinalis*, kao i oba

alkoholna ekstrakta *L. cardiaca*, ima sličnu ili značajno višu aktivnost od kojične kiseline (45,59%). Najjaču aktivnost je ispoljio metanolni ekstrakt *S. montana* (76,97%), dok je metanolni ekstrakt *L. cardiaca* imao upola slabiju aktivnost.

Dok je aktivnost biljnih ekstrakata i etarskih ulja na inhibiciju enzima asociranih sa neurodegeneracijom, posebno AChE i tirozinaze, intenzivno proučavana, njihova antineuroinflamatorna aktivnost je ređe bila predmet istraživanja iako je utvrđena veza između unosa hrane bogate supstancama sa antioksidativnim dejstvom i smanjene incidence mnogih inflamatornih bolesti u čijoj se osnovi nalazi oksidativni stres.

S obzirom na to da su ispitivani ekstrakti pokazali značajnu antineurodegenerativnu aktivnost, u sledećem koraku ove doktorske disertacije je ispitan njihov antineuroinflamatorni potencijal. Antineuroinflamatorna aktivnost je testirana samo za etanolne ekstrakte biljaka familije Lamiaceae. Uticaj etanolnih ekstrakata u koncentraciji 10 µg/mL na funkciju ćelija mikroglije, BV2 ćelije, koje su aktivirane lipopolisaharidom (LPS) je ispitan korišćenjem tri testa, MTT, NBT i Grisovog testa, a rezultati su prikazani na Graficima 21-24.

U MTT testu je određen efekat etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na metaboličku aktivnost LPS-om aktiviranih BV2 ćelija (Grafik 21), pri čemu je cilj ovog testa bio da se prati da li nakon 24-časovnog tretmana ekstraktima ispitivanih biljaka nivo metaboličke aktivnosti ovih ćelija može da se vrati na nivo neaktivnih ćelija. Zaista, pokazano je da svi ekstrakti dovode do značajnog povećanja metaboličke aktivnosti ovih ćelija, do ili iznad nivoa kontrolnih ćelija.



Grafik 21. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen MTT testom.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 10 µg/mL su predstavljeni netretirane ćelije, dok LPS označava ćelije tretirane samo LPS-om.

* vs. kontrola (p<0,05)

U NBT testu je procenjen uticaj etanolnih ekstrakata na produkciju RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija (Grafik 22). Rezultati ovog testa su prikazani kao indeks, koji predstavlja odnos između apsorbanci LPS-om aktiviranih i ekstraktima tretiranih ćelija i negativne kontrole, izračunat na 100% vijabilnih ćelija. Svi etanolni ekstrakti biljaka familije Lamiaceae su značajno uticali na smanjenje produkcije RVK-a od strane LPS-om aktiviranih

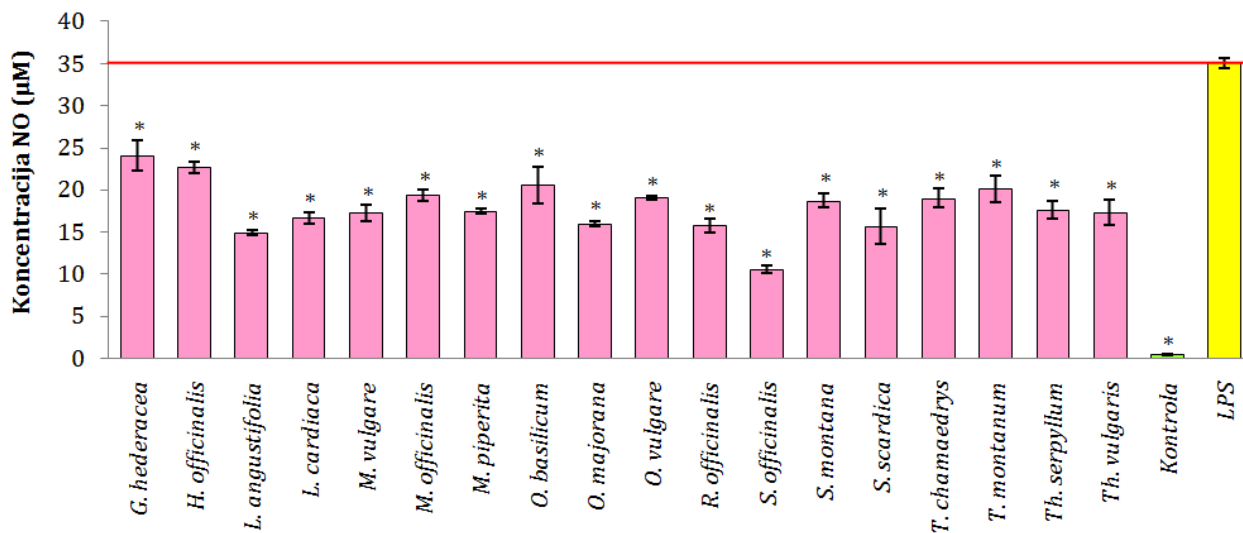
BV2 ćelija, pri čemu je nivo produkcije RVK-a u ekstraktima tretiranim ćelijama doveden na nivo produkcije RVK-a od strane netretiranih, kontrolnih ćelija.



Grafik 22. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen NBT testom.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 10 µg/mL su predstavljeni kao srednja vrednost indeksa NBT ± standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije, dok LPS označava ćelije tretirane samo LPS-om.

* vs. kontrola (p<0,05)



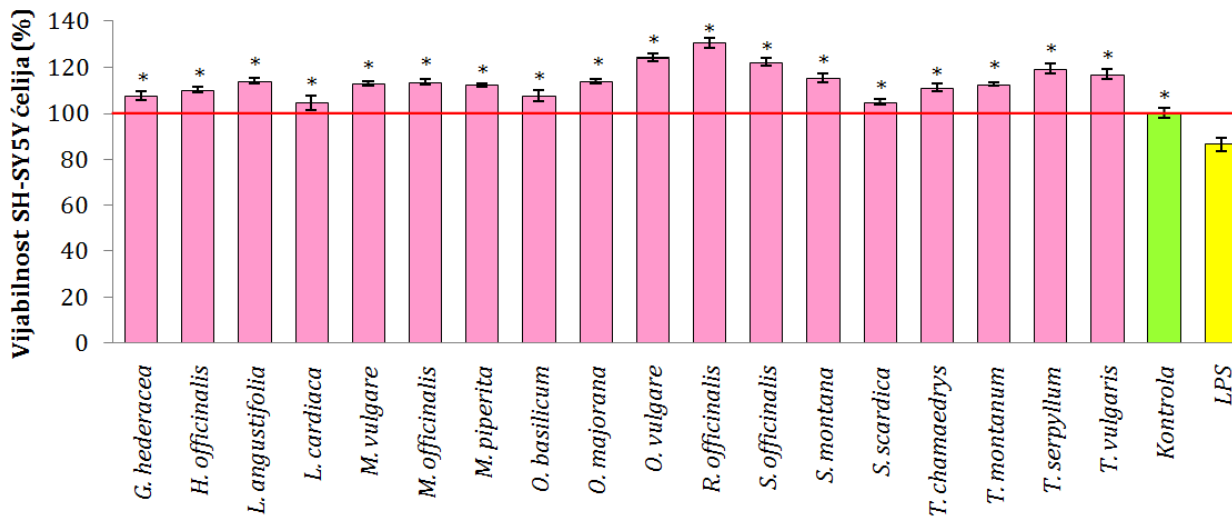
Grafik 23. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen Grisovim testom.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 10 µg/mL su predstavljeni kao srednja vrednost koncentracije azot monoksida (NO) ± standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije, dok LPS označava ćelije tretirane samo LPS-om.

* vs. kontrola (p<0,05)

U Grisovom testu, kontrolne ćelije su proizvele izuzetno male koncentracije NO (0,42 μM), dok su BV2 ćelije aktivirane LPS-om proizvele velike koncentracije NO (35,03 μM) (Grafik 23). Rezultati ovog testa su pokazali da etanolni ekstrakti utiču na aktivirane ćelije da značajno smanje produkciju NO-a koja je indukovana LPS-om.

Na kraju, istraživanje antineuroinflammatorne aktivnosti etanolnih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae je zaokruženo ispitivanjem njihovog uticaja primenom modela transfera supernatanta LPS-om aktiviranih i ekstraktima tretiranih BV2 ćelija u kulturu SH-SY5Y neurona. Ovi neuroni su tretirani supernatantima BV2 ćelija koje su prethodno bile aktivirane LPS-om i tretirane ekstraktima biljaka (Grafik 24). Rezultati ovog testa su pokazali da svi testirani biljni ekstrakti normalizuju vijabilnost SH-SY5Y neurona na nivo netretiranih, kontrolnih ćelija.



Grafik 24. Neuroprotektivni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae.

Rezultati za ekstrakte koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ su predstavljeni kao srednja vrednost vijabilnosti SH-SY5Y neurona \pm standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije, dok LPS označava ćelije tretirane samo LPS-om.

* vs. kontrola ($p < 0,05$)

Mikroglia predstavljaju rezidentne ćelije imunskog sistema mozga, koje se karakterišu jedinstvenim homeostatskim fenotipom i čvrstom regulacijom mikrookruženja centralnog nervnog sistema (CNS). Svoje funkcije, ćelije mikroglije ostvaruju tako što utiču na vijabilnost neurona i sinaptogenezu, a takođe se aktiviraju u različitim patološkim stanjima CNS-a (povredama mozga, infekcijama, moždanom udaru i neurodegeneraciji) (Colonna i Butovsky, 2017). U eksperimentalnim uslovima se ove ćelije najčešće aktiviraju LPS-om, koji je termostabilna neproteinska komponenta ćelijskog zida bakterija. Vezivanjem LPS za receptore na mikrogliji dovodi do aktivacije protein kinaze C, protein-tirozin kinaze i NF- κ B, koji su uključeni u oslobađanje citotoksičnih faktora, kao što su NO i proinflammatorni citokini (Qin i sar., 2004). Stoga je aktivacija mikroglije LPS-om dobar model sistem za ispitivanje antineuroinflammatornog efekta različitih supstanci.

Ćelije nervnog sistema su podložne delovanju mehanizama oksidativnog stresa zbog visoke metaboličke aktivnosti, odnosno velike potrošnje kiseonika (Rocamora i sar., 2020), dostupnosti tranzicionih metala i auto-oksidabilnih kateholamina, obilju polinezasićenih masnih kiselina, kao i prisustva relativno neefikasnih mehanizama antioksidativne odbrane. Oksidativni stres je pokretač patogeneze mnogih bolesti, između ostalih i neurodegenerativnih, prvenstveno zbog štetnog delovanja RVK-a na kritične ćelijske

komponente kao što su proteini, fosfolipidi i DNK, što može dovesti do poremećaja ćelijske homeostaze, a što dalje ima implikacije u razvoju i/ili progresiji bolesti. U patološkim stanjima, proizvodi oksidativnog oštećenja se često akumuliraju u velikim količinama u tkivima i telesnim tečnostima, a akumulacija markera oksidativnih oštećenja lipida, proteina i nukleinskih kiselina, kao i prelaznih metala kao što su gvožđe i bakar, dokazana je u moždanom tkivu mnogih pacijenata obolelih od Alchajmerove bolesti. Iako RVK mogu da interaguju sa velikim brojem biomolekula unutar neurona, oksidativno oštećenje proteina bi posebno moglo biti važno u neurodegenerativnim bolestima jer dovodi do poremećaja metabolizma, proteostaze (dinamičke regulacije uravnoteženog, funkcionalnog proteoma) i aberantne redoks signalizacije u neuronima i ćelijama mikroglije, aktivacije pojedinih kinaza ili oksidativne modifikacije redoks-osetljivih transkripcionih faktora (Ganguly i sar., 2021).

Mitohondrije su centri intenzivnog ćelijskog disanja, zbog čega one ujedno predstavljaju i izvor RVK-a koji mogu izazvati oksidativni stres. Povećanjem RVK-a, mitohondrije indukuju ćeliju da se podvrgne apoptozi povećanjem permeabilnosti spoljašnje mitohondrijalne membrane, smanjenjem mitohondrijalnog transmembranskog potencijala, oslobađanjem citohroma C i daljom produkcijom RVK-a. Drugim rečima, RVK proizvedeni u mitohondrijama mogu izazvati oštećenje membrane mitohondrija, što može dovesti do apoptoze ćelija (Coelho i sar., 2017). Povećana proizvodnja RVK-a od strane aktivirane mikroglije nastaje aktivacijom NADPH oksidaza, enzima koji učestvuju u stvaranju RVK-a, kao što su superoksid radikal ($O_2^{\cdot-}$) i H_2O_2 (Colonna i Butovsky, 2017). Zbog toga bi inhibicija ovog enzima mogla predstavljati odličnu metu za sprečavanje nastanka oksidativnog stresa kod pacijenata sa neurodegenerativnim oboljenjima, budući da RVK mogu izazvati degeneraciju neurona, a redoks-signalnim putevima mogu stimulisati formiranje i oslobađanje proinflamatornih citokina od strane mikroglije (Ganguly i sar., 2021).

Dakle, produžena produkcija RVK-a izazvana proinflamatornim medijatorima može izazvati oksidativno oštećenje DNK molekula. S druge strane, oksidativni stres može biti posledica povećanja proizvodnje RVK-a, smanjenja aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su glutation peroksidaze, superoksid dismutaze i katalaze, ili smanjenja nivoa neenzimskih antioksidanasa poput glutationa. Važno je istaći da RVK imaju važnu ulogu u LPS-indukovanoj toksičnosti aktivacijom NF- κ B, koji indukuje ekspresiju gena za inflamatorne medijatore, čime se oksidativni stres dovodi u direktnu vezu sa inflamatornim procesima, koji zajedno za posledicu mogu imati razvoj brojnih patoloških stanja (Chou i sar., 2019).

S druge strane, NO je molekul koji se sintetiše zahvaljujući azot oksid sintazama (engl. *nitric oxide synthases*, NOS) i ima ključnu ulogu u brojnim fiziološkim procesima kao što su regulacija proliferacije, preživljavanje i diferencijacija neurona budući da funkcioniše kao neurotransmiter, ali i kao vazodilatator. Međutim, NO u reakciji sa superoksid anjonom ($O_2^{\cdot-}$), stvara peroksinitrite (ONOO $^-$), moćne pro-oksidanse koji dovode do oštećenja biomolekula, povećanja peroksidacije lipida, i patoloških procesa uključujući smrt neurona, koja dalje dovodi do razvoja različitih neurodegenerativnih bolesti (Calabrese i sar., 2007; Wahby i sar., 2015; Javadian i sar., 2016). Progres neurodegenerativnih bolesti se sve češće dovodi u vezu sa akutnom ili hroničnom neuroinflamacijom posredovanom mikroglijom. Ovakva neuroinflamacija predstavlja koordinirani ćelijski odgovor na oštećenje tkiva nervnog sistema i karakteriše je oslobađanje proinflamatornih faktora (citokina, proteaza i toksičnih slobodnih radikala) od strane mikroglije. Zbog toga, odgovarajuća regulacija procesa neuroinflamacije olakšava proces oporavka budući da je glavna svrha akutne neuroinflamacije uklanjanje štetnog izvora kako bi se mozak vratio u fiziološko stanje. Međutim, sa druge strane, nekontrolisana neuroinflamacija može izazvati sekundarnu povredu kontinuiranom aktivacijom mikroglije (Yuste i sar., 2015; Colonna i Butovsky, 2017).

Glechoma hederacea

Ekstrakti *G. hederacea* su pokazali odličan antineurodegenerativni i antineuroinflamatorni potencijal. U testu inhibicije AChE se najviše istakao vodeni ekstrakt, koji je inhibirao 73,09% aktivnosti ovog enzima, što je znatno više u odnosu na galantamin, kao i alkoholne ekstrakte (Grafik 19). Pretragom literature je ustanovljeno da do sada nije ispitan uticaj ekstrakata *G. hederacea* na aktivnost enzima AChE.

U testu inhibicije aktivnosti tirozinaze, etanolni ekstrakt *G. hederacea* je ispoljio najbolji potencijal, inhibirajući 46,24% aktivnosti ovog enzima, što se nije značajno razlikovalo od kojične kiseline i vodenog ekstrakta, dok je metanolni ekstrakt ispoljio nešto slabiju aktivnost (Grafik 20). Qiao i sar. (2012) su ispitali efekat vodenog ekstrakta *G. hederacea* koncentracije 200 µg/mL, međutim nije utvrđena značajna inhibitorna aktivnost prema tirozinazi (svega 10% inhibicije), što je znatno manje od naših rezultata. S druge strane, autori su takođe pokazali antimelanogeni efekat ovog ekstrakta, koji je povezan sa njegovom inhibicijom transkripcije gena za tirozinazu.

Chou i sar. (2019) su pokazali da vodeni ekstrakt *G. hederacea* dovodi do inhibicije produkcije NO u LPS-om aktiviranim RAW 264.7 makrofagima, kao i do inhibicije LPS-om indukovane ekspresije iRNK za TNF- α , IL-6 i IL-1 β u RAW 264.7 makrofagima. U ovoj studiji, autori su pokazali da vodeni ekstrakt *G. hederacea* pored toga što smanjuje proizvodnju proinflamatornih medijatora u LPS-om aktiviranim makrofagima, takođe normalizuje njihovu sekreciju i ekspresiju. Pored pomenutih studija, ekstrakti *G. hederacea* do sada nisu bili objekat istraživanja antineuroinflamatorne niti neuroprotektivne aktivnosti, dok je u našem radu pokazano da je etanolni ekstrakt ove biljke imao značajan antineuroinflamatorni efekat u svim primenjenim testovima (Grafici 21-24).

Hyssopus officinalis

Svi ekstrakti *H. officinalis* su ispoljili značajno višu inhibiciju AChE od galantamina, međutim i u ovom slučaju se najviše istakao vodeni ekstrakt, koji je inhibirao 84,49% aktivnosti ovog enzima (Grafik 19). Wszelaki i sar. (2010) su pokazali da metanolni ekstrakti *H. officinalis* nemaju značajnu inhibitornu aktivnost prema AChE, budući da su na 100 µg/mL dobili samo 5,2% inhibicije aktivnosti, što je znatno manje od inhibicije koja je prikazana u ovoj doktorskoj disertaciji (Prilog 8). S druge strane, etanolni ekstrakt *H. officinalis* je ispoljio sličan efekat prema tirozinazi kao kojična kiselina, inhibirajući 42,58% aktivnosti ovog enzima, dok su vodeni i metanolni ekstrakti imali nešto slabije dejstvo (Grafik 20).

Pretragom literature je ustanovljeno da su efekti ekstrakata *H. officinalis* prema tirozinazi, kao i antineuroinflamatorna svojstva njegovog etanolnog ekstrakta, po prvi put ispitani u ovoj doktorskoj disertaciji. Pri tome, etanolni ekstrakt je ispoljio značajnu antineuroinflamatornu aktivnost prema BV2 ćelijama i smanjio je citotoksičnost njihovih solubilnih produkata na SH-SY5Y neurone (Grafici 21-24). U studiji Salehi i Setorki (2017), pokazano je da etarsko ulje *H. officinalis* poseduje neuroprotektivni potencijal tako što kod pacova promovise pamćenje i učenje povećanjem opšteg antioksidativnog kapaciteta.

Lavandula angustifolia

U testu inhibicije AChE, najbolju aktivnost među ekstraktima *L. angustifolia* ispoljio je vodeni ekstrakt (59,4% inhibicije), što se nije značajno razlikovalo od aktivnosti pozitivne kontrole. Za razliku od toga, etanolni i metanolni ekstrakti su imali značajno slabije dejstvo od vodenog ekstrakta, kao i od pozitivne kontrole (Grafik 19). Ferreira i sar. (2006) su pokazali da dekoka *L. angustifolia* (500, 1000 i 5000 µg/mL) ne dovodi do inhibicije AChE, dok je etanolni ekstrakt (500 i 1000 µg/mL) inhibirao 26,6%, odnosno 28,4% aktivnosti ovog

enzima, što je značajno slabije dejstvo u odnosu na naše rezultate. S druge strane, metanolni ekstrakt je ispoljio gotovo tri puta viši stepen inhibicije AChE u poređenju sa vodenim (Adersen i sar., 2006), što je delimično u saglasnosti sa našim rezultatima.

U testu inhibicije tirozinaze, ekstrakti *L. angustifolia* su pokazali međusobno slično dejstvo, među kojima se izdvojio vodeni ekstrakt sa najvišim stepenom inhibicije (45,66%) (Grafik 20). Aktivnost ovih ekstrakata prema tirozinazi nije detaljno ispitivana, međutim, Hsu i sar. (2007) su pokazali da vodeni ekstrakt *L. angustifolia* koncentracije 40 µg/mL inhibira 50% aktivnosti tirozinaze. Zanimljivo je da su autori pronašli koncentraciono-zavisnu aktivnost uzorka, dok u našem radu zavisnost od koncentracije nije uočena. Adersen i sar. (2006) su sugerisali da je *L. angustifolia* odličan kandidat za dalja ispitivanja antiholinergičke i neuroprotektivne aktivnosti, što su kasnije dokazali i Rabiei i Rafieian-Kopaei (2014) za etanolni ekstrakt *L. angustifolia*, koji dovodi do smanjenja propustljivosti krvno-moždane barijere i oporavka neuroloških funkcija pacova, što se dovede u vezu sa povećanjem endogene antioksidativne odbrane i inhibicijom oksidativnog stresa u mozgu pacova. Međutim, antineuroinflamatorna aktivnost ekstrakata *L. angustifolia* do sada nije testirana, dok je u našem istraživanju pokazano da etanolni ekstrakt ove biljke dovodi do značajnog anti-inflamatornog dejstva (Grafici 21-24).

Leonurus cardiaca

Ekstrakti *L. cardiaca* su pokazali značajan potencijal u inhibiciji AChE, pri čemu su svi inhibirali njegovu aktivnost značajno jače od galantamina. U ovom testu, najviše se istakao vodeni ekstrakt (83,71%), za kojim slede etanolni i metanolni, a statistička analiza je pokazala da je rastvarač igrao značajnu ulogu u ekstrakciji jedinjenja sa sposobnošću inhibicije AChE (Grafik 19). S druge strane, ekstrakti su pokazali slabiju inhibiciju tirozinaze, mada je vodeni ekstrakt imao sličnu aktivnost kao i kojična kiselina (41,33% inhibicije), dok su alkoholni ispoljili međusobno sličan stepen inhibicije (Grafik 20). Angeloni i sar. (2021) su pokazali da etanolni ekstrakt *L. cardiaca* više od dva i po puta efikasnije inhibira aktivnost AChE nego tirozinaze, međutim u poređenju sa pozitivnim kontrolama, ova aktivnost je okarakterisana kao slaba. Ovi rezultati su delimično u saglasnosti sa našima, gde je pokazano da su svi ekstrakti *L. cardiaca* imali jaču inhibitornu aktivnost prema AChE nego prema tirozinazi.

U hemijskom modelu ispitivanja uticaja na inhibiciju NO radikala, vodeni ekstrakt *L. cardiaca* (1000 µg/mL) je pokazao dobar efekat tako što je inhibirao 50% ovih radikala, međutim ova aktivnost je u studiji Wong i sar. (2014) interpretirana kao antioksidativna aktivnost budući da nije rađena na ćelijama nervnog sistema. Etanolni ekstrakt *L. cardiaca* ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazao značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24), međutim slična aktivnost nije ustanovljena u ranijim studijama, već je pokazan samo neuroprotektivni efekat leonurina, alkaloida izolovanog iz *L. cardiaca*. Smatra se da je neuroprotektivni efekat leonurina omogućen njegovim uticajem na smanjenje formiranja RVK-a, čime se održava pravilno funkcionisanje mitohondrija i inhibira ulazak neurona u apoptozu (Qi i sar, 2010).

Marrubium vulgare

U testu inhibicije AChE, vodeni ekstrakt *M. vulgare* je pokazao sličan stepen inhibicije (57,37%), kao i galantamin, dok su etanolni i metanolni ekstrakti imali slabiju inhibitornu aktivnost AChE. Statistička analiza je pokazala da se inhibitorna aktivnost AChE ispitivanih ekstrakata međusobno značajno razlikovala (Grafik 19). Metanolni ekstrakt *M. vulgare* je u studiji Al-Zaban i sar. (2021) inhibirao 50% AChE u koncentraciji 400 µg/mL, što nije u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji, budući da su autori dobili slabiju inhibitornu aktivnost.

U testu inhibicije tirozinaze, metanolni ekstrakt *M. vulgare* koncentracije 250 µg/mL je pokazao jači inhibitorni efekat (52,1%) od kojične kiseline, dok su etanolni i vodeni ekstrakti ispoljili međusobno sličan inhibitorni efekat, kao i efekat sličan kojičnoj kiselini (Grafik 20). U studiji Namjoyan i sar. (2015), etanolni ekstrakt *M. vulgare* je pokazao slabu inhibiciju tirozinaze (IC₅₀ vrednost 2,82 mg/mL), pri čemu je određeno da je to nekonkurentna inhibicija, što znači da se vezuje za enzim-supstrat kompleks, proizvodi deaktivirani enzim-supstrat-inhibitor kompleks i ne može se vezati za slobodnu tirozinazu. S druge strane, kojična kiselina je pokazala mešovitu inhibiciju, što podrazumeva da se može vezati za slobodni enzim i enzim-supstrat kompleks i smanjiti afinitet supstrata za tirozinazu. U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je etanolni ekstrakt *M. vulgare* doveo do značajne antineuroinflamatorne aktivnosti (Grafik 21-24). Shaheen i sar. (2014) su proučavali potencijalni inhibitorni efekat sedam jedinjenja izolovanih iz *M. vulgare* na proizvodnju NO od strane LPS-om aktiviranih makrofaga i utvrdili da su sva jedinjenja imala inhibitorni efekat na proizvodnju NO. Jedinjenje 4',5,7-trihidroksiflavon je inhibiralo čak 98,3% produkcije NO od strane inducibilne NOS (iNOS), i jedino je ovo jedinjenje takođe moglo da inhibira produkciju RVK-a od strane zimozanom³ aktiviranih ukupnih fagocita krvi.

Melissa officinalis

Svi ekstrakti *M. officinalis* su pokazali značajnu inhibitornu aktivnost prema AChE u odnosu na pozitivnu kontrolu, pri čemu se vodeni ekstrakt posebno istakao, inhibirajući 76,09% aktivnosti AChE, za kojim slede alkoholni ekstrakti (preko 60% inhibicije). Statistička analiza je pokazala da se inhibitorna aktivnost AChE ispitivanih ekstrakata međusobno značajno razlikovala (Grafik 19). Dekokt *M. officinalis* iz Portugala nije imao aktivnost prema AChE u koncentracijama nižim od 1000 µg/mL, dok je na 1000 µg/mL inhibirao svega 12,8% aktivnosti ovog enzima. Za razliku od toga, etanolni ekstrakt ove biljke koncentracije 500 µg/mL je inhibirao 17,8% aktivnosti AChE (Ferreira i sar., 2006). Adersen i sar. (2006) su zabeležili izostanak inhibicije AChE metanolnim i vodenim ekstraktima *M. officinalis* iz Danske u koncentraciji 100 µg/mL. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa našim rezultatima prikazanim, gde je prikazano da je vodeni ekstrakt *M. officinalis* aktivniji od njenog etanolnog ekstrakta u svim ispitivanim koncentracijama.

Ekstrakti *M. officinalis* su imali viši inhibitorni potencijal prema tirozinazi od kojične kiseline, pri čemu su svi ekstrakti pokazali sličan inhibitorni efekat, inhibirajući preko 50% aktivnosti tirozinaze (Grafik 20). Pored toga, etanolni ekstrakt je ispoljio značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Jeong i sar. (2018) su pokazali su da je etanolni ekstrakt *M. officinalis* (200 µg/mL) jače inhibirao aktivnost tirozinaze od arbutina, koji je korišćen kao kontrola. Takođe su pokazali da je hloroformska frakcija ekstrakta značajno inhibirala proizvodnju NO od strane RAW 264.7 makrofaga, što ukazuje na njenu anti-inflamatornu aktivnost. S druge strane, rozmarinska kiselina je dovela do smanjenja ekspresije M1 markera iNOS (marker aktivirane mikroglije) i nivoa proinflamatornih faktora, uključujući TNF-α, IL-1β i IL-6, a do povećanja ekspresije M2 markera Arg-1 (asociran sa neuroprotekcijom) i inhibicije produkcije RVK (Coelho i sar., 2017). Dakle, antineuroinflamatorna aktivnost etanolnog ekstrakta *M. officinalis* zabeležena u našoj studiji bi se mogla objasniti visokim nivom rozmarinske kiseline, koja je sposobna da smanji oslobađanje inflamatornih faktora i stvaranje RVK-a i NO-a odgovornih za efektorske funkcije M1 mikroglije.

³ liganda ćelijskog zida kvasaca koji se često koristi u istraživanjima za indukciju inflamacije

Lee i sar. (2008), su ranije pokazali da se u osnovi neuroprotektivne aktivnosti rozmarinske kiseline prema SH-SY5Y ćelijama nalazi odlaganje apoptoze neurona i stimulacija antioksidativnog molekula hem oksigenaze-1. Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima, gde je za ispitivanje neuroprotektivne aktivnosti ekstrakata korišćen model transfera supernatanata tretiranih aktiviranih BV2 ćelija.

Mentha × piperita

U testu inhibicije AChE, svi ekstrakti *M. piperita* su ispoljili sličnu aktivnost kao i pozitivna kontrola, inhibirajući preko 60% aktivnosti tirozinaze, pri čemu rastvarač nije igrao značajnu ulogu u ispoljenoj aktivnosti (Grafik 19). *M. piperita* je često bila objekat ispitivanja antineurodegenerativne i neuroprotektivne aktivnosti, međutim treba naglasiti da je njeno etarsko ulje češće bilo testirano od ekstrakata. U studiji Vladimir-Knežević i sar. (2014) je uočena koncentraciona zavisnost prema aktivnosti AChE, što se razlikuje od naših rezultata. Pored toga, ovi autori su pokazali da etanolni ekstrakt *M. piperita* koncentracije 500 µg/mL inhibira 45% aktivnosti AChE, što je niže od vrednosti predstavljene u ovoj doktorskoj disertaciji (60,73% inhibicije AChE, Prilog 8).

Pored toga, svi ekstrakti *M. piperita* koncentracije 250 µg/mL su ispoljili značajnu inhibitornu aktivnost prema tirozinazi u odnosu na kojičnu kiselinu, inhibirajući oko 50% aktivnosti enzima, pri čemu rastvarač nije imao značajan uticaj na ispoljenu aktivnosti (Grafik 20). Hamed i sar. (2021) su pokazali da je vodeni ekstrakt ove biljke koncentracije 50 mg/mL inhibirao 82,2% aktivnosti tirozinaze, što je više od korišćene pozitivne kontrole (73,4%), međutim autori su ekstrakte pravili prema drugačijem protokolu za ekstrakciju u odnosu na protokol korišćen u našem radu. Takođe, Pavlić i sar. (2021) su pokazali da sastav ekstrakata *M. piperita*, kao i njihova biološka aktivnost varira u odnosu na korišćenu ekstrakcionu proceduru. Ipak, svi ekstrakti su imali znatno slabiju anti-AChE aktivnost od anti-tirozinazne aktivnosti.

Etanolni ekstrakt *M. piperita* je ispoljio značajnu antineuroinflamatornu aktivnost u odnosu na netretirane kontrolne ćelije, što je prikazano na Graficima 21-24. Anti-inflamatorna svojstva *M. piperita* su od ranije poznata, međutim u ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put određen uticaj njenih ekstrakata na funkciju aktivirane mikroglije. Pretragom literature je ustanovljeno da je za ovu aktivnost zaslužan sveobuhvatni fitohemijski sastav ovih ekstrakata. Za neke komponente ekstrakata *M. piperita*, poput rozmarinske, kafene, hlorogene i ferulinske kiseline, kvercetina, rutina, naringenina i drugih je poznato da imaju neuroprotektivni potencijal koji ispoljavaju povećanjem otpornosti neurona na oksidativni stres, modulacijom brojnih enzima asociranih sa neurodegeneracijom, kao i modulacijom mehanizama ćelijske smrti (Hanafy i sar., 2020).

Ocimum basilicum

Svi ekstrakti *O. basilicum* su pokazali veoma visok antineurodegenerativni potencijal izmeren testovima inhibicije AChE i tirozinaze. U testu inhibicije AChE, svi ekstrakti su imali značajno jači efekat u odnosu na pozitivnu kontrolu, pri čemu su se posebno istakli vodeni i etanolni ekstrakti (89,96, odnosno 85,98% inhibicije), dok je metanolni bio nešto manje efikasan, što je potvrđeno i statističkom analizom (Grafik 19). U testu inhibicije tirozinaze, s druge strane, najviše su se istakli alkoholni ekstrakti (60,71% inhibicije etanolnim i 58,5% inhibicije metanolnim ekstraktom), pri čemu su imali značajno višu aktivnost od kojične kiseline, dok je vodeni ekstrakt imao sličnu aktivnost kao i kojična kiselina (Grafik 20). Metanolni i etanolni ekstrakti *O. basilicum* poreklom iz Portugala koncentracije 50 µg/mL su pokazali značajno nižu aktivnost od pozitivnih kontrola u testovima inhibicije AChE (5% inhibicije metanolnim ekstraktom, 2,5% inhibicije etanolnim) i tirozinaze (33% inhibicije

metanolnim ekstraktom, 30% inhibicije etanolnim) (Coelho i sar., 2018). Ovi rezultati su u saglasnosti sa našim rezultatima inhibicije tirozinaze, međutim ne i sa rezultatima inhibicije AChE, budući da je metanolni ekstrakt *O. basilicum* poreklom iz Srbije ispoljio slabiju inhibitornu aktivnost prema AChE od etanolnog ekstrakta.

Etanolni ekstrakt *O. basilicum* je ispoljio značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24), što je u skladu sa Aye i sar. (2019), koji su pokazali da etanolni ekstrakt listova *O. basilicum* (10-1000 µg/mL) dovodi do smanjenja proizvodnje NO-a od strane RAW 264.7 makrofaga aktiviranih LPS-om u poređenju sa neaktiviranim i netretiranim ćelijama. U studiji Liu i sar. (2017) je pokazano da je cikorična kiselina, fenolna kiselina prisutna u ekstraktima *O. basilicum*, povećala vijabilnost LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i inhibirala je proizvodnju RVK-a i NO-a od strane ovih ćelija, što je u korelaciji sa njenom antioksidativnom aktivnošću. Pored toga, i za druga aktivna jedinjenja *O. basilicum* poput apigenina, eugenola, miretenala, luteolina, rozmarinske i karnozinske kiseline, je poznato da poseduju neuroprotektivni potencijal, međutim, sami ekstrakti *O. basilicum* istraživani su u znatno manjoj meri (Seyed i sar., 2021).

Origanum majorana

Ekstrakti *O. majorana* su pokazali značajno slabiju inhibitornu aktivnost prema AChE u odnosu na galantamin, pri čemu su se jedino vodeni (56,04%) i metanolni ekstrakt (48,95%) međusobno značajno razlikovali (Grafik 19). S druge strane, u testu inhibicije tirozinaze je pokazano da su svi ekstrakti imali značajno viši stepen inhibicije od pozitivne kontrole. Ipak, u ovom testu se neznatno više istakao etanolni ekstrakt, inhibirajući 63,03% aktivnosti tirozinaze, dok su metanolni i vodeni ekstrakti ostvarili nešto niži stepen inhibicije (Grafik 20). U studiji Duletić-Laušević i sar. (2018a), vodeni ekstrakt *O. majorana* poreklom iz Srbije je imao jaču inhibitornu aktivnost prema AChE od etanolnog ekstrakta i nije detektovana koncentraciona zavisnost, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Međutim, autori su prijavili slabiju aktivnost ekstrakata *O. majorana* i prema AChE i tirozinazi: u koncentraciji 100 µg/mL, etanolni ekstrakt je inhibirao 5,96% aktivnosti AChE i 7,87% aktivnosti tirozinaze, a vodeni je inhibirao 8,6% aktivnosti AChE i 7,77 % aktivnosti tirozinaze.

Takođe, etanolni ekstrakt *O. majorana* je pokazao značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Za razliku od etarskog ulja, antineuroinflamatorna aktivnost ekstrakata *O. majorana* nije do sada ispitana.

Origanum vulgare

U testu inhibicije AChE, vodeni i etanolni ekstrakti *O. vulgare* su ispoljili sličan efekat na inhibiciju ovog enzima (≈70%), što je značajno viši procenat u odnosu na galantamin. S druge strane, najslabiju aktivnost je ispoljio metanolni ekstrakt, čiji je procenat inhibicije bio sličan galantaminu (Grafik 19). Za razliku od toga, Adersen i sar. (2006) su zabeležili odsustvo inhibicije AChE vodenim ekstraktom *O. vulgare* iz Danske koncentracije 100 µg/mL, dok je metanolni ekstrakt inhibirao svega 3% njegove aktivnosti.

U testu inhibicije tirozinaze, svi ekstrakti *O. vulgare* su ispoljili značajnu inhibiciju od oko 60%, što je bio viši procenat od onog dobijenog za kojičnu kiselinu (Grafik 20). Moghrovyan i sar. (2019) su dobili 6,5% inhibicije tirozinaze etanolnim ekstraktom *O. vulgare*, međutim ovaj rezultat se ne može uporediti sa rezultatima predstavljenim u ovoj doktorskoj disertaciji jer autori nisu naveli na kojoj je koncentraciji ekstrakt ispitivan.

Etanolni ekstrakt *O. vulgare* je pokazao značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24), dok je u studiji Javadian i sar. (2016), metanolni ekstrakt *O. vulgare* ispoljio

anti-inflamatorno dejstvo na mikroglijalne ćelije inhibicijom ekspresije iNOS i TNF- α . Smatra se da je za ovu aktivnost u velikoj meri zaslužan timol, koji je prethodno identifikovan u ispitivanom ekstraktu. Pored toga, nađeno je da etanolni ekstrakt ove biljke, pored inhibicije TNF- α , inhibira IL-6 kao i produkciju NO-a od strane RAW 264.7 ćelija, bez uticaja na njihovu vijabilnost (Mir i sar., 2021).

Rosmarinus officinalis

Etanolni (71,96%) i vodeni ekstrakti *R. officinalis* (65,67%) su u testu inhibicije AChE ispoljili značajno veću aktivnost od galantamina, dok je metanolni ekstrakt imao je sličnu aktivnost kao i galantamin. Ipak, primećeno je da se aktivnost metanolnog i vodenog ekstrakta nije međusobno značajno razlikovala (Grafik 19). Adsersen i sar. (2006) su pokazali da je metanolni ekstrakt *R. officinalis* koncentracije 100 $\mu\text{g/mL}$ efikasnije inhibirao aktivnost AChE od vodenog (17% i 12% inhibicije, respektivno), što nije u saglasnosti sa našim rezultatima (66,09% i 71,07% inibicije na istoj koncentraciji, Prilog 8).

U testu inhibicije tirozinaze, svi ekstrakti *R. officinalis* su imali značajan inhibitorni efekat ($\approx 60\%$) u odnosu na kojičnu kiselinu (Grafik 20). Antitirozinazna aktivnost ekstrakata *R. officinalis* je ispitivana u studiji Chiocchio i sar. (2018), i utvrđeno je da metanolni ekstrakt ove biljke koncentracije 50 $\mu\text{g/mL}$ inhibira 19% aktivnosti tirozinaze. Pored pomenute studije, u literaturi nema dodatnih podataka o inhibiciji tirozinaze ekstraktima *R. officinalis*, mada je za ursolnu, 12-*O*-metilkarnozinsku i betulinsku kiselinu koje su izolovane iz ekstrakata ove biljke pokazano da regulišu ekspresiju tirozinaze u HMV-II humanim melanoma ćelijama (Kai i sar., 2015).

Etanolni ekstrakt *R. officinalis* je ispoljio značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Kuhlmann i Röhl (2006) su ukazale na to da bi karnozinska kiselina mogla biti odgovorna za anti-inflamatornu aktivnost metanolnog ekstrakta *R. officinalis* prema LPS-om aktiviranoj mikroglijii ispoljenu smanjenjem produkcije NO-a. Međutim, karnozinska kiselina nije stabilno jedinjenje, već nakon ekstrakcije veoma brzo oksidira u karnozol, te se zbog toga ne može tvrditi koji je od ova dva diterpena glavni nosilac biološke aktivnosti ruzmarina. Pored karnozinske kiseline i karnozola, pokazano je da i rozmarinska kiselina ima značajan doprinos u biološkim efektima *R. officinalis* (Habtemariam, 2016). Takođe, ekstrakti *R. officinalis* imaju sposobnost modulacije sinaptičke transmisije, čime dovode do neuroprotektivnog efekta (Khalid i sar., 2020).

Salvia officinalis

Ekstrakti *S. officinalis* su pokazali značajan antineurodegenerativni potencijal u odnosu na pozitivne kontrole. Naime, u testu inhibicije AChE, etanolni i vodeni ekstrakti su pokazali značajno jaču inhibitornu aktivnost (oko 80%) u odnosu na galantamin. Za razliku od toga, metanolni ekstrakt je imao značajno slabiju aktivnost, dostižući vrednost sličnu onoj za pozitivnu kontrolu (Grafik 19). U studiji Ferreira i sar. (2006), dekokt *S. officinalis* u koncentracijama nižim od 1000 $\mu\text{g/mL}$ nije inhibirao aktivnost AChE, dok je u koncentraciji 1000 $\mu\text{g/mL}$ inhibirao svega 6% aktivnosti ovog enzima. S druge strane, etanolni ekstrakt ove biljke koncentracije 500 $\mu\text{g/mL}$ je inhibirao 16,4% aktivnosti enzima. Ovi rezultati nisu u potpunosti u skladu sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji budući da su ekstrakti *S. officinalis* iz Srbije bili generalno znatno aktivniji na svim ispitivanim koncentracijama u poređenju sa ekstraktima *S. officinalis* iz Portugala.

U testu inhibicije tirozinaze, svi ekstrakti su imali značajno jaču inhibitornu aktivnost od kojične kiseline, mada su alkoholni ekstrakti imali značajno jaču aktivnost ($>60\%$) od vodenog ($<60\%$) (Grafik 20). Etanolni ekstrakt *S. officinalis* poreklom iz Rumunije nije ispoljio

antitirozinaznu aktivnost (Mocan i sar., 2020), dok je u studiji Duletić-Laušević i sar. (2019) pokazano da su etanolni ekstrakti ove biljke poreklom iz Srbije ispoljili veću aktivnost od vodenih. Pored toga, u studiji Duletić-Laušević i sar. (2019) nije detektovana aktivnost zavisna od koncentracije, što je u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije.

Etanolni ekstrakt *S. officinalis* poseduje značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Uticaj ekstrakata *S. officinalis* na neuroinflamaciju nije do sada ispitivan iako su njegovi anti-inflamatorni i neuroprotektivni efekti poznati od ranije (Mohebbati i sar., 2017). Kolac i sar. (2017) smatraju da ova biljka ostvaruje svoj anti-inflamatorni potencijal povećanjem aktivnosti endogenih antioksidativnih enzima, kao i modulacijom ekspresije ključnih pro- i anti- inflamatornih molekula, što su potvrdili i Vieira i sar. (2020).

Ekstrakti *S. officinalis* su imali najviši sadržaj naringina u odnosu na sve ispitivane ekstrakte. Za ovaj flavonoid je ranije pokazano da u LPS-om aktiviranim BV2 ćelijama dovodi do inhibicije oslobađanja IL-1 β , kao i do koncentraciono-zavisnog smanjenja proizvodnje NO-a od strane aktiviranih BV2 ćelija i inhibicije aktivacije p65/NF- κ B signalnog puta, koji je inače ključan za proinflamatorni odgovor (Bai i sar., 2019). Na osnovu prethodno navedenog, može se pretpostaviti da je ovo fenolno jedinjenje, između ostalog, zaslužno za antineuroinflamatornu aktivnost ekstrakta *S. officinalis*.

Satureja montana

Ekstrakti *S. montana* su u testu inhibicije AChE ispoljili značajno višu aktivnost u odnosu na galantamin, pri čemu je najviša aktivnost zabeležena za vodeni ekstrakt (73,77%). Ispoljena inhibitorna aktivnost prema AChE se značajno razlikovala u zavisnosti od rastvarača koji je korišćen za ekstrakciju (Grafik 19). U studiji Vladimir-Knežević i sar. (2014) je uočeno da etanolni ekstrakt *S. montana* ima visok sadržaj fenolnih kiselina i značajnu antioksidativnu aktivnost. Etanolni ekstrakt koncentracije 250 μ g/mL ispitivan u njihovoj studiji je inhibirao 24% aktivnosti AChE, što je značajno slabije u odnosu na ekstrakt ispitivan u našem radu.

Ekstrakti *S. montana* su ispoljili značajno višu aktivnost inhibicije tirozinaze u odnosu na pozitivnu kontrolu, od kojih je najviši procenat inhibicije imao metanolni ekstrakt (76,97%) (Grafik 20). Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje raniji podaci o efektima ekstrakata *S. montana* na inhibiciju aktivnosti tirozinaze. Za razliku od ekstrakata, etarska ulja biljaka roda *Satureja* su češće bila predmet sličnih istraživanja.

Etanolni ekstrakt *S. montana* je pokazao značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24), dok su literaturni podaci o anti-inflamatornoj aktivnosti ekstrakata ove biljke oskudni. Suvi ekstrakt *S. montana* je ispoljio anti-inflamatornu aktivnost kod pacova sa karagenan-indukovanom inflamacijom (Vilmosh i sar., 2021), a kod miševa je metanolni ekstrakt ove biljke doveo do smanjenja NO u serumu, čime je smanjena tioglikolatom indukovana inflamacija (Bahramnezhad i sar., 2021).

Sideritis scardica

Ispitivani ekstrakti *S. scardica* su ispoljili značajan antineurodegenerativni potencijal. U testu inhibicije AChE, među ekstraktima *S. scardica*, najbolju aktivnost je ispoljio vodeni ekstrakt (81,95%), nakon čega slede etanolni i metanolni ekstrakt, čija se aktivnost statistički značajno razlikovala u odnosu na vodeni ekstrakt (Grafik 19). Takođe, u testu inhibicije tirozinaze, najsnažnija inhibitorna aktivnost je uočena za vodeni ekstrakt (59,65%), nakon čega slede alkoholni ekstrakti (Grafik 20). Pretragom literature je pokazano da inhibitorna aktivnost ekstrakata *S. scardica* prema AChE i tirozinazi nije do sada ispitana, mada su druge vrste ovog roda često objekat ispitivanja antineurodegenerativne aktivnosti. Neke od najčešće ispitivanih vrsta su *S. albiflora*, *S. leptoclada*, *S. libanotica*, *S. perfoliata* i *S. stricta*. U studiji

Sarikurkcu i sar. (2020), metanolni ekstrakt *S. perfoliata* je imao jaču inhibitornu aktivnost prema AChE a slabiju inhibitornu aktivnost prema tirozinazi od njenog vodenog ekstrakta, što je suprotno od naših rezultata. S druge strane, metanolni ekstrakti *S. albiflora* i *S. leptoclada* na koncentracijama nižim od 200 µg/mL nisu inhibirali aktivnost AChE, dok je metanolni ekstrakt *S. albiflora* koncentracije 200 µg/mL inhibirao oko 50% jače aktivnost tirozinaze od ekstrakta *S. leptoclada* (Deveci i sar., 2019). Ovi rezultati takođe nisu u skladu sa našim rezultatima, gde su ekstrakti *S. scardica* bili aktivniji prema AChE nego prema tirozinazi.

Etanolni ekstrakt *S. scardica* je pokazao značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). U studiji Knörle (2012) je ispitivan efekat metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata *S. scardica* na unos serotonina, noradrenalina i dopamina u sinaptosome mozga pacova i unos serotonina u ljudske ćelije horiokarcinomna (JAR ćelije). Njihovi rezultati su pokazali da su ekstrakti *S. scardica* inhibirali unos ovih monoamina u sinaptosome mozga pacova odgovarajućim transporterima, pri čemu su alkoholni ekstrakti bili efikasniji od vodenog ekstrakta. Budući da je inhibicija transportera humanog serotonina metanolnim ekstraktom takođe bila veoma efikasna, zaključeno je da ovi ekstrakti mogu biti od velike koristi u terapiji mentalnih poremećaja povezanih sa neispravnom monoaminergičnom neurotransmisijom (poremećaji anksioznosti, hiperaktivnosti povezane sa deficitom pažnje, depresija, oštećenja i/ili neurodegenerativne bolesti). Međutim, iako su biljke roda *Sideritis* poznate u narodnoj medicini kao anti-inflamatorni agensi (Todorova i Trendafilova, 2014), u literaturi ne postoje podaci o antineuroinflamatornoj aktivnosti njihovih ekstrakata.

Teucrium chamaedrys* i *T. montanum

U testu inhibicije AChE, metanolni ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* su ispoljili značajno slabiju aktivnost (oko 60%) od galantamina. Za razliku od toga, vodeni i etanolni ekstrakti *T. chamaedrys* su ispoljili sličan inhibitorni efekat kao i galantamin, a vodeni i etanolni ekstrakti *T. montanum* su imali značajno jaču inhibitornu aktivnost od galantamina (Grafik 19). U studiji Vladimir-Knežević i sar. (2014) je pokazano da etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* poreklom iz Hrvatske (500 µg/mL) ima 1,4 puta veću AChE aktivnost od etanolnog ekstrakta *T. montanum*, što nije u saglasnosti sa našim rezultatima, budući da je pri istoj koncentraciji etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* iz Srbije slabije inhibirao aktivnost AChE od ekstrakta *T. montanum*.

U testu inhibicije tirozinaze, svi ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* su ispoljili značajno veću inhibitornu aktivnost u odnosu na kojičnu kiselinu. Pri koncentraciji od 250 µg/mL nije bilo značajne razlike u aktivnosti ovih ekstrakata u odnosu na korišćeni ekstrakcioni rastvarač: ekstrakti obe biljke su inhibirali aktivnost tirozinaze za oko 60% (Grafik 20). U studiji Vujanović i sar. (2019) je pokazano da je etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* poreklom iz Srbije 3,2 puta efikasnije inhibirao aktivnost tirozinaze od etanolnog ekstrakta *T. montanum*, što nije bio slučaj sa uzorcima ispitivanim u ovoj disertaciji, gde nije uočena značajna razlika između aktivnosti ekstrakata ove dve biljne vrste.

Etanolni ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* su ispoljili značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Pretragom literature je pokazano da efekat ekstrakata *T. chamaedrys* i *T. montanum* na neuroinflamaciju do sada nije ispitan. Ipak, za pojedine komponente njihovih ekstrakata, kao što su verbaskozid, forzitozid B, harpagid, 8-O-acetil-harpagid, cirziliol i β -arbutin je ranije pokazano da imaju anti-inflamatorni, kao i neuroprotektivni efekat (Frezza i sar., 2018).

Thymus serpyllum* i *Th. vulgaris

Ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* su pokazali sličan trend inhibicije AChE. Pojedini ekstrakti ovih biljaka su imali sličan inhibitorski efekat prema AChE kao galantamin, dok su neki imali značajno veći inhibitorski efekat od galantamina. Među ekstraktima *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*, najviši inhibitorski efekat su ispoljili vodeni ekstrakti (oko 70%), nakon čega slede etanolni, a zatim i metanolni ekstrakti (Grafik 19). S druge strane, etanolni ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* poreklom iz Hrvatske (500 µg/mL) imali su niži stepen inhibicije AChE u odnosu na naše rezultate, pri čemu su autori pokazali da je ekstrakt *Th. vulgaris* 1,3 puta aktivniji od ekstrakta *Th. serpyllum* (Kindl i sar., 2015). Za razliku od toga, ekstrakti ispitivani u ovoj disertaciji nisu pokazali značajnu razliku prilikom inhibicije AChE. U studiji Adersen i sar. (2006) nije zabeležena inhibicija AChE metanolnim i vodenim ekstraktima *Th. vulgaris* iz Danske na koncentraciji 100 µg/mL, što nije u skladu sa našim rezultatima.

U testu inhibicije tirozinaze, ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* su imali značajno veći inhibitorski efekat u odnosu na kojičnu kiselinu. Ekstrakti *Th. serpyllum* se nisu međusobno značajno razlikovali prema ispoljenom antitirozinaznom efektu (bez obzira na rastvarač, inhibicija ekstraktima je bila oko 60%). S druge strane, alkoholni ekstrakti *Th. vulgaris* su ispoljili značajno jače dejstvo (69,68%) u odnosu na vodeni ekstrakt (60,64%) (Grafik 20). U studiji Chiochio i sar. (2018), metanolni ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* su imali isti procenat inhibicije tirozinaze (26% inhibicije pri koncentraciji 50 µg/mL), što je u saglasnosti sa našim rezultatima.

Etanolni ekstrakti *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* su ispoljili značajnu antineuroinflamatornu aktivnost (Grafici 21-24). Pretragom literature je ustanovljeno da antineuroinflamatorni efekat ekstrakata ove vrste roda *Thymus* nije do sada ispitivan, međutim njihova etarska ulja, kao i pojedinačna jedinjenja su često bili objekat sličnih istraživanja. Pokazano je da pored inhibicije enzima odgovornih za razvoj neurodegenerativnih bolesti, monoterpenski fenoli timol i karvakrol izolovani iz etarskog ulja ovih biljaka dovode i do smanjenja kognitivnog deficita *in vivo* (Tundis i sar., 2018). Takođe, kod rotenonom indukovane neurodegeneracije u mozgu pacova, timol je doveo do značajnog smanjenja gubitka dopaminergičkih neurona, oksidativnog stresa i inflamacije. Ove efekte je timol ostvario pospešujući očuvanje endogenih antioksidativnih odbrambenih mehanizama i smanjenjem inflamatornih medijatora: citokina IL-1 β , IL-6 i TNF- α , enzima iNOS i COX-2, i transkripcionog faktora NF- κ B (Javed i sar., 2019).

Pojedine studije sugerišu da pacijenti oboleli od neurodegenerativnih bolesti imaju povećani rizik za razvoj određenih tipova tumora. Naime, primećeno je da su geni koji uzrokuju neurodegeneraciju često mutirani ili abnormalno eksprimirani u tumorskim ćelijama. Mnogi geni koji su eksprimirani u tumorskim oboljenjima i/ili neurodegeneraciji igraju značajnu ulogu u kontroli ćelijskog ciklusa, reparaciji DNK i brojnim signalnim putevima (Plun-Favreau i sar., 2010; Jackson i sar., 2021). Zbog toga se očekuje da će buduća istraživanja identifikovati prognostičke markere zajedničke za neurodegeneraciju i tumor koji bi mogli rezultirati poboljšanim imunomodulatornim terapijskim strategijama.

4.8. Antitumorska aktivnost

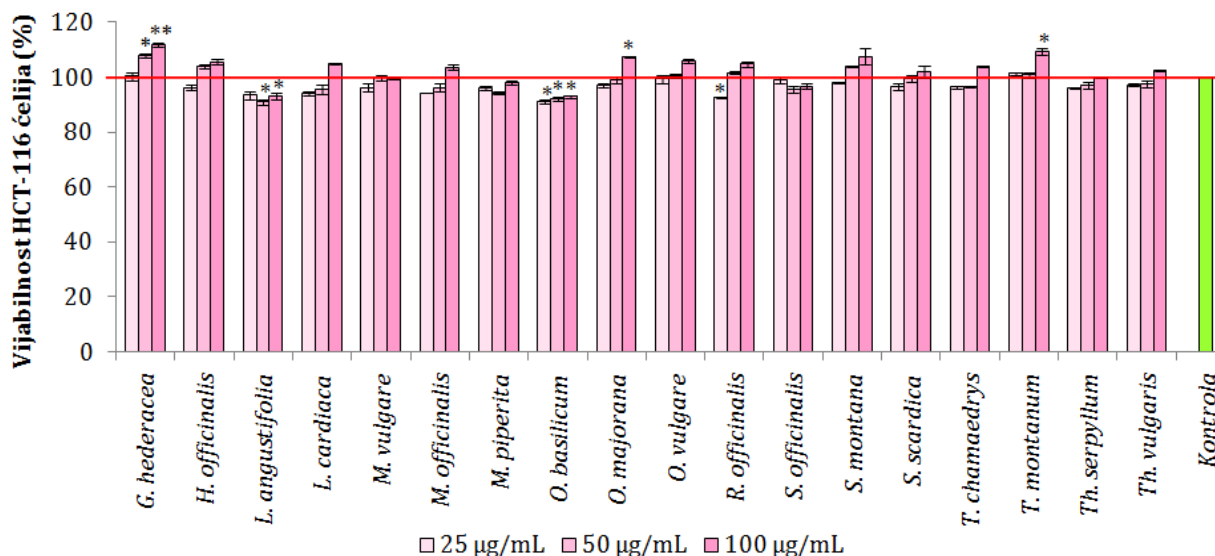
Istraživanja su pokazala da umereni nivoi RVK-a utiču na proliferaciju i diferencijaciju ćelija, međutim, pri većoj koncentraciji RVK-a može doći do zaustavljanja rasta ili čak do smrti tumorskih ćelija (tzv. „Pristup povišenih RVK-a“). Ovakav pristup implicira da su pod uslovima povišenih RVK-a, tumorske ćelije osetljivije na dodatni oksidativni stres (Trivellini i

sar., 2016; Perillo i sar., 2020). Međutim, takođe postoje indicije da je uloga RVK-a u tumorskim ćelijama dvojaka, što znači da bi te ćelije mogle biti osjetljivije pri smanjenim koncentracijama RVK-a (tzv. „Pristup smanjenih RVK“) (Wang i Yi, 2008). Budući da bi RVK mogle funkcionisati i kao proinflatorni medijatori (Naik i Dixit, 2011), smanjeni nivoi RVK-a bi se mogli odraziti na zaštitu normalnih, susednih ćelija od oksidativnog oštećenja. Takođe, NO ima važnu homeostatsku ulogu u ljudskom telu (Costa i sar., 2021), međutim studije ukazuju na to da pored toga, NO predstavlja signalni molekul sa ključnom ulogom u modulaciji procesa tumorogeneze. Uloga NO-a u tumorogenezi nije u potpunosti razjašnjena zbog brojnih funkcionalnih aktivnosti koje NO ima kako u normalnim, tako i u patofiziološkim stanjima. Ipak, pokazano je da NO može direktno ili indirektno dovesti do oštećenja DNK, a takođe može ometati popravku DNK, i/ili izazvati posttranslacione modifikacije, što dalje dovodi do potencijalnog razvoja tumora, njegove promocije i progresije (Rao, 2004). Međutim, značajno je napomenuti da je u višim koncentracijama NO citotoksičan za tumorske ćelije i može inhibirati rast tumora (Sinha, 2020).

Tumorske ćelije proliferišu brže od normalnih, te se smatra da su zbog toga osjetljivije na efekte antitumorskih agenasa Blagosklonny (2006), a takođe je pokazano da oštećenje DNK igra važnu ulogu u inicijalnom koraku procesa tumorogeneze (Beedanagari, 2017).

Biljke familije Lamiaceae poseduju širok spektar sekundarnih metabolita koji svojim sinergističkim delovanjem ostvaruju značajne biološke efekte. Zahvaljujući svom bogatom fitohemijskom sastavu, ove biljke poseduju sposobnost da utiču na različite faze razvoja tumora, dok u isto vreme imaju i imunomodulatornu aktivnost na normalno tkivo. Antitumorska aktivnost supstanci je često posledica njihove antioksidativne aktivnosti, te su zbog toga biljke familije Lamiaceae odlični kandidati za ispitivanje antitumorskog potencijala.

Za ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata biljaka familije Lamiaceae selektovani su samo etanolni ekstrakti, budući da su oni u našem preliminarnom istraživanju bili aktivniji od metanolnih i vodenih ekstrakata odgovarajućih biljaka. Antitumorski potencijal je dalje ispitivan na ćelijskoj liniji kolorektalnog kancera, HCT-116 ćelijskoj liniji, a rezultati antitumorske aktivnosti su predstavljeni na Graficima 25-28.



Grafik 25. Antiproliferativni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u MTT testu.

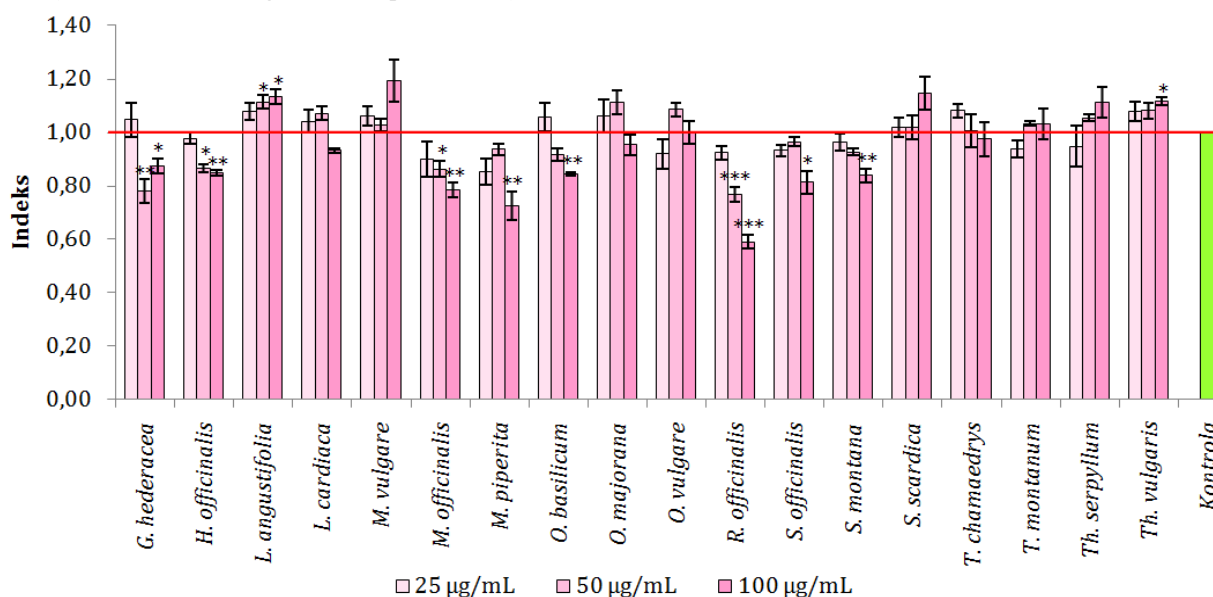
Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije.

* ($p < 0,05$) vs. kontrola, ** ($p < 0,01$) vs. kontrola

Od 18 etanolnih ekstrakata, samo ekstrakti *L. angustifolia* koncentracija 50 i 100 µg/mL, *O. basilicum* koncentracija 25, 50 i 100 µg/mL i *R. officinalis* koncentracije 25 µg/mL su doveli do značajnog smanjenja proliferacije HCT-116 ćelija. Ostali ekstrakti nisu ispoljili efekat na smanjenje proliferacije ovih tumorskih ćelija (Grafik 25).

Budući da su pojedini ispitivani ekstrakti ispoljili antiproliferativni efekat na ćelijsku liniju kolorektalnog tumora, u narednim koracima ove studije ispitivan je njihov efekat na modulaciju produkcije RVK-a i NO-a od strane ovih ćelija.

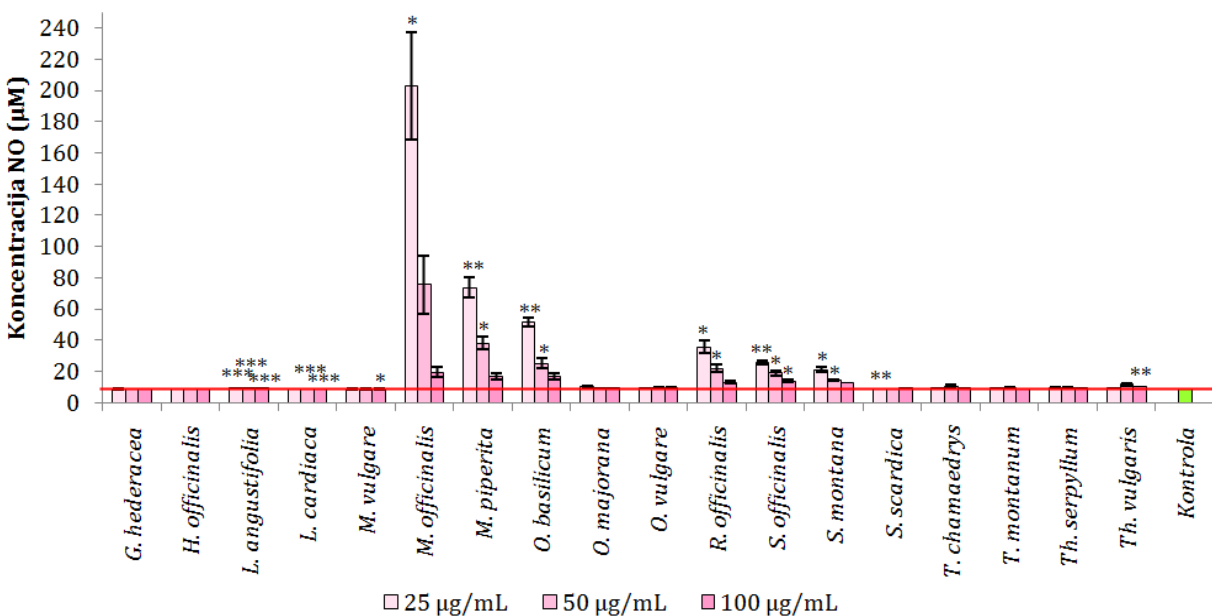
U NBT testu je procenjen efekat na produkciju RVK-a od strane HCT-116 ćelija. Ekstrakt *G. hederacea* (50 i 100 µg/mL), *H. officinalis* (50 i 100 µg/mL), *M. officinalis* (50 i 100 µg/mL), *M. piperita* (100 µg/mL), *O. basilicum* (100 µg/mL), *R. officinalis* (50 i 100 µg/mL), *S. officinalis* (100 µg/mL) i *S. montana* (100 µg/mL) su doveli do značajnog smanjenja produkcije RVK-a od strane HCT-116 ćelija. S druge strane, ekstrakti *L. angustifolia* (50 i 100 µg/mL) i *Th. vulgaris* (100 µg/mL) su značajno povećali produkciju RVK-a od strane HCT-116 ćelija. Rezultati ovog testa su predstavljeni na Grafiku 26.



Grafik 26. Antitumorski efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u NBT testu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost indeksa ± standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije.

* (p<0,05) vs. kontrola, ** (p<0,01) vs. kontrola, *** (p<0,001) vs. kontrola

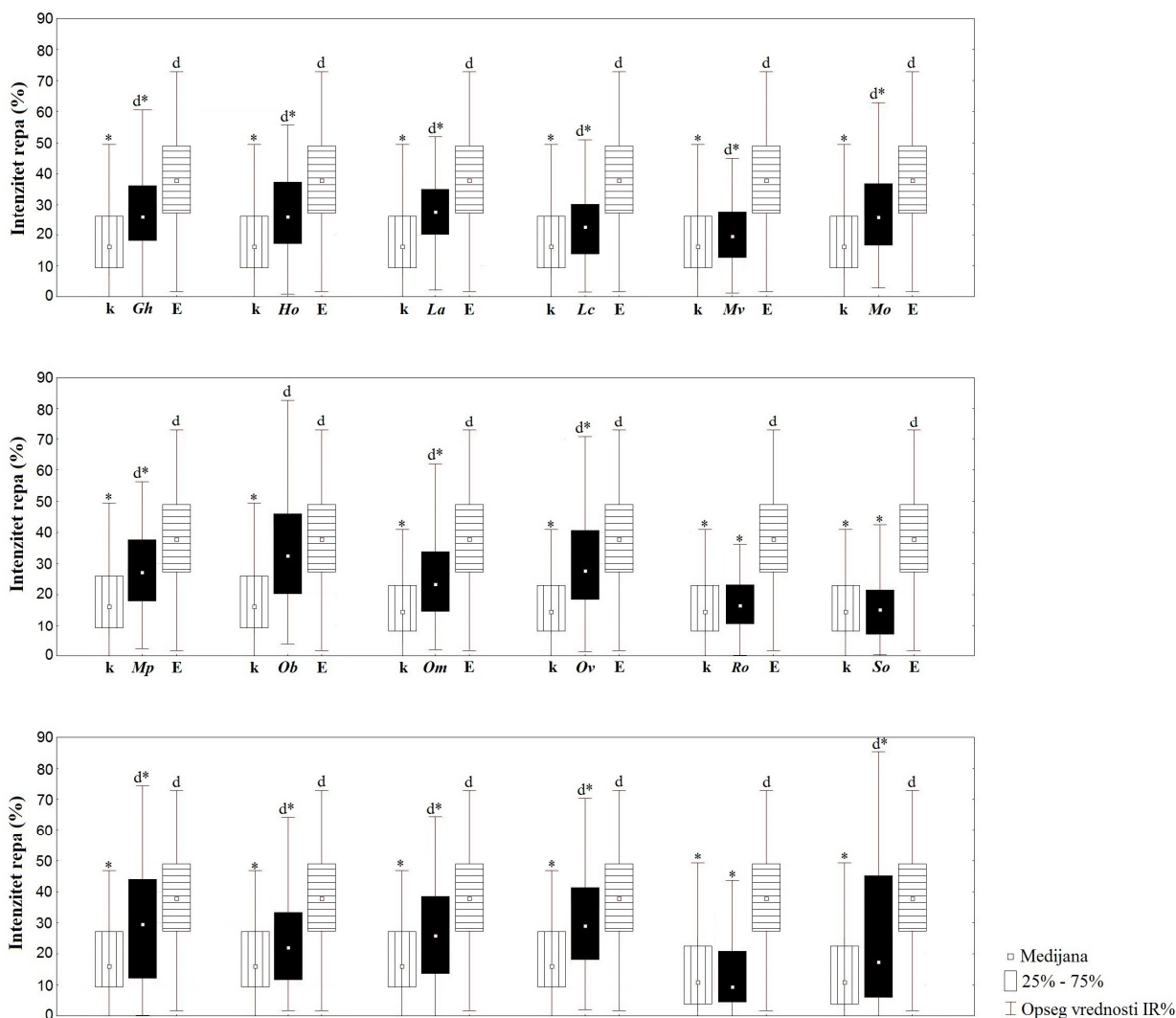


Grafik 27. Antitumorski efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u Grisovom testu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost koncentracije azot monoksida (NO) ± standardna greška. Kontrola predstavlja netretirane ćelije.

* (p<0,05) vs. kontrola, ** (p<0,01) vs. kontrola, *** (p<0,001) vs. kontrola

Rezultati ispitivanja uticaja etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na produkciju NO od strane HCT-116 ćelija su predstavljeni na Grafiku 27. U ovom testu je pokazano da ekstrakti *L. angustifolia* (25, 50 i 100 µg/mL), *L. cardiaca* (50 i 100 µg/mL), *M. vulgare* (100 µg/mL), *M. officinalis* (25 µg/mL), *M. piperita* (25 i 50 µg/mL), *O. basilicum* (25 i 50 µg/mL), *R. officinalis* (25 i 50 µg/mL), *S. officinalis* (25, 50 i 100 µg/mL), *S. montana* (25 i 50 µg/mL), *S. scardica* (25 µg/mL) i *Th. vulgaris* (100 µg/mL) dovode do značajnog povećanja produkcije NO-a u HCT-116 ćelijama. Primećeno je da je najveći efekat na produkciju NO-a dobijen pri najmanjoj testiranoj koncentraciji (25 µg/mL).

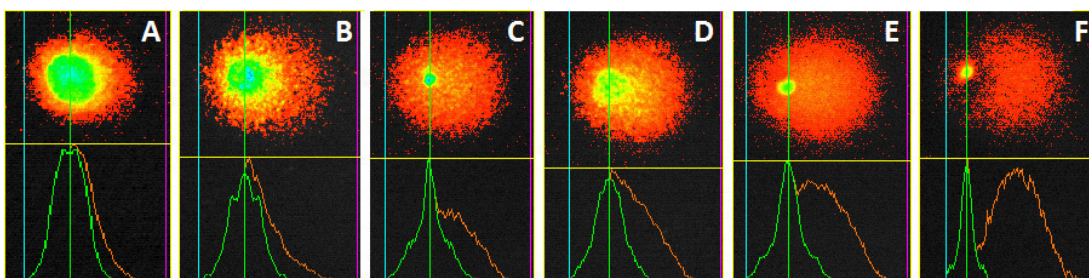


Grafik 28. Genotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae na HCT-116 ćelijsku liniju.

Rezultati su predstavljeni kao procenat intenziteta repa (IR%) komete u odnosu na netretiranu kontrolu (k) i etopozid (E, pozitivna kontrola).

^d vs. netretirana kontrola, * vs. etopozid ($p < 0,05$)

Rezultati ispitivanja genotoksičnog potencijala etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae na HCT-116 ćelijsku liniju su prikazani na Grafiku 28. Svi etanolni ekstrakti, osim *R. officinalis*, *S. officinalis* i *Th. serpyllum*, su značajno povećali nivo oštećenja DNK u ovim tumorskim ćelijama, međutim samo je *O. basilicum* ispoljio genotoksični efekat sličan etopozidu. Na Slici 30 su prikazane dobijene reprezentativne slike nukleoida, odnosno „kometa“ HCT-116 ćelija u komet testu.



Slika 30. Reprezentativne slike nukleoida HCT-116 ćelija.

Nivoi oštećenja nukleotida HCT-116 ćelija su predstavljeni kao intenzitet repa komete (%): A – 18,97%, B – 29,94%, C – 38,08%, D – 46,58%, E – 56,74% i F – 78,28% (foto: M. M. Oalđe Pavlović).

U ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da se antiproliferativna aktivnost ekstrakata pojedinih predstavnika porodice Lamiaceae na HCT-116 ćelije može objasniti modulacijom proizvodnje RVK-a i NO-a. U skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije su i nalazi drugih studija koje su pokazale da ekstrakti ovih biljaka, kao i njihova etarska ulja, indukuju povećanu proizvodnju RVK-a u tumorskim ćelijama debelog creva i dovode do njihove apoptoze i inhibicije proliferacije (Weidner i sar., 2015; Pérez-Sánchez i sar., 2019), što se pokazalo kao efikasan pristup u terapiji tumora (Perillo i sar., 2020). S druge strane, literaturni podaci koji govore o sposobnosti ovih biljaka da modulišu produkciju NO-a u tumorskim ćelijama su veoma retki.

U literaturi je malo studija o genotoksičnom efektu predstavnika porodice Lamiaceae testiranih u ovoj disertaciji na HCT-116 ćelijsku liniju. Međutim, pokazano je da pojedine vrste porodice Lamiaceae ispoljavaju genotoksični efekat na različite tumorske ćelije, uključujući ćelije adenokarcinoma debelog creva, tumora dojke i ovarijuma (Grujičić i sar., 2020; Mićović i sar., 2021).

Glechoma hederacea

Etanolni ekstrakt *G. hederacea* poseduje slabiji antitumorski potencijal na ispitivanim koncentracijama na HCT-116 ćelije u odnosu na ostale ekstrakte biljaka porodice Lamiaceae. U MTT testu, ekstrakt ove biljke je sa povećanjem koncentracije stimulisao rast vijabilnosti ovih ćelija (Grafik 25). Etanolni ekstrakt *G. hederacea* koncentracije 50 i 100 µg/mL je značajno smanjio produkciju RVK-a (Grafik 26), a nije uticao na produkciju NO-a u HCT-116 ćelijama (Grafik 27). U komet testu je ovaj ekstrakt na koncentraciji od 100 µg/mL, indukovao znatno niži nivo oštećenja DNK molekula u HCT-116 ćelijama u poređenju sa etopozidom (Grafik 28).

Antitumorska aktivnost ekstrakata *G. hederacea* na ćelijama kolorektalnog kancera nije prethodno detaljno istražena. Međutim, u studiji Kumarasamy i sar. (2006) je pokazano da su hederacin A i B, dva alkaloida izolovana iz metanalnog ekstrakta ove biljke, inhibirala rast Caco-2 ćelija humanog kolorektalnog adenokarcinoma. Pored toga, pokazano je da ursolna kiselina, koja je inače prisutna u *G. hederacea* u visokom procentu, može uticati na G0/G1 kontrolnu tačku ćelijskog ciklusa i dovesti do inhibicije replikacije DNK u HCT-15 ćelijama, što za posledicu ima inhibiciju proliferacije ovih ćelija (Li i sar., 2002).

Hyssopus officinalis

Etanolni ekstrakt *H. officinalis* je ispoljio slabiji antitumorski potencijal u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. Ipak, iako nije uticao na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25), na 50 i 100 µg/mL je doveo do značajnog smanjenja produkcije RVK-a u odnosu na netretirane ćelije (Grafik 26), što može sugerisati određen nivo antitumorskog potencijala. S druge strane, u Grisovom testu nije primećeno njegovo značajno dejstvo u odnosu na netretirane ćelije

(Grafik 27), međutim u komet testu je ovaj ekstrakt na 100 µg/mL značajno povećao oštećenje molekula DNK ispitivanih tumorskih ćelija u odnosu na netretirane ćelije. Ipak, stepen oštećenja DNK izazvan ekstraktom *H. officinalis* je bio značajno niži od stepena oštećenja izazvanih etopozidom (Grafik 28).

U studiji Mićović i sar. (2021), metanolni ekstrakti *H. officinalis* poreklom iz Srbije i Crne Gore su pokazali vremenski-nezavisnu genotoksičnu aktivnost na SW-480 ćelije. Ipak, autori su poredili ovu genotoksičnu aktivnost sa aktivnošću ovih ekstrakata prema HeLa ćelijama cervikalnog kancera, čime su ustanovili da se njihova aktivnost na SW-480 ćelije može okarakterisati kao slaba.

Lavandula angustifolia

Etanolni ekstrakt *L. angustifolia* je jedan od retkih ekstrakata ispitivanih u ovoj studiji koji je značajno smanjio vijabilnost HCT-116 ćelija u odnosu na netretirane tumorske ćelije (Grafik 25). Pored toga, u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da je antitumorski efekat etanolnog ekstrakta *L. angustifolia* posredovan povećanjem produkcije RVK-a (Grafik 26) i NO-a (Grafik 27) u HCT-116 ćelijama, kao i njegovim genotoksičnim efektom na ove ćelije (Grafik 28).

Uticaj ekstrakata *L. angustifolia* na ćelije kolorektalnog kancera do sada nije istraživan. Ipak, pojedine studije koje ukazuju na to da etarsko ulje ove biljke, zahvaljujući linalolu, linalil acetatu i 1,8-cineolu, može indukovati ćelijsku smrt Caco-2 ćelija (Donadu i sar., 2017). Pored pomenute aktivnosti, pokazano je da etarsko ulje ove biljke takođe može imati i antinociceptivno dejstvo nakon operacije kolorektalnog kancera (Yu i Seol, 2017).

Leonurus cardiaca

Etanolni ekstrakt *L. cardiaca* nije značajno smanjio vijabilnost HCT-116 ćelija u odnosu na netretirane tumorske ćelije (Grafik 25), a takođe nije imao efekta ni na modulaciju produkcije RVK-a (Grafik 26). Ipak, etanolni ekstrakt na 50 i 100 µg/mL je doveo do značajnog povećanja koncentracije NO-a u HCT-116 ćelijama (Grafik 27), a u koncentraciji 100 µg/mL je takođe ispoljio značajnu genotoksičnu aktivnost koja je bila niža u poređenju sa etopozidom (Grafik 28). Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje podaci koji govore o uticaju ekstrakata *L. cardiaca* na ćelije kolorektalnog kancera.

Marrubium vulgare

Etanolni ekstrakt *M. vulgare* nije uticao na vijabilnost ćelija kolorektalnog tumora (Grafik 25), mada je doveo do povećanja produkcije RVK-a (Grafik 26) i značajno povećao produkciju NO-a od strane ovih tumorskih ćelija u koncentraciji od 100 µg/mL (Grafik 27). Na istoj koncentraciji, u komet testu je pokazano da ekstrakt *M. vulgare* značajno povećava oštećenja DNK HCT-116 ćelija koje je ipak bilo značajno manje u poređenju sa ćelijama tretiranih etopozidom (Grafik 28).

Pretragom literature je utvrđeno da ne postoje podaci o uticaju ekstrakata *M. vulgare* na ćelije kolorektalnog kancera, međutim pokazana je antiproliferativna aktivnost metanolnog ekstrakta *Marrubium thessalum* i izolovanih jedinjenja (posebno akteozida, leukoseptozida A, forzitozida B, izoakteozida i dekafeoil-akteozida) na HCT-116 ćelije. Ipak, zanimljivo je da flavonoidi izolovani iz *M. thessalum* nisu uticali na smanjenje proliferacije ovih ćelija (Argyropoulou i sar., 2012).

Melissa officinalis

Etanolni ekstrakt *M. officinalis* nije uticao na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25), ali je značajno smanjio njihovu produkciju RVK-a (Grafik 26). Sa druge strane, etanolni ekstrakt je povećao produkciju NO-a u odnosu na netretirane ćelije, pri čemu je to povećanje produkcije bilo značajno više u odnosu na ekstrakte ostalih testiranih predstavnika porodice Lamiaceae (Grafik 27). Etanolni ekstrakt *M. officinalis* je takođe ispoljio značajno genotoksično dejstvo na HCT-116 ćelije, mada je intenzitet tog dejstva bio slabiji u odnosu na etopozid (Grafik 28).

Encalada i sar. (2011) su otkrili su da etanolni ekstrakt *M. officinalis* ima citotoksično dejstvo na HCT-116 ćelije, međutim ova aktivnost može biti posledica primene visoke koncentracije uzorka (1000 µg/mL), za razliku od deset puta niže koncentracije, koja je korišćena u našem radu. U studiji Weidner i sar. (2015) je pokazano da je ova aktivnost posledica visokog sadržaja rozmarinske kiseline u ekstraktima *M. officinalis*, koja je i sama imala visok citotoksični efekat na HCT-116 ćelije. Pored toga, autori su pokazali da etanolni ekstrakt *M. officinalis* pri koncentracijama višim od 1000 µg/mL dovodi do inhibicije proliferacije HT-29 i T84 ćelija kolorektalnog kancera i indukuje apoptozu povećanjem RVK-a. Međutim, na nižim koncentracijama uzorka, autori nisu dobili aktivnost na HCT-116 ćelijama.

Mentha × piperita

Etanolni ekstrakt *M. piperita* nije imao efekat na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25). S druge strane, ovaj ekstrakt je pokazao značajan antitumorski potencijal usled smanjenja produkcije RVK-a i povećanja produkcije NO-a u ovim ćelijama, kao i genotoksičnom aktivnošću koje su ispoljili na HCT-116 tumorske ćelije (Grafici 26-28).

Elansary i sar. (2020b) su pokazali da je metanolni ekstrakt *M. piperita* imao antiproliferativni/citotoksični efekat na HT-29 ćelije (ćelijska linija adenokarcinoma debelog creva). Autori su pripisali ispoljenu aktivnost metanolnog ekstrakta *M. piperita* visokom sadržaju rozmarinske kiseline i naringina u ispitivanom ekstraktu, za koje je od ranije poznato da imaju antiproliferativni efekat na mnogim tumorskim ćelijskim linijama.

Ocimum basilicum

Etanolni ekstrakt *O. basilicum* je pokazao najbolji antitumorski potencijal u odnosu na sve ostale ekstrakte predstavnika porodice Lamiaceae ispitivanih u ovoj doktorskoj disertaciji. Ovaj ekstrakt je bio jedan od retkih koji su značajno smanjili vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25). Pored toga, ekstrakt *O. basilicum* je značajno smanjio produkciju RVK-a (Grafik 26) i značajno povećao produkciju NO-a u odnosu na netretirane ćelije (Grafik 27). Pored toga, značajno je naglasiti da je etanolni ekstrakt *O. basilicum* jedini izazvao oštećenje DNK tumorskih ćelija sličnog intenziteta kao etopozid pri istoj koncentraciji (Grafik 28).

Pretragom literature je ustanovljeno da ekstrakti *O. basilicum* do sada nisu bili objekat sličnih istraživanja. Sa druge strane, *in silico* studija rađena na izolovanim komponentama etarskog ulja listova ove biljke, kao što su eugenol, germakren, mentol i β-elemen, pokazuje da ona imaju snažan antitumorski potencijal na regulatorne gene humanog kolorektalnog kancera. Naime, visok afinitet vezivanja ovih jedinjenja za pojedine onkogene, kao što je *BRAF* onkogen, može izazvati njihovu inaktivaciju, čime je omogućena antitumorska aktivnost etarskog ulja *O. basilicum* (Purushothaman i sar., 2019). S druge strane, ustanovljeno je da metanolni ekstrakt *O. sanctum* smanjenjem produkcije NO-a dovodi do prevencije nastanka pojedinih tumora (Kim i sar., 1998). Pomenuto smanjenje produkcije NO-a pod uticajem ekstrakta ove biljke nije u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. Ipak, pokazano je da smanjenje, ali i povećanje produkcije NO-a, kao i RVK-a, može za posledicu imati poremećaj

metabolizma tumorskih ćelija, što dalje vodi ka različitim antitumorskim mehanizmima (Rao, 2004; Wang i Yi, 2008; Naik i Dixit, 2011; Trivellini i sar., 2016; Perillo i sar., 2020; Sinha, 2020; Costa i sar., 2021).

Origanum majorana

Etanolni ekstrakt *O. majorana* koncentracija nižih od 100 µg/mL nema uticaja na vijabilnost HCT-116 ćelija. Međutim, na koncentraciji 100 µg/mL značajno povećava njihovu vijabilnost (Grafik 25). S druge strane, modulacija produkcije RVK-a i NO-a od strane HCT-116 ćelija nije detektovana ni na jednoj testiranoj koncentraciji (Grafici 26 i 27). Ovaj ekstrakt je ispoljio značajno genotoksično dejstvo na HCT-116 ćelije, ali je to dejstvo ipak značajno slabije u odnosu na etopozid (Grafik 28).

Za razliku od rezultata ove doktorske disertacije, Benhalilou i sar. (2019) su pokazali da znatno više koncentracije etanolnog ekstrakta *O. majorana* (IC₅₀ vrednost za HT-29 i Caco-2 ćelije iznosi 498 µg/mL i 506 µg/mL nakon 24-časovnog tretmana), imaju snažan antiproliferativni efekat na navedene ćelija humanog kolorektalnog kancera. Etanolni ekstrakt *O. majorana* ispitivan u studiji Benhalilou i sar. (2019) je takođe izazvao oštećenje DNK, pokrenuo autofagiju i aktivirao apoptotski put zavisan od kaspaza 3 i 7, najverovatnije aktivirajući kaskadu TNF-α. Slična aktivnost je pokazana i za kempferol, flavonol koji je često prisutan u ekstraktima *O. majorana*. Prema, Choi i sar. (2018), kempferol je povećanjem produkcije RVK-a doveo do aktivacije kaspaza i stimulacije apoptoze u HCT-116 ćelijama.

Origanum vulgare

Etanolni ekstrakt *O. vulgare* nije imao efekta na vijabilnost HCT-116 ćelija nakon 24-časovnog tretmana (Grafik 25). Međutim, u istraživanju Grbović i sar. (2013), metanolni ekstrakt *O. vulgare* sa teritorije Srbije je smanjio vijabilnost HCT-116 ćelija u zavisnosti od primenjene koncentracije i dužine tretmana. Naime, u koncentraciji ekstrakta 500 µg/mL, preživljavanje HCT-116 ćelija nakon 24-časovnog tretmana je smanjeno na 15%, a nakon 72-časovnog tretmana na 10%. S druge strane, primenom niže koncentracije ekstrakta, 100 µg/mL, vijabilnost ćelija nakon 24-časovnog tretmana je smanjena na 30%, a nakon 72-časovnog tretmana na 5%. Ipak, u našem radu su testirane niže koncentracije ekstrakta, što može biti razlog odsustva efekta.

Ekstrakt *O. vulgare* ispitan u našem radu takođe nije imao efekat na produkciju RVK-a i NO-a u HCT-116 ćelijama (Grafici 26 i 27). Sa druge strane, ovaj ekstrakt je ispoljio genotoksični potencijal u komet testu, ali je intenzitet izazvanih oštećenja DNK HCT-116 ćelija bio značajno slabiji od efekta iste koncentracije etopozida (100 µg/mL) (Grafik 28).

Rosmarinus officinalis

Etanolni ekstrakt *R. officinalis* ne utiče na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25), a takođe ne ispoljava ni genotoksičan efekat prema ovim tumorskim ćelijama (Grafik 26). Međutim, na 50 i 100 µg/mL doveo je do značajne redukcije RVK-a u poređenju sa netretiranim ćelijama (Grafik 27), dok je na 25 i 50 µg/mL doveo do značajnog povećanja produkcije NO-a (Grafik 28). Ovakav rezultat ukazuje na sposobnost modulacije metaboličkih mehanizama u ovim tumorskim ćelijama i potencijalni antitumorski efekat.

Istraživanje Valdés i sar. (2015) je pokazalo da su ekstrakti lista *R. officinalis* bogati rozmarinskom i karnozinskom kiselinom, imali antiproliferativno dejstvo na HT-29 ćelije tako što su zaustavljali ćelijski ciklus i stimulisali apoptozu. Pored toga, Pérez-Sánchez i sar. (2019) su pokazali da ekstrakt ove biljke dobijen superkričnom ekstrakcijom snažno inhibira proliferaciju, migraciju i formiranje agregata ćelija kolorektalnog adenokarcinoma, HT-29 i

SW480. Tretman ovim ekstraktom je takođe doveo do rasta produkcije RVK-a u ovim ćelijama, i njihove nekroze. Elansary i sar. (2020a) su pokazali da metanolni ekstrakt *R. officinalis* imao veću citotoksičnu aktivnost prema HT-29 ćelijama nego metanolni ekstrakt *O. basilicum* zahvaljujući visokom sadržaju rozmarinske kiseline.

Salvia officinalis

Dobijeni rezultati su pokazali da etanolni ekstrakt *S. officinalis* ne utiče na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafici 25). Jedino na najvišoj testiranoj koncentraciji etanolni ekstrakt *S. officinalis* je značajno redukovao produkciju RVK-a (Grafik 26), dok je značajno povećanje produkcije NO-a uočeno na svim koncentracijama (Grafik 27). Ipak, etanolni ekstrakt *S. officinalis* nije ispoljio genotoksični efekat prema HCT-116 ćelijama (Grafik 28).

Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje ranije studije antiproliferativnog uticaja ekstrakata *S. officinalis* na HCT-116 ćelije, međutim za druge vrste roda *Salvia*, poput *S. fruticosa*, *S. lanigera* i *S. ringens* je pokazano da smanjuju proliferaciju HCT-116 ćelija (Alimpić i sar., 2015; Duletić-Laušević i sar., 2018b). Takođe je pokazano da etarsko ulje *S. officinalis* ima efekat na različite tumorske ćelije debelog creva (Caco-2, HT-29 i HCT-116) zahvaljujući visokom sadržaju 1,8-cineola, α -tujona i kamfora (Luca i sar., 2020).

Satureja montana

Iako etanolni ekstrakt *S. montana* nije smanjio vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25), pokazao je značajan antitumorski potencijal. Testirani ekstrakt je doveo do koncentraciono-zavisnog smanjenja produkcije RVK-a (Grafik 26), dok je značajno povećanje produkcije NO-a u HCT-116 ćelijama dobijeno na 25 i 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Grafik 27). Pored toga, etanolni ekstrakt *S. montana* je ispoljio značajan genotoksični potencijal prema HCT-116 ćelijama u odnosu na netretiranu kontrolu, međutim njegov efekat je bio značajno slabiji od genotoksičnog efekta iste koncentracije etopozida (Grafik 28).

Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje podaci o efektima ekstrakata *S. montana* na HCT-116 ćelije kolorektalnog kancera. Međutim, pokazano je da etarsko ulje ove biljke ima citotoksično dejstvo na LS174 ćelijsku liniju kolorektalnog kancera (Kundaković i sar., 2014). Ovi autori su naglasili da efikasnost etarskog ulja ove biljke zavisi od njegovog fitohemijskog sastava, koji je u direktnoj vezi sa lokalitetom na kom je biljka rasla.

Sideritis scardica

Etanolni ekstrakt *S. scardica* nije ispoljio značajnu antitumorsku aktivnost u svim testovima korišćenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Nije uočen uticaj ovog ekstrakta na vijabilnost HCT-116 ćelija (Grafik 25), kao ni na modulaciju produkcije RVK-a (Grafik 26). S druge strane, na najmanjoj testiranoj koncentraciji ovaj ekstrakt je značajno povećao produkciju NO-a (Grafik 27), i ispoljio značajan genotoksični potencijal, indukujući oštećenja DNK. Međutim, ova oštećenja su bila slabijeg intenziteta u odnosu na etopozid testiran na istoj koncentraciji (Grafik 28).

Pretragom literature je ustanovljeno da *S. scardica* nije do sada bila objekat sličnih istraživanja. Međutim, metanolni ekstrakti listova dve endemične vrste poreklom iz Turske, *Sideritis ozturkii* i *S. niveotomentosa*, su ispoljili citotoksični efekat na DLD1 ćelije kolorektalnog kancera. Ekstrakt *S. ozturkii* je doveo do stimulacije ekspresije različitih proapoptotskih gena u ovim ćelijama, posebno kaspaza 3, zahvaljujući čemu se smatra da ove biljke predstavljaju odlične kandidate za detaljnija istraživanja antitumorskih mehanizama (Şimşek Sezer i Uysal, 2018; 2021).

Teucrium chamaedrys* i *T. montanum

Etanolni ekstrakti *T. chamaedrys* i *T. montanum* ispitivani su generalno pokazali slab antitumorski potencijal, pri čemu nisu uticali na vijabilnost, niti na produkciju RVK-a i NO-a od strane HCT-116 ćelija (Grafici 25-27). Međutim u komet testu je primećena značajna genotoksična aktivnost ekstrakti obe vrste ovog roda *Teucrium*, ali je efekat bio slabiji u poređenju sa genotoksičnošću iste koncentracije etopozida (Grafik 28). U studiji Stanković i sar. (2011a), metanolni ekstrakti ovih biljaka poreklom iz Srbije, posebno ekstrakt *T. montanum*, su redukovali proliferaciju HCT-116 ćelija. Pored toga, autori su pokazali da metanolni ekstrakti obe biljke indukuju apoptozu HCT-116 ćelija i smanjuju produkciju superoksid anjon radikala i NO, međutim ovi antitumorski efekti su bili najjači nakon 24-časovnog tretmana, dok je njihova efikasnost slabila tokom vremena. Milutinović i sar. (2019) su pokazali da metanolni ekstrakt *T. chamaedrys* ispoljava selektivnu citotoksičnost prema SW-480 ćelijama kolorektalnog kancera (IC₅₀ nakon 24 sata je iznosio 53,27 µg/mL, dok nakon 72 sata je iznosio 20,87 µg/mL), a ne i prema normalnim HaCaT keratinocitima, pri čemu su indukovali apoptozu samo SW-480 ćelija. Autori su takođe pokazali da metanolni ekstrakt *T. chamaedrys* inhibira ekspresiju *CIP1A1*, *CIP1B1*, *GSTP1*, *MRP1* i *MRP2* gena u SW480 ćelijama, što je dovedeno u vezu sa visokim sadržajem kafeine kiseline. Mukanganyama i sar. (2011) smatraju da bi inhibicija ovih gena mogla da poveća terapijsku efikasnost antitumorskih lekova, zbog čega je rezultat studije Milutinović i sar. (2019), gde se ističe visok antitumorski potencijal ekstrakta *T. montanum*, od velikog značaja. Pored toga, metanolni ekstrakt *T. montanum* poreklom iz Srbije je takođe ispoljio citotoksičan efekat na SW-480 ćelije i indukovao je kaspaza-nezavisnu apoptozu ovih ćelija (Nikodijević i sar., 2016).

Thymus serpyllum* i *Th. vulgaris

Etanolni ekstrakt *Th. serpyllum* nije pokazao antitumorsku aktivnost u testovima za procenu antitumorskog potencijala (Grafici 25-28). Takođe ne postoje ni literaturni podaci koji opisuju njegove efekte na kolorektalni kancer. Za razliku od etanolnog ekstrakta *Th. serpyllum*, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* svoju antitumorsku aktivnost prema HCT-116 ćelijama ostvaruje povećanjem produkcije RVK-a i NO-a (Grafici 26 i 27), kao i indukcijom oštećenja DNK (Grafik 28). U studiji Al-Menhali i sar. (2015), vodeni ekstrakt *Th. vulgaris* je redukovao proliferaciju HCT-116 ćelija praćenu apoptozom, o čemu svedoči povećana aktivnost kaspaza 3 i 7. Pored toga, značajno je inhibirao adheziju, migraciju i invazivni potencijal HCT-116 ćelija. Važno je pomenuti da karvakrol, monoterpensko fenolno jedinjenje široko prisutno u ovim biljnim vrstama, indukuje apoptozu posredovanu mitohondrijama time što remeti homeostazu kalcijuma u ćelijama humanog horiokarcinoma (Lim i sar., 2019).

Iako je potrebno uraditi dodatne studije da bi se bolje razjasnio mehanizam antitumorskog delovanja biljnih ekstrakata, može se zaključiti da biljke porodice Lamiaceae poseduju sposobnost da selektivno deluju na ćelije kolorektalnog kancera tako što dovode do povećanja intracelularnih RVK i smanjenja vijabilnosti, što može biti dobra strategija za lečenje ove široko rasprostranjene bolesti, posebno ako se uzme u obzir da su sintetički antitumorski agensi obično toksični za normalne ćelije. Poželjno je razviti terapiju sa kombinovanom sposobnošću zaštite normalnih ćelija i izazivanja oštećenja tumorskih ćelija. Rezultati ove studije su dokazali da među ispitivanim uzorcima, etanolni ekstrakt *O. basilicum*, ne samo da ima antigenotoksično dejstvo na normalne ćelije, već je smanjio i preživljavanje HCT-116 ćelija, modulirao produkciju RVK-a, a u komet testu pokazao sličan genotoksični efekat kao etopozid. Ranije je pokazano da etopozid utiče na mašineriju za popravku oštećenja time što je sprečava da spoji lance DNK, što može imati presudan antitumorski efekat (Atha i

sar., 2020), te se na osnovu rezultata ove disertacije može postaviti hipoteza da bi sličan efekat na mašineriju za popravku oštećenja DNK mogao imati i etanolni ekstrakt *O. basilicum*. Pored toga, tumorske ćelije su osetljivije na spoljne stimulse koji mogu uticati na njihovu proizvodnju RVK (Perillo i sar., 2020). Imajući to u vidu, može se zaključiti da su prirodne supstance sa snažnim antioksidativnim efektom više nego sposobne da deluju kao potencijalni antitumorski lekovi, te bi bilo opravdano da se buduća istraživanja usmere ka razjašnjenju njihovih mehanizama delovanja u višim model sistemima.

Zbog imunokompromitujuće prirode oboljenja, osobe obolele od različitih tipova tumora su osetljivije na bakterijske infekcije, što potencijalno može dovesti do poremećaja u njihovom režimu lečenja i produžene hospitalizacije. Iako je zahvaljujući adekvatnoj antibiotskoj terapiji stopa mortaliteta ovih pacijenata opala tokom proteklih godina, bakterijske infekcije i dalje predstavljaju pretnju osobama sa imunokompromitujućim oboljenjima (Bhat i sar., 2021). Zbog toga je u sledećem koraku ove doktorske disertacije ispitan antibakterijski efekat ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na pojedine model sisteme humanih patogena.

4.9. Antibakterijska aktivnost ekstrakata biljaka familije Lamiaceae

Bakterije imaju tendenciju vezivanja za različite površine, jer im ta osobina, u evolutivnom smislu, omogućava bolje preživljavanje, posebno ako se ima u vidu da se hranljive materije češće mogu naći na čvrstoj površini. Iz tog razloga su bakterije razvile različite specijalizovane strukture i složene ligandske interakcije koje im daju sposobnost da prepoznaju i vezuju se (adheriraju) za različite abiotičke (inertni materijali) ili biotičke površine (ćelije ili tkiva). Pored adhezije za određenu površinu, mnoge bakterije imaju sposobnost formiranja biofilma zahvaljujući proizvodnji određenih polisaharida, koji zajedno sa supstancama sa površine koju pokušavaju da kolonizuju, čine kompleksni matriks (Dunne, 2002). Terminom „film“ su naučnici pokušali da objasne zapažanje da su se bakterije, alge i protisti vezivali i razmnožavali na staklenim pločicama koje su na svojoj površini imale kapljice slatke ili morske vode. U takvim uslovima je primećeno da se ti mikroorganizmi, posebno oni iz jezerske vode, razvijaju u „ujednačenom filmu“ (Henrici, 1933).

Termin „biofilm“ je uveden šezdesetih godina XX veka, kada je istraživano prečišćavanje otpadnih voda, a kasnije je počeo da se upotrebljava u medicinskoj i stomatološkoj mikrobiologiji (Flemming i sar., 2021). Moderne definicije biofilma uključuju tri neizostavne komponente: mikroorganizam, matriks i površinu na kojoj se širi film mikroorganizama, što podrazumeva da ukoliko jedna od tih komponenti izostane, ne dolazi do razvoja biofilma (Dunne, 2002; Flemming i sar., 2021). Prema savremenoj IUPAC definiciji, biofilm predstavlja agregat mikroorganizama u kom su ćelije često ugrađene u samoproizvedeni matriks ekstracelularnih polimernih supstanci koje su povezane međusobno i/ili su adherirale za površinu (Vert i sar., 2012). Unutar biofilma, pojedinačne planktonske bakterijske ćelije se vezuju jedna za drugu, čime formiraju struktuiranu kompoziciju koja im omogućava bolje preživljavanje u različitim uslovima sredine. Bakterijske ćelije koje formiraju biofilm zajedno prate promene životne sredine i imaju visoku toleranciju kada su u pitanju uslovi sredine kao što su RVK, ograničena dostupnost nutrijenata i vode, nizak pH. Zapravo, struktura biofilma, površina na koju je adherirao i polimerni matriks koji bakterijske ćelije proizvode sadrži visok nivo nutrijenata i vode koji im omogućava slobodni transfer gena, metabolita i enzimske interakcije, što za posledicu može imati promene u ekspresiji komponenti na površini bakterijskih ćelija, determinanti virulencije, kao i u iskorišćavanju dostupnih mikronutrijenata (Gambino i Cappitelli, 2016; Mirzaei i sar., 2020).

Generalno, bakterije mogu preživeti terapiju antibioticima time što razvijaju mehanizme tolerancije, odnosno otpornosti na njih. Tako, perzisteri predstavljaju subpopulaciju bakterijskih ćelija koje su prolazno tolerantne na antibiotike, zbog čega često sporo rastu ili zaustavljaju svoj rast, međutim nakon letalnog nivoa stresa, sposobne su da nastave sa rastom. Formiranje takvih perzistentnih ćelija uspostavlja fenotipsku heterogenost unutar bakterijske populacije, što je od velike važnosti za prilagođavanje promenama životne sredine (Fisher i sar., 2017). Bakterijski biofilmovi se mogu smatrati specifičnim tipom perzistentne bakterijske infekcije, koji pored rezistencije na antibiotike razvijaju i rezistenciju na imunski sistem domaćina, što za posledicu ima razvoj ozbiljnih infekcija. Zapravo, smatra se da je preko 60% bakterijskih infekcija ljudi u razvijenim državama izazvano bakterijskim biofilmovima (Chen i Wen, 2011), te uklanjanje biofilma predstavlja veliki problem sa kojim se čovek danas susreće. Biofilm se obično može ukloniti mehanički ili pomoću biocidnih agenasa, međutim to je najčešće samo delimično uklanjanje. Kao što je već napomenuto, bakterijske ćelije koje sačinjavaju biofilm su rezistentnije na antimikrobne agense od planktonskih bakterija (Gambino i Cappitelli, 2016), a izbegavanjem odbrambenih mehanizama imunskog odgovora čoveka, terapija pojedinih infekcija je znatno otežana (Mirzaei i sar., 2020). Takođe, s obzirom na to da se biofilm može formirati i na abiotičkim površinama, postoje sve veće potrebe za pronalaženjem načina za njihovo suzbijanje posebno sa medicinskih uređaja i opreme kao što su kateteri. Pored toga, oslobađanje mikroorganizama iz biofilma može izazvati ozbiljne, često po život pacijenta opasne, infekcije (Slettengren i sar., 2020).

Na osnovu strategija koje koriste za invaziju domaćina, kao što su izbegavanje ili odupiranje urođenom imunskom odgovoru, oštećenje ćelija i razmnožavanje u specifičnim uslovima, bakterije se mogu podeliti na nekoliko grupa. Invazivne bakterije predstavljaju patogene koji mogu da vrše invaziju različitih delova tela u kojima bakterije obično nisu prisutne, kao što su krvotok, mišići, masna tkiva i moždane ovojnice (Drevets i sar., 2004). U invazije bakterije spada i *P. aeruginosa*, čiju infekciju karakterišu tri osnovna stadijuma: (i) adhezija za ćeliju domaćina i njena kolonizacija, (ii) lokalna infekcija penetracijom i internalizacijom tkiva, (iii) diseminacija bakterije putem krvotoka.

Početni stadijumi penetracije tkiva (cepanje proteina ekstracelularnog matriksa i čvrstih spojeva) i invazije ćelija domaćina su kritični za opstanak bakterija i uspostavljanje infekcije. Za bakterijski soj *P. aeruginosa* PAO1 je pokazano da je invazija ćelija nezavisna od proizvodnje LPS ili citotoksičnosti, i da se odigrava putem odgovora domaćina posredovanog receptorom. Zapravo, eksperimentalno je dokazano da ove bakterije produkuju i oslobađaju tzv. sekretom. Sekretom se sastoji od toksina, proteaza, lipaza i lizina, koji omogućavaju bakteriji efikasniju invaziju ćelija domaćina (Ravichandran i sar., 2015). Značajno je napomenuti da je afinitet vezivanja *P. aeruginosa* veći za ćelije koje su zahvaćene inflamacijom ili su na drugi način kompromitovane, nego za normalne, zdrave ćelije (Ahmed i sar., 2014), zbog čega je upotreba antioksidativnih i anti-inflamatornih agenasa, posebno u patološkim stanjima, ključna.

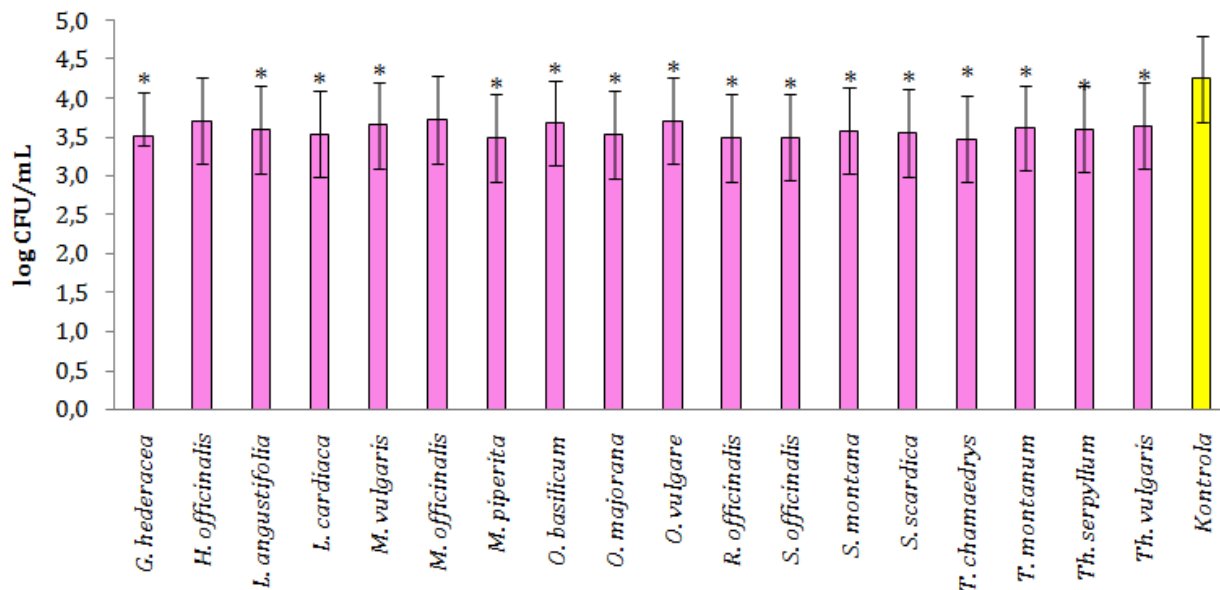
Povećanje otpornosti bakterija, posebno gram-negativnih, na antibiotike predstavlja ozbiljnu pretnju po zdravlje ljudi širom sveta. Smatra se da ukoliko se ovaj trend nastavi, vremenom se čak ni jednostavne infekcije više neće moći lečiti poznatim antibioticima (Ezadi i sar., 2019). Određivanje senzitivnosti bakterija na antibakterijske agense je od izuzetnog značaja, ne samo za kontrolu i lečenje infekcija, već i za upoređivanje efikasnosti pomenutih agenasa, što se može uraditi različitim metodama, a pre ostalih, zahtevnijih metoda, primenjuje se jednostavni i univerzalno prihvaćeni MIK test (Veiga i sar., 2019). U ovom testu se efikasnost antibiotičkog agensa može proceniti njihovom sposobnošću da inhibiraju rast

bakterija (minimalna inhibitorna koncentracija, MIK) ili da ubiju bakterije (minimalna baktericidna koncentracija, MBK) (Bonev i sar., 2008).

Za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata familije Lamiaceae korišćeni su: test minimalne inhibitorne koncentracije (MIK test), test adhezije i invazije kao i testovi za određivanje uticaja na formiranje biofilma i na već formirani biofilm (Tabelama 8-9 i na Graficima 29-31).

U Tabeli 8 su prikazane minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije metanolnih i vodenih ekstrakata ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae, dok rezultati za vodene ekstrakte nisu prikazani jer nisu pokazali antibakterijsko dejstvo (MIK je bio $>1000 \mu\text{g/mL}$, a MBK nije detektovan). Generalno, antimikrobni efekat je bio izraženiji prema gram-pozitivnim u poređenju sa gram-negativnim bakterijama, sa izuzetkom *E. faecalis*. Od svih testiranih bakterija, najveću osetljivost je pokazao *B. subtilis*, etanolni ekstrakt *H. officinalis* i metanolni ekstrakt *S. scardica* su imali istu vrednost MIK, $31,25 \mu\text{g/mL}$, dok je MIK etanolnog ekstrakta *S. officinalis* bio $62,5 \mu\text{g/mL}$. Za razliku od *E. coli* i *S. typhimurium*, kod kojih je za sve testirane ekstrakte MIK bio veći od $1000 \mu\text{g/mL}$, MIK vrednosti etanolnih ekstrakata za *P. aeruginosa* je u opsegu $250 - 500 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 8). Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da su alkoholni ekstrakti, posebno etanolni, pokazali bolju antibakterijsku aktivnost od vodenih ekstrakata. Značajno je napomenuti da je pozitivna kontrola, antibiotik streptomycin, pokazao najjaču antibakterijsku aktivnost (*B. subtilis*, $3,125 \mu\text{g/mL}$, *E. coli* $12,5$ i *S. typhimurium* $3,125 \mu\text{g/mL}$), dok etanol u testiranim koncentracijama nije imao efekta na rast ispitanih bakterija.

U testu u kome je praćena adhezija nije dobijena inhibicija adhezije *P. aeruginosa* PAO1 za MRC-5 ćelijsku liniju ni za jedan od testiranih ekstrakata.



Grafik 29. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na invaziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća.

* ($p < 0,05$) vs. kontrola

U testu uticaja na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija, metanolni i vodeni ekstrakti nisu redukovali broj bakterija. U istom testu, svi testirani etanolni ekstrakti, osim *H. officinalis* i *M. officinalis*, su smanjili broj bakterija sposobnih za invaziju MRC-5 ćelija (Grafik 29).

Za praćenje inhibitornog efekta etanolnih ekstrakata familije Lamiaceae na formiranje i degradaciju već formiranog biofilma korišćen je *P. aeruginosa* PAO1. Odabir ekstrakata za testiranje izvršen je na osnovu dobijenih MIK vrednosti kod *P. aeruginosa* (ATCC 15442). Testirani su svi ekstrakti kod kojih je MIK bio 250 µg/mL (Tabela 8), osim *S. scardica*, zbog njegove slabe rastvorljivosti.

U testu inhibicije formiranja biofilma, etanolni ekstrakti su testirani u opsegu od 156 do 1250 µg/mL, a rezultati su predstavljeni na Grafiku 30. Uticaj rastvarača, odnosno etanola, testiran je u opsegu 0,937 – 7,5% i ustanovljeno je da ne utiče na vijabilnost bakterija tokom formiranja biofilma. Streptomycin je testiran u opsegu 0,781 – 6,25 µg/mL, pri čemu na ovim koncentracijama nije primećeno smanjenje vijabilnosti bakterija. Najviše testirane koncentracije ekstrakata odgovaraju vrednostima MIK za *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 9), osim za *H. officinalis* i *O. basilicum*, gde su najviše vrednosti odgovarale $\frac{1}{4}$ MIK. Svi testirani ekstrakti su pokazali inhibitorni efekat na formiranje biofilma, posebno ekstrakti *H. officinalis*, *M. officinalis*, *M. piperita* i *O. basilicum*. Značajno je naglasiti da, osim u slučaju *M. piperita*, *O. basilicum* i *T. montanum*, najviše koncentracije ekstrakata nisu imale najjači inhibitorni efekat. Najviši nivo inhibicije formiranja biofilma pokazali su ekstrakti *O. vulgare*, 54,57%, i *H. officinalis*, 50,9%, na istoj koncentraciji 625 µg/mL.

Tabela 8. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije ekstrakata i pozitivnih kontrola za ispitane bakterije.

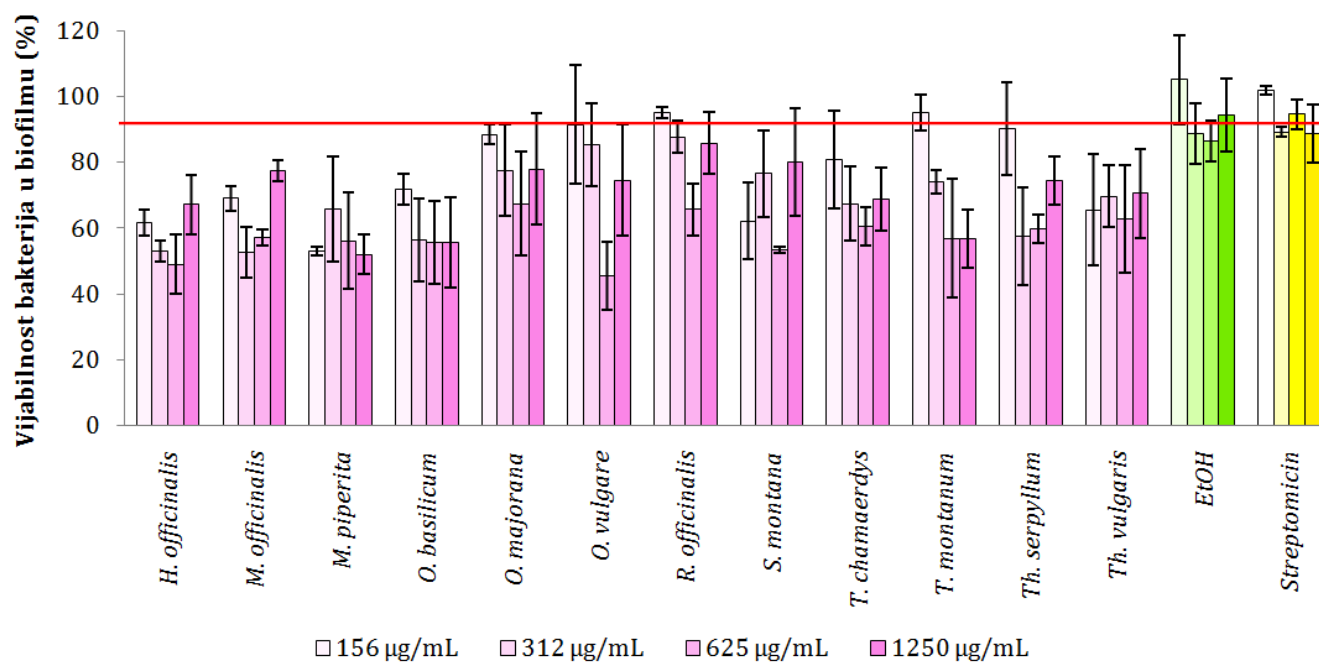
Biljna vrsta	Ekstrakt	Gram-pozitivne bakterije						Gram-negativne bakterije								
		<i>B. subtilis</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>L. innocua</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. typhimurium</i>		
		MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	
<i>G. hederacea</i>	metanolni	1000	>1000	nd	>1000	nd	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	nd	500	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	nd	
<i>H. officinalis</i>	metanolni	1000	>1000	nd	>1000	nd	>1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	31,25	62,50	nd	500	nd	1000	250	500	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>L. angustifolia</i>	metanolni	250	500	nd	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	nd	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	500	1000	>1000	nd	
<i>L. cardiaca</i>	metanolni	250	500	>1000	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	125	250	nd	1000	nd	500	250	500	>1000	>1000	500	1000	>1000	nd	
<i>M. vulgare</i>	metanolni	>1000	nd	>1000	nd	>1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	nd	500	1000	1000	250	500	>1000	>1000	500	1000	>1000	nd	
<i>M. officinalis</i>	metanolni	500	1000	>1000	>1000	nd	1000	250	500	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	nd	500	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>M. piperita</i>	metanolni	500	>1000	nd	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	1000	nd	>1000	nd	500	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>O. basilicum</i>	metanolni	500	1000	>1000	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	nd	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>O. majorana</i>	metanolni	250	500	1000	1000	500	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	>1000	>1000	500	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>O. vulgare</i>	metanolni	500	1000	nd	>1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	nd	>1000	nd	1000	250	500	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>R. officinalis</i>	metanolni	125	250	1000	1000	500	1000	250	500	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	62,50	125	nd	1000	nd	1000	250	500	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>S. officinalis</i>	metanolni	500	1000	nd	1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	62,50	125	500	500	500	1000	125	250	>1000	>1000	500	1000	>1000	nd	
<i>S. montana</i>	metanolni	500	1000	nd	1000	nd	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	nd	1000	nd	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>S. scardica</i>	metanolni	31,25	62,50	>1000	>1000	1000	1000	250	500	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	125	250	>1000	>1000	500	1000	250	500	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>T. chamaedrys</i>	metanolni	500	1000	nd	>1000	nd	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	>1000	>1000	500	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>T. montanum</i>	metanolni	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	>1000	>1000	1000	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>Th. serpyllum</i>	metanolni	500	1000	>1000	>1000	500	1000	1000	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	500	1000	>1000	>1000	500	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
<i>Th. vulgaris</i>	metanolni	250	500	>1000	>1000	250	500	1000	1000	>1000	>1000	>1000	nd	>1000	nd	
	etanolni	250	500	>1000	>1000	500	1000	500	1000	>1000	>1000	250	500	>1000	nd	
Pozitivne kontrole																
Streptomycin		≤3,125	3,125	≤200	200	≤25	25	≤1,532	3,125	≤12,5	12,5	25	50	≤3,125	3,125	-
Rifampicin		-	-	≤3,125	50	≤3,906	7,812	-	-	-	-	-	-	-	-	-

nd – nije detektovano; Rezultati su prikazani kao µg/mL.

Tabela 9. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije ekstrakata i pozitivne kontrole za soj *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Biljna vrsta	MIK	MBK	2×MIK	½MIK	¼MIK
<i>H. officinalis</i>	5000	>5000	10000	2500	1250
<i>M. officinalis</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>M. piperita</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>O. basilicum</i>	5000	>5000	10000	2500	1250
<i>O. majorana</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>O. vulgare</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>R. officinalis</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>S. montana</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>T. chamaedrys</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>T. montanum</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>Th. serpyllum</i>	1250	2500	2500	625	312
<i>Th. vulgaris</i>	1250	2500	2500	625	312
Kontrole					
Streptomycin	6,25	6,25	12,5	3,125	1,562

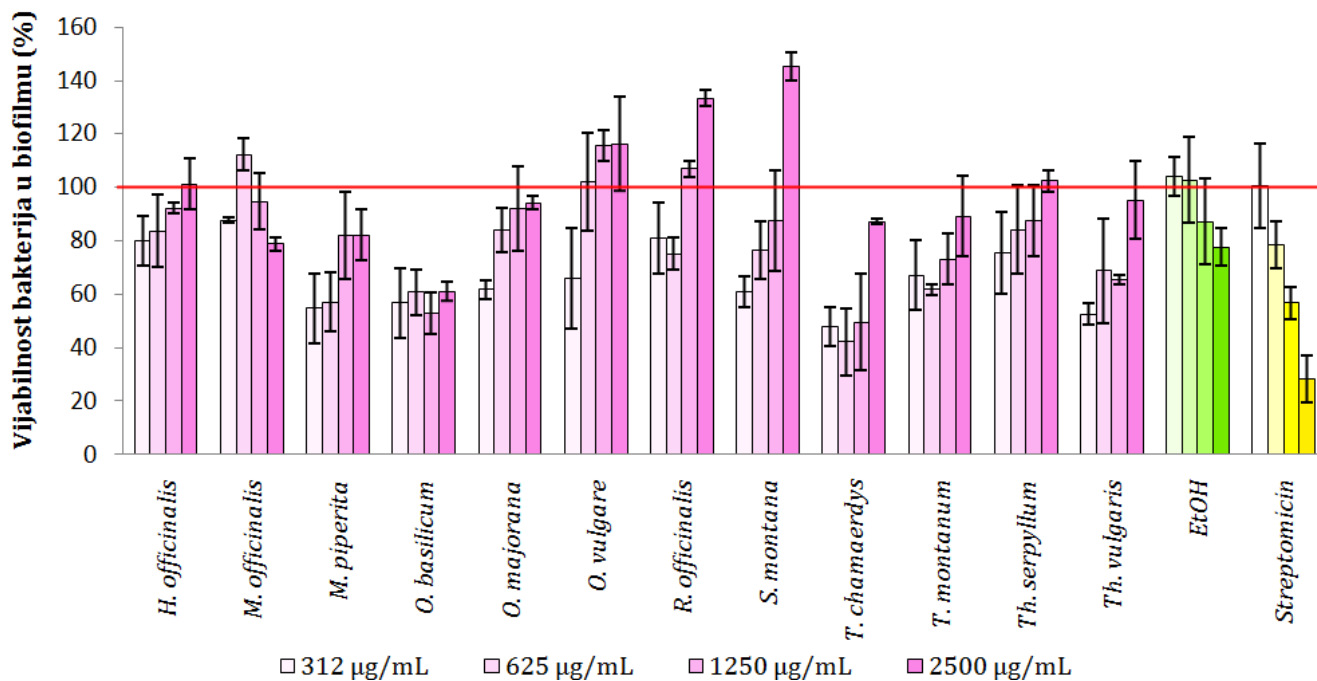
Rezultati su prikazani kao µg/mL.



Grafik 30. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na formiranje biofilma.

Rezultati su predstavljeni procentom vijabilnih bakterija u novoformiranom biofilmu. Koncentracije ekstrakata su prikazane u legendi grafika; koncentracije etanola (EtOH) su bile 0,937; 1,875; 3,75 i 7,5%, dok su koncentracije streptomicina bile 0,781; 1,562; 3,125 i 6,25 µg/mL

Dejstvo odabranih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na degradaciju već formiranog biofilma je prikazano na Grafiku 31. Etanolni ekstrakti su ispitivani u opsegu 312 – 2500 µg/mL, etanol u opsegu 1,875 – 15%, a streptomycin 1,562 – 12,5 µg/mL. Za razliku od prethodnog testa, etanol je degradirao 22,48% već postojećeg biofilma na najvišoj testiranoj koncentraciji, a streptomycin je delovao dozno-zavisno, pri čemu je na najvišoj testiranoj koncentraciji od 12,5 µg/mL samo 28,3% bakterija u biofilmu bilo vijabilno. Najviše testirane koncentracije ekstrakata odgovaraju vrednostima 2×MIK, osim za *H. officinalis* i *O. basilicum*, za koje najviše koncentracije odgovaraju vrednostima ½MIK (Tabela 9). U ovom testu, za razliku od prethodnog, nisu svi ispitivani ekstrakti pokazali aktivnost i interesantno je da ekstrakti *O. vulgare* i *H. officinalis*, koji su pokazali visoku inhibiciju formiranja biofilma, u testu degradacije biofilma nisu imali efekta. Takođe, pokazano je da najviše koncentracije ekstrakata nemaju efekta na degradaciju biofilma, osim u slučaju *M. officinalis*. Među ispitivanim ekstraktima, najbolju aktivnost je pokazao ekstrakt *T. chamaedrys*, koji je na 625 µg/mL degradirao 57,74% već formiranog biofilma. Dobar potencijal za degradaciju biofilma su pokazali i ekstrakti *M. piperita*, *O. basilicum* i *Th. vulgaris*, posebno pri nižim koncentracijama.



Grafik 31. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na već formirani biofilm.

Rezultati su predstavljeni procentom vijabilnih bakterija u biofilmu. Koncentracije ekstrakata su prikazane u legendi grafika; koncentracije etanola (EtOH) su bile 1,875; 3,75; 7,5 i 15%, dok su koncentracije streptomicina bile 1,562; 3,125; 6,25 i 12,5 µg/mL.

Glechoma hederacea

Ekstrakti *G. hederacea* generalno nisu ispoljili značajan antibakterijski efekat, osim etanolnog ekstrakta koji je značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji humanih fibroblasta pluća. Što se tiče MIK testa, ekstrakti na koncentracijama nižim od 500 µg/mL nisu inhibirale rast bakterija, dok su alkoholni ekstrakti na 500 µg/mL inhibirali rast *B. subtilis*, *L. innocua*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Tabela 8).

Za razliku od ovih rezultata, Kumarasamy i sar. (2002) su pokazali da je metanolni ekstrakt inhibirao pojedine bakterije pri nižim koncentracijama (*E. faecalis* i *P. aeruginosa* na 125 µg/mL, *S. aureus* i *E. coli* na 250 µg/mL, *B. subtilis* na 500 µg/mL). Međutim potrebno je naglasiti da su autori koristili bakterijske sojeve koji nisu deo ATCC kolekcije, kao i to da je metanolni ekstrakt ove biljke u njihovoj studiji ispoljio značajno slabije dejstvo od pozitivne kontrole, što je u skladu sa našim rezultatima. Zbog slabog inhibitornog potencijala koji su ovi ekstrakti pokazali prema *P. aeruginosa*, nije testirana njihova aktivnost na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1.

Hyssopus officinalis

Među ispitivanim ekstraktima *H. officinalis*, u MIK testu najbolju antibakterijsku aktivnost je pokazao etanolni ekstrakt na *B. subtilis* (MIK 31,25 µg/mL), dok je na 250 µg/mL inhibiran i rast *S. aureus* i *P. aeruginosa* (Tabela 8). Iz ovog razloga, u daljem radu je praćen efekat etanolnog ekstrakta na formiranje i degradaciju biofilma. Na koncentraciji od 625 µg/mL ekstrakt je inhibirao formiranje biofilma od 50,9% i degradaciju već formiranog biofilma od 19,96% (Grafici 29 i 30). Međutim, etanolni ekstrakt *H. officinalis* nije značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija.

U studiji Vlase i sar. (2014) je pokazano da je etanolni ekstrakt *H. officinalis* značajno inhibirao *S. aureus*, što nije bio slučaj sa *L. monocytogenes*, *E. coli* i *S. typhimurium*. Ovi rezultati su u skladu sa našim rezultatima MIK testa za pomenute gram-pozitivne bakterije, kao i sa studijom Hassanshahiyani i sar. (2018), u kojoj je dobijen bolji antibakterijski efekat u MIK testu za etanolni, nego za metanolni ekstrakt. Međutim, Hassanshahiyani i sar. su za ispitivanje antibakterijske aktivnosti koristili ekstrakte *H. officinalis* znatno viših koncentracija, tako da su detektovali inhibiciju čak i *E. coli* (MIK 25 mg/mL). Pored toga, pokazali su da je etanolni ekstrakt ove biljke efikasnije inhibirao formiranje biofilma *P. aeruginosa* (oko 90% na 6,25 mg/mL), dok su metanolni i etanolni ekstrakti podjednako dobro inhibirali degradaciju biofilma ove bakterije (>80% na 6,25 mg/mL). Takođe, značajno je napomenuti da su u pomenutoj studiji, pored toga, ekstrakti *H. officinalis* uspešno inhibirali i formiranje i degradaciju biofilma *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii* i *Klebsiella pneumoniae*.

Lavandula angustifolia

U MIK testu, alkoholni ekstrakti *L. angustifolia* su najbolji antibakterijski efekat imali na *B. subtilis* (MIK 250 µg/mL), slabiji efekat je dobijen kod *L. innocua*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* (MIK 500 µg/mL), dok na ostale bakterije nisu imali efekat (Tabela 8). Zbog slabog inhibitornog efekta koji su ovi ekstrakti pokazali prema *P. aeruginosa*, nije testirana njihova aktivnost na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1.

Interesantno je da je u studiji Zenão i sar. (2017), etanolni ekstrakt *L. angustifolia* pokazao odličan efekat prema meticilin-senzitivnom i meticilin-rezistentnim sojevima *S. aureus* (MSSA i MRSA), kada se zna da su ovi sojevi senzitivni samo na nekolicinu antibakterijskih agenasa. Prema podacima autora, etanolni ekstrakt *L. angustifolia* je inhibirao i MSSA i MRSA u opsegu MIK vrednosti od 63 – 1000 µg/mL, što je povezano sa visokim sadržajem fenola u ispitivanom ekstraktu. Pretragom literature je ustanovljeno da uticaj ekstrakata *L. angustifolia* na adheziju i invaziju bakterija prilikom infekcije eukariotskih ćelija do sada nije ispitivan. Za razliku od toga, postoji podatak da inhibira formiranje biofilma *Campylobacter jejuni*, gram-negativne bakterije čiji biofilmovi ugrožavaju industriju hrane (Ramić i sar., 2021).

Leonurus cardiaca

Alkoholni ekstrakti *L. cardiaca*, posebno etanolni, najbolji efekat su ispoljili prema *B. subtilis* (etanolni ekstrakt, MIK 125 µg/mL i metanolni ekstrakt, MIK 250 µg/mL) i prema *S. aureus* (etanolni ekstrakt, MIK 250 µg/mL i metanolni ekstrakt, MIK 500 µg/mL). Među ekstraktima ove biljke, jedino je etanolni ekstrakt inhibirao rast *P. aeruginosa* (MIK 500 µg/mL) (Tabela 8), ali usled visoke MIK vrednosti efekat na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1 nije praćen.

U testu uticaja na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija etanolni ekstrakt *L. cardiaca* je pokazao značajnu inhibiciju invazivne aktivnosti ove bakterije.

Micota i sar. (2016) su pokazali da acetonski ekstrakt *L. cardiaca* inhibira rast *S. aureus* na MIK od čak 6 mg/mL, i da značajno inhibira njegovu adheziju u eksperimentalnom modelu endokarditisa (60-75% inhibicije). Međutim, autori su detektovali svega 5% inhibicije u procesu formiranja biofilma *S. aureus*.

Marrubium vulgare

Za razliku od metanolnog i vodenog ekstrakta, etanolni ekstrakt *M. vulgare* je pokazao antibakterijski potencijal u MIK testu, pri čemu je rast *B. subtilis* i *S. aureus* inhibirao na MIK 250 µg/mL, dok je rast *L. innocua* i *P. aeruginosa* inhibirao na MIK 500 µg/mL (Tabela 8). S obzirom na to da ekstrakt nije inhibirao rast *P. aeruginosa* u koncentracijama nižim od 500 µg/mL, nije bio dalje selektovan za testiranje uticaja na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1. Etanolni ekstrakt *M. vulgare* je ispoljio značajan inhibitorni efekat na invaziju *P. aeruginosa* PAO1 prilikom infekcije fibroblasta pluća (Grafik 29).

Generalno u studiji Al-Zaban i sar. (2021) su korišćene znatno više koncentracije ekstrakata, pri čemu je metanolni ekstrakt *M. vulgare* pokazao slab antibakterijski potencijal prema gram-pozitivnim bakterijama inhibirajući rast *E. faecalis* na MIK 12,5 mg/mL, a *B. cereus*, *L. monocytogenes* i *S. aureus* na MIK 25 mg/mL. S druge strane, u slučaju gram-negativnih bakterija, autori su pokazali da je *Klebsiella pneumoniae* bila najsenzitivnija (MIK 6,25 mg/mL), zatim *E. coli* i *P. aeruginosa* (MIK 12,5 mg/mL), dok je najrezistentnija bila *S. typhimurium* (MIK 25 mg/mL). Za razliku od toga, u studiji Mssillou i sar. (2021), etanolni ekstrakt *M. vulgare* je ispoljio bolju antibakterijsku aktivnost prema testiranim gram-pozitivnim (MIK 2,5 i 1,87 mg/mL, za *B. subtilis* i *S. aureus*) u odnosu na gram-negativne bakterije (MIK 2,5 i 5 mg/mL, za *E. coli* i *Salmonella enterica*) (Mssillou i sar., 2021). Uticaj etanolnog ekstrakta korena *M. vulgare* na formiranje biofilma i adheziju MRSA je proučavali su Quave i Smeltzer (2009), pri čemu je ustanovljeno da je ovaj ekstrakt pokazao koncentraciono-zavisno dejstvo u oba testa. Najbolje inhibitorno dejstvo na formiranje biofilma je bilo pri koncentraciji 128 µg/mL (31% inhibicije biofilma) a adheziju biofilma za plastiku je inhibirao pri koncentraciji IC₅₀ od 8 µg/mL.

Melissa officinalis

Ekstrakti *M. officinalis* imaju generalno visok biološki potencijal, što je potvrđeno i u testovima za određivanje antibakterijske aktivnosti. U MIK testu, najbolji inhibitorni efekat je dao metanolni ekstrakt na *S. aureus* i etanolni na *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL), dok su isti ekstrakti slabije inhibirali rast *B. subtilis* (MIK 500 µg/mL). Etanolni ekstrakt je inhibirao i rast *L. innocua* i *S. aureus* (MIK 500 µg/mL) (Tabela 8). S druge strane, etanolni ekstrakt nije značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* prilikom infekcije MRC-5 ćelija (Grafik 29), dok je inhibicija formiranja

biofilma *P. aeruginosa* PAO1 od 47,38% dostignuta na 312 µg/mL (Grafik 30). Jedino na najnižoj i najvišoj testiranoj koncentraciji etanolni ekstrakt *M. officinalis* je doveo do degradacije već formiranog biofilma (12,43% i 21,08%, Grafik 31).

Vodeni ekstrakt *M. officinalis* nije pokazao antibakterijsku aktivnost ni na jednoj od testiranih koncentracija uključujući i najvišu od 1000 µg/mL. Čanadanović-Brunet i sar. (2008) su pokazali da ovaj ekstrakt na MIK 1,25 mg/mL inhibira rast *B. cereus* i *S. aureus*, dok na *E. coli* i *P. aeruginosa* nije imao efekat ni na 10 mg/mL. Ovaj rezultat je delimično u saglasnosti sa studijom Stefanović i Čomić (2012), gde je MIK vrednost vodenih ekstrakata *M. officinalis* za *E. coli* i *P. aeruginosa* iznosila 20 mg/mL, a za *B. subtilis* i *S. aureus* 5 mg/mL. U studiji Stefanović i Čomić (2012), etanolni ekstrakt *M. officinalis* je imao slabije dejstvo od vodenog na *E. coli* i *P. aeruginosa* (MIK 40 mg/mL). Značajno je napomenuti da su autori utvrdili 3,5 puta viši sadržaj ukupnih fenola u vodenom ekstraktu u odnosu na etanolni, što nije slučaj sa rezultatima dobijenim u ovoj doktorskoj disertaciji. Pretragom literature je ustanovljeno da ekstrakti *M. officinalis* nisu do sada bili objekat istraživanja uticaja na adheziju, invaziju ili formiranje i degradaciju biofilma bakterija.

Mentha × piperita

U MIK testu, etanolni ekstrakt *M. piperita* je na 250 µg/mL inhibirao rast *P. aeruginosa*, a na 500 µg/mL rast *L. innocua*. Metanolni ekstrakt je na 500 µg/mL inhibirao rast *B. subtilis* i *S. aureus* (Tabela 8). U studiji Elansary i sar. (2020b), najbolja antibakterijska aktivnost metanolnog ekstrakta *M. piperita* prema *P. aeruginosa*, zatim za *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* i *B. cereus*, pripisana je aktivnosti njegovih komponenti, hlorogenoj i kafenoj kiselini. U studiji Patil i sar. (2016) je dobijen efikasniji inhibitorski efekat na rast *S. aureus* vodenim ekstraktom nego etanolnim, dok je etanolni ekstrakt snažnije inhibirao rast *B. cereus*. Ertürk (2006) je takođe pokazao da etanolni ekstrakt *M. piperita* ima antibakterijski potencijal prema *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* na MIK 5 mg/mL.

Etanolni ekstrakt ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je takođe značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća (Grafik 29). Iako ne postoje ranije studije o uticaju ekstrakata ove biljke na invaziju bakterija pri infekciji eukariotskih ćelija pokazano je da dihlormetanski:metanolni (1:1) ekstrakt *M. piperita* stimuliše adheziju *P. aeruginosa* ATCC 9027, a inhibira adheziju kliničkog izolata *P. aeruginosa* (Sandasi i sar., 2011).

Etanolni ekstrakt *M. piperita* ispitivan u ovoj doktorskoj disertaciji je inhibirao formiranje biofilma (inhibicija od 46,88% i 48,05% postignuta je na najnižoj i najvišoj testiranoj koncentraciji, Grafik 30) i na najnižoj testiranoj koncentraciji je degradovao 45,35% formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Grafik 31). Sandasi i sar. (2011) su pokazali da od ispitanih vrsta uključujući četiri vrste porodice Lamiaceae, jedino dihlormetanski:metanolni (1:1) ekstrakt *M. piperita* inhibira stvaranje biofilma *P. aeruginosa* ATCC 9027 (13% inhibicije pri koncentraciji 750 µg/mL) i kliničkog izolata (38% inhibicije pri koncentraciji 1000 µg/mL).

Ocimum basilicum

Alkoholni ekstrakti *O. basilicum* su u MIK testu pokazali antibakterijski potencijal prema nekim gram-pozitivnim bakterijama, ali i prema *P. aeruginosa*, koja spada u gram-negativne bakterije. Među ispitivanim ekstraktima *O. basilicum*, najbolju aktivnost su imali etanolni ekstrakti (*B. subtilis* i *P. aeruginosa* MIK 250 µg/mL, i *S. aureus* MIK 500 µg/mL) (Tabela 8). Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Vlase i sar. (2014), koji su pokazali da je etanolni ekstrakt

efikasnije inhibirao rast *S. aureus* od *L. monocytogenes*, *E. coli* i *S. typhimurium*. Prema bakterijama roda *Bacillus* ispitivane u studiji Adigüzel i sar. (2005), metanolni ekstrakt *O. basilicum* je imao jače dejstvo nego etanolni ekstrakt (MIK 62,5-125 µg/mL i 125 µg/mL, respektivno), što nije u skladu sa našim rezultatima. S druge strane, autori su pokazali da metanolni ekstrakt efikasnije inhibira rast *E. coli* od etanolnog ekstrakta (MIK 125 µg/mL i 250 µg/mL), dok su suprotne vrednosti dobijene za *S. aureus* (MIK za metanolni ekstrakt 250 µg/mL, a za etanolni 125 µg/mL).

Ekstrakti ispitivani u ovoj doktorskoj disertaciji nisu značajno inhibirali invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija (Grafik 29). Etanolni ekstrakti *O. basilicum* su efikasno inhibirali formiranje biofilma (sve testirane koncentracije su pokazale sličan nivo inhibicije koji je na najvišoj dostigao 45,55%) i degradaciju već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (37,15%), na gotovo svim testiranim koncentracijama (Grafici 30 i 31). Etanolni ekstrakt ove biljke ispitivan u studiji Pratiwi i sar. (2015) je inhibirao samo formiranje biofilma *S. aureus*, ali nije delovao na njegovu degradaciju. Takođe, u istoj studiji nije pokazan efekat etanolnog ekstrakta na formiranje i degradaciju već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1.

Origanum majorana

Metanolni ekstrakt *O. majorana* je najbolji inhibitorni efekat ostvario prema *B. subtilis* (MIK 250 µg/mL), dok je nešto slabije inhibirao *L. innocua* i *S. aureus* (MIK 500 µg/mL). Značajno je napomenuti da je ovaj ekstrakt jedini pored etanolnog ekstrakta *S. officinalis*, inhibirao rast *E. faecalis* na 500 µg/mL. Etanolni ekstrakt je najbolji inhibitorni efekat ostvario prema *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL), dok je *B. subtilis*, *L. innocua* i *S. aureus* inhibirao pri koncentraciji 500 µg/mL (Tabela 8). U studiji Duletić-Laušević i sar. (2018a), etanolni i vodeni ekstrakti *O. majorana* poreklom iz Srbije nisu imali efekta na ispitivane gram-negativne bakterije, ali su pokazali da etanolni ekstrakti imaju antibakterijski potencijal u slučaju gram-pozitivnih bakterijai, što je u skladu sa našim rezultatima. Isti su prikazali da etanolni ekstrakt *O. majorana* ima najbolju inhibitornu aktivnost prema *B. subtilis* (MIK 625 µg/mL), *L. innocua* i *S. aureus* (MIK 625 µg/mL), dok je skoro 5 mg/mL bilo potrebno za inhibiciju rasta *E. faecalis*.

Etanolni ekstrakt *O. majorana* ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća (Grafik 29). Najbolji efekat na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 je ostvaren pri koncentraciji 625 µg/mL (32,59% inhibicije) (Grafik 30), dok je degradacija biofilma bila 38,1% na koncentraciji od 312 µg/mL (Grafik 31). Za razliku od toga, u studiji Varposhti i sar. (2013), etanolni ekstrakt *O. majorana* nije inhibirao formiranje biofilma *P. aeruginosa* 214, već je naprotiv, stimulisao njegovo formiranje. Pored toga, pretragom literature je ustanovljeno da ne postoji veći broj podataka o uticaju ekstrakata *O. majorana* na formiranje i degradaciju bakterijskog biofilma, kao ni o njihovom uticaju na bakterijsku infekciju eukariotskih ćelija.

Origanum vulgare

Među ekstraktima *O. vulgare*, najbolji antibakterijski efekat u MIK testu je pokazao etanolni ekstrakt, koncentracija od 250 µg/mL je inhibirala rast *B. subtilis*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*, dok je metanolni ekstrakt inhibirao *B. subtilis*, *L. innocua* i *S. aureus* na 500 µg/mL (Tabela 8). Ashraf i sar. (2011) su pokazali da metanolni ekstrakti imaju bolji antibakterijski potencijal od vodenih ekstrakata, što je u skladu sa našim rezultatima. U studiji Parra i sar. (2021), etanolni ekstrakt *O. vulgare* je rast *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* inhibirao na

156 µg/mL, dok su Coccimiglio i sar. (2016) pokazali da etanolni ekstrakt ove biljke inhibira *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* na MIK 25 µg/mL.

U testu inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija, etanolni ekstrakt je ostvario značajno dejstvo u odnosu na negativnu kontrolu (Grafik 29). Takođe, ovaj ekstrakt je na koncentraciji od 625 µg/mL inhibirao formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 od 54,57% (Grafik 30), a na koncentraciji 312 µg/mL doveo je do degradacije već formiranog biofilma od 34,01% (Grafik 31). Pretragom literature je ustanovljeno da je do sada intenzivno proučavan uticaj etarskog ulja *O. vulgare* na bakterijski biofilm, međutim ne postoje podaci o uticaju ekstrakata ove biljke na formiranje i degradaciju već formiranog biofilma.

Rosmarinus officinalis

Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da vodeni ekstrakt *R. officinalis* nema antibakterijsku aktivnost, dok je etanolni ekstrakt inhibirao rast *B. subtilis* (MIK 62,5 µg/mL), *S. aureus* i *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL) i *L. innocua* (MIK 500 µg/mL) (Tabela 8). U MIK testu, metanolni ekstrakt je najbolji inhibitorni efekat ostvario prema *B. subtilis* (MIK 125 µg/mL), *L. innocua* (MIK 250 µg/mL) i *S. aureus* (MIK 500 µg/mL). Takođe, ovaj ekstrakt je, pored metanolnog ekstrakta *O. majorana*, jedini inhibirao rast *E. faecalis* na 500 µg/mL). Etanolni ekstrakt *R. officinalis* je, s druge strane, inhibirao rast *B. subtilis* (MIK 62,5 µg/mL), *S. aureus* i *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL), kao i *L. innocua* (MIK 500 µg/mL) (Tabela 8). U studiji Jafari-Sales i Hossein-Nezhad (2020) je pokazano da metanolni ekstrakt *R. officinalis* inhibirao rast *S. aureus* i *E. coli* tek na 25 mg/mL, dok je rast *P. aeruginosa* inhibirao na 6,25 mg/mL.

Ekstrakti *R. officinalis* ispitivani u okviru ove doktorske disertacije nisu inhibirali adheziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća. Međutim, postoji podatak da je dihlormetanski:metanolni (1:1) ekstrakt ove biljke inhibirao adheziju *P. aeruginosa* ATCC 9027 i kliničnog izolata *P. aeruginosa* (Sandasi i sar., 2011).

Etanolni ekstrakt *R. officinalis* je značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća (Grafik 29). Ovaj ekstrakt je pri koncentraciji 625 µg/mL ostvario najviši inhibitorni efekat na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (34,28%, Grafik 30), dok je degradaciju biofilma inhibirao samo na najnižim koncentracijama, 625 i 312 µg/mL (24,9 i 18,94% degradacije, respektivno, Grafik 31). Etanolni ekstrakt *R. officinalis* je u studiji Quave i Smeltzer (2009) inhibirao rast *S. aureus* MRSA na MIK₅₀⁴ 512 µg/mL, a formiranje biofilma *S. aureus* MRSA, na IC₅₀ 8 µg/mL. S druge strane, Zarei Yazdeli i sar. (2021) su pokazali da metanolni ekstrakt *R. officinalis* inhibira formiranje biofilma *P. aeruginosa* ATCC1074, ali i kliničkih izolata *P. aeruginosa* na koncentraciono-zavisan način.

Salvia officinalis

Među ekstraktima *S. officinalis*, najbolji efekat u MIK testu je ispoljio etanolni ekstrakt, i to prema *B. subtilis* (MIK 62,5 µg/mL) i *S. aureus* (MIK 125 µg/mL). Pored metanolnog ekstrakta *Th. vulgaris*, etanolni ekstrakt *S. officinalis* je, u odnosu na ostale ispitane ekstrakte predstavnika familije Lamiaceae, najjače inhibirao rast *L. innocua* (MIK 250 µg/mL). Pored toga, ovaj ekstrakt je, pored metanolnog ekstrakta *O. majorana*, ostvario i inhibiciju rasta *E. faecalis* (MIK 500 µg/mL). Mocan i sar. (2020) su za gram-pozitivne bakterije dobili sledeće rezultate: MIK za *B. cereus*, *S. aureus* i *L. monocytogenes* = 180 µg/mL, MIK za *P. aeruginosa* i *S. typhimurium* = 90

⁴ MIK₅₀ predstavlja minimalnu inhibitornu koncentraciju koja inhibira 50% rasta mikroorganizama.

$\mu\text{g/mL}$, MIK za *E. coli* = 45 $\mu\text{g/mL}$. Ovi rezultati nisu u saglasnosti sa rezultatima predstavljenim u okviru ove doktorske disertacije, kao ni sa radom Mosafa i sar. (2014), gde je inhibicija rasta pomenutih bakterija postignuta primenom značajno viših koncentracija ekstrakata.

Budući da je etanolni ekstrakt *S. officinalis* u MIK testu inhibirao rast *P. aeruginosa* tek na 500 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8), u daljem radu nije praćen njegov efekat na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1. U studiji Lekbach i sar. (2019), ekstrakti *S. officinalis* su sprečili formiranje biofilma, ali i degradirali već formirani biofilm *P. aeruginosa* i imali su baktericidan efekat na sesilne bakterije.

U testu invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća, etanolni ekstrakt je pokazao značajan efekat (Grafik 29).

Satureja montana

Etanolni ekstrakt *S. montana* je pokazao najbolji antibakterijski efekat od svih ispitivanih ekstrakata ove biljke, pri čemu je u MIK testu najviše inhibirao rast *B. subtilis* i *P. aeruginosa* (MIK 250 $\mu\text{g/mL}$) i *L. innocua* i *S. aureus* (MIK 500 $\mu\text{g/mL}$). Metanolni ekstrakt je u MIK testu najbolje inhibirao rast *B. subtilis* i *L. innocua* (MIK 500 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 8), dok vodeni ekstrakt *S. montana* nije imao antibakterijsku aktivnost ni u jednom od korišćenih testova za određivanje antibakterijske aktivnosti. Antibakterijska aktivnost ekstrakata *S. montana* dobijena u okviru ove doktorske disertacije u MIK testu je bila značajno jača nego u studiji Serrano i sar. (2011). U ovoj studiji je pokazano da vodeni ekstrakti ne utiču na inhibiciju rasta testiranih bakterija, dok etanolni inhibiraju rast *L. innocua*, *L. monocytogenes*, *E. coli* i *S. typhimurium* na značajno višim vrednostima MIK (MIK 3 mg/mL za testirane bakterijske vrste roda *Listera*, MIK 15,1 mg/mL za *E. coli* i MIK 30,3 mg/mL za *S. typhimurium*). Pored toga, etarsko ulje ove biljke ispoljilo značajno višu antibakterijsku aktivnost u odnosu na njene ekstrakte.

U testu inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelijama, etanolni ekstrakt *S. montana* ispitivan u okviru ove doktorske disertacije je pokazao značajan efekat u odnosu na negativnu kontrolu (Grafik 29). Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima studije Šimunović i sar. (2020), gde je pokazano da etanolni ekstrakt ove biljke koncentracije 62,5 $\mu\text{g/mL}$ inhibira invaziju jednog gram-negativnog bakterijskog soja, *Campylobacter jejuni* 11168, pri invaziji epitelijalnih INT407 ćelija, za čak 81%, a njihovu adheziju na pomenute ćelije inhibira za 15%.

Etanolni ekstrakt *S. montana* koncentracije 625 $\mu\text{g/mL}$ je ostvario najbolji efekat na formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu je dostignuta inhibicija od 46,62% (Grafik 30). S druge strane, najbolji efekat na degradaciju biofilma ove bakterije, etanolni ekstrakt je ostvario na najmanjoj testiranoj koncentraciji – 39,16% (Grafik 31). Pretragom literature je ustanovljeno da je, za razliku od ekstrakata *S. montana*, inhibitorna aktivnost etarskog ulja ove biljke na formiranje i degradaciju biofilma intenzivno proučavana. Istraživanja Maraghi i sar. (2021) su pokazala značajnu inhibiciju vezivanja *S. aureus* u toku prve faze formiranja biofilma metanolnim ekstraktom *Satureja khuzistanica*, koji je na koncentraciji 50 mg/mL doveo i do razgradnje formiranog biofilma. Upoređujući koncentracije ekstrakata korišćene u navedenom i našem radu, može se zaključiti da je *S. montana* uzgajana u Srbiji pokazala veoma visok potencijal inhibicije kako formiranja, tako i degradacije biofilma.

Sideritis scardica

Od svih ispitanih metanolnih ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae, ekstrakt *S. scardica* ispoljio najbolji antibakterijski efekat na rast *B. subtilis* (MIK 31,25 µg/mL), dok je etanolni ekstrakt slabije inhibirao rast *B. subtilis* (MIK 125 µg/mL). Metanolni i etanolni ekstrakti su pokazali antibakterijski efekat i na *S. aureus* (MIK 250 µg/mL) i *L. innocua* (MIK 500 µg/mL). U studiji Tadić i sar. (2012a) je pokazano da je etanolni ekstrakt inhibira rast *S. aureus*, MIK 1280 µg/mL, *E. faecalis* MIK > 2560 µg/mL, a *E. coli* i *P. aeruginosa*, MIK 2560 µg/mL. Poređenjem rezultata navedenog inašeg rada može se uočiti da je antibakterijska aktivnost ekstrakata ispitanih u ovoj doktorskoj disertaciji znatno jača, iako je radi o biljnom materijalu sakupljenom na istom geografskom području. Iako je etanolni ekstrakt inhibirao rast *P. aeruginosa* na MIK 250 µg/mL (Tabela 8) koja se koristi za detekciju inhibitornog dejstva na formiranje i degradaciju biofilma *P. aeruginosa* PAO1, zbog slabe rastvorljivosti nije mogao biti testiran.

U testu inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća, etanolni ekstrakt *S. scardica* je ostvario značaj efekat (Grafik 29). Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje slična istraživanja, te je ovo prva studija koja je obuhvatila uticaj ekstrakata *S. scardica* na formiranje i degradaciju bakterijskog biofilma, kao i invaziju bakterija tokom infekcije eukariotskih ćelija.

Teucrium chamaedrys* i *T. montanum

Za razliku od vodenih ekstrakata *T. chamaedrys*, antimikrobni potencijal su pokazali alkoholni ekstrakti kod nekih gram-pozitivnih bakterija kao što su *B. subtilis*, *L. innocua* i *S. aureus* (MIK 500 µg/mL), kao i kod *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL). Slični rezultati su dobijeni i sa ekstraktima *T. montanum*, pri čemu je najbolji efekat pokazao etanolni ekstrakt, MIK kod *B. subtilis* i *S. aureus* je bio 500 µg/mL, a kod *P. aeruginosa* MIK 250 µg/mL (Tabela 8). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima Vlase i sar. (2014), koji su pokazali da je etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* imao odlično inhibitorno dejstvo prema *S. aureus* (bolje od gentamicina) i prema *L. monocytogenes*, dok je slabo inhibirao rast *E. coli* i *S. typhimurium* u disk difuzionom testu. U studiji Stanković i sar. (2012) je pokazano da je za inhibiciju rasta određenih bakterija potrebna veća koncentracija ekstrakata *T. chamaedrys* nego što je korišćena u okviru ove doktorske disertacije (MIK 5 mg/mL za *E. coli* i 1,25 mg/mL za *P. aeruginosa*), dok je rast *S. aureus* inhibiran metanolnim ekstraktom pri MIK 78 µg/mL. Takođe, autori su pokazali da metanolni ekstrakti *T. montanum* i *T. chamaedrys* inhibiraju rast *E. coli* na istoj koncentraciji (MIK 5 mg/mL), ali isti ekstrakt *T. chamaedrys* ima bolji antimikrobni efekat na *P. aeruginosa* (MIK 2,5 mg/mL) i *S. aureus* ATCC 25923 (MIK 150 µg/mL).

Etanolni ekstrakt *T. chamaedrys* testiran je značajno inhibirao invaziju *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća (Grafik 29). Takođe, ostvario je i najbolji efekat na inhibiciju već formiranog biofilma (57,31% inhibicije pri koncentraciji 625 µg/mL, Grafik 31). U testu inhibicije formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1, najbolju aktivnost je ostvario pri koncentraciji 625 µg/mL inhibirajući 39,36% biofilma (Grafik 30). Etanolni ekstrakt *T. montanum* je pokazao značajnu inhibiciju invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija (Grafik 29), a podjednako dobar efekat je pokazao i na sprečavanje formiranja biofilma na 625 i 1250 µg/mL (42,13%, Grafik 30). Na koncentraciji od 625 µg/mL, etanolni ekstrakt *T. montanum* je doveo do najveće degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (38,3%, Grafik 31). Kao i u slučaju *T. chamaedrys*, ni za ekstrakte *T. montanum* ne postoje studije o uticaju na adheziju i invaziju

bakterija pri infekciji eukariotskih ćelija, kao ni u njihovom uticaju na formiranje i degradaciju bakterijskog biofilma.

Thymus serpyllum

Alkoholni ekstrakti *Th. serpyllum* su u MIK testu pokazali jednaku inhibiciju rasta *B. subtilis* i *L. innocua* (MIK 500 µg/mL), dok je u slučaju *S. aureus* (MIK 500 µg/mL) i *P. aeruginosa* (MIK 250 µg/mL) etanolni ekstrakt bio efikasniji (Tabela 8). Ekstrakt *Th. serpyllum* je u studiji Jovanović i sar. (2021) najefikasnije inhibirao rast *E. faecalis* (MIK 313 µg/mL), zatim na *B. cereus*, *S. aureus* i *L. monocytogenes* (MIK 1,25 mg/mL), dok je najslabije inhibirao rast *E. coli* i *S. enterica* (MIK 5 mg/mL). Ovi rezultati su delimično u skladu sa rezultatima ove doktorske disertacije. S druge strane, Ivasenko i sar. (2021) su pokazali da je etanolni ekstrakt inhibirao rast *P. aeruginosa* na 5 mg/mL, što je značajno viša koncentracija od MIK vrednosti dobijenih u našem radu.

U testu inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća, etanolni ekstrakt *Th. serpyllum* je imao značajnu aktivnost (Grafik 29). Najbolju inhibitornu aktivnost na formiranje biofilma, etanolni ekstrakt je ostvario pri koncentraciji 312 µg/mL (42,45% inhibicije, Grafik 30). Prema već formiranom biofilmu, etanolni ekstrakt *Th. serpyllum* je ispoljio obrnutu koncentracionu zavisnost, pri čemu je najbolji efekat ostvaren na najmanjoj koncentraciji (24,56% degradacije biofilma, Grafik 31). Pretragom literature je ustavnoljeno da do sada ne postoje studije o uticaju ekstrakata *Th. serpyllum* na adheziju i invaziju bakterija pri infekciji eukariotskih ćelija, kao ni u njihovom uticaju na formiranje i degradaciju bakterijskog biofilma. Međutim, postoji podatak da je vodeni ekstrakt listova *Th. serpyllum* korišćen kao redukciono i stabilizaciono sredstvo za jone srebra (Ag) prisutne u rastvoru Ag nanočestica, koje su, tako napravljene, pokazale visoku inhibiciju biofilma *S. aureus* (Erci i Torlak, 2019).

Thymus vulgaris

U MIK testu, metanolni ekstrakt *Th. vulgaris* je, pored metanolnog ekstrakta *R. officinalis*, pokazao najbolji inhibitorni efekat na *L. innocua*, inhibirajući rast pri MIK 250 µg/mL. Metanolni, kao i etanolni ekstrakt *Th. vulgaris*, su na istoj MIK vrednosti inhibirali rast *B. subtilis* (MIK 250 µg/mL). Prema *P. aeruginosa*, etanolni ekstrakt je ostvario bolji efekat od metanolnog ekstrakta, inhibirajući rast ove bakterije pri MIK 250 µg/mL (Tabela 8). Ovi rezultati su delimično u saglasnosti sa rezultatima Mohsenipour i Hassanshahian (2015), gde je pokazano da su metanolni ekstrakti efikasnije inhibirali rast ispitivanih bakterija. Naime, u njihovoj studiji, najbolji efekat je dobijen na *P. aeruginosa*, zatim *S. aureus* i *B. cereus*, dok je *E. coli* bila najrezistentnija.

Iako ekstrakti *Th. vulgaris* nisu imali efekta na adheziju *P. aeruginosa* pri infekciji fibroblasta pluća, studija Sandasi i sar. (2011) je pokazala da dihlormetanski:metanolni (1:1) ekstrakt *Th. vulgaris* inhibira jedino adheziju kliničnog izolata *P. aeruginosa*, dok adheziju *P. aeruginosa* ATCC 9027 stimuliše.

U testu inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija, etanolni ekstrakt je ostvario značajan efekat (Grafik 29). Pored toga, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* je pokazao sličnu inhibiciju formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1, pri čemu je na testiranim koncentracijama dostignut plato, mada je ipak najbolji efekat ostvaren na 625 µg/mL (37,22%, Grafik 30). Interesantno je da, za razliku od testa inhibicije formiranja biofilma, na degradaciju biofilma, etanolni ekstrakt *Th. vulgaris* je imao bolji efekat, pri čemu je najbolje delovala najniža

koncentracija (47,54%, Grafik 31). Na osnovu ovih rezultata, kao i rezultata studije Mohsenipour i Hassanshahian (2015) može se zaključiti da inhibitorno dejstvo ekstrakata *Th. vulgaris* na biofilm zavisi pre svega od faze razvoja biofilma, bakterijskog soja, rastvarača korišćenog za ekstrakciju, kao i primenjene koncentracije ekstrakta. Pored toga, u pomenutoj studiji je primećeno da ekstrakti *Th. vulgaris* slabije deluju na gram-negativne nego na gram-pozitivne bakterije (metabolička aktivnost *S. aureus* je smanjena za 74,47%, a *P. aeruginosa* za 29,38%).

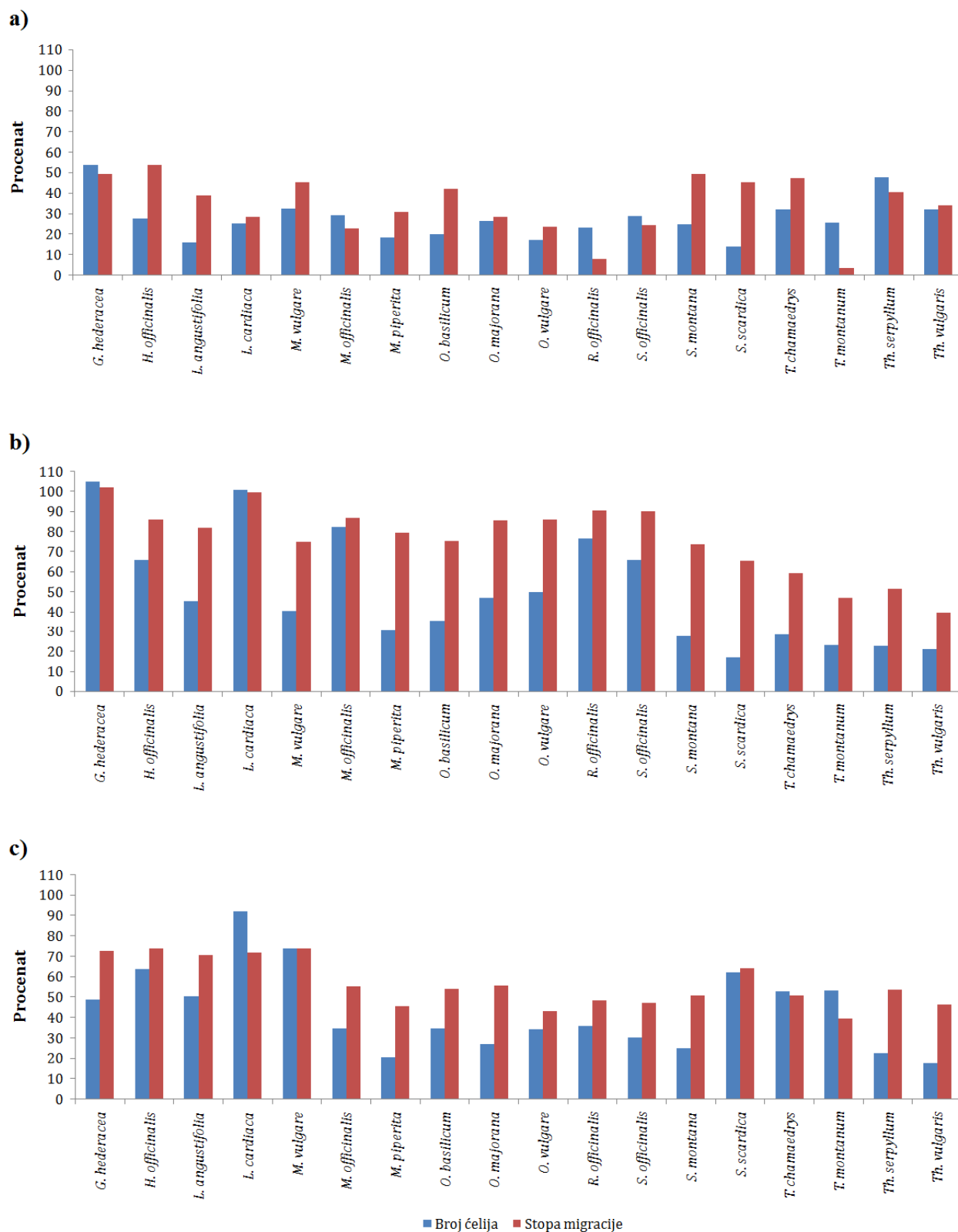
4.10. Uticaj na migraciju ćelija u *in vitro* modelu zarastanja rana

Do formiranja rana dolazi nakon određenih trauma i u patološkim stanjima, kao što su inflamacija, dijabetes, reumatoidni artritis ili tumor. Tako nastale rane je potrebno tretirati kako bi brže zarastale, a takođe i kako bi se sprečila invazija bakterija, budući da je pokazano da bakterijska infekcija može odložiti ili čak sprečiti zatvaranje i zarastanje rana (Edwards i Harding, 2004; Zenão i sar., 2017).

U akutnim ranama privremeno dolazi do povećanja nivoa prooksidanasa. Iako su mehanizmi antioksidativne odbrane zasnovani na postepenoj eliminaciji oksidativnog stresa, kod hroničnih rana je proces uspostavljanja redoks homeostaze otežan zbog nekontrolisane produkcije RVK i RVA tokom faze inflamacije. Iako je antioksidativni odgovor povišen na mestu hroničnih rana, dolazi do smanjenja antioksidativne efikasnosti usled viška prooksidanasa, poremećaja i disbalansa redoks homeostaze. Pored toga, NO na tim mestima reaguje sa drugim prooksidansima, što pored oksidativnog, za posledicu ima i pojavu nitrozativnog stresa, zbog čega hronične rane ostaju u fazi inflamacije i nemaju spontanu tendenciju stvaranja granulacionog tkiva koji bi doveo do zarastanja. Imajući u vidu navedene činjenice, preporučuje se tretiranje rana antioksidativnim agensima koji smanjuju oksidativno oštećenje ćelija i pospešuju zarastanja rana (Soneja i sar., 2005).

Do danas je pokazano da ekstrakti nekoliko stotina biljnih vrsta imaju mogućnost da modulišu proces zarastanja rana zahvaljujući biološki aktivnim fitohemijskim komponentama, posebno njihovim antioksidativnim, imunomodulatornim i antibakterijskim efektima (Ghosh i Gaba, 2013). Budući da su nabrojana dejstva ekstrakte biljaka familije Lamiaceae već pokazana u ranijim studijama i u ovoj doktorskoj disertaciji, finalni deo naših istraživanja je bio usmeren na ispitivanje uticaja metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata odabranih biljaka familije Lamiaceae na migraciju MRC-5 ćelija. MRC-5 ćelijska linija je odabrana kao veoma pogodna za ispitivanje aktivnosti zarastanja rana *in vitro* (Abe i sar., 2000).

U okviru ove doktorske disertacije efekti ekstrakata biljaka familije Lamiaceae (100 µg/mL) na zarastanje monosloja su procenjeni na osnovu broja ćelija i stope njihove migracije za 24 sata na mestu ogrebotine ćelijskog monosloja, a u odnosu na netretirane, kontrolne ćelije. Računanjem Pearsonovih koeficijenata je ustanovljeno da između ova dva načina prikazivanja rezultata postoji jaka korelacija ($r = 0,72$ za metanolne ekstrakte, $r = 0,85$ za etanolne ekstrakte i $r = 0,81$ za vodene ekstrakte) (Grafik 32). Obradene mikrografije za metanolne, etanolne i vodene ekstrakte su prikazane u Prilozima 9-11.



Grafik 32. Uticaj metanolnih (a), etanolnih (b) i vodenih (c) ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na migraciju ćelija fibroblasta pluća.

Na osnovu dobijenih rezultata uočeno je da su etanolni ekstrakti predstavnika familije Lamiaceae imali najbolji efekat na migraciju ćelija fibroblasta pluća (Grafik 32B), nakon čega slede vodeni (Grafik 32C), i na kraju metanolni ekstrakti, koji su pokazali najslabije dejstvo (Grafik 32A). Među etanolnim ekstraktima, *G. hederacea* je u poređenju sa netretiranom kontrolom imao 4,72% više ćelija u ogrebotini uz stopu migracije od 1,86%, dok je tretman *L. cardiaca* imao sličan broj ćelija i stopu migracije kao i kontrolna grupa (Grafik 32B, Prilog 10). Ipak, u odnosu na netretirane ćelije, nijedan ekstrakt nije pokazao statistički značajan efekat n zrastranje monosloja ćelija.

Kao što je već rečeno, dve veoma značajne karakteristike obnove tkiva prilikom zarastanja rana su proliferacija i migracija ćelija. Test analize ogrebotina monosloja ćelija koji je korišćen u okviru ove disertacije predstavlja *in vitro* model koji oponaša ranu i na osnovu njega je procenjena brzina zarastanja rana migracijom ćelija, ali ne i proliferacijom budući da u medijum u kom su rastvoreni ekstrakti nije bio dodat FBS, čime je sprečena proliferacija fibroblasta pluća. Pravljenjem ogrebotine, poremećen je ćelijski monosloj i prekinute su interakcije između ćelija, što je dovelo do povećanja koncentracije faktora rasta i citokina na ivici ogrebotine, čime je pokrenuta migracija ćelija (Pitz i sar., 2016).

Iako u okviru ove doktorske disertacije nije pokazano da ispitivani ekstrakti biljaka familije Lamiaceae u koncentraciji 100 µg/mL imaju značajan uticaj na migraciju ćelija i zarastanje monosloja, pretragom literature je ustanovljeno da ekstrakti ispitivanih biljaka u većoj ili manjoj meri utiču na zarastanje rana (Amri i sar., 2017; Karimzadeh i Farahpour, 2017; Ehsani i sar., 2021). Treba imati u vidu da su, iako je proliferacija ćelija fibroblasta pluća bila sprečena, ekstrakti testiranih biljaka familije Lamiaceae poreklom iz Srbije povećavali vijabilnost ovih ćelija, te se ne može isključiti njihova uloga u stimulaciji proliferacije i zarastanju rana.

Dakle, u narednim istraživanjima je neophodno da se ispita pomenuta hipoteza o kombinovanom dejstvu ovih ekstrakata na proliferaciju i migraciju ćelija fibroblasta pluća, a takođe i uvesti modifikacije metode uz pomoć kojih bi se ona optimizovala i na takav način smanjila greška ljudskog faktora u tumačenju rezultata.

4.11. Opšta diskusija

Sadržaj i hemijski sastav pojedinih fitokonstituenata ekstrakata

Faktori koji doprinose sastavu i kvantitetu ekstrahovanih komponenti iz biljnog materijala su, pre svega, izbor protokola i rastvarača za ekstrakciju. Na rastvorljivost različitih fenolnih jedinjenja značajno utiče polarnost rastvarača, zbog čega je veoma teško primeniti proceduru pogodnu za ekstrahovanje svih prisutnih polifenola (Jovanović i sar., 2017). Ipak, metanol, etanol, kao i smeše ovih alkohola sa vodom u različitim odnosima (binarni sistem rastvarača) uspešno koriste se za ekstrakciju polifenolnih jedinjenja iz lekovitih i aromatičnih biljaka. Voda se često koristi kao rastvarač zbog svoje netoksičnosti, izrazito polarnih svojstava, kao i mogućnosti da se u njoj rastvori širok spektar fitokonstituenata. Pored toga, pokazano je da čak i mala količina vode u binarnoj smeši rastvarača ima značajan uticaj jer dovodi do pojave polarnije sredine, olakšava ekstrakciju polifenolnih jedinjenja, a povećanje temperature vode povećava efikasnost ekstrakcije. Metanol i etanol su, s druge strane, manje polarni rastvarači od vode i netoksični su u niskim koncentracijama (Serrano i sar., 2011; Jovanović i sar., 2017; Abubakar i Haque, 2020). Metanol se generalno koristi za ekstrakciju polifenola manje molekulske težine, dok se u etanolu,, koji je ekološki prihvatljiviji rastvarač, rastvara veći broj ovih jedinjenja (Do i sar., 2014). Zbog

pomenutih osobina rastvarača, kao i zbog široke primene tinktura i čajeva u tradicionalnoj medicini, u ovoj doktorskoj disertaciji su ispitivani metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti 18 predstavnika familije Lamiaceae sa teritorije Srbije.

U ovoj studiji je određen je sadržaj fitokonstituenata spektrofotometrijski, kao i hemijski sastav ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae HPLC-DAD analizom. Iako je pokazano da su u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae dominantni različiti fitokonstituenti, potrebno je naglasiti da je najčešće identifikovana fenolna kiselina bila rozmarinska, a da je najčešće identifikovani flavonoid bio luteolin-7-*O*-glukozid, što je u saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima.

Pored analize sadržaja i hemijskog sastava osnovnih fitokonstituenata, ispitana je i biološka aktivnost ekstrakata: antioksidativna, genoprotektivna, antigenotoksična, antidiijabetična, antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna, antitumorska, antibakterijska, kao i uticaj ekstrakata na migraciju ćelija. Budući da je svaka biološka aktivnost ispitivana primenom većeg broja testova, bilo je neophodno proceniti njihovu korelaciju, ali i detektovati tip ekstrakta i biljnu vrstu sa najboljim biološkim potencijalom, što je urađeno IBR analizom.

Korelacija između hemijskog sastava ekstrakata i rezultata testova za određivanje biološke aktivnosti, kao i međusobna korelacija rezultata pomenutih testova je definisana Pirsonovim koeficijentom korelacije (r), a rezultati su prikazani u Tabelama 10 i 11. Pojedine vrednosti r prikazane u Tabelama 10-11 izračunate su samo za rezultate etanolnih ekstrakata jer su ili samo oni bili testirani, ili su bili biološki aktivniji.

Tabela 10. Korelacija spektrofotometrijski određenog hemijskog sastava i fenolnih jedinjenja identifikovanih HPLC-DAD analizom sa testovima za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata.

r	Ukupna fenolna jedinjenja	Ukupne fenolne kiseline	Ukupni flavonoidi	Ukupni flavonoli	Ukupni kumarini	Ukupni triterpenoidi	Rozmarinska kiselina	Kafena kiselina	Hlorogena kiselina	Kvercetin	Rutin	Naringin	Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid
DPPH	0,78	0,78	0,66	0,57	0,54	0,14	0,67	0,17	-0,21	0,14	0,09	0,24	0,45
ABTS	0,77	0,74	0,65	0,59	0,53	-0,09	0,73	0,30	-0,10	0,21	-0,04	0,24	0,51
β -karoten/linolna kiselina	0,43	0,27	0,52	0,29	0,37	0,05	0,49	0,27	-0,15	0,23	0,01	0,51	0,51
FRAP	0,77	0,89	0,62	0,47	0,59	-0,06	0,79	0,22	-0,10	0,24	0,09	0,29	0,51
URP	0,79	0,79	0,71	0,58	0,64	0,12	0,71	0,20	-0,12	0,24	0,14	0,30	0,58
Relaksacija plazmidne DNK*	0,56	0,29	0,54	0,59	0,53	0,26	0,24	0,36	0,01	0,18	0,18	0,19	0,48
SOS/ <i>umuC</i>	-0,19	-0,07	-0,14	-0,22	-0,39	-0,25	-0,14	-0,31	-0,14	-0,37	0,06	0,11	0,24
Komet test na MRC-5 ćelijama*	-0,48	-0,15	-0,67	-0,65	-0,47	0,06	-0,29	-0,14	0,16	-0,23	-0,23	-0,37	-0,49
α -glukozidaza	0,54	0,44	0,54	0,47	0,33	-0,10	0,63	0,41	-0,10	0,24	-0,18	0,29	0,47

r	Ukupna fenolna jedinjenja	Ukupne fenolne kiseline	Ukupni flavonoidi	Ukupni flavonoli	Ukupni kumarini	Ukupni triterpenoidi	Rozmarinska kiselina	Kafena kiselina	Hlorogena kiselina	Kvercetin	Rutin	Naringin	Luteolin-7-O-glukozid
Acetilholinesteraza	-0,15	-0,15	-0,11	-0,09	-0,17	-0,40	-0,20	-0,13	0,34	0,06	-0,35	0,08	-0,08
Tirozinaza	0,49	0,36	0,55	0,32	0,68	-0,03	0,48	0,45	-0,19	0,30	0,19	0,45	0,53
MTT na BV2 ćelijama*	0,00	-0,15	0,21	0,12	-0,31	0,38	0,18	-0,07	-0,15	-0,10	-0,43	0,57	0,45
NBT na BV2 ćelijama*	-0,40	-0,11	-0,42	-0,41	-0,41	-0,07	-0,30	-0,49	0,20	0,09	-0,04	-0,22	-0,20
Gris na BV2 ćelijama*	0,16	0,16	0,32	0,25	0,13	0,51	0,15	0,08	-0,17	0,10	-0,13	0,53	0,46
MTT na SH-SY5Y ćelijama*	0,63	0,59	0,44	0,22	0,17	0,32	0,69	0,12	-0,36	-0,29	0,00	0,19	0,64
MTT na HCT-116 ćelijama*	-0,41	-0,05	-0,37	-0,32	-0,25	0,06	-0,10	-0,52	0,03	-0,02	0,06	-0,21	-0,35
NBT na HCT-116 ćelijama*	0,18	0,63	0,22	0,02	0,29	-0,22	0,26	-0,12	-0,25	-0,19	0,06	-0,11	0,05
Gris na HCT-116 ćelijama*	0,21	0,60	0,09	-0,06	0,40	-0,05	0,41	0,02	-0,13	0,34	-0,05	0,03	-0,14
Komet test na HCT-116 ćelijama*	0,06	-0,01	-0,04	0,01	-0,07	-0,16	-0,25	0,09	0,03	0,15	0,07	-0,22	-0,25
MIK na <i>B. subtilis</i>	0,18	0,21	0,19	0,16	0,31	0,46	0,19	-0,14	0,03	0,20	0,11	0,19	0,22
MIK na <i>E. faecalis</i>	0,24	0,32	0,25	0,05	0,47	0,24	0,24	0,12	0,02	0,23	0,26	0,29	0,32
MIK na <i>L. innocua</i>	0,25	0,33	0,33	0,28	0,45	0,40	0,30	-0,12	0,00	0,20	0,15	0,20	0,32
MIK na <i>S. aureus</i>	0,19	0,21	0,11	0,12	0,08	0,32	0,17	-0,22	0,09	0,18	-0,07	0,10	0,18
MIK na <i>P. aeruginosa</i> *	0,44	0,33	0,37	0,28	0,56	-0,26	0,34	0,25	0,18	0,33	0,16	0,04	0,15
Invazija <i>P. aeruginosa</i> PAO1*	-0,06	0,04	0,37	0,34	0,20	0,15	0,06	-0,07	-0,19	-0,18	-0,11	0,15	0,21
Formiranje biofilma <i>P. aeruginosa</i> PAO1*	0,52	0,32	0,25	0,29	0,10	-0,27	0,26	0,03	0,11	-0,09	-0,08	-0,20	0,09
Degradacija biofilma <i>P. aeruginosa</i> PAO1*	0,38	0,22	0,57	0,53	0,43	-0,20	0,13	0,22	-0,26	-0,12	0,36	0,09	0,29
Stopa migracije MRC-5 ćelija*	-0,15	0,27	-0,24	-0,31	-0,38	-0,11	-0,01	-0,38	-0,10	-0,25	-0,19	-0,28	-0,08

r – Pirsonovi koeficijenti korelacije; $|r| < 0,35$ slaba korelacija (nebojena polja); $0,36 < |r| < 0,67$ umerena korelacija (zeleno polja); $0,68 < |r| < 1$ jaka korelacija (roze polja) (Taylor, 1990); * – r samo za etanolne ekstrakte.

Jaka korelacija je ustanovljena između ukupnih fenolnih jedinjenja, uključujući fenolne kiseline, i antioksidativne aktivnosti u DPPH, ABTS, FRAP i URP testovima; između ukupnih flavonoida i URP testa, kao i između ukupnih kumarina i sposobnosti inhibicije tirozinaze. S druge strane, od pojedinačnih jedinjenja, jedino je visoko prisustvo rozmarinske kiseline bilo u korelaciji sa antioksidativnom aktivnošću u ABTS, FRAP i URP testovima, kao i sa stepenom citotoksičnosti prema SH-SY5Y neuronima (Tabela 10). Rezultati ovih analiza ukazuju na to da bi ukupna i pojedinačna fenolna i terpenska jedinjenja, mogla biti nosioci detektovane biološke aktivnosti.

Umerena korelacija je nađena između ukupnih fenolnih jedinjenja i rezultata antioksidativne aktivnosti u β -karoten/linolna kiselina testu, genoprotektivne aktivnosti, antigenotoksične aktivnosti u eukariotskom modelu, sposobnosti inhibicije α -glukozidaze i tirozinaze, produkcije RVK-a od strane BV2 ćelija, stepena citotoksičnosti prema SH-SY5Y i HCT-116 ćelijama, inhibicije rasta *P. aeruginosa*, kao i između ukupnih fenolnih jedinjenja i inhibicije formiranja i degradacije već postojećeg biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 10). Ovaj tip korelacije između rezultata spektrofotometrijski određenih sadržaja fitohemijskih jedinjenja ili pojedinačnih identifikovanih fenolnih jedinjenja i testova za određivanje različitih bioloških aktivnosti bi mogao ukazati na delimičan uticaj pomenutih sekundarnih metabolita na ispoljavanje ispitanih bioloških aktivnosti.

Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina je bio u umerenoj korelaciji sa inhibicijom aktivnosti α -glukozidaze i tirozinaze, vijabilnosti SH-SY5Y neurona, kao i produkcijom RVK-a i NO-a od strane HCT-116 ćelija. Budući da su sve vrednosti r bile pozitivne, može se reći da sa povećanjem ukupnih fenolnih kiselina raste i detektovana biološka aktivnost (Tabela 10).

Ukupni flavonoidi su takođe pokazali umerenu korelaciju sa rezultatima testova u kojima su praćene antioksidativna, genoprotektivna i antigenotoksična aktivnost u eukariotskom modelu, inhibicije α -glukozidaze i tirozinaze, kao i sa produkcijom RVK-a od strane BV2 ćelijama, stepenom citotoksičnosti na SH-SY5Y neurone i HCT-116 ćelije, inhibicijom rasta *P. aeruginosa*, inhibicija invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća, a takođe i sa degradacijom biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 10).

Pokazana je umerena korelacija između ukupnog sadržaja flavonola i rezultata testova antioksidativne aktivnosti (osim β -karoten/linolna kiselina testa), genoprotektivne i antigenotoksične aktivnosti u eukariotskom modelu, stepena inhibicije α -glukozidaze, produkcije RVK-a od strane BV2 ćelija, kao i sa degradacijom već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 10).

S druge strane, sadržaj kumarina je umereno korelisao sa rezultatima testova antioksidativne, genoprotektivne i antigenotoksične aktivnosti, produkcijom RVK-a od strane BV2 i NO-a od strane HCT-116 ćelija, inhibicijom rasta *E. faecalis*, *L. innocua* i *P. aeruginosa*, kao i sa degradacijom već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 i migracijom MRC-5 ćelija (Tabela 10).

Slično kao za flavonole, umerena korelacija je utvrđena između ukupnih triterpena i sposobnosti inhibicije AChE, vijabilnosti i produkcije NO-a od strane BV2 ćelija, kao i inhibicije rasta *B. subtilis* i *L. innocua* (Tabela 10).

Pored jake korelacije između količine rozmarinske kiseline i rezultata pojedinih testova za određivanje biološke aktivnosti, utvrđena je i umerena korelacija između ove fenolne kiseline i

rezultata antioksidativne aktivnosti (DPPH i ABTS testova), sposobnosti inhibicije aktivnosti α -glukozidaze i tirozinaze, kao i produkcije NO-a od strane HCT-116 ćelija. Dobijeni rezultati pokazuju da se sa povećanjem koncentracije rozmarinske kiseline u ekstraktima povećava njihova biološka aktivnost. Umerena korelacija količine rozmarinske kiseline u ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae i β -karoten/linolna kiselina testa (Tabela 10), povezana je i sa relativno polarnom prirodom rozmarinske kiseline, što sugerira da ekstrakti bogati rozmarinskom kiselinom imaju dobar potencijal da zaštite već postojeće antioksidante u sistemu, međutim treba imati u vidu da polarnost jedinjenja često može predstavljati prepreku prilikom prodiranja kroz ćeliju u *in vivo* sistemu.

Rezultati dobijeni u ovoj doktorskoj disertaciji su pokazali da kafena kiselina, pored inhibicije α -glukozidaze i tirozinaze, delimično doprinosi i genoprotektivnom efektu ekstrakata. Nasuprot tome, utvrđena je negativna umerena korelacija između količine kafene kiseline i produkcije RVK-a od strane BV2 ćelija, vijabilnosti HCT-116 ćelija, kao i migracije MRC-5 ćelija prilikom zarastanja monosloja (Tabela 10). Negativna umerena korelacija je pronađena i između količine hlorogene kiseline i stepena citotoksičnosti prema SH-SY5Y neuronima (Tabela 10).

Količina naringina u ekstraktima predstavnika porodice Lamiaceae je bila u umerenoj korelaciji sa rezultatima β -karoten/linolna kiselina testa. Kao i u slučaju rozmarinske kiseline, nije iznenađujuće što korelacija između količine naringina i antioksidativnog efekta detektovanog u ovom testu nije jaka budući da je naringin polarno jedinjenje, odnosno glikozid, a β -karoten/linolna kiselina je test koji se, pre svega, koristi za merenje antioksidativne aktivnosti nepolarnih agenasa (Prieto i sar., 2012). Pored toga, količina naringina je umereno korelirala sa genoprotektivnom aktivnošću ekstrakata, inhibicijom tirozinaze, kao i vijabilnošću i produkcijom NO-a od strane BV2 ćelija (Tabela 10).

Količina luteolin-7-O-glukozid je bila u umerenoj korelaciji sa rezultatima testova antioksidativne i genoprotektivne aktivnosti. Pored toga, postojala je umerena korelacija sa inhibicijom aktivnosti tirozinaze, vijabilnošću i produkcijom NO-a od strane BV2 ćelija, kao i sa vijabilnošću SH-SY5Y neurona (Tabela 10).

Među ispitivanim grupama sekundarnih metabolita i pojedinačnih fenolnih jedinjenja, najslabiju korelaciju sa testovima za određivanje biološke aktivnosti su imali rutin (negativna umerena korelacija sa vijabilnošću BV2 ćelija i pozitivna umerena korelacija sa degradacijom formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1), kvercetin (negativna umerena korelacija sa antigenotoksičnom aktivnošću u prokariotskom modelu) (Tabela 10).

Generalno, na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 10, može se uočiti jača korelacija između rezultata testova za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata i sadržaja njihovih fitokonstituenata u poređenju sa rezultatima pomenutih testova za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata i pojedinačnih jedinjenja, što može biti posledica sinergističkog efekta komponenti ekstrakata. Takođe, ovi rezultati ukazuju da je količina fitokonstituenata dobar pokazatelj biološkog potencijala ekstrakata.

Korelacija rezultata testova antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i drugih bioloških aktivnosti

Svi ispitivani ekstrakti predstavnika porodice Lamiaceae su ispoljili antioksidativno dejstvo *in vitro*, a budući da je oksidativni stres u osnovi mnogih savremenih bolesti čoveka, u narednim koracima ove studije su ispitane i druge biološke aktivnosti koje su povezane antioksidativnim

dejstvom. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da se antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae, pored direktne sposobnosti da izvrše prenos atoma vodonika ili pojedinačnog elektrona, zaštite drugih antioksidativnih supstanci i reakcija oksido-redukcije, manifestuje i time što ovi ekstrakti pružaju zaštitu genetičkom materijalu, a takođe pospešuju i određene mehanizme reparacije molekula DNK, što je primećeno kako u prokariotskom, tako i u eukariotskom modelu.

Rezultati dobijeni različitim testovima za određivanje antioksidativne aktivnosti su međusobno ispoljili jaku korelaciju. Rezultati Pirsonove korelacije potvrđuju prethodnu kategorizaciju testova za određivanje antioksidativne aktivnosti prikazanu u poglavlju 4.3, prema kojoj su DPPH i ABTS testovi svrstani u jednu grupu ($r_{\text{DPPH-ABTS}} = 0,77$); FRAP i URP testovi u zasebnu grupu ($r_{\text{FRAP-URP}} = 0,87$), dok su β -karoten/linolna kiselina testom ispitivani drugačiji mehanizmi antioksidativnog delovanja od prethodne dve grupe testova (r u opsegu od 0,31 – 0,48), zbog čega je ovaj test svrstan u zasebnu grupu (Tabela 11).

Rezultati testova antioksidativne aktivnosti ekstrakata su umereno korelisali sa rezultatima genoprotektivne aktivnosti, kao i sa sposobnošću inhibicije aktivnosti tirozinaze. Rezultati DPPH testa su, pored toga, umereno korelisali sa antigenotoksičnom aktivnošću u prokariotskom modelu, produkcijom RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i NO-a od strane HCT-116 ćelija, inhibicijom rasta *B. subtilis*, kao i sa inhibicijom formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 11).

Između rezultata ABTS testa i inhibicije aktivnosti α -glukozidaze utvrđena je jaka korelacija, dok su rezultati ABTS testa umereno korelisali sa rezultatima antigenotoksične aktivnosti, efektom na smanjenje neurocitotoksičnog potencijala solubilnih produkata LPS-om aktiviranih BV2 ćelija, inhibicijom rasta *P. aeruginosa*, kao i degradacijom formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1. (Tabela 11).

Rezultati β -karoten/linolna kiselina testa su jako pozitivno korelisali sa smanjenjem neurocitotoksičnog potencijala solubilnih produkata LPS-om aktiviranih BV2 ćelija. Za razliku od toga, rezultati β -karoten/linolna kiselina testa su umereno do slabo korelisali sa antigenotoksičnom aktivnošću u eukariotskom modelu, sposobnošći inhibicije aktivnosti α -glukozidaze, kao i vijabilnošću i produkcijom RVK-a i NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija (Tabela 11).

Rezultati FRAP i URP testa su umereno korelisali inhibicijom rasta *B. subtilis*, sposobnošću inhibicije aktivnosti α -glukozidaze, citotoksičnom aktivnošću prema SH-SY5Y neuronima, kao i sa inhibicijom formiranja i degradacije već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 11). Pored toga, rezultati FRAP testa su umereno korelisali i sa antigenotoksičnom aktivnošću u prokariotskom modelu, produkcijom RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i produkcijom NO-a od strane HCT-116 ćelija, kao i sa inhibicijom rasta *P. aeruginosa* (Tabela 11).

Dakle, jake i umerene korelacije uočene između antioksidativne aktivnosti i drugih ispitivanih bioloških aktivnosti predstavljaju dokaz njihove povezanosti sa ublažavanjem ili eliminacijom negativnih efekata oksidativnog i nitrozativnog stresa *in vitro*. Ipak, potrebno je naglasiti da se pojedini mehanizmi ovih bioloških aktivnosti mogu razlikovati u *in vivo* sistemima zbog dejstva drugih, unutrašnjih, faktora.

Tabela 11. Međusobna korelacija testova za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata.

r	1	2	3	4	5	6*	7*	8*	9	10	11	12*	13*	14*	15*	16*	17*	18*	19*	20*	21*	22*	23*	24*	25*	26*	27*	28*
1	1	0,77	0,36	0,85	0,80	0,36	-0,39	-0,34	0,51	-0,14	0,37	-0,16	-0,45	-0,02	0,32	-0,34	0,29	0,48	0,14	-0,54	0,07	0,22	-0,28	0,23	-0,01	0,46	0,34	0,01
2		1	0,31	0,90	0,77	0,46	-0,46	-0,42	0,76	-0,06	0,52	-0,06	-0,45	0,07	0,47	-0,16	0,24	0,42	0,07	-0,54	-0,03	0,18	-0,35	0,56	0,01	0,47	0,51	-0,16
3			1	0,38	0,48	0,47	0,08	-0,48	0,44	-0,14	0,37	0,39	-0,40	0,42	0,68	-0,16	0,15	0,08	-0,21	0,20	0,31	0,24	0,06	0,34	0,14	0,16	0,17	-0,15
4				1	0,87	0,39	-0,40	-0,38	0,63	-0,10	0,55	-0,13	-0,47	0,04	0,52	-0,14	0,34	0,59	0,07	-0,43	0,09	0,23	-0,33	0,48	-0,08	0,47	0,38	-0,10
5					1	0,59	-0,26	-0,61	0,55	-0,19	0,63	0,03	-0,35	0,17	0,62	-0,27	0,25	0,27	-0,01	-0,26	0,21	0,24	-0,16	0,58	0,09	0,45	0,46	-0,20
6*						1	-0,19	-0,51	0,50	-0,02	0,25	-0,07	-0,23	0,34	0,32	-0,48	-0,24	-0,23	-0,23	0,21	0,36	-0,06	0,27	0,36	-0,01	-0,01	0,22	-0,38
7*							1	0,24	-0,18	-0,25	0,12	0,47	0,41	0,43	0,36	0,11	0,23	-0,38	-0,33	0,63	0,30	0,65	-0,55	0,25	-0,40	-0,35	0,48	0,48
8*								1	-0,03	0,24	-0,19	-0,11	0,45	-0,13	-0,19	0,15	0,04	0,06	-0,13	0,31	-0,02	0,14	0,36	-0,50	-0,27	-0,12	-0,69	0,56
9									1	-0,04	0,48	0,09	-0,41	0,19	0,59	-0,09	0,19	0,38	-0,23	-0,36	0,05	0,24	-0,27	0,51	0,18	0,26	0,34	-0,21
10										1	-0,14	0,12	0,08	-0,03	-0,11	0,18	0,43	0,15	0,08	0,47	0,27	-0,16	0,46	0,09	-0,07	0,24	-0,19	0,24
11											1	0,26	-0,46	0,21	0,59	-0,20	0,07	0,17	-0,11	-0,11	0,19	-0,10	-0,19	0,58	0,02	0,21	0,51	-0,50
12*												1	0,17	0,75	0,33	0,20	-0,21	-0,21	-0,38	0,37	0,21	0,22	0,31	-0,33	0,34	-0,38	-0,13	-0,03
13*													1	0,29	-0,22	0,34	0,02	-0,05	-0,19	0,33	0,42	0,39	0,53	-0,42	0,12	-0,38	-0,50	0,61
14*														1	0,39	0,15	-0,08	-0,02	-0,55	0,24	0,60	0,47	0,41	-0,26	0,46	-0,51	-0,19	0,00
15*															1	-0,07	0,28	0,07	-0,47	0,16	0,16	0,30	0,23	0,17	0,16	0,14	0,05	-0,02
16*																1	0,21	0,33	-0,06	0,18	0,02	-0,10	-0,02	0,05	-0,06	-0,14	-0,07	0,18
17*																	1	0,51	0,06	-0,08	0,35	0,06	0,08	0,19	0,17	0,21	0,06	0,53
18*																		1	0,15	-0,35	0,20	0,01	-0,22	0,24	-0,23	0,19	-0,05	0,19
19*																			1	-0,26	-0,35	-0,56	-0,45	0,24	-0,58	0,49	0,44	-0,01
20*																				1	0,30	0,16	0,68	-0,24	-0,19	-0,13	-0,44	0,18
21*																					1	0,47	0,39	-0,10	0,33	-0,36	-0,20	0,29
22*																						1	0,42	-0,33	0,39	-0,29	-0,34	0,35
23*																							1	-0,33	0,04	-0,12	-0,53	0,40
24*																								1	-0,22	0,60	0,63	-0,49
25*																									1	-0,57	-0,09	0,11
26*																										1	0,44	-0,14
27*																											1	-0,52
28*																												1

r – Pearsonov koeficijent korelacije; $|r| < 0,35$ slaba korelacija (neobojena polja); $0,36 < |r| < 0,67$ umerena korelacija (zelena polja); $0,68 < |r| < 1$ jaka korelacija (roze polja) (Taylor, 1990); * – r samo za etanolne ekstrakte. Testovi: 1 – DPPH; 2 – ABTS; 3 – β -karoten/linolna kiselina; 4 – FRAP; 5 – URP; 6 – Relaksacija plazmidne DNK; 7 – SOS/umic; 8 – Komet test na MRC-5 ćelijama; 9 – α -glukozidaza; 10 – Acetilholinesteraza; 11 – Tirozinaza; 12 – MTT na BV2 ćelijama; 13 – NBT na BV2 ćelijama; 14 – Gris na BV2 ćelijama; 15 – MTT na SH-SY5Y ćelijama; 16 – MTT na HCT-116 ćelijama; 17 – NBT na HCT-116 ćelijama; 18 – Gris na HCT-116 ćelijama; 19 – Komet test na HCT-116 ćelijama; 20 – MTK na *E. faecalis*; 21 – MTK na *B. subtilis*; 22 – MTK na *L. innocua*; 23 – MTK na *S. aureus*; 24 – MTK na *P. aeruginosa*; 25 – Invazija *P. aeruginosa* PAO1; 26 – Formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1; 27 – Degradacija biofilma *P. aeruginosa* PAO1; 28 – Stopa migracije MRC-5 ćelija.

IBR analiza antioksidativne aktivnosti

Iako je uobičajeno je da se IBR analiza koristi za vizuelizaciju bioloških efekata zagađivača i tumačenje odnosa između različitih biomarkera i nivoa kontaminacije (Beliaeff i Burgeot, 2002), u ovoj doktorskoj disertaciji je IBR metoda prilagođena za analizu rezultata testova biološke aktivnosti ispitivanih ekstrakata sa ciljem da se predstavi njihov ukupni biološki potencijal i izdvoji najaktivniji uzorak. Rezultati ove analize predstavljaju sumirani zbir ukupne biološke aktivnosti ekstrakata, u formi histograma, koji su dobijeni na osnovu radijalnih grafika. Na osnovu IBR analize antioksidativne aktivnosti ekstrakata pokazano je da je uticaj rastvarača veoma značajan budući da su metanolni ekstrakti generalno ispoljili najjaču aktivnost, nakon čega slede etanolni, dok su vodeni ekstrakti imali najslabiju antioksidativnu aktivnost.

Sa radijalnih grafika prikazanih u Prilogu 12 preračunate su IBR površine za ukupnu antioksidativnu aktivnost (Prilozi 13 i 14), pri čemu se može primetiti da su među ispitivanim ekstraktima, metanolni ekstrakti *M. piperita* i *M. officinalis*, kao i etanolni ekstrakt *O. vulgare* ispoljili najjači ukupni antioksidativni potencijal.

Na osnovu histogramskog prikaza rezultata IBR metode, *O. vulgare* i *M. officinalis* su se izdvojili kao najjači antioksidativni agensi, dok je za *M. vulgare* primećeno da ima najslabiji antioksidativni potencijal (Prilozi 13 i 14).

Korelacija rezultata testova genoprotektivne i antigenotoksične aktivnosti ispitivanih ekstrakata i drugih bioloških aktivnosti

Budući da su ispitivani ekstrakti ispoljili genoprotektivnu aktivnost na acelularnom model sistemu, dalje je ispitivan njihov antigenotoksični efekat na bakterijskom modelu, kao i na humanim fibroblastima pluća.

U ovoj studiji je po prvi put ispitivana i potvrđena genoprotektivna i antigenotoksična aktivnost pojedinih biljnih vrsta porodice Lamiaceae. Naime, genoprotektivna aktivnost je bila poznata jedino za pojedine biljne vrste roda *Marrubium*, *Mentha*, *Salvia*, *Sideritis* i *Teucrium*, dok aktivnost biljnih vrsta koje su bile objekat ove doktorske disertacije do sada nije bila ispitivana. Genoprotektivni efekat predstavnika porodice Lamiaceae može biti posledica visokog sadržaja fenolnih jedinjenja u njihovim ekstraktima, budući da je pokazano da izolovana rozmarinska, kafena, vanilinska, ferulinska, cimeta, siringinska, hlorogena, *p*-hidroksibenzojeva, galna i protokatehinska kiselina (Sevgi i sar., 2015), kao i katehin, luteolin, apigenin, kvercetin, kempferol, hiperozid, kvercitrin i rutin imaju visok genoprotektivni potencijal (Zhu i sar., 2017).

Takođe, u ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put opisana antigenotoksična aktivnost SOS/*umuC* testom za sve ispitivane biljne vrste porodice Lamiaceae, dok je jedino antigenotoksična aktivnost *G. hederacea* bila od ranije poznata. Pored toga, po prvi put je komet testom ispitana i opisana antigenotoksična aktivnost sledećih biljnih vrsta: *G. hederacea*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *M. piperita*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *S. montana*, *S. scardica*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*.

Prethodna istraživanja ukazuju na to da bi se antigenotoksični potencijal ovih biljaka mogao pripisati prisustvu fenolnih jedinjenja u njihovim ekstraktima (Kapiszewska i sar., 2005; Sghaier i sar., 2015; Sabahi i sar., 2018). Naime, pokazano je da rutin inhibira aktivnost ciklooksigenaza i lipoksigenaza, a pospešuje stvaranje neenzimskih lipidnih medijatora, čime inhibira proinflamatornu signalizaciju, što za posledicu ima sprečavanje nastanka promena u funkciji ćelijske membrane fibroblasta izazvane UV zračenjem. Dakle, sprečavanjem

prekomerne ekspresije proteina indukovanu UV zračenjem proteina uključenih u organizaciji i ekspresiji DNK, kao i sprečavanjem biosinteze pojedinih proteina (Geçotek i sar., 2020) ovaj flavonoid bi potencijalno mogao omogućiti ekstraktima biljaka porodice Lamiaceae sposobnost sprečavanja genotoksičnih oštećenja humanog molekula DNK.

Koeficijenti korelacije **genoprotektivne aktivnosti** i ostalih bioloških aktivnosti prikazani su samo za rezultate etanolnih ekstrakata. Između rezultata genoprotektivne i antigenotoksične aktivnosti u eukariotskom modelu, citotoksičnosti prema HCT-116 ćelijama i migracije MRC-5 ćelija, utvrđena je negativna umerena korelacija. S druge strane, pozitivna umerena korelacija je utvrđena između rezultata genoprotektivne aktivnosti i sposobnosti inhibicije aktivnosti α -glukozidaze, produkcije NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija, inhibicije rasta *L. innocua*, kao inhibicije invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća (Tabela 11).

Kao što je ranije naglašeno, ispitivanje **antigenotoksičnog efekta** ekstrakata je rađeno korišćenjem dva model sistema, međutim izračunavanjem koeficijenata korelacije između ova dva testa utvrđena je slaba korelacija, što je očekivano budući da ovi testovi ispituju različite mehanizme antigenotoksičnog dejstva ekstrakata.

Koeficijenti korelacije antigenotoksične sa ostalim biološkim aktivnostima su predstavljeni samo za etanolne ekstrakte. Negativna umerena korelacija je pronađena između rezultata SOS/*umuC* testa i produkcije NO-a od strane HCT-116 ćelija, inhibicije rasta *B. subtilis* i *P. aeruginosa*, inhibicije formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 i migracije MRC-5 ćelija. S druge strane, pozitivna umerena korelacija je pokazana između rezultata SOS/*umuC* testa i vijabilnosti BV2 i SH-SY5Y ćelija, kao i produkcije RVK-a i NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija (Tabela 11).

Za razliku od SOS/*umuC* testa, rezultati komet testa su jako negativno korelisali sa degradacijom biofilma *P. aeruginosa* PAO1. Umereno negativno su korelisali samo sa inhibicijom rasta *P. aeruginosa*, a umereno pozitivno sa produkcijom RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija, inhibicijom rasta *S. aureus* i migracijom MRC-5 ćelija (Tabela 11).

Korelacija rezultata testova antidijabetične aktivnosti ispitivanih ekstrakata i drugih bioloških aktivnosti

Iako literaturni podaci sugerišu da pojedine biljne vrste porodice Lamiaceae poseduju sposobnost inhibicije aktivnosti α -amilaze pri višim koncentracijama ekstrakata, u ovoj doktorskoj disertaciji, ekstrakti ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae nisu ispoljili ovaj efekat. Pored toga, ekstrakti *H. officinalis*, *L. angustifolia*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, kao i etanolni i vodeni ekstrakti *S. scardica* i etanolni ekstrakt *O. basilicum* nisu čak ni pri najvišoj testiranoj koncentraciji inhibirali aktivnost α -glukozidaze, dok su ekstrakti *Th. serpyllum* imali najbolji efekat u ovom testu. Ipak, postoje podaci da se brojne biljke porodice Lamiaceae koriste u tradicionalnoj medicini za kontrolu i lečenje dijabetesa, što nije iznenađujuće s obzirom na to da su fenolna jedinjenja poznati inhibitori enzima ključnih za metabolizam ugljenih hidrata u organizmu, sa sposobnošću da modulišu njihovu digestiju, te se zahvaljujući njima može vršiti kontrola glikemijskog indeksa pojedinih prehrambenih proizvoda (Kajaria i sar., 2013).

Budući da ispitivani ekstrakti predstavnika porodice Lamiaceae nisu imali aktivnost prema α -amilazi, ovaj test nije uzet u obzir prilikom izračunavanja koeficijenata korelacije.

Rezultati antidijabetične aktivnosti dobijeni testom inhibicije α -glukozidaze su jako korelisali samo sa rezultatima antioksidativne aktivnosti u ABTS testu. Negativna umerena korelacija je utvrđena između sposobnosti inhibicije aktivnosti α -glukozidaze i produkcije RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija, kao i inhibicije rasta *B. subtilis*. Umerena

korelacija nađena između rezultata antidijabetične aktivnosti ekstrakata i inhibicije rasta *B. subtilis* je posebno značajna iz razloga što su osobe obobile od dijabetesa generalno podložnije bakterijskim infekcijama (Liu i sar., 2004), a između ostalog i infekcijama bakterija roda *Bacillus*.

Sa druge strane, pozitivna umerena korelacija je utvrđena između sposobnosti inhibicije aktivnosti α -glukozidaze i rezultata DPPH testa, sposobnosti inhibicije aktivnosti tirozinaze, citotoksičnosti prema SH-SY5Y neuronima, produkcije NO-a od strane HCT-116 ćelija i inhibicije rasta *P. aeruginosa* (Tabela 11).

Korelacija rezultata testova imunomodulatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata i drugih bioloških aktivnosti

Terminom imunomodulatorna aktivnost obuhvaćene su antineurodegenerativna, antineuroinflamatorna i antitumorska aktivnost, kao i aktivnost zarastanja rana, budući da preko stimulacije, odnosno inhibicije komponenti uključenih u ove aktivnosti, u ljudskom organizmu može doći do modulacije kako urođenog, tako i adaptivnog imunskog odgovora.

Rezultati **antineurodegenerativne i antineuroinflamatorne aktivnosti** su blisko povezani sa rezultatima antidijabetične aktivnosti ekstrakata dobijenih u ovoj studiji. Naime, ranija istraživanja su pokazala da je izostanak aktivnosti ekstrakata prema α -amilazi poželjan s obzirom na to da je aktivnost ovog enzima u mozgu neophodna u određenim patološkim stanjima. Tačnije, zahvaljujući aktivnosti α -amilaze može se sprečiti progresivni gubitak pamćenja, na primer, u slučaju Alchajmerove bolesti (Agatonović-Kuštrin i sar., 2020; Byman i sar., 2021). Budući da je incidenca oboljevanja od Alchajmerove bolesti povećana kod dijabetičara (Mittal i sar., 2016), kod njih je neophodno izbegavati lekove koji funkcionišu po principu inhibicije aktivnosti α -amilaze, zbog čega su rezultati ove doktorske disertacije od još većeg značaja jer ukazuju na to da se ovaj problem potencijalno može prevazići upotrebom terapije zasnovanoj na biljnim preparatima. Ova tvrdnja posebno dobija na značaju kada se uzme u obzir da je u okviru ove studije pokazano da predstavnici familije Lamiaceae imaju odličnu sposobnost inhibicije enzima ključnih za procese neurodegeneracije: AChE i tirozinaze.

Pored inhibicije enzima odgovornih za početak i progresiju neurodegenerativnih bolesti, veliku pretnju predstavljaju i neuroinflamatorni procesi, koji izazivaju, ali i ubrzavaju proces pomenutih bolesti. Kao što je prethodno napomenuto, u okviru ove studije su dobijeni ohrabrujući rezultati koji sugerišu da predstavnici familije Lamiaceae, odnosno njihovi etanolni ekstrakti, imaju značajan antineuroinflamatorni potencijal time što normalizuju vijabilnost mikroglijalnih ćelija nakon indukcije inflamacije, smanjuju produkciju RVK-a i NO-a od strane ovih makrofaga, a takođe je pokazano da normalizuju i vijabilnost samih neuronskih ćelija. U okviru ove doktorske disertacije je po prvi put predstavljena antineuroinflamatorna aktivnost ekstrakata *O. majorana*, *S. scardica*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*. Za razliku od toga, antineuroinflamatorna i antineuroinflamatorna aktivnost preostalih biljnih vrsta je od ranije poznata, kao i antineurodegenerativna i antineuroinflamatorna aktivnost pojedinih fitokonstituenata izolovanih iz ovih biljaka, poput rozmarinske, kafene, hlorogene, ferulinske i cikorične kiseline, kvercetina, rutina, naringenina, leonurina, timola i karvakrola (Qi i sar., 2010; Habtemariam, 2016; Coelho i sar., 2017; Tundis i sar., 2018; Hanafy i sar., 2020; Mir i sar., 2021; Seyed i sar., 2021).

Izračunavanjem koeficijenta korelacije je utvrđeno da je sposobnost inhibicije aktivnosti tirozinaze jače korelirala sa rezultatima ostalih bioloških aktivnosti od sposobnosti inhibicije aktivnosti AChE. Rezultati testova inhibicije AChE i tirozinaze su međusobno imali

slabu korelaciju, što nije iznenađujuće budući da su ovi enzimi uključeni u različite aspekte neurodegeneracije, zbog čega se ovim testovima određuju drugačiji mehanizmi delovanja biljnih ekstrakata.

Rezultati antineurodegenerativne aktivnosti određena sposobnošću inhibicije AChE su umereno korelisali sa produkcijom RVK-a od strane HCT-116 ćelija, kao i sa inhibicijom rasta *B. subtilis* i *S. aureus* (Tabela 11).

Pozitivna umerena korelacija je utvrđena između sposobnosti inhibicije aktivnosti tirozinaze i inhibicije rasta *P. aeruginosa*, kao i degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1. Ovaj nalaz je veoma značajan budući da postoje podaci da bakterije produkuju pro-inflamatorne faktore i neurotoksine koji mogu imati važne uloge u razvoju i/ili kaskadi događaja koji dovode do neurodegeneracije. Posebno važan agens u ovakvim događajima jeste LPS, koji preko stimulacije produkcije pojedinih pro-inflamatornih faktora može uticati na neurodegeneraciju. Budući da je LPS endotoksin gram-negativnih bakterija, infekcija bilo kojom gram-negativnom bakterijom, pa i *P. aeruginosa*, teoretski može dovesti do razvoja Parkinsonove bolesti (Smeyne i sar., 2021). Pored toga, sposobnost inhibicije aktivnosti tirozinaze je negativno umereno korelisala sa migracijom MRC-5 ćelija (Tabela 11), što je očekivano budući da pored značajne uloge ovog enzima u Parkinsonovoj bolesti, tirozinaza je značajna za biosintezu melanina u koži. Naime, inhibitori tirozinaze koji imaju sposobnost da regulišu produkciju RVK-a u tkivima se često koriste u procesima zarastanja rana (Kim i sar., 2016).

Ispitivanjem antineuroinflamatorne aktivnosti ekstrakata je određen njihov uticaj na smanjenje inflamatornog odgovora BV2 ćelija i SH-SY5Y neurona izazvanog LPS-om. Jaka korelacija je utvrđena između vijabilnosti LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i njihove produkcije NO-a, dok je umerena korelacija utvrđena između uticaja ekstrakata na produkciju NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i vijabilnosti SH-SY5Y neurona. S druge strane, rezultati antineuroinflamatorne aktivnosti ekstrakata i sposobnosti inhibicije AChE su slabo korelisali, dok su rezultati antineuroinflamatorni aktivnosti ekstrakata i njihove sposobnosti inhibicije tirozinaze pokazali slabu do umerenu korelaciju (Tabela 11). Umerena korelacija koja je pronađena između rezultata antineurodegenerativne i antineuroinflamatorne aktivnosti ekstrakata biljaka familije Lamiaceae je od velike važnosti za nastavak detaljnijih istraživanja mehanizama antineuroinflamatorne aktivnosti ekstrakata, budući da se inflamacija, kao i oksidativni i nitrozativni stres nalaze u osnovi mnogih bolesti, između ostalog i neurodegenerativnih.

Uticaj ekstrakata na vijabilnost LPS-om aktiviranih BV2 ćelija je negativno umereno korelisao sa rezultatima genotoksične aktivnosti na HCT-116 ćelijama, kao i sa inhibicijom formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1. Sa druge strane, uticaj ekstrakata na vijabilnost LPS-om aktiviranih BV2 ćelija je pozitivno umereno korelisao sa inhibicijom rasta *B. subtilis* (Tabela 11).

Zanimljivo je da je produkcija RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija umereno korelisala sa gotovo svim testovima korišćenim za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata. Tako je produkcija RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija umereno korelisala sa inhibicijom rasta *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus*, kao i *P. aeruginosa*, sa inhibicijom formiranja i degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1, ali i sa migracijom MRC-5 ćelija (Tabela 11). Ovi nalazi su od velikog značaja budući da inflamacija posredovana modulacijom produkcije RVK-a ima veliki uticaj kako na bakterijske infekcije, tako i na zarastanje rana (poglavlja 4.9. i 4.10.).

Rezultati uticaja ekstrakata na modulaciju produkcije NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija su umereno negativno korelisali sa genotoksičnom aktivnošću ekstrakata prema HCT-116 ćelijama, kao i sa inhibicijom formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1. S druge strane, pozitivna umerena korelacija je nađena između uticaja ekstrakata na modulaciju produkcije NO-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija i pojedinih testova za određivanje antibakterijske aktivnosti ekstrakata: inhibicijom rasta *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus*, kao i inhibicijom invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji MRC-5 ćelija (Tabela 11). Kao i prethodni, i ovi nalazi su veoma značajni budući da inflamacija posredovana modulacijom produkcije RVA ima značajan uticaj na odgovor imunskog sistema na bakterijske infekcije (poglavlje 4.9.).

Za kraj, utvrđeno je da je citotoksičnost prema SH-SY5Y neuronima negativno umereno korelisala sa genotoksičnošću ekstrakata prema HCT-116 ćelijama (Tabela 11).

U ovoj studiji, **antitumorska aktivnost** je ispitivana na HCT-116 ćelijama kolorektalnog kancera preko citotoksičnog uticaja etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae i modulacije produkcije RVK-a i NO-a, kao i genotoksičnog uticaja ekstrakata na ove tumorske ćelije. Dobijeni rezultati ukazuju na to da se antiproliferativna i genotoksična aktivnost ovih ekstrakata pojedinih predstavnika familije Lamiaceae prema HCT-116 ćelijama može objasniti modulacijom proizvodnje RVK-a i NO-a. Pretragom literature je ustanovljeno da ne postoje literaturni podaci o antitumorskoj aktivnosti ekstrakata *L. cardiaca*, *M. vulgaris*, *S. officinalis*, *S. montana*, *S. scardica* i *Th. serpyllum* na ćelijama kolorektalnog kancera, već je ona po prvi put istražena u okviru ove doktorske disertacije.

Značajno je pomenuti da mnoga fenolna i neka terpenska jedinjenja izolovana iz biljaka familije Lamiaceae ispoljavaju antitumorsku aktivnost na ćelije kolorektalnog kancera: rozmarinska, kafena kiselina, apigenin, naringin, kempferol, karvakrol, ursolna, karnozinska i oleinska kiselina (Han i sar., 2018; Lim i sar., 2019; Milutinović i sar., 2019; Elansary i sar., 2020a). Ekstrakti biljaka ispitivanih u okviru ove doktorske disertacije su izuzetno značajni kandidati za dalja istraživanja antitumorske aktivnosti, budući da je utvrđeno da koriste različite efikasne mehanizme za borbu protiv ćelija kolorektalnog tumora, a u dostupnoj literaturi je pokazano da deluju i na druge tipove tumora.

Izračunavanjem koeficijenata korelacije je utvrđeno da rezultati testova korišćenih za ispitivanje antitumorske aktivnosti ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae međusobno nemaju jaku korelaciju. Jedina umerena korelacija je nađena između modulacije produkcije RVK-a i NO-a od strane HCT-116 ćelija pod uticajem etanolnih biljnih ekstrakata, dok su ostale korelacije označene kao slabe (Tabela 11). Ovi nalazi se mogu objasniti time da su biljni ekstrakti koristili različite mehanizme antitumorske aktivnosti, koje je u budućim istraživanjima potrebno detaljnije ispitati.

Modulacija produkcije RVK-a je umereno korelisala sa migracijom fibroblasta pluća prilikom zarastanja monosloja (Tabela 11), a značaj RVK-a tokom zarastanja monosloja je opisan u poglavlju 4.10.

S druge strane, genotoksična aktivnost ekstrakata prema HCT-116 ćelijama je negativno umereno korelisala sa inhibicijom rasta *L. innocua* i *S. aureus*, kao i sa inhibicijom invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća. Za razliku od toga, direktna umerena korelacija je nađena između rezultata genotoksične aktivnosti ekstrakta prema HCT-116 ćelijama i inhibicije formiranja i degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 11). Ovi nalazi su od velikog značaja budući da je imunokompromitovani organizam sklon čestim bakterijskim infekcijama, a u ovoj doktorskoj disertaciji je pokazano da etanolni ekstrakti biljaka familije Lamiaceae imaju potencijala da deluju kao efikasni imunomodulatorni agensi.

IBR analiza imunomodulatorne aktivnosti

Na osnovu rezultata imunomodulatorne aktivnosti etanolnih ekstrakata ispitivanih biljaka porodice Lamiaceae urađena je IBR analiza. Ova analiza je podrazumevala standardizaciju rezultata dobijenih testovima za određivanje antineurodegenerativnog (testovi inhibicije AChE i tirozinaze), antineuroinflamatornog (MTT, NBT i Grisov test na BV2 ćelijskoj liniji, kao i MTT test na SH-SY5Y ćelijskoj liniji) i antitumorskog potencijala (MTT, NBT, Grisov i komet test na HCT-116 ćelijama), kao i stopom migracije MRC-5 ćelija pod uticajem ekstrakata biljaka porodice Lamiaceae (Prilog 15).

Sa radijalnih grafika predstavljenih u Prilogu 15 preračunate su IBR površine za imunomodulatornu aktivnost etanolnih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae i rezultati analize su prikazani u Prilozima 16 i 17. Rezultati ove analize sugerišu da je najviši imunomodulatorni potencijal ispoljio etanolni ekstrakt *O. basilicum*, nakon čega slede ekstrakti *R. officinalis* i *S. officinalis*, dok je najslabiji potencijal ispoljio etanolni ekstrakt *T. montanum*.

Značajno je istaći da iako su Pirsonovi koeficijenti korelacije pokazali jaku i umerenu korelaciju između rezultata pojedinačnih testova antioksidativne i imunomodulatorne aktivnosti, kada se uzmu u obzir IBR vrednosti dobijene za antioksidativnu i imunomodulatornu aktivnost, primećuje se slaba korelacija ($r = 0,07$). Ovaj nalaz nije začuđujuć kada se ima u vidu činjenica da je u okviru ove doktorske disertacije ispitivano 18 biljaka porodice Lamiaceae koje pripadaju različitim rodovima, zbog čega nije očekivana jača korelacija između ovih aktivnosti. Kao što je naglašeno u poglavlju 1.4., pregled literaturnih podataka ukazuje na to da ove biljke ispoljavaju različite biološke aktivnosti, odnosno različit biološki potencijal, što je u saglasnosti sa nalazima opisanim u okviru ove doktorske disertacije.

Korelacija rezultata testova antibakterijske aktivnosti ispitivanih ekstrakata i drugih bioloških aktivnosti

Biljke sa antibakterijskim potencijalom sve više privlače pažnju naučnika zahvaljujući činjenici da je mnogobrojnim studijama pokazana bolja bioraspoloživost aktivnih prirodnih jedinjenja biljaka poput fenolnih jedinjenja i terpena u odnosu na sintetički dobijene lekove. Savremene studije pokazuju da ekstrakti i etarska ulja biljaka, ali i njihovi izolovani fitokonstituenti mogu imati uticaja na rast kako gram-pozitivnih, tako i gram-negativnih bakterija, na formiranje biofilma, kao i adheziju i invaziju bakterija prilikom infekcije različitih ćelija i tkiva (Stegaruš i sar., 2021).

U ovoj doktorskoj disertaciji, antibakterijska aktivnost je ispitivana MIK testom za sve ekstrakte 18 predstavnika porodice Lamiaceae, pri čemu se pokazalo da su etanolni ekstrakti bili najaktivniji, zbog čega su oni bili dalje ispitivani u testu invazije *P. aeruginosa* PAO1 prilikom infekcije fibroblasta pluća, a dodatno su ekstrakti bili selektovani za testiranje u testovima inhibicije formiranja i degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1.

Rezultati MIK testa dobijeni za različite bakterije su se međusobno razlikovali, pri čemu je između MIK testa na gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama utvrđena slaba korelacija (Tabela 11). Ovaj rezultat je očekivan budući da gram-negativne bakterije poseduju spoljašnju membranu sa hidrofobnim polisaharidnim lancem, koja funkcioniše kao hidrofobna barijera za veliki broj sekundarnih metabolita biljaka (Stegaruš i sar., 2021). Jaka korelacija je utvrđena jedino između inhibicije rasta *B. subtilis* i *S. aureus*, dok je umerena korelacija utvrđena između inhibicija rasta *E. faecalis* i *L. innocua*, *E. faecalis* i *S. aureus*, kao i između

inhibicije rasta *L. innocua* i *S. aureus* (Tabela 11). Ovi nalazi su očekivani budući da prema klasifikaciji po Gramu, sve pomenute vrste pripadaju gram-pozitivnim bakterijama.

Rezultati testa invazije *P. aeruginosa* PAO1 su pozitivno umereno korelisali sa inhibicijom rasta *L. innocua*, a negativno umereno sa inhibicijom formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 11).

Sposobnost ekstrakata da inhibiraju formiranje i stimulišu degradaciju već postojećeg biofilma *P. aeruginosa* PAO1 je međusobno umereno korelisala. Umerena korelacija je pronađena između sposobnosti ekstrakata da inhibiraju formiranje biofilma *P. aeruginosa* PAO1 i rast *E. faecalis*, kao i između sposobnosti degradacije već formiranog biofilma *P. aeruginosa* PAO1 i inhibicije rasta *P. aeruginosa*, *B. subtilis* i *S. aureus* (Tabela 11).

Migracija ćelija prilikom zarastanja monosloja MRC-5 ćelija je pored rezultata genoprotektivne aktivnosti, antigenotoksičnog efekta ekstrakata, sposobnosti inhibicije tirozinaze i produkcije RVK-a od strane LPS-om aktiviranih BV2 ćelija, kao i HCT-116 ćelija (opisano u prethodnim delovima poglavlja 4.11.), umereno korelisala i sa inhibicijom rasta *S. aureus* i *P. aeruginosa*, kao i sa sposobnošću degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1 (Tabela 11). Ovi rezultati su od izuzetnog značaja za dalja istraživanja zarastanja rana kod imunokompromitovanih osoba.

IBR analiza antibakterijske aktivnosti

IBR analiza je podrazumevala standardizaciju rezultata MIK testa na *B. subtilis*, *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*; testa invazije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća; testa inhibicije formiranja i degradacije biofilma *P. aeruginosa* PAO1. MIK test na *E. coli* i *S. typhimurium* i test adhezije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća nisu uzeti u obzir za ovu analizu iz razloga što nijedan etanolni ekstrakt nije pokazao aktivnost u pomenutim testovima. Pored toga, IBR analiza antibakterijske aktivnosti je obuhvatila standardizaciju i grafičku prezentaciju rezultata dobijenih za etanolne ekstrakte odabranih predstavnika familije Lamiaceae: *H. officinalis*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. montana*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*, što je prikazano u Prilozima 18-20.

Nalazi IBR analize su pokazali da je najbolji antibakterijski potencijal ispoljio etanolni ekstrakt *S. montana*, nakon čega sledi ekstrakt *O. vulgare*, dok je, kao i u slučaju imunomodulatorne aktivnosti, najslabiji antibakterijski potencijal ispoljio etanolni ekstrakt *T. montanum* (Prilozi 19 i 20).

Nalazi dobijeni IBR analizom testova za određivanje antibakterijske aktivnosti su slabo korelisali sa nalazima dobijenim IBR analizom testova za određivanje antioksidativne i imunomodulatorne aktivnosti ekstrakata.

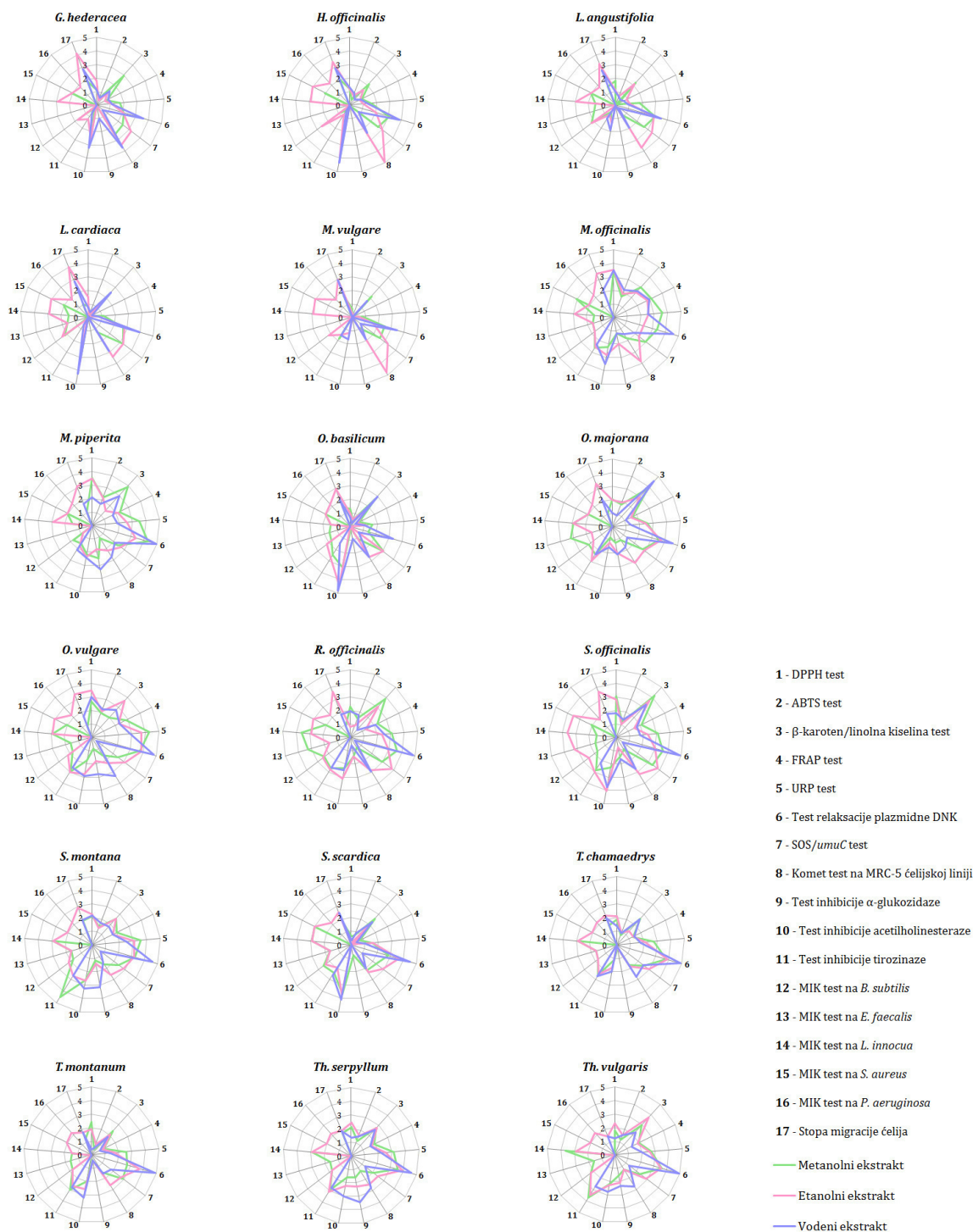
IBR analiza svih bioloških aktivnosti ekstrakata

IBR analiza ukupnog biološkog potencijala ekstrakata je sprovedena putem dve podanalize:

1. podanaliza koja je obuhvatila rezultate za metanolne, etanolne i vodene ekstrakte,
2. podanaliza koja je obuhvatila rezultate samo za etanolne ekstrakte.

Kao što je prethodno prikazano, kako bi se stekao uvid u to koje se biljke izdvajaju u odnosu na korišćenu grupu testova, rezultati dobijeni različitim testovima grupisani su na tri velike grupe: antioksidativna, imunomodulatorna i antibakterijska grupa testova. Pored toga,

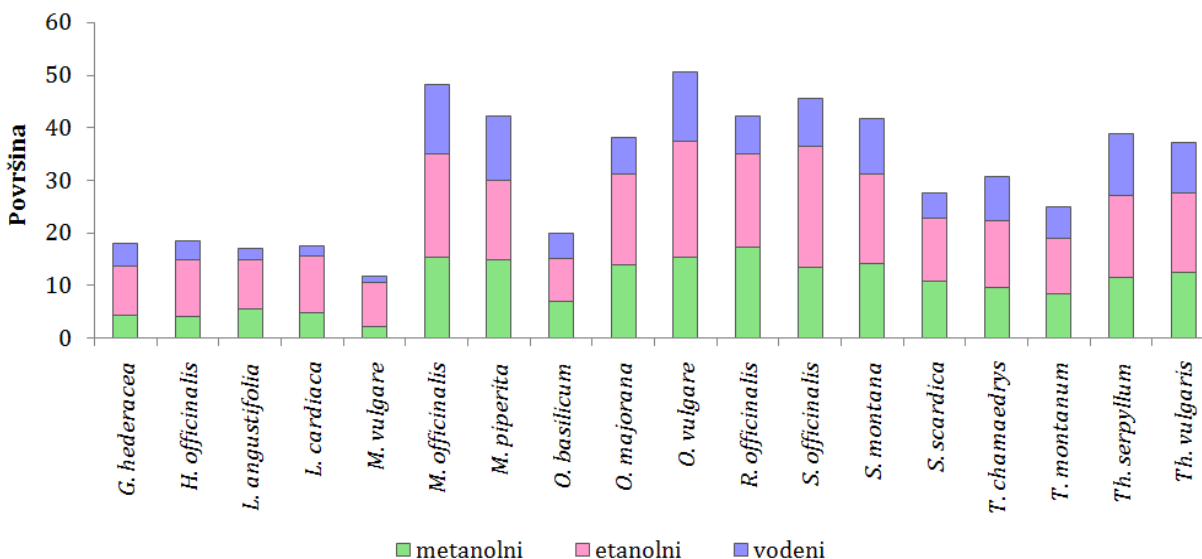
na Slikama 31 i 32, Graficima 33 i 34, kao i u Prilozima 21 i 22 će biti prikazani rezultati objedinjene IBR analize, sa ciljem da se izdvoji predstavnik familije Lamiaceae koji je u ovoj doktorskoj disertaciji ispoljio generalno najviši biološki potencijal.



Slika 31. Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata bioloških aktivnosti ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.

Prvom IBR podanalizom obuhvaćeni su rezultati ekstrakata svih 18 predstavnika familije Lamiaceae dobijeni analizom 17 testova, što ujedno predstavlja i broj testova u kojima su ispitani metanolni, etanolni i vodeni ekstrakti ovih biljaka (53,12% svih testova). Na osnovu radialnih grafika sa Slike 31, izračunate su IBR površine za svaki ispitivani ekstrakt (Prilog 21, Grafik 33), te je pokazano da su etanolni ekstrakti imali generalno najviši biološki potencijal, nakon čega slede metanolni, dok su vodeni ekstrakti imali najniži ukupni biološki potencijal.

Ovom analizom je takođe pokazano da je među ispitivanim predstavnicima familije Lamiaceae, biološki najaktivnija biljna vrsta bila *O. vulgare*, nakon čega sledi *M. officinalis*, zatim *S. officinalis*, *M. piperita*, *R. officinalis*, *S. montana*, *Th. serpyllum*, *O. majorana*, *Th. vulgaris*, *T. chamaedrys*, *S. scardica*, *T. montanum*, *O. basilicum*, *H. officinalis*, *G. hederacea*, *L. cardiaca*, *L. angustifolia*. Kao što je ranije naglašeno, i ovom analizom je pokazano da je najniži biološki potencijal ispoljio *M. vulgare* (Grafik 33).

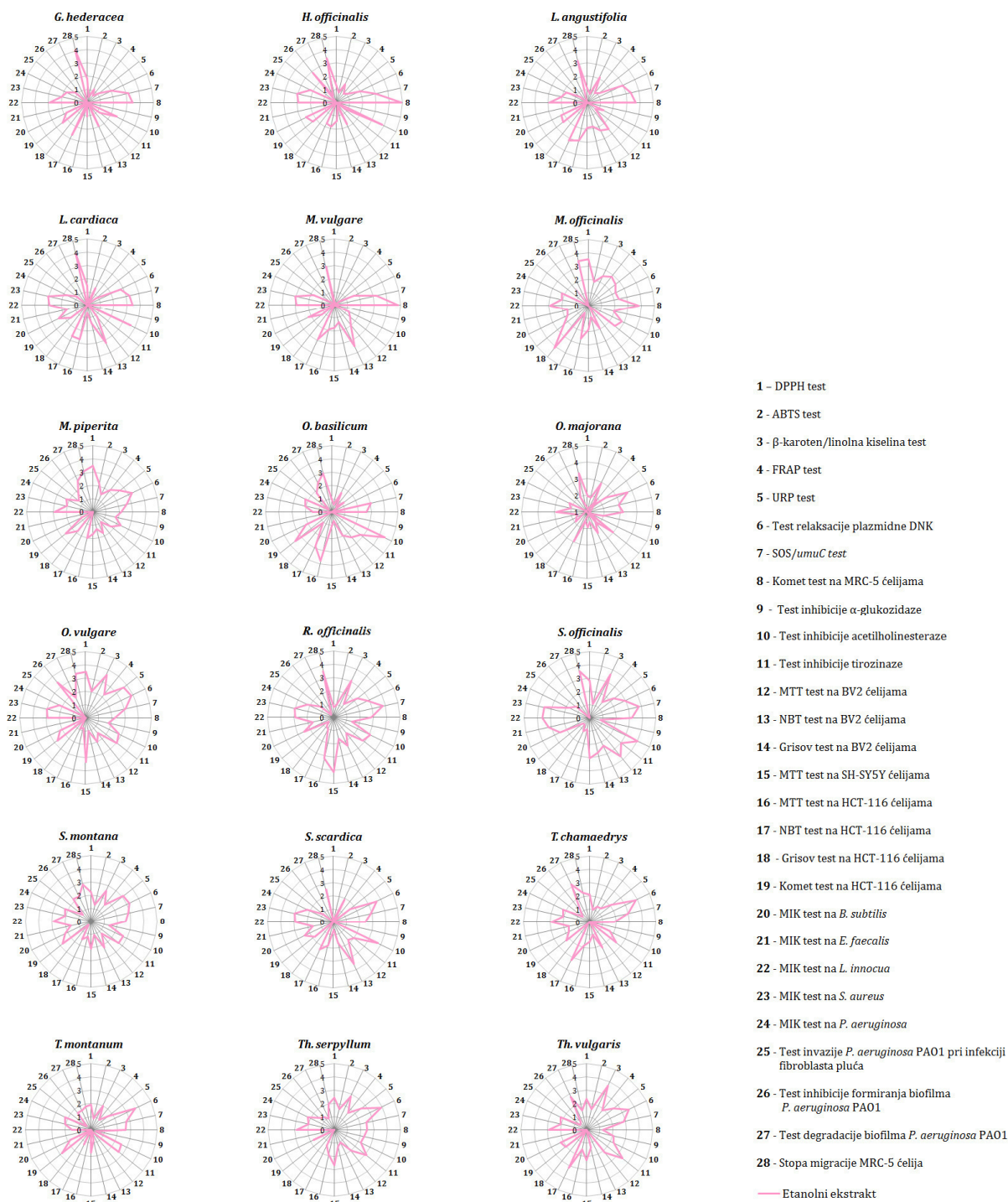


Grafik 33. Površina radialnih dijagrama prikazanih na Slici 31.

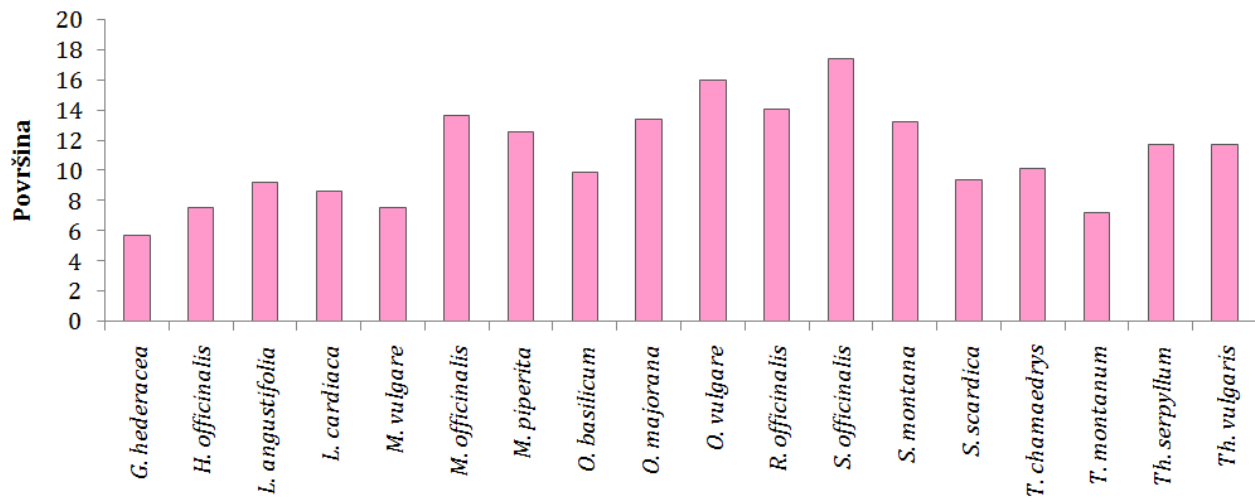
Veća površina ukazuje na veći biološki potencijal ispitivanih ekstrakata.

Međutim, budući da su pojedinim testovima ispitivani samo etanolni ekstrakti predstavnika familije Lamiaceae, bilo je neophodno uraditi detaljniju IBR analizu koja će obuhvatiti najveći broj korišćenih testova. Nakon što su izostavljeni rezultati testa inhibicije α -amilaze, MIK testa na *E. coli* i *S. typhimurium*, kao i testa adhezije *P. aeruginosa* PAO1 pri infekciji fibroblasta pluća zbog izostanka aktivnosti ekstrakata (Slika 32), sveobuhvatna IBR analiza biološke aktivnosti etanolnih ekstrakata je podrazumevala standardizaciju rezultata 28 testova, odnosno 87,5% svih korišćenih testova u ovoj doktorskoj disertaciji.

Pomenuta sveobuhvatna IBR analiza je pokazala da je najbolji ukupni biološki potencijal u ovoj doktorskoj disertaciji imao etanolni ekstrakt *S. officinalis*, nakon čega slede etanolni ekstrakti *O. vulgare*, *R. officinalis*, *M. officinalis*, *O. majorana*, *S. montana*, *M. piperita*, *Th. vulgaris*, *Th. serpyllum*, *T. chamaedrys*, *O. basilicum*, *S. scardica*, *L. angustifolia*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *H. officinalis* i *T. montanum*. Ovom analizom je, međutim, pokazano da je među ispitivanim ekstraktima, etanolni ekstrakt *G. hederacea* imao generalno najniži biološki potencijal (Prilog 22, Grafik 34).



Slika 32. Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata svih ispitivanih bioloških aktivnosti etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.



Grafik 34. Površina radialnih dijagrama prikazanih na Slici 32.
Veća površina ukazuje na veći biološki potencijal ispitivanih etanolnih ekstrakata.

ZAKLJUČCI

5. ZAKLJUČCI

U ovoj doktorskoj disertaciji je izvršena analiza sadržaja i hemijskog sastava osnovnih fitokonstituenta metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata 18 aromatičnih i lekovitih predstavnika porodice Lamiaceae sa teritorije Srbije, kao i sveobuhvatno istraživanje njihove antioksidativne, genoprotektivne, antigenotoksične, antidijabetične, antineurodegenerativne, antineuroinflamatorne, antitumorske i antibakterijske aktivnosti, kao i njihovog uticaja na zarastanje rane u *in vitro* modelu. Na osnovu rezultata predstavljenih u okviru ove doktorske disertacije izvedeni su sledeći zaključci:

- ⊗ Vodeni ekstrakti predstavnika porodice Lamiaceae su imali veći prinos u odnosu na metanolne i etanolne ekstrakte odgovarajućih biljaka.
- ⊗ Ekstrakti predstavnika porodice Lamiaceae obiluju sekundarnim metabolitima, posebno onima iz grupe fenolnih jedinjenja. Količina fenolnih jedinjenja, ali i triterpena, u ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta se statistički značajno razlikuje u zavisnosti od primenjenog rastvarača.
- ⊗ Etanolni ekstrakt *Origanum vulgare* je imao najviši sadržaj ukupnih fenola u odnosu na sve ispitivane biljke, a metanolni ekstrakt *Melissa officinalis* je imao najviši sadržaj ukupnih fenolnih kiselina. Najviši sadržaj ukupnih flavonoida je izmeren u etanolnom ekstraktu *Mentha × piperita*, a najviši sadržaj ukupnih flavonola u metanolnom ekstraktu ove biljke. Metanolni ekstrakt *Teucrium montanum* je sadržao najviše kumarina, dok je najviše triterpena bilo prisutno u ekstraktima *Lavandula angustifolia*, posebno u etanolnom ekstraktu.
- ⊗ Najprisutnija fenolna kiselina u ekstraktima ispitivanih predstavnika porodice Lamiaceae je bila rozmarinska kiselina, a najprisutniji flavonoid luteolin-7-O-glukozid.
- ⊗ U svim testovima za određivanje antioksidativne aktivnosti uočena je zavisnost antioksidativnog efekta od koncentracije ekstrakta. Najjaču antioksidativnu aktivnost u DPPH testu, na 250 µg/mL, imali su ekstrakti *M. officinalis*, alkoholni ekstrakti *M. piperita* i etanolni ekstrakt *O. vulgare*, inhibirajući značajno više DPPH radikala od sintetičkih antioksidanata, BHA i BHT. U ABTS testu, vodeni ekstrakt *M. officinalis*, alkoholni ekstrakti *M. piperita*, kao i etanolni i vodeni ekstrakti *O. vulgare* inhibirali su najviše ABTS radikala, ali značajno manje od vitamina C. U β-karoten/linolna kiselina testu, najbolju aktivnost je ispoljio vodeni ekstrakt *Origanum majorana*, značajno višu od svih pozitivnih kontrola. Najvišu aktivnost u FRAP testu su imali svi ekstrakti *M. officinalis*, značajno višu jedino od BHT, dok je u URP testu metanolni ekstrakt *O. vulgare* imao najbolju aktivnost u poređenju sa ostalim testiranim ekstraktima. Na osnovu IBR analize, *O. vulgare* i *M. officinalis* su se izdvojile kao vrste sa najjačim antioksidativnim potencijalom.
- ⊗ Iako su svi ekstrakti predstavnika porodice Lamiaceae pokazali značajnu genoprotektivnu aktivnost, vodeni ekstrakti, posebno *M. piperita* i *Thymus vulgaris*, su pružali najviši nivo zaštite plazmidne DNK.
- ⊗ Najjaču antigenotoksičnu aktivnost u prokariotskom modelu *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 su pokazali etanolni ekstrakti *Rosmarinus officinalis* i *Salvia officinalis*, dok su na modelu ćelija fibroblasta pluća posebno dobru aktivnost imali ekstrakti *Hyssopus officinalis*, *Leonurus cardiaca* i *Marrubium vulgare*.

- ⊗ U testu inhibicije α -glukozidaze ispitivani ekstrakti su ispoljili koncentraciono-zavisno dejstvo, dok u testu inhibicije enzima α -amilaze nije ispoljen efekat. Vodeni ekstrakti *M. piperita*, *Satureja montana* i *Thymus serpyllum* koncentracije 250 $\mu\text{g/mL}$ su značajno više inhibirali aktivnost α -glukozidaze u odnosu na akarbozu pri istoj koncentraciji.
- ⊗ Većina ekstrakata je ispoljila inhibitornu aktivnost na AChE i tirozinazi, sličnu ili veću u poređenju sa pozitivnim kontrolama. Najviši nivo inhibicije AChE, na koncentraciji 250 $\mu\text{g/mL}$, ispoljili su etanolni i vodeni ekstrakti *Ocimum basilicum*, dok je najefikasniji u inhibiciji tirozinaze bio metanolni ekstrakt *S. montana*. Svi etanolni ekstrakti ispitivanih biljaka su značajno povećali metaboličku aktivnost LPS-om aktiviranih BV2 mikrogljijskih ćelija i doveli su do smanjenja produkcije RVK-a i NO-a, što jasno ukazuje na antineuroinflamatornu aktivnost ispitanih ekstrakata. Primenom modela transfera supernatanata LPS-om aktiviranih i ekstraktima tretiranih BV2 ćelija u kulturu SH-SY5Y neurona pokazano je da svi testirani biljni ekstrakti smanjuju neurocitotoksični potencijal solubilnih molekula oslobođenih od strane LPS-om aktivirane mikroglije.
- ⊗ Ekstrakti *L. angustifolia*, *O. basilicum* i *R. officinalis* su značajno smanjili proliferaciju HCT-116 ćelija. Ispitivani ekstrakti su ispoljili dvojaki efekat na produkciju RVK-a od strane HCT-116 ćelija, te su ekstrakti *Glechoma hederacea*, *H. officinalis*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *R. officinalis*, *S. officinalis* i *S. montana* značajno smanjili produkciju RVK-a od strane HCT-116 ćelija, dok su je ekstrakti *L. angustifolia* i *Th. vulgaris* značajno povećali. Procenom uticaja ekstrakata na produkciju NO-a od strane HCT-116 ćelija pokazano je da su na povećanje produkcije NO-a uticali ekstrakti *L. angustifolia*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *M. officinalis*, *M. piperita*, *O. basilicum*, *R. officinalis*, *S. officinalis*, *S. montana*, *Sideritis scardica* i *Th. vulgaris*. Svi etanolni ekstrakti, osim *R. officinalis*, *S. officinalis* i *Th. serpyllum*, značajno su povećali nivo oštećenja DNK u ovim tumorskim ćelijama, dok je genotoksični efekat sličan etopozidu ispoljio jedino *O. basilicum*.
- ⊗ Rezultati IBR analize imunomodulatorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata, koja je obuhvatila obradu podataka dobijenih za antineurodegenerativnu, antineuroinflamatornu i antitumorsku aktivnost, kao i efekat na zarastanje rane, sugerišu da je najbolji imunomodulatorni potencijal ispoljio etanolni ekstrakt *O. basilicum*, nakon čega slede ekstrakti *R. officinalis* i *S. officinalis*.
- ⊗ U MIK testu, antimikrobni efekat je bio izraženiji u slučaju gram-pozitivnih bakterija, sa izuzetkom *Enterococcus faecalis*. Najvišu osetljivost je pokazao *Bacillus subtilis*, i to na etanolni ekstrakt *H. officinalis* i metanolni ekstrakt *S. scardica*. Nijedan od testiranih ekstrakata nije inhibirao adheziju *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 za MRC-5 ćelije, ali su svi etanolni ekstrakti, osim *H. officinalis* i *M. officinalis*, značajno redukovali invaziju bakterija na MRC-5 ćelije. Najefikasniji u inhibiciji formiranja biofilma *P. aeruginosa* PAO1 su bili etanolni ekstrakti *O. vulgare* i *H. officinalis*, dok su etanolni ekstrakt *Teucrium chamaedrys* i ekstrakti *M. piperita*, *O. basilicum* i *Th. vulgaris*, posebno pri nižim koncentracijama, imali efekat na njegovu degradaciju. Na osnovu IBR analize, najbolji antibakterijski potencijal je pokazan za etanolni ekstrakt *S. montana*, nakon čega sledi ekstrakt *O. vulgare*.
- ⊗ Od svih testiranih ekstrakata, jedino je etanolni ekstrakt *G. hederacea* stimulisao migratorni potencijal MRC-5 ćelija.

- ⊗ Između testova korišćenih u analizi hemijskog sastava osnovnih fitokonstituenata i testova za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae dobijeni su svi tipovi korelacija: negativna i pozitivna, jaka, umerena i slaba korelacija, što je takođe bio slučaj i u međusobnom poređenju testova za određivanje biološke aktivnosti. Pirsonovi koeficijenti korelacije ukazuju na to da fenolna jedinjenja imaju veći uticaj na jačinu ispoljene biološke aktivnosti ekstrakata od triterpena.
- ⊗ U 53,12% korišćenih testova, IBR analizom alkoholnih i vodenih ekstrakata familije Lamiaceae je pokazano da je biološki najaktivniji bio *O. vulgare*, nakon njega *M. officinalis*, dok je najniži biološki potencijal ispoljio *M. vulgare*.
- ⊗ U 87,5% korišćenih testova, IBR analizom etanolnih ekstrakata je pokazano da je najbolji ukupni biološki potencijal imao ekstrakt *S. officinalis*, nakon čega sledi ekstrakt *O. vulgare*, dok je etanolni ekstrakt *G. hederacea* imao generalno najniži biološki potencijal.
- ⊗ U ovoj doktorskoj disertaciji je po prvi put testirana i potvrđena genoprotektivna, kao i antigenotoksična aktivnost ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae. Takođe, po prvi put je komet testom detaljno određena antigenotoksična aktivnost: *G. hederacea*, *L. cardiaca*, *M. vulgare*, *M. piperita*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *S. montana*, *S. scardica*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris*. Pored toga, ova studija po prvi put daje uvid u antineuroinflatornu aktivnost ekstrakata *O. majorana*, *S. scardica*, *T. chamaedrys*, *T. montanum*, *Th. serpyllum* i *Th. vulgaris* i antitumorsku aktivnost ekstrakata *L. cardiaca*, *M. vulgaris*, *S. officinalis*, *S. montana*, *S. scardica* i *Th. serpyllum* na ćelijama kolorektalnog kancera.
- ⊗ Imajući u vidu rezultate predstavljene u disertaciji, buduća istraživanja bi trebalo usmeriti ka detaljnijem ispitivanju hemijskog sastava pomenutih predstavnika familije Lamiaceae, kao i ispitivanju pojedinačne biološke aktivnosti njihovih fitokonstituenata, ali i njihovog sinergističkog dejstva. Pored toga, potrebno je uraditi optimizaciju procesa ekstrakcije sa ciljem da se otkrije što efikasnija procedura kojom bi se dobio najviši prinos ekstrakcije, ali i najveći broj aktivnih sekundarnih metabolita. S obzirom na to da su u ovoj studiji za ispitivane biljke po prvi put dokazane i opisane genoprotektivna, antigenotoksična, antineuroinflatorna i antitumorska aktivnost prema ćelijskoj liniji kolorektalnog karcinoma, a imajući u vidu i porast broja rezistentnih bakterija na postojeće antibiotike, u budućnosti bi trebalo više pažnje usmeriti ka ispitivanju mehanizama delovanja ovih ekstrakata u složenijim, *in vivo* model sistemima, sa ciljem dobijanja efikasnijih i bezbednijih terapijskih agenasa. Budući da su se ispitivani ekstrakti pokazali kao dobri imunomodulatori, neophodno je dalje ispitati njihov efekat na imunski sistem, što je od posebne važnosti u postpandemijskoj eri, kada je adekvatno funkcionisanje imunskog sistema krucijalno za efikasnu borbu sa infekcijom SARS-CoV-2 virusa.

LITERATURA

6. LITERATURA

- Abdelli, I., Benariba, N., Adjdir, S., Fekhikher, Z., Daoud, I., Terki, M., Benramdane, H., Ghalem, S. (2021): *In silico* evaluation of phenolic compounds as inhibitors of α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 39(3): 816-822.
- Abdelli, W., Bahri, F., Romane, A., Höferl, M., Wanner, J., Schmidt, E., Jirovetz, L. (2017): Chemical composition and anti-inflammatory activity of Algerian *Thymus vulgaris* essential oil. *Natural Product Communications*, 12(4): 1934578X1701200435.
- Abdel-Megeed, R.M., El Newary, S.A., Kadry, M.O., Ghanem, H.Z., El-Shesheny, R.A., Said-Al Ahl, H.A., Abdel-Hamid, A.H.Z. (2020): *Hyssopus officinalis* exerts hypoglycemic effects on streptozotocin-induced diabetic rats via modulating GSK-3 β , C-fos, NF- κ B, ABCA1 and ABGA1 gene expression. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 19(1): 483.
- Abdollahi, E., Momtazi, A.A., Johnston, T.P., Sahebkar, A. (2018): Therapeutic effects of curcumin in inflammatory and immune-mediated diseases: A nature-made jack-of-all-trades? *Journal of Cellular Physiology*, 233(2): 830-848.
- Abdolshahi, A., Naybandi-Atashi, S., Heydari-Majd, M., Salehi, B., Kobarfard, F., Ayatollahi, S.A., Ata, A., Tabanelli, G., Sharifi-Rad, M., Montanari, C., Iriti, M. (2018): Antibacterial activity of some Lamiaceae species against *Staphylococcus aureus* in yoghurt-based drink (Doogh). *Cellular and Molecular Biology*, 64(8): 71-77.
- Abe, Y., Inagaki, K., Fujiwara, A., Kuriyama, K. (2000): Wound healing acceleration of a novel transforming growth factor- β inducer, SEK-1005. *European Journal of Pharmacology*, 408(2): 213-218.
- Abubakar, A.R., Haque, M. (2020): Preparation of medicinal plants: basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1): 1-10.
- Abu-Reidah, I.M., Arráez-Román, D., Al-Nuri, M., Warad, I., Segura-Carretero, A. (2019): Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. *Food Chemistry*, 279: 128-143.
- Aburigal, Y.A.A., Mirghani, M.E.S., Elmogtaba, E.Y., Sirible, A.A.M., Hamza, N.B., Hussein, I.H. (2017): Total phenolic content and antioxidant capacity of basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves from different locations. *International Food Research Journal*, 24: 378-381.
- Aćimović, M., Jeremić, K., Salaj, N., Gavarić, N., Kiproviski, B., Sikora, V., Zeremski, T. (2020): *Marrubium vulgare* L.: A phytochemical and pharmacological overview. *Molecules*, 25(12): 1-24.
- Adaszyńska-Skwirzyńska, M., Dzięcioł, M. (2017): Comparison of phenolic acids and flavonoids contents in various cultivars and parts of common lavender (*Lavandula angustifolia*) derived from Poland. *Natural Product Research*, 31(21): 2575-2580.
- Adeniran, L.A., Oguntade, E.S., Anjorin, T.S., Ajagbonna, O.P. (2021): Epidemiological status of coronavirus diseases and the remedy potentials of medicinal plants in Africa. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 13(1): 18-32.
- Adigüzel, A., Güllüce, M., Şengül, M., Ögütcü, H., Şahin, F., Karaman, İ. (2005): Antimicrobial effects of *Ocimum basilicum* (Labiatae) extract. *Turkish Journal of Biology*, 29(3): 155-160.
- Adsersen, A., Gauguin, B., Gudiksen, L., Jäger, A.K. (2006): Screening of plants used in Danish folk medicine to treat memory dysfunction for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(3): 418-422.
- Afolayan, A.J., Sunmonu, T.O. (2010): *In vivo* studies on antidiabetic plants used in South African herbal medicine. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47(2): 98-106.
- Agatonović-Kuštrin, S., Kuštrin, E., Gegechkori, V., Morton, D.W. (2020): Bioassay-guided identification of α -amylase inhibitors in herbal extracts. *Journal of Chromatography A*, 1620: 460970.

- Aghakhani, F., Kharazian, N., Lori Gooini, Z. (2018): Flavonoid constituents of *Phlomis* (Lamiaceae) species using liquid chromatography mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, 29(2): 180-195.
- Ahangari, M.G., Farimani, M.M., Erfani, M. (2021): Assessment of Re/[^{99m}Tc]Tc-cirsiliol as a potential radiotracer to detect melanoma tumor. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 2021: 1-9.
- Ahmed, G.F., Elkhatib, W.F., Noreddin, A.M. (2014): Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 adhesion to and invasion of A549 lung epithelial cells by natural extracts. *Journal of Infection and Public Health*, 7(5): 436-444.
- Ahn, J., Alford, A.R., Niemeyer, E.D. (2020): Variation in phenolic profiles and antioxidant properties among medicinal and culinary herbs of the Lamiaceae family. *Journal of Food Measurement and Characterization*: 1-13.
- Alcântara, M.A., Polari, I.D.L.B., de Albuquerque Meireles, B.R.L., de Lima, A.E.A., da Silva Junior, J.C., de Andrade Vieira, É., Dos Santos, N.A., de Magalhães Cordeiro, A.M.T. (2019): Effect of the solvent composition on the profile of phenolic compounds extracted from chia seeds. *Food Chemistry*, 275: 489-496.
- Aleksić, I., Petković, M., Jovanović, M., Milivojević, D., Vasiljević, B., Nikodinović-Runić, J., Senerović, L. (2017): Anti-biofilm properties of bacterial di-rhamnolipids and their semi-synthetic amide derivatives. *Frontiers in Microbiology*, 8: 2454.
- Alexa, E., Danciu, C., Radulov, I., Obistoiu, D., Sumalan, R.M., Morar, A., Dehelean, C.A. (2018): Phytochemical screening and biological activity of *Mentha × piperita* L. and *Lavandula angustifolia* Mill. extracts. *Analytical Cellular Pathology*, 2678924: 1-7.
- Algieri, F., Rodriguez-Nogales, A., Garrido-Mesa, N., Zorrilla, P., Burkard, N., Pischel, I., Sievers, H., Benedek, B., Feistel, B., Walbroel, B., Rodriguez-Cabezas, M.E. (2014): Intestinal anti-inflammatory activity of the *Serpylli* herba extract in experimental models of rodent colitis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 8(8): 775-788.
- Al-Hamwi, M., Aboul-Ela, M., El-Lakany, A., Nasreddine, S. (2021): Anticancer activity of *Micromeria fruticosa* and *Teucrium polium* growing in Lebanon. *Pharmacognosy Journal*, 13(1): 103-109.
- Alimpić Aradski, A.Z., Oalđe, M.M., Duletić-Laušević, S.N. (2021): *Salvia officinalis*: Traditional medicinal plant with novel therapeutical perspectives. Chapter in *Salvia officinalis*: Production, cultivation and uses, Ed. Ashton, C. Nova Science Publishers, Inc., New York, USA, pp. 1-72.
- Alimpić, A., Knežević, A., Šavikin, K., Ćurčić, M., Veličković, D., Stević, T., Matevski, V., Stajić, M., Marković, S., Marin, P.D., Duletić-Laušević, S. (2017): Composition and biological activities of different extracts of *Salvia jurisicii*, a rare and endemic Macedonian species. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 151(6): 1002-1011.
- Alimpić, A., Oalđe, M., Matevski, V., Marin, P.D., Duletić-Laušević, S. (2014): Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. *Archives of Biological Science*, 66(1): 307-316.
- Alimpić, A., Pljevljakušić, D., Šavikin, K., Knežević, A., Ćurčić, M., Veličković, D., Stević, T., Petrović, G., Matevski, V., Vukojević, J., Marković, S. (2015): Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. *Industrial Crops and Products*, 76: 702-709.
- Alinezhad, H., Azimi, R., Zare, M., Ebrahimzadeh, M.A., Eslami, S., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M. (2013): Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of *Hyssopus officinalis* L. var. *angustifolius*. *International Journal of Food Properties*, 16(5): 1169-1178.
- Aljarah, A.K., Hameed, I.H. (2018): *In vitro* anti-diabetic properties of methanolic extract of *Thymus vulgaris* using α -glucosidase and α -amylase inhibition assay and determination of its bioactive

- chemical compounds. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 9(3): 388-392.
- AlKahtane, A.A., Ghanem, E., Bungau, S.G., Alarifi, S., Ali, D., AlBasher, G., Alkahtani, S., Aleya, L., Abdel-Daim, M.M. (2020): Carnosic acid alleviates chlorpyrifos-induced oxidative stress and inflammation in mice cerebral and ocular tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(11): 11663-11670.
- Allen, G.P., Bierman, B.C. (2009): *In vitro* analysis of resistance selection by linezolid in vancomycin-susceptible and-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34(1): 21-24.
- Almatroodi, S.A., Alsahli, M.A., Almatroudi, A., Khan, A.A., Rahmani, A.H. (2021): Peppermint, (*Mentha × piperita*): Role in management of diseases through modulating various biological activities. *Pharmacognosy Journal*, 13(3): 822-827.
- Al-Menhali, A., Al-Rumaihi, A., Al-Mohammed, H., Al-Mazrooey, H., Al-Shamlan, M., AlJassim, M., Al-Korbi, N., Eid, A.H. (2015): *Thymus vulgaris* (thyme) inhibits proliferation, adhesion, migration, and invasion of human colorectal cancer cells. *Journal of Medicinal Food*, 18(1): 54-59.
- Al-Shalabi, E., Alkhaldi, M., Sunoqrot, S. (2020): Development and evaluation of polymeric nanocapsules for cirsiol isolated from Jordanian *Teucrium polium* L. as a potential anticancer nanomedicine. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 56: 1-9.
- Altemimi, A.B., Mohammed, M.J., Yi-Chen, L., Watson, D.G., Lakhssassi, N., Cacciola, F., Ibrahim, S.A. (2020): Optimization of ultrasonicated kaempferol extraction from *Ocimum basilicum* using a box-behnken design and its densitometric validation. *Foods*, 9(10): 1379.
- Al-Zaban, M., Naghmouchi, S. AlHarbi, N.K. (2021): HPLC-analysis, biological activities and characterization of action mode of Saudi *Marrubium vulgare* against foodborne diseases bacteria. *Molecules*, 26(17): 5112.
- Alzheimer's News Today (2021): Alzheimer's Disease Statistics (<https://alzheimersnewstoday.com/alzheimers-disease-statistics/>) Pristupljeno 07. decembra 2021.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Abu-Reidah, I.M., Quirantes-Piné, R., Madani, K., Segura-Carretero, A., (2014a): Phytochemical profiling, *in vitro* evaluation of total phenolic contents and antioxidant properties of *Marrubium vulgare* (horehound) leaves of plants growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 61: 120-129.
- Amessis-Ouchemoukh, N., Madani, K., Falé, P.L., Serralheiro, M.L., Araújo, M.E.M. (2014b): Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. *Industrial Crops and Products*, 53: 6-15.
- Aminov, R.I. (2010): A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1: 134.
- Amri, B., Martino, E., Vitulo, F., Corana, F., Kaâb, L.B.B., Rui, M., Rossi, D., Mori, M., Rossi, S., Collina, S. (2017): *Marrubium vulgare* L. leave extract: Phytochemical composition, antioxidant and wound healing properties. *Molecules*, 22(11): 1851.
- Andrade, J.M., Faustino, C., Garcia, C., Ladeiras, D., Reis, C.P., Rijo, P. (2018): *Rosmarinus officinalis* L.: an update review of its phytochemistry and biological activity. *Future Science O.A.*, 4(4): FSO283.
- Androutsopoulos, V.P., Mahale, S., Arroo, R.R., Potter, G. (2009): Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation. *Oncology Reports*, 21(6): 1525-1528.

- Angeloni, S., Spinozzi, E., Maggi, F., Sagratini, G., Caprioli, G., Borsetta, G., Ak, G., Sinan, K.I., Zengin, G., Arpini, S., Mombelli, G. (2021): Phytochemical profile and biological activities of crude and purified *Leonurus cardiaca* extracts. *Plants*, 10(195): 1-15.
- Antora, R.A., Salleh, R.M. (2017): Antihyperglycemic effect of *Ocimum* plants: A short review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(8): 755-759.
- Anwar, S., Shamsi, A., Shahbaaz, M., Queen, A., Khan, P., Hasan, G.M., Islam, A., Alajmi, M.F., Hussain, A., Ahmad, F., Hassan, M.I. (2020): Rosmarinic acid exhibits anticancer effects via MARK4 inhibition. *Scientific reports*, 10(1): 1-13.
- Argyropoulou, A., Samara, P., Tsitsilonis, O., Skaltsa, H. (2012): Polar constituents of *Marrubium thessalum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) and their cytotoxic/cytostatic activity. *Phytotherapy Research*, 26(12): 1800-1806.
- Arnaldez, F.I., O'Day, S.J., Drake, C.G., Fox, B.A., Fu, B., Urba, W.J., Montesarchio, V., Weber, J.S., Wei, H., Wigginton, J.M., Ascierto, P.A. (2020): The Society for Immunotherapy of Cancer perspective on regulation of interleukin-6 signaling in COVID-19-related systemic inflammatory response. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1): 1-12.
- Asadi, A., Shidfar, F., Safari, M., Hosseini, A.F., Fallah Huseini, H., Heidari, I., Rajab, A. (2019b): Efficacy of *Melissa officinalis* L. (lemon balm) extract on glycemic control and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, clinical trial. *Phytotherapy Research*, 33(3): 651-659.
- Asadi, N.S., Heidari, M.M., Khatami, M. (2019a): Protective effect of *Berberis vulgaris* on Fenton reaction-induced DNA cleavage. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 9(3): 213-220
- Aseyd Nezhad, S., Es-haghi, A., Tabrizi, M.H. (2020): Green synthesis of cerium oxide nanoparticle using *Origanum majorana* L. leaf extract, its characterization and biological activities. *Applied Organometallic Chemistry*, 34(2): e5314.
- Ashkani-Esfahani, S., Ebrahimi, A., Bahmani-Jahromi, M., Nadimi, E., Arabzadeh, H., Jalalpour, M.H., Ghasemnezhad, A., Ebrahimi, S. (2021): The effect of *Melissa officinalis* extract on streptozotocin-induced diabetes in rats: A stereological study on pancreatic islets and beta-cells. *Journal of Advances in Medical and Biomedical Research*, 29(132): 34-40.
- Ashraf, Z., Muhammad, A., Imran, M., Tareq, A.H. (2011): *In vitro* antibacterial and antifungal activity of methanol, chloroform and aqueous extracts of *Origanum vulgare* and their comparative analysis. *International Journal of Organic Chemistry*, 1(4): 257-261.
- Atha, D.H., Coskun, E., Erdem, O., Tona, A., Reipa, V., Nelson, B.C. (2020): Genotoxic effects of etoposide, bleomycin, and ethyl methanesulfonate on cultured CHO Cells: Analysis by GC-MS/MS and comet assay. *Journal of Nucleic Acids*, 2020: 1-10.
- Auclair, C., Voisin, E. (1985): Nitroblue tetrazolium reduction. In *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. BokaratonCrc Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 123-132.
- Aye, A., Jeon, Y.D., Lee, J.H., Bang, K.S., Jin, J.S. (2019): Anti-inflammatory activity of ethanol extract of leaf and leaf callus of basil (*Ocimum basilicum* L.) on RAW 264.7 macrophage cells. *Oriental Pharmacy and Experimental Medicine*, 19(2): 217-226.
- Aymerich, T., Garriga, M., Ylla, J., Vallier, J., Monfort, J.M., Hugas, M. (2000): Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*, 63(6): 721-726.
- Azimi, M., Ahmadi, E., Aghaie, F., Orafei, M., Ahmadi, A., Ranjbary, A.G. (2021): The effect of alcoholic extract of *Thymus vulgaris* on hepatic enzymes activity and apoptosis-related gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Research Square*, 2021: 2948966.
- Azqueta, A., Slyskova, J., Langie, S.A., O'Neill Gaivão, I., Collins, A. (2014): Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Frontiers in Genetics*, 5: 1-8.

- Baba, H., Usifoh, C.O. (2014): Isolation and characterization of kaempferol-7-O-methyl ether from *Solenostemon monostachys* (P. Beauv.) Briq. (Lamiaceae). Nigerian Journal of Pharmaceutical and Applied Science Research, 3(1): 32-37.
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Astahova, L., Chupakhin, E., Belova, D., Prosekov, A., Ivanova, S. (2021): Evaluation of the conditions for the cultivation of callus cultures of *Hyssopus officinalis* regarding the yield of polyphenolic compounds. Plants, 10(5): 1-10.
- Badamtsetseg, B., Myong, L.S., Yuon, L.H. (2012): Pollen morphology of the Lamiaceae in Mongolia. Journal of Korean Nature, 5(2): 169-179.
- Bagci, E., Yazgın, A., Hayta, S., Cakılcıoğlu, U. (2010) Composition of the essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. Journal of Medicinal Plants Research, 4(23): 2588-2590.
- Bahramikia, S., Yazdanparast, R. (2012): Phytochemistry and medicinal properties of *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). Phytotherapy Research, 26(11): 1581-1593.
- Bahramnezhad, Z., Ghazavi, A., Ganji, A., Mosayebi, G. (2021): Investigation on the effect of combination of *Tanacetum parthenium* and *Satureja montana* methanolic extracts on the total antioxidant capacity and serum nitric oxide. Journal of Arak University of Medical Sciences, 24(3): 386-397.
- Bai, J., Li, S., Wu, G., Ma, L., Li, C., Liu, H., Zhang, P. (2019): Naringin inhibits lipopolysaccharide-induced activation of microglia cells. Cellular and Molecular Biology, 65(5): 38-42.
- Baj, T., Błażewicz, Świątek, Ł., Wolski, T., Kocjan, R., Głowniak, K. (2011): Analysis of phenolic acids in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) by HPLC-DAD with monolithic column Chromolith™ RP-18e. Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lubin – Polonia, XXIV, 4, 5, sectio DDD: 59-65.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.
- Barbosa, A.C.L., Sarkar, D., Pinto, M.D.S., Ankolekar, C., Greene, D., Shetty K. (2013): Type 2 diabetes relevant bioactive potential of freshly harvested and long-term stored pears using *in vitro* assay models. Journal of Food Biochemistry, 37(6): 677-686.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C. (2010): Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. LWT-Food Science and Technology, 43(3): 544-550.
- Beedanagari, S. (2017): Genetic Toxicology. In Comprehensive Medicinal Chemistry III, Eds. Chackalamannil, S., Rotella, D., Ward, S.E. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 195-203
- Begum, A., Sandhya, S., Vinod, K.R., Reddy, S., Banji, D. (2013): An in-depth review on the medicinal flora *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae). Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 12(1): 61-74.
- Behradmanesh, S., Derees, F., Rafeiean-Kopaei, M. (2013): Effect of *Salvia officinalis* on diabetic patients. Journal of Renal Injury Prevention, 2(2): 51-54.
- Beliaeff, B., Burgeot, T. (2002): Integrated biomarker response: a useful tool for ecological risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal, 21(6): 1316-1322.
- Belmouhoub, M., Bribi, N., Iguer-Ouada, M. (2017): Alpha-glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of flavonoids rich fractions of *Rosmarinus officinalis* in normal and streptozotocin diabetic mice. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 17(1): 29-39.
- Ben Abdallah, F., Lagha, R., Gaber, A. (2020): Biofilm inhibition and eradication properties of medicinal plant essential oils against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Pharmaceuticals, 13(11): 369.

- Benhalilou, N., Alsamri, H., Alneyadi, A., Athamneh, K., Alrashedi, A., Altamimi, N., Al Dhaheri, Y., Eid, A.H., Iratni, R. (2019): *Origanum majorana* ethanolic extract promotes colorectal cancer cell death by triggering abortive autophagy and activation of the extrinsic apoptotic pathway. *Frontiers in Oncology*, 9: 795.
- 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: 70-76.
- Berezin, A.E., Berezin, A.A. (2019): Impaired function of fibroblast growth factor 23/Klotho protein axis in prediabetes and diabetes mellitus: Promising predictor of cardiovascular risk. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 13(4): 2549-2556.
- Berić, T., Nikolić, B., Stanojević, J., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J., (2008): Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 724-732.
- Bernatoniene, J., Kucinskaite, A., Masteikova, R., Kalveniene, Z., Kasparaviciene, G., Savickas, A. (2009): The comparison of anti-oxidative kinetics *in vitro* of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 66(4): 415-421.
- Berrougui, H., Isabelle, M., Cherki, M., Khalil, A. (2006): *Marrubium vulgare* extract inhibits human-LDL oxidation and enhances HDL-mediated cholesterol efflux in THP-1 macrophage. *Life Sciences*, 80: 105-112.
- Bhalodia, N.R., Shukla, V.J. (2011): Antibacterial and antifungal activities formleaf extracts of *Cassia fistula* L.: An ethnomedicinal plant. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(2): 104-109.
- Bhat, S., Muthunatarajan, S., Mulki, S.S., Archana Bhat, K., Kotian, K.H. (2021): bacterial infection among cancer patients: analysis of isolates and antibiotic sensitivity Pattern. *International Journal of Microbiology*, 2021: 8883700.
- Bina, F., Rahimi, R. (2017): Sweet marjoram: a review of ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(1): 175-185.
- Birnboim, H. C. (1989): A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods in Enzymology*, 100: 243-255.
- Blagosklonny, M.V. (2006): Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia*, 20(3): 385-391.
- Blois, M.S. (1958): Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
- Böllmann, J., Scholler, M. (2004): *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) in North America: invasion history and current distribution. *Feddes Repertorium*, 115(1-2): 178-188.
- Bonesi, M., Loizzo, M.R., Acquaviva, R., Malfa, G.A., Aiello, F., Tundis, R. (2017): Anti-inflammatory and antioxidant agents from *Salvia* genus (Lamiaceae): An assessment of the current state of knowledge. *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*, 16(2): 70-86.
- Bonev, B., Hooper, J., Parisot, J. (2008): Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 61(6): 1295-1301.
- Boozari, M., Hosseinzadeh, H. (2020): Natural products for COVID-19 prevention and treatment regarding to previous coronavirus infections and novel studies. *Phytotherapy Research*, 35(2): 864-876.
- Borrelli, F., Pagano, E., Formisano, C., Piccolella, S., Fiorentino, A., Tenore, G.C., Izzo, A.A., Rigano, D., Pacifico, S. (2019): *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*: An unexploited wild-growing crop for new disclosed bioactives. *Industrial Crops and Products*, 140: 1-11.

- Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A.T., Horhat, F.G. (2014): *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of Medicine and Life*, 7(3): 56-60.
- Boudjelal, A., Henchiri, C., Siracusa, L., Sari, M., Ruberto, G. (2012): Compositional analysis and *in vivo* anti-diabetic activity of wild Algerian *Marrubium vulgare* L. infusion. *Fitoterapia*, 83(2): 286-292.
- Boulila, A., Sanaa, A., Salem, I.B., Rokbeni, N., M'rabet, Y., Hosni, K., Fernandez, X. (2015): Antioxidant properties and phenolic variation in wild populations of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 76: 616-622.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Larbat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S., Matern, U. (2006): Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5: 293-308.
- Bouyahya, A., Chamkhi, I., Benali, T., Guaouguaou, F.E., Balahbib, A., El Omari, N., Taha, D., Belmehdi, O., Ghokhan, Z., El Menyiy, N. (2021): Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 265: 113318.
- Brahmi, F., Hauchard, D., Guendouze, N., Madani, Khodir, Kiendrebeogo, M., Kamagaju, L., Stévigny, C., Chibane, M., Duez, P. (2015): Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 74: 722-730.
- Braidly, N., Matin, A., Rossi, F., Chinain, M., Laurent, D., Guillemin, G.J. (2014): Neuroprotective effects of rosmarinic acid on ciguatoxin in primary human neurons. *Neurotoxicity Research*, 25(2): 226-234.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., The Listeria Consortium, Kunst, F., Cossart, P., Glaser, P. (2003): Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3): 207-213.
- Byman, E., Martinsson, I., Haukedal, H., Netherlands Brain Bank, Gouras, G., Freude, K.K., Wennström, M. (2021): Neuronal α -amylase is important for neuronal activity and glycogenolysis and reduces in presence of amyloid beta pathology. *Aging Cell*, 20(8): e13433.
- Čabarkapa, I., Čolović, R., Đuragić, O., Popović, S., Kokić, B., Milanov, D., Pezo, L. (2019): Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella enteritidis*. *Biofouling*, 35(3): 361-375.
- Calabrese, V., Mancuso, C., Calvani, M., Rizzarelli, E., Butterfield, D. A., Stella, A. M. G. (2007): Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(10): 766-775.
- Calderon-Montano, M.J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M. (2011): A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(4): 298-344.
- Cam, M., Basyigit, B., Alasalvar, H., Yilmaztekin, M., Ahhmed, A., Sagdic, O., Konca, Y., Telci, I. (2020): Bioactive properties of powdered peppermint and spearmint extracts: Inhibition of key enzymes linked to hypertension and type 2 diabetes. *Food Bioscience*, 35: 100577.
- Čanadanović-Brunet, J., Četković, G., Djilas, S., Tumbas, V., Bogdanović, G., Mandić, A., Markov, S., Cvetković, D., Čanadanović, V. (2008): Radical scavenging, antibacterial, and antiproliferative activities of *Melissa officinalis* L. extracts. *Journal of Medicinal Food*, 11(1): 133-143.
- Čanadanović-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Četković, G.S., Tumbas, V.T., Mandić, A.I., Čanadanović, V.M. (2006): Antioxidant activities of different *Teucrium montanum* L. extracts. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(6): 667-673.
- Čančarević, A., Bugarski, B., Šavikin, K., Zdunić, G. (2013): Biological activity and ethnomedicinal use of *Thymus vulgaris* and *Thymus serpyllum*. *Lekovite sirovine*, 33: 3-17.

- Carballo-Carbajal, I., Laguna, A., Romero-Giménez, J., Cuadros, T., Bové, J., Martínez-Vicente, M., Parent, A., Gonzalez-Sepulveda, M., Peñuelas, N., Torra, A., Rodríguez-Galván, B. (2019): Brain tyrosinase overexpression implicates age-dependent neuromelanin production in Parkinson's disease pathogenesis. *Nature Communications*, 10(1): 1-19.
- Carev, I., Sarikurkcü, C. (2021): LC-MS/MS profiles and *in vitro* biological activities of extracts of an endemic species from Turkey: *Stachys cretica* ssp. *anatolica*. *Plants*, 10(6): 1054.
- Carmona, F., Pereira, A.M.S. (2013): Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(2): 379-385.
- Carrasco, F.R., Schmidt, G., Romero, A.L., Sartoretto, J.L., Caparroz-Assef, S.M., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N. (2009): Immunomodulatory activity of *Zingiber officinale* Roscoe, *Salvia officinalis* L. and *Syzygium aromaticum* L. essential oils: evidence for humor- and cell-mediated responses. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(7): 961-967.
- Carvalho, N.C.D., Corrêa-Angeloni, M.J.F., Leffa, D.D., Moreira, J., Nicolau, V., Amaral, P.D.A., Rossatto, Â.E., Andrade, V.M.D. (2011): Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. *Genetics and Molecular Biology*, 34: 290-297.
- Casanova, L.M., da Silva, D., Sola-Penna, M., de Magalhães Camargo, L.M., de Moura Celestrini, D., Tinoco, L.W., Costa, S.S. (2014): Identification of chicoric acid as a hypoglycemic agent from *Ocimum gratissimum* leaf extract in a biomonitoring *in vivo* study. *Fitoterapia*, 93: 132-141.
- Castellano, J.M., Guinda, A., Delgado, T., Rada, M., Cayuela, J.A. (2013): Biochemical basis of the antidiabetic activity of oleanolic acid and related pentacyclic triterpenes. *Diabetes*, 62(6): 1791-1799.
- Ćavar Zeljković, S., Topčagić, A., Požgan, F., Štefane, B., Tarkowski, P., Maksimović, M. (2015): Antioxidant activity of natural and modified phenolic extracts from *Satureja montana* L. *Industrial Crops and Products*, 76: 1094-1099.
- Cazzola, R., Camerotto, C., Cestaro, B. (2011): Anti-oxidant, anti-glycant, and inhibitory activity against α -amylase and α -glucosidase of selected spices and culinary herbs. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(2): 175-184.
- Ch, M.A., Naz, S.B., Sharif, A., Akram, M., Saeed, M.A. (2015): Biological and pharmacological properties of the sweet basil (*Ocimum basilicum*). *Journal of Pharmaceutical Research International*, 7(5): 330-339.
- Chandrasekara, A. (2018): Phenolic acids. Reference Module in Food Science. *Encyclopedia of Food Chemistry*: 535-545.
- Chang, C.L., Lin, C.S., Lai, G.H. (2012): Phytochemical characteristics, free radical scavenging activities, and neuroprotection of five medicinal plant extracts. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012: 1-8.
- Chang, W.C., Kuo, P.L., Chen, C.W., Wu, J.S.B., Shen, S.C. (2015): Caffeic acid improves memory impairment and brain glucose metabolism via ameliorating cerebral insulin and leptin signaling pathways in high-fat diet-induced hyperinsulinemic rats. *Food Research International*, 77: 24-33.
- Chaudhary, A., Garud, S., Kotecha, M. (2020): Herbs and COVID-19 Pandemic. *Journal of Ayurveda*, 14(4): 100.
- Chaudhuri, D., Roy Chowdhury, A., Biswas, B., Chakravorty, D. (2018): *Salmonella typhimurium* infection leads to colonization of the mouse brain and is not completely cured with antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1632.
- Chauhan, N.S. (1999): Medicinal and aromatic plants of Himachal Pradesh. Indus Publishing Company, New Delhi. ISBN 81-7387-098-5.

- Chen, J.J., Zhang, J.X., Zhang, X.Q., Qi, M.J., Shi, M.Z., Yang, J., Zhang, K.Z., Guo, C., Han, Y.L. (2017): Effects of diosmetin on nine cytochrome P450 isoforms, UGTs and three drug transporters *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 334: 1-7.
- Chen, L., Wen, Y.M. (2011): The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*, 3(2): 66-73.
- Cheng, A.X., Lou, Y.G., Mao, Y.B., Lu, S., Wang, L.J., Chen, X.Y. (2007): Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49(2): 179-186.
- Chi, H., Chang, H.Y., Sang, T.K. (2018): Neuronal cell death mechanisms in major neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(10): 3082.
- Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., Lin, C.C. (2003): Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Medica*, 69(07): 600-604.
- Chinsembu, K.C. (2019): Diabetes mellitus and nature's pharmacy of putative antidiabetic plants. *Journal of Herbal Medicine*, 15: 100230.
- Chiocchio, I., Mandrone, M., Sanna, C., Maxia, A., Tacchini, M., Poli, F.J.I.C. (2018): Screening of a hundred plant extracts as tyrosinase and elastase inhibitors, two enzymatic targets of cosmetic interest. *Industrial Crops and Products*, 122: 498-505.
- Cho, K., Choi, Y.J., Ahn, Y.H. (2020): Identification of polyphenol glucuronide conjugates in *Glechoma hederacea* var. *longituba* hot water extracts by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *Molecules*, 25(20): 4713.
- Choi, J.B., Kim, J.H., Lee, H., Pak, J.N., Shim, B.S., Kim, S.H. (2018): Reactive oxygen species and p53 mediated activation of p38 and caspases is critically involved in kaempferol induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(38): 9960-9967.
- Chou, S.T., Chan, Y.R., Chung, Y.C. (2012): Studies on the antimutagenicity and antioxidant activity of the hot water extract of *Glechoma hederacea*. *Journal of Food & Drug Analysis*, 20(3): 637-645.
- Chou, S.T., Lai, C.C., Lai, C.P., Chao, W.W. (2018): Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil. *Industrial Crops and Products*, 122: 675-685.
- Chou, S.T., Lin, T.H., Peng, H.Y., Chao, W.W. (2019): Phytochemical profile of hot water extract of *Glechoma hederacea* and its antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Life Sciences*, 231: 1-10.
- Chua, L.S., Lau, C.H., Chew, C.Y., Ismail, N.I.M., Soontorngun, N. (2018): Phytochemical profile of *Orthosiphon aristatus* extracts after storage: Rosmarinic acid and other caffeic acid derivatives. *Phytomedicine*, 39: 49-55.
- Ćilerdžić, J., Alimpić Aradski, A., Stajić, M., Vukojević, J., Duletić-Laušević, S. (2019): Do *Ganoderma lucidum* and *Salvia officinalis* extracts exhibit synergistic antioxidant and antineurodegenerative effects? *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(4): 3357-3365.
- Cimpan, G., Gocan, S. (2002): Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 25(13-15): 2225-2292.
- Ciocârlan, N. (2016): Family Lamiaceae: main important spontaneous medicinal and aromatic species in the Republic of Moldova. *Revista Botanică*, 12(1): 86-91.
- Coccimiglio, J., Alipour, M., Jiang, Z.H., Gottardo, C., Suntres, Z. (2016): Antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of the ethanolic *Origanum vulgare* extract and its major constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1404505.

- Coelho, J., Veiga, J., Karmali, A., Nicolai, M., Pinto Reis, C., Nobre, B., Palavra, A. (2018): Supercritical CO₂ extracts and volatile oil of basil (*Ocimum basilicum* L.) comparison with conventional methods. *Separations*, 5(2): 21.
- Coelho, V.R., Viau, C.M., Staub, R.B., De Souza, M.S., Pflüger, P., Regner, G.G., Pereira, P., Saffi, J. (2017): Rosmarinic acid attenuates the activation of murine microglial N9 cells through the downregulation of inflammatory cytokines and cleaved caspase-3. *Neuroimmunomodulation*, 24(3): 171-181.
- Colonna, M., Butovsky, O. (2017): Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*, 35: 441-468.
- Cordeiro, M.F., Nunes, T.R.S., Bezerra, F.G., Damasco, P.K.M., Silva, W.A.V., Ferreira, M.R.A., Magalhães, O.M.C., Soares, L.A.L., Cavalcanti, I.M.F., Pitta, M.G.R., Rêgo, M.J.B.M. (2021): Phytochemical characterization and biological activities of *Plectranthus barbatus* Andrews. *Brazilian Journal of Biology*, 82: e236297.
- Costa, T.J., Barros, P.R., Arce, C., Santos, J.D., da Silva-Neto, J., Egea, G., Dantas, A.P., Tostes, R.C., Jimenez-Altayó, F. (2021): The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radical Biology and Medicine*, 162: 615-635.
- Croxen, M.A., Finlay, B.B. (2010): Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1): 26-38.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (Eds.) (2007): *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Publishing, New Jersey.
- Cui, H.Y., Zhang, X.J., Yang, Y., Zhang, C., Zhu, C.H., Miao, J.Y., Chen, R. (2018): Rosmarinic acid elicits neuroprotection in ischemic stroke via Nrf2 and heme oxygenase 1 signaling. *Neural Regeneration Research*, 13(12): 2119.
- Cuppett, S.L., Hall, C.A. (1998): Antioxidant activity of the Labiatae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 42: 245-272.
- Da Porto, C., Decorti, D., Kikic, I. (2009): Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: comparison of three different extraction methods. *Food Chemistry*, 112: 1072-1078.
- da Silva, L.A.L., Pezzini, B.R., Soares, L. (2015): Spectrophotometric determination of the total flavonoid content in *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae) leaves. *Pharmacognosy Magazine*, 11(41): 96-101.
- Daga, P., Vaishnav, S.R., Dalmia, A., Tumaney, A.W. (2021): Extraction, fatty acid profile, phytochemical composition and antioxidant activities of fixed oils from spices belonging to Apiaceae and Lamiaceae family. *Journal of Food Science and Technology*: 1-14.
- Dajić Stevanović, Z. (2011): Herbal sector of Serbia: General Overview. [citirano 13. aprila 2021.]. Preuzeto sa: <http://www.amapseec.com/Herbal%20sector%20of%20Serbia%20overview.pdf>.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H. (1998): Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 140-146.
- Darenskaya, M.A., Kolesnikova, L.I., Kolesnikov, S.I. (2021): Oxidative stress: Pathogenetic role in diabetes mellitus and its complications and therapeutic approaches to correction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 171(2): 179-189.
- Dashputre, N.L., Naikwade, N.S. (2010): Preliminary immunomodulatory activity of aqueous and ethanolic leaves extracts of *Ocimum basilicum* Linn in mice. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2): 1342-1349.

- de Amorim, E.C., de Castro, V.D.A., de Melo, J.G., Corrêa, A.J.C., Sobrinho, T.D.S.P. (2012): Standard operating procedures (SOP) for the spectrophotometric determination of phenolic compounds contained in plant samples. In Latest research into quality control. InTech.
- De Macedo, L.M., Santos, É.M.D., Militão, L., Tundisi, L.L., Ataide, J.A., Souto, E.B., Mazzola, P.G. (2020): Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L., syn *Salvia rosmarinus* Spenn.) and its topical applications: a review. *Plants*, 9(5): 651.
- de Medeiros Gomes, J., Cahino Terto, M.V., Golzio do Santos, S., Sobral da Silva, M., Fachine Tavares, J. (2021): Seasonal variations of polyphenols content, sun protection factor and antioxidant activity of two Lamiaceae species. *Pharmaceutics*, 13(1): 110.
- de Oliveira, A.P., Borges, I.V., Pereira, E.C.V., Feitosa, T.A., Dos Santos, R.F., de Oliveira-Junior, R.G., Rolim, L.A., Viana, L.G.F.C., de Araújo Ribeiro, L.A., da Conceição Santos, A.D., Rolim-Neto, P.J. (2019): Influence of light intensity, fertilizing and season on the cirsiol content, a chemical marker of *Leonotis nepetifolia* (Lamiaceae). *Heliyon*, 7: 1-10.
- de Oliveira, M.R. (2016): The dietary components carnosic acid and carnosol as neuroprotective agents: a mechanistic view. *Molecular Neurobiology*, 53(9): 6155-6168.
- de Oliveira, M.R. (2018): Carnosic acid as a promising agent in protecting mitochondria of brain cells. *Molecular Neurobiology*, 55(8): 6687-6699.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P. (1990): The antimicrobial properties of marjoram (*Origanum majorana* L.) volatile oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 5: 187-190.
- Dej-adisai, S., Rais, I.R., Wattanapiromsakul, C., Pitakbut, T. (2021): Phytochemical investigation of bauhinia winitii based on alpha-glucosidase inhibitory effect and molecular docking affirmation. *Pharmacognosy Magazine*, 17(76): 666-672.
- Demetriou, M., Papaemmanouil, V. (2021): Bacteremia caused by *Listeria innocua* in a patient with hairy leukemia. *Archives of Hellenic Medicine/Arheia Ellenikes Iatrikes*, 38(1): 99-100.
- Dev, N., Das, A.K., Hossain, M.A., Rahman, S.M.M. (2011): Chemical compositions of different extracts of *Ocimum basilicum* leaves. *Journal of Scientific Research*, 3(1): 197-197.
- Deveci, E., Cayan, G.T., Duru, M.E. (2020): *In vitro* antidiabetic activity of seven medicinal plants naturally growing in Turkey. *European Journal of Biology*, 79(1): 23-28.
- Deveci, E., Tel-Çayan, G., Duru, M.E., Öztürk, M. (2019): Phytochemical contents, antioxidant effects, and inhibitory activities of key enzymes associated with Alzheimer's disease, ulcer, and skin disorders of *Sideritis albiflora* and *Sideritis leptoclada*. *Journal of Food Biochemistry*, 43(12): e13078.
- Devi, R.S., Srinivas, P., Thoppil, J.E. (2021): Evaluation of genoprotection against malathion induced toxicity by *Orthosiphon thymiflorus* (ROTH) Sleses. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 12(2): 320-329.
- Dey, A., Nandy, S., Mukherjee, A., Pandey, D.K. (2020): Plant natural products as neuroprotective nutraceuticals: preclinical and clinical studies and future implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*: 1-15.
- Di Sotto, A., Vitalone, A., Di Giacomo, S. (2020): Plant-derived nutraceuticals and immune system modulation: An evidence-based overview. *Vaccines*, 8(3): 468.
- Diklić, N. (1974): Flora SR Srbije (Ed. Josifović, M.). Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd, pp. 339-510.
- Diklić, N. (1986): Flora SR Srbije X, dodatak 2. Srpska Akademija Nauka i Umetnosti, Beograd. pp. 181-188.

- Do, Q.D., Angkawijaya, A.E., Tran-Nguyen, P.L., Huynh, L.H., Soetaredjo, F.E., Ismadji, S., Ju, Y.H. (2014): Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(3): 296-302.
- Dobrucka, R., Romaniuk-Drapała, A., Kaczmarek, M. (2021): Facile synthesis of Au/ZnO/Ag nanoparticles using *Glechoma hederacea* L. extract, and their activity against leukemia. *Biomedical Microdevices*, 23(1): 1-15.
- Dodoš, T., Rajčević, N., Janačković, P., Novaković, J., Marin, P.D. (2019): Intra- and interpopulation variability of Balkan endemic – *Satureja kitaibelii* based on n-alkane profile. *Biochemical Systematics and Ecology*, 85: 68-71.
- Donadu, M.G., Usai, D., Mazzarello, V., Molicotti, P., Cannas, S., Bellardi, M.G., Zanetti, S. (2017): Change in Caco-2 cells following treatment with various lavender essential oils. *Natural Product Research*, 31(18): 2203-2206.
- Đorđević, J., Kolarević, S., Jovanović, J., Kostić-Vuković, J., Novaković, I., Jeremić, M., Sladić, D., Vuković-Gačić, B. (2020): Evaluation of genotoxic potential of tert-butylquinone and its derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(5): 522-530.
- Döring, A.S., Petersen, M. (2014): Production of caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids in plants and suspension cultures of *Glechoma hederacea*. *Phytochemistry Letters*, 10: CXI-CXVII.
- Doron, S., Gorbach, S.L. (2008): Bacterial infections: overview. *International Encyclopedia of Public Health*, 273-282.
- Dos Santos, A.M., Ferrari, R.G., Conte-Junior, C.A. (2019): Virulence factors in *Salmonella typhimurium*: the sagacity of a bacterium. *Current Microbiology*, 76(6): 762-773.
- Drevets, D.A., Leenen, P.J., Greenfield, R.A. (2004): Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2): 323-347.
- Drew, B.T., González-Gallegos, J.G., Xiang, C.L., Kriebel, R., Drummond, C.P., Walked, J.B., Sytsma, K.J. (2017): *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*, 66(1): 133-145.
- Duda, S.C., Mărghitaș, L.A., Dezmiorean, D., Duda, M., Mărgăoan, R., Bobiș, O. (2015): Changes in major bioactive compounds with antioxidant activity of *Agastache foeniculum*, *Lavandula angustifolia*, *Melissa officinalis* and *Nepeta cataria*: Effect of harvest time and plant species. *Industrial Crops and Products*, 77: 499-507.
- Đukić, D., Mašković, P., Moračanin, S.V., Kurčubić, V., Milijašević, M., Babić, J. (2017): Conventional and unconventional extraction methods applied to the plant, *Thymus serpyllum* L. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Vol. 85(1): 012064. IOP Publishing, Bristol, United Kingdom.
- Duletić-Laušević, S., Alimpić-Aradski, A., Živković, J., Gligorijević, N., Šavikin, K., Radulović, S., Čočić, D., Marin, P.D. (2019): Evaluation of bioactivities and phenolic composition of extracts of *Salvia officinalis* L. (Lamiaceae) collected in Montenegro. *Botanica Serbica*, 43(1): 47-58.
- Duletić-Laušević, S., Aradski, A.A., Kolarević, S., Vuković-Gačić, B., Oalđe, M., Živković, J., Šavikin, K., Marin, P.D. (2018a): Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of *Origanum majorana* L. (Lamiaceae) extracts. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91: 126-134.
- Duletić-Laušević, S., Aradski, A.A., Šavikin, K., Knežević, A., Milutinović, M., Stević, T., Vukojević, J., Marković, S., Marin, P.D. (2018b): Composition and biological activities of Libyan *Salvia fruticosa* Mill. and *S. lanigera* Poir. extracts. *South African Journal of Botany*, 117: 101-109.
- Dunne Jr, W.M. (2002): Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 155-166.

- Durand, G.A., Raoult, D., Dubourg, G. (2019): Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(4): 371-382.
- Dwivedi, S.N. (2004): Herbal remedies among the tribals of Sidhi District of Madhya Pradesh. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 28(3): 675-687.
- Džamić, A.M., Soković, M.D., Novaković, M., Jadranin, M., Ristić, M.S., Tešević, V., Marin, P.D. (2013): Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts. *Industrial Crops and Products*, 51: 401-407.
- Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.F., Nabavi, S.M., Eslami, B., Asgarirad, H. (2010): *In vitro* antioxidant and free radical scavenging activity of *Leonurus cardiaca* subsp. *persicus*, *Grammosciadium platycarpum* and *Onosma demawendicum*. *African Journal of Biotechnology*, 9(51): 8865-8871.
- Edwards, R., Harding, K.G. (2004): Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(2): 91-96.
- Eftekhari, N., Moghimi, A., Roshan, N.M., Saadat, S., Boskabady, M.H. (2019): Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of hydro-ethanolic extract of *Ocimum basilicum* leaves and its effect on lung pathological changes in an ovalbumin-induced rat model of asthma. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(1): 1-11.
- Ehsani, P., Farahpour, M.R., Mohammadi, M., Mahmazi, S., Jafarirad, S. (2021): Green fabrication of ZnO/magnetite-based nanocomposite-using *Salvia officinalis* extract with antibacterial properties enhanced infected full-thickness wound. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 628: 127362.
- Eidi, A., Eidi, M. (2009): Antidiabetic effects of sage (*Salvia officinalis* L.) leaves in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 3(1): 40-44.
- Ekin, H.N., Deliorman Orhan, D., Erdoğan Orhan, İ., Orhan, N., Aslan, M. (2019): Evaluation of enzyme inhibitory and antioxidant activity of some Lamiaceae plants. *Journal of Research in Pharmacy*, 23(4): 749-58.
- Elahian, F., Garshasbi, M., Mehri Asiabar, Z., Gholamian Dehkordi, N., Yazdinezhad, A., Mirzaei, S.A. (2021): Ecotypic variations affected the biological effectiveness of *Thymus daenensis* Celak essential oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021: 6686558.
- Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., El-Ansary, D.O., Al-Mana, F.A., Mahmoud, E.A., (2020a): Saudi *Rosmarinus officinalis* and *Ocimum basilicum* L. polyphenols and biological activities. *Processes*, 8(4): 446.
- Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Klimek-Szczykutowicz, M., El-Ansary, D.O., Mahmoud, E.A. (2020b): Polyphenol profile and antimicrobial and cytotoxic activities of natural *Mentha × piperita* and *Mentha longifolia* populations in Northern Saudi Arabia. *Processes*, 8(4): 479.
- Elberry, A.A., Harraz, F.M., Ghareib, S.A., Gabr, S.A., Nagy, A.A., Abdel-Sattar, E. (2015): Methanolic extract of *Marrubium vulgare* ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 3(1): 37-44.
- El-Beshbishy, H.A., Bahashwan, S.A. (2012): Hypoglycemic effect of basil (*Ocimum basilicum*) aqueous extract is mediated through inhibition of α -glucosidase and α -amylase activities: an *in vitro* study. *Toxicology and Industrial Health*, 28(1): 42-50.
- El-Boshy, M.E., Refaat, B., Qasem, A.H., Khan, A., Ghaith, M., Alasmoum, H., Mahbub, A., Almainani, R.A. (2019): The remedial effect of *Thymus vulgaris* extract against lead toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, immunosuppression, and hematological disorders in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(22): 22736-22746.
- Elgndi, M.A., Filip, S., Pavlić, B., Vladić, J., Stanojković, T., Žižak, Ž., Zeković, Z. (2017): Antioxidative and cytotoxic activity of essential oils and extracts of *Satureja montana* L., *Coriandrum sativum* L.

- and *Ocimum basilicum* L. obtained by supercritical fluid extraction. The Journal of Supercritical Fluids, 128: 128-137.
- El-Hawary, S.S., El-Sofany, R.H., Abdel-Monem, A.R., Ashour, R.S., Sleem, A.A. (2012): Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng growing in Egypt (Lamiaceae). Pharmacognosy Journal, 4(32): 45-54.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M. (1961): A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology, 7: 88-95.
- El-Maati, M.F.A., Labib, S.M., Al-Gaby, A.M.A., Ramadan, M.F. (2012): Antioxidant properties of different extracts from five medicinal plants. Zagazig Journal of Agricultural Research, 39: 1-13.
- Elmasri, W.A., Hegazy, M.E.F., Aziz, M., Koksai, E., Amor, W., Mechref, Y., Hamood, A.N., Cordes, D.B., Paré, P.W. (2014): Biofilm blocking sesquiterpenes from *Teucrium polium*. Phytochemistry, 103: 107-113.
- Elmasras, M., Erenler, R., Isnac, B., Aksit, H., Sen, O., Genc, N., Demirtas, I. (2015): Isolation and identification of a new neo-clerodane diterpenoid from *Teucrium chamaedrys* L. Natural Product Research, 30(3): 299-304.
- Encalada, M.A., Hoyos, K.M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M.G.Í., Ansorena, D., Astiasarán, I., Navarro-Blasco, Í., Caverro, R.Y., Calvo, M.I. (2011): Anti-proliferative effect of *Melissa officinalis* on human colon cancer cell line. Plant Foods for Human Nutrition, 66(4): 328-334.
- Erci, F., Torlak, E. (2019): Antimicrobial and antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles by using aqueous leaf extract of *Thymus serpyllum*. Sakarya University Journal of Science, 23(3): 333-339.
- Erdtman, G. (1945): Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae, and Avicenniaceae. Svensk Botanisk Tidskrift, 29: 279-285.
- Erel, O. (2004): A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clinical Biochemistry, 37(4): 277-285.
- Ertürk, Ö. (2006): Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. Biologia, 61(3): 275-278.
- Espinosa, S., Bec, N., Larroque, C., Ramírez, J., Sgorbini, B., Bicchi, C., Cumbicus, N., Gilardoni, G. (2021): A novel chemical profile of a selective *in vitro* cholinergic essential oil from *Clinopodium taxifolium* (Kunth) Govaerts (Lamiaceae), a native Andean species of Ecuador. Molecules, 26(1): 45.
- Esra, M., Cetin, O., Kahraman, A., Celep, F., Dogan, M. (2011): A cytomorphological study on some taxa of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae). Caryologia, 64(3): 272-287.
- Etsassala, N.G., Hussein, A.A., Nchu, F. (2021): Potential application of some Lamiaceae species in the management of diabetes. Plants, 10(2): 279.
- Exarchou, V., Kanetis, L., Charalambous, Z., Apers, S., Pieters, L., Gekas, V., Goulas, V. (2015): HPLC-SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. extract with antifungal potential: Relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(2): 457-463.
- Ezadi, F., Ardebili, A., Mirnejad, R. (2019): Antimicrobial susceptibility testing for polymyxins: challenges, issues, and recommendations. Journal of Clinical Microbiology, 57(4): e01390-18.
- Fachel, F.N.S., Schuh, R.S., Veras, K.S., Bassani, V.L., Koester, L.S., Henriques, A.T., Braganhol, E., Teixeira, H.F. (2019): An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. Neurochemistry International, 122: 47-58.

- Faiella, L., Dal Piaz, F., Bader, A., Braca, A. (2014): Diterpenes and phenolic compounds from *Sideritis pullulans*. *Phytochemistry*, 106: 164-170.
- Faiku, F., Buqaj, L., Haziri, A. (2019): Phytochemicals and antioxidant study of *Teucrium chamaedrys* (L.) plant. *Poljoprivreda i Šumarstvo*, 65(1): 137-145.
- Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P. (2012): Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3: 222.
- Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoroso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, S., Lombardi, G. (2009): Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in *in vitro* models of neuronal death. *British Journal of Pharmacology*, 157(6): 1072-1084.
- Fang, Z.Y., Zhang, M., Liu, J.N., Zhao, X., Zhang, Y.Q., Fang, L. (2021): Tanshinone IIA: A review of its anticancer effects. *Frontiers in Pharmacology*, 11: 2189.
- Farlow, C.H. (2007): *Food additives: A shopper's guide to what's safe & what's not!* KISS For Health Publishing, Econdido, California.
- Farnad, N., Heidari, R., Aslanipour, B. (2014): Phenolic composition and comparison of antioxidant activity of alcoholic extracts of Peppermint (*Mentha piperita*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 8(2): 113-121.
- Farr, S.A., Niehoff, M.L., Ceddia, M.A., Herrlinger, K.A., Lewis, B.J., Feng, S., Welleford, A., Butterfield, D.A., Morley, J.E. (2016): Effect of botanical extracts containing carnosic acid or rosmarinic acid on learning and memory in SAMP8 mice. *Physiology & Behavior*, 165: 328-338.
- Fathiazad, F., Hamedeyazdan, S. (2011): A review on *Hyssopus officinalis* L.: Composition and biological activities. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(17): 1959-1966.
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., Hamedeyazdan, S. (2011): Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2): 63-67.
- Fatiha, B., Didier, H., Naima, G., Khodir, M., Martin, K., Léocadie, K., Caroline, S., Mohamed, C., Pierre, D. (2015): Phenolic composition, *in vitro* antioxidant effects and tyrosinase inhibitory activity of three Algerian *Mentha* species: *M. spicata* (L.), *M. pulegium* (L.) and *M. rotundifolia* (L.) Huds (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 74: 722-730.
- Fatima, N., Hafizur, R.M., Hameed, A., Ahmed, S., Nisar, M., Kabir, N. (2017): Ellagic acid in *Emblica officinalis* exerts anti-diabetic activity through the action on β -cells of pancreas. *European Journal of Nutrition*, 56(2): 591-601.
- Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., Fontana, C. (2014): First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and eternecept. *JMM Case Reports*, 1(2): e003103.
- Fecka, I., Turek, S. (2008): Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques. *Food Chemistry*, 108(3): 1039-1053.
- Fernández-No, I.C., Guarddon, M., Böhme, K., Cepeda, A., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J. (2011): Detection and quantification of spoilage and pathogenic *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* by real-time PCR. *Food Microbiology*, 28(3): 605-610.
- Fernando, I.D.N.S., Abeyasinghe, D.C., Dharmadasa, R.M. (2013): Determination of phenolic contents and antioxidant capacity of different parts of *Withania somnifera* (L.) Dunal. from three different growth stages. *Industrial Crops and Products*, 50: 537-539.
- Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M.L.M., Araujo, M.E.M. (2006): The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(1): 31-37.

- Filip, S., Vidović, S., Adamović, D., Zeković, Z. (2014): Fractionation of non-polar compounds of basil (*Ocimum basilicum*) by supercritical fluid extraction (SFE). *The Journal of Supercritical Fluids*, 86: 85-90.
- Fisher, R.A., Gollan, B., Helaine, S. (2017): Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8): 453-464.
- Flemmig, J., Noetzel, I., Arnhold, J., Rauwald, H.W. (2015): *Leonorus cardiaca* L. herb extracts and their constituents promote lactoperoxidase activity. *Journal of Functional Foods*, 17: 328-339.
- Flemming, H.C., Baveye, P., Neu, T.R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J., Wuertz, S. (2021): Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *Biofilms and Microbiomes*, 7(1): 1-5.
- Foster, T.J., Geoghegan, J.A. (2015): *Staphylococcus aureus*. *Molecular Medical Microbiology*: 655-674.
- Freitas, J.R., Vendramini, P.H., Melo, J.O., Eberlin, M.N., Augusti, R. (2019): Assessing the spatial distribution of key flavonoids in *Mentha × piperita* leaves: An application of Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry Imaging (DESI-MSI). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(7): 1437-1446.
- Frezza, C., Venditti, A., Giuliani, C., Foddai, S., Cianfaglione, K., Maggi, F., Fico, G., Guiso, M., Nicoletti, M., Bianco, A., Serafini, M. (2021): Occurrence of flavonoids in different Lamiaceae taxa for a preliminary study on their evolution based on phytochemistry. *Biochemical Systematics and Ecology*, 96: 104247.
- Frezza, C., Venditti, A., Matrone, G., Serafini, I., Foddai, S., Bianco, A., Serafini, M. (2018): Iridoid glycosides and polyphenolic compounds from *Teucrium chamaedrys* L. *Natural Product Research*, 32(13): 1583-1589.
- Friedly, E.C., Crandall, P.G., Ricke, S., O'Bryan, C.A., Martin, E.M., Boyd, L.M. (2008): Identification of *Listeria innocua* surrogates for *Listeria monocytogenes* in hamburger patties. *Journal of Food Science*, 73(4): M174-M178.
- Galanakis, C.M., Rizou, M., Aldawoud, 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.
- Gambino, M., Cappitelli, F. (2016): Mini-review: biofilm responses to oxidative stress. *Biofouling*, 32(2): 167-178.
- Ganguly, U., Kaur, U., Chakrabarti, S. S., Sharma, P., Agrawal, B. K., Saso, L., Chakrabarti, S. (2021): Oxidative Stress, Neuroinflammation, and NADPH oxidase: implications in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021: 1-19.
- García-Risco, M.R., Mouhid, L., Salas-Pérez, L., López-Padilla, A., Santoyo, S., Jaime, L., de Molina, A.R., Reglero, G., Fornari, T. (2017): Biological activities of Asteraceae (*Achillea millefolium* and *Calendula officinalis*) and Lamiaceae (*Melissa officinalis* and *Origanum majorana*) plant extracts. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72(1): 96-102.
- Garland, S. (2004): *The Complete Book of Herbs & Spices*. Frances Lincoln. London.
- Gateva, S., Jovtchev, G., Stankov, A., Gregan, F. (2015): *Salvia* extract can decrease DNA damage induced by zeocin. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*, 4(1): 1-10.
- Gavarić, A., Vidović, S., Aladić, K., Jokić, S., Vladić, J. (2021): Supercritical CO₂ extraction of *Marrubium vulgare*: intensification of marrubiin. *RSC Advances*, 11(16): 9067-9075.
- Gavarić, N., Kladar, N., Mišan, A., Nikolić, A., Samojlik, I., Mimica-Dukić, N., Božin, B. (2015): Postdistillation waste material of thyme (*Thymus vulgaris* L., Lamiaceae) as a potential source of biologically active compounds. *Industrial Crops and Products*, 74: 457-464.

- Gęgotek, A., Jarocka-Karpowicz, I., Skrzydlewska, E. (2020): Cytoprotective effect of ascorbic acid and rutin against oxidative changes in the proteome of skin fibroblasts cultured in a three-dimensional system. *Nutrients*, 12(4): 1-15.
- Ghaffari, H., Venkataramana, M., Ghassam, B.J., Nayaka, S.C., Nataraju, A., Geetha, N.P., Prakash, H.S. (2014): Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life Sciences*, 113(1-2): 7-13.
- Ghasemzadeh, A., Ghasemzadeh, N. (2011): Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(31): 6697-6703.
- Ghorbani, A., Esmailizadeh, M. (2017): Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 7(4): 433-440.
- Ghosh, P.K., Gaba, A. (2013): Phyto-extracts in wound healing. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 16(5): 760-820.
- Gião, M.S., Gomes, S., Madureira, A.R., Faria A., Pestana, D., Calhau, C., Pintado, M.E., Azevedo, I., Malcata, F.X. (2012): Effect of *in vitro* digestion upon the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Agrimonia eupatoria*, *Rubus idaeus*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. *Food Chemistry*, 131: 761-767.
- Gilbert-Girard, S., Savijoki, K., Yli-Kauhaluoma, J., Fallarero, A. (2020): Optimization of a high-throughput 384-well plate-based screening platform with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9): 3034.
- Giuberti, G., Rocchetti, G., Lucini, L. (2020): Interactions between phenolic compounds, amylolytic enzymes and starch: An updated overview. *Current Opinion in Food Science*, 31: 102-113.
- Gormez, A., Bozari, S., Yanmis, D., Gulluce, M., Sahin, F., Agar, G. (2015): Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of two species of Lamiaceae against phytopathogenic bacteria. *Polish Journal of Microbiology*, 64(2): 121-127.
- Grazul, M., Budzisz, E. (2009): Biological activity of metal ions complexes of chromones, coumarins and flavones. *Coordination Chemistry Reviews*, 253(21-22): 2588-2598.
- Grbović, F., Stanković, M.S., Čurčić, M., Đorđević, N., Šeklić, D., Topuzović, M., Marković, S. (2013): *In vitro* cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. *Plants*, 2(3): 371-378.
- Greggio, E., Bergantino, E., Carter, D., Ahmad, R., Costin, G.E., Hearing, V.J., Clarimon, J., Singleton, A., Eerola, J., Hellström, O., Tienari, P.J. (2005): Tyrosinase exacerbates dopamine toxicity but is not genetically associated with Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 93(1): 246-256.
- Griess, P. (1879): Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 12(1): 426-428.
- Grujičić, D., Marković, A., Vukajlović, J.T., Stanković, M., Jakovljević, M.R., Ćirić, A., Đorđević, K., Planojević, N., Milutinović, M., Milošević-Đorđević, O. (2020): Genotoxic and cytotoxic properties of two medical plants (*Teucrium arduini* L. and *Teucrium flavum* L.) in relation to their polyphenolic contents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 852: 503168.
- Gudzenko, A. (2013): Development and validation of a method for the determination of rosmarinic acid in *Mentha piperita* L. using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 5(9): 40-45.
- Güez, C.M., Souza, R.O.D., Fischer, P., Leão, M.F.D.M., Duarte, J.A., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Zuravski, L., Oliveira, L.F.S.D., Machado, M.M. (2017): Evaluation of basil extract (*Ocimum basilicum* L.) on

- oxidative, anti-genotoxic and anti-inflammatory effects in human leukocytes cell cultures exposed to challenging agents. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 53: e15098.
- Gupta, R.K., Patel, A.K., Shah, N., Choudhary, A.K., Jha, U.K., Yadav, U.C., Gupta, P.K., Pakuwal, U. (2014): Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: a review. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(11): 4405-4409.
- Gürbüz, P., Dokumacı, A.H., Gündüz, M.G., Perez, C., Göger, F., Paksoy, M.Y., Yerer, M.B., Demirezer, L.Ö. (2021): *In vitro* biological activity of *Salvia fruticosa* Mill. infusion against amyloid β -peptide-induced toxicity and inhibition of GSK-3 β , CK-1 δ , and BACE-1 enzymes relevant to Alzheimer's disease. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 29(3): 236-243.
- Guzmán-Ávila, R., Flores-Morales, V., Paoli, P., Camici, G., Ramírez-Espinosa, J.J., Cerón-Romero, L., Navarrete-Vázquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Yolanda Rios, M., Villalobos-Molina, R., Estrada-Soto, S. (2018): Ursolic acid derivatives as potential antidiabetic agents: *In vitro*, *in vivo*, and *in silico* studies. *Drug Development Research*, 79(2): 70-80.
- Habtemariam, S. (2016): The therapeutic potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) diterpenes for Alzheimer's disease. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016: 2680409.
- Hajdari, A., Mustafa, B., Hyseni, L., Bajrami, A., Mustafa, G., Quave, C.L., Nebija, D. (2020): Phytochemical study of eight medicinal plants of the Lamiaceae family traditionally used as tea in the Sharri Mountains region of the Balkans. *The Scientific World Journal*, 2020: 1-9.
- Halliwell, B. (2012): Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*, 70(5): 257-265.
- Hamed, S., Afifi, F., Mansi, I., Bustanji, Y., Alkhatib, H.S. (2021): Screening of commonly used plant extracts in Jordanian skin lightening folkloric recipes for their tyrosinase inhibitory activity: An *in vitro* study. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(2): 113-125.
- Han, X., Li, L., Diao, J. (2021): Qualitative and quantitative analyses of labiatic acid, apigenin and buddleoside in *Hyssopus officinalis* by high-performance thin-layer chromatography. *JPC- Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 34(1): 45-53.
- Han, X., Parker, T.L. (2017): Anti-inflammatory, tissue remodeling, immunomodulatory, and anticancer activities of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil in a human skin disease model. *Biochimie Open*, 4: 73-77.
- Han, Y.H., Kee, J.Y., Hong, S.H. (2018): Rosmarinic acid activates AMPK to inhibit metastasis of colorectal cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 9: 1-14.
- Hanafy, D.M., Burrows, G.E., Prenzler, P.D., Hill, R.A. (2020): Potential role of phenolic extracts of mentha in managing oxidative stress and Alzheimer's disease. *Antioxidants*, 9(7): 631.
- Hao, X.C., Zhang, J.W., Xia, G.X., Xue, Y.B., Luo, Z.W., Si, Y.Y., Yao, G.M., Zhang, Y.H. (2013) A new triterpenoid from *Teucrium viscidum*. *Molecules*. 18: 1262-1269.
- Harput, U.S., Saracoglu, I., Ogihara, Y. (2006): Effects of two *Prunella* species on lymphocyte proliferation and nitric oxide production. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(2): 157-159.
- Hassanshahiyani, M., Saadatfar, A., Masoumi, F. (2018): Antimicrobial properties of *Hyssopus officinalis* extract against antibiotic-resistant bacteria in planktonic and biofilm form. *Biological Journal of Microorganisms*, 7(28): 91-101.
- Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E., Şakin, H. (2013): Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, 43: 427-433.

- He, Q., Hou, Q., Wang, Y., Li, J., Li, W., Kwok, L.Y., Sun, Z., Zhang, H., Zhong, Z. (2018): Comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis*: insights into their environmental adaptations. *BMC Genomics*, 19(1): 1-12.
- Hedge, I.C. (1972): *Origanum* L. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.). *Flora Europaea* 3. Cambridge University Press, 171-172.
- Hellal, K., Maulidiani, M., Ismail, I.S., Tan, C.P., Abas, F. (2020): Antioxidant, α -glucosidase, and nitric oxide inhibitory activities of six Algerian traditional medicinal plant extracts and 1H-NMR-based metabolomics study of the active extract. *Molecules*, 25(5): 1247.
- Henrici, A.T. (1933): Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of bacteriology*, 25(3): 277-287.
- Héral, B., Stierlin, É., Fernandez, X., Michel, T. (2020): Phytochemicals from the genus *Lavandula*: a review. *Phytochemistry Reviews*, 20: 751-771.
- Hidayat, M., Handayani, D., Nurwidya, F., Laksmi Andarini, S. (2021): Hyperinflammation syndrome in COVID-19 Disease: pathogenesis and potential immunomodulatory agents. *Turkish Journal of Immunology*, 9(1): 1-11.
- Ho, C.T., Huang, M.T., Lou, Y.R., Ma, W., Shao, Y., Wei, G.J., Wang, M., Chin, C.K. (1999): Antioxidant and antitumour activity of rosemary leaves. *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*: 296-307.
- Hohmann, J., Zupkó, I., Rédei, D., Csányi, M., Falkay, G., Máthé, I., Janicsák, G. (1999): Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis* and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. *Planta Medica: Natural Products and Medicinal Plant Research*, 65(6): 576-578.
- Hombach, M., Maurer, F.P., Pfiffner, T., Böttger, E.C., Furrer, R. (2015): Standardization of operator-dependent variables affecting precision and accuracy of the disk diffusion method for antibiotic susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(12): 3864-3869.
- Hoseinkhani, Z., Norooznezhad, F., Rastegari-Pouyani, M., Mansouri, K. (2020): Medicinal Plants Extracts with Antiangiogenic Activity: Where Is the Link? *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(3): 370-378.
- Hossain, M.A., Al-Hdhami, S.S., Weli, A.M., Al-Riyami, Q., Al-Sabahi, J.N. (2014): Isolation, fractionation and identification of chemical constituents from the leaves crude extracts of *Mentha piperita* L. grown in Sultanate of Oman. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(1): S368-S372.
- Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Siana, A.B., Brunton, N.P. (2011): Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chemistry*, 126: 339-346.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C. (2010): Characterization of phenolic composition in Lamiaceae spices by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19): 10576-10581.
- Hsu, C.K., Chang, C.T., Lu, H.Y., Chung, Y.C. (2007): Inhibitory effects of the water extracts of *Lavendula* sp. on mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry*, 105(3): 1099-1105.
- Hu, X., Cui, S., Chen, X., Hu, Z. (2009): CE with field-enhanced stacking for rapid and sensitive determination of umbelliferone, rutin and aesculetin in *Prunella vulgaris*. *Chromatographia*, 70(11-12): 1733-1736.
- Huang, A.C., Osbourn, A. (2019): Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection. *Pest Management Science*, 75(9): 2368-2377.

- Hudz, N., Makowicz, E., Shanida, M., Białoń, M., Jasicka-Misiak, I., Yezerska, O., Svydenko, L., Wieczorek, P.P. (2020): Phytochemical evaluation of tinctures and essential oil obtained from *Satureja montana* herb. *Molecules*, 25(20): p.4763.
- Hulkower, K.I., Herber, R.L. (2011): Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. *Pharmaceutics*, 3(1): 107-124.
- Husak, L., Dakhym, I., Marchyshyn, S., Demydyak, O., Kyryliv, M. (2017): Determination of phenolic compounds from *Stachys sieboldii* MIQ. herb and tubers. *The Pharma Innovation Journal*, 6(9): 450-453.
- Hutchings, M.J., Price, E.A. (1999): *Glechoma hederacea* L. (*Nepeta glechoma* Benth., *N. hederacea* (L.) Trev.). *Journal of Ecology*, 87(2), 347-364.
- Huynh, N.T., Van Camp, J., Smagghe, G., Raes, K. (2014): Improved release and metabolism of flavonoids by steered fermentation processes: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11): 19369-19388.
- Imanshahidi, M., Hosseinzadeh, H. (2006): The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 20(6): 427-437.
- Iqbal, D., Dukhyil, A.B., Khan, M.S. (2021): Geno-protective, free radical scavenging and antimicrobial potential of *Hyptis suaveolens* methanolic fraction: An in-vitro study. *Journal of Pharmaceutical Research International*: 46-57.
- Irakli, M., Tsifodimou, K., Sarrou, E., Chatzopoulou, P. (2018): Optimization infusions conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Sideritis scardica* tea using response surface methodology. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 8: 67-74.
- Iseppi, R., Tardugno, R., Brighenti, V., Benvenuti, S., Sabia, C., Pellati, F., Messi, P. (2020): Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial activity of essential oils from the Lamiaceae family against *Streptococcus agalactiae* and *Candida albicans* biofilms. *Antibiotics*, 9(9): 592.
- Ishihara, S., Kawata, A., Inoue, M., Watanabe, T., Tsuji, K. (2007): Hypoglycemic effect of *Glechoma hederacea* extract on blood glucose level in rats. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology (Japan)*, 54(9): 412-414.
- Islam, M.T., Quispe, C., Mubarak, M.S., Salehi, B., Reiner, Ž., Martorell, M., Sharifi-Rad, J., Setzer, W.N. (2021): Protective effects of natural products and their derivatives on genetic material: A critical review. *Records of Natural Products*, 15(6): 433-462.
- Ismail, M. (2006): Central properties and chemical composition of *Ocimum basilicum* essential oil. *Pharmaceutical Biology*, 44(8): 619-626.
- Issa, A., Mohammad, M., Hudaib, M., Tawah, K., Rjai, T.A., Oran, S., Bustanji, Y. (2011): A potential role of *Lavandula angustifolia* in the management of diabetic dyslipidemia. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16): 3876-3882.
- Iturria-Medina, Y., Sotero, R.C., Toussaint, P.J., Evans, A.C., the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2014): Epidemic spreading model to characterize misfolded proteins propagation in aging and associated neurodegenerative disorders. *PLoS Computational Biology*, 10(11): e1003956.
- Ivasenko, S., Orazbayeva, P., Skalicka-Wozniak, K., Ludwiczuk, A., Marchenko, A., Ishmuratova, M., Poleszak, E., Korona-Glowniak, I., Akhmetova, S., Karilkhan, I., Loseva, I. (2021): Antimicrobial activity of ultrasonic extracts of two chemotypes of *Thymus serpyllum* L. of Central Kazakhstan and their polyphenolic profiles. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 9(A): 61-67.
- Jackson, J.T., Mulazzani, E., Nutt, S.L., Masters, S.L. (2021): The role of PLC γ 2 in immunological disorders, cancer and neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 297(2): 100905.

- Jacob, B., Narendhirakannan, R.T. (2019): Role of medicinal plants in the management of diabetes mellitus: A review. *3 Biotech*, 9(1): 1-17.
- Jadhav, R., Puchchakayala, G. (2012): Hypoglycemic and antidiabetic activity of flavonoids: boswellic acid, ellagic acid, quercetin, rutin on streptozotocin-nicotinamide induced type 2 diabetic rats. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(2): 251-256.
- Jafari-Sales, A., Hossein-Nezhad, P. (2020): Antimicrobial effects of *Rosmarinus officinalis* methanolic extract on *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* in laboratory conditions. *Journal of Medicinal and Chemical Sciences*, 3(2): 103-108.
- Jain, P.K., Joshi, H. (2012): Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(6): 236-240.
- Jakovljević Kovač, M., Pavić, V., Huđ, A., Cindrić, I., Molnar, M. (2021): Determination of suitable macroporous resins and desorbents for carnosol and carnosic acid from deep eutectic solvent sage (*Salvia officinalis*) extract with assessment of antiradical and antibacterial activity. *Antioxidants*, 10(4): 556.
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018): Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 7(1): 1-7.
- Jamuna, K.S., Ramesh, C.K., Srinivasa, T.R., Raghu, K.L. (2010): Comparative studies on DPPH and reducing power antioxidant properties in aqueous extracts of some common fruits. *Journal of Pharmacy Research*, 3(10): 2378-2380.
- Janačković, P., Gavrilović, M., Savić, J., Marin, P.D., Dajić Stevanović, Z. (2019): Traditional knowledge on plant use from Negotin Krajina (Eastern Serbia): An ethnobotanical study. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 18: 25-33.
- Jančić, P., Stošić, D., Mimica-Dikić, N., Lakušić, B. (1995): *Aromatične biljke Srbije*. Dečije novine, Beograd, Gornji Milanovac.
- Janeska, B., Stefova, M., Alipieva, K. (2007): Assay of flavonoid aglycones from the species of genus *Sideritis* (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD. *Acta Pharmaceutica*, 57(3): 371-377.
- Janick, J. (2003): Herbals: the connection between horticulture and medicine. *HortTechnology*, 13(2): 229-238.
- Jantan, I., Ahmad, W., Bukhari, S.N.A. (2015): Plant-derived immunomodulators: an insight on their preclinical evaluation and clinical trials. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1-18.
- Jantová, S., Hudec, R., Sekretár, S., Kučerák, J., Melušová, M. (2014): *Salvia officinalis* L. extract and its new food antioxidant formulations induce apoptosis through mitochondrial/caspase pathway in leukemia L1210 cells. *Interdisciplinary Toxicology*, 7(3): 146-153.
- Jarić, S., Mitrović, M., Pavlović, P. (2014): An ethnobotanical and ethnomedicinal study on the use of wild medicinal plants in rural areas of Serbia, In *Ethnobotany and biocultural diversities in the Balkans: perspectives on sustainable rural development and reconciliation*, ed. Pieroni, A. and Quave, C.L., Springer, New York, pp. 87-111.
- Jarić, S., Mitrović, M., Pavlović, P. (2015): Review of ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological study of *Thymus serpyllum* L. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 1-11.
- Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E.A., Ochman, H. (2010): Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 14028 genome. *Journal of Bacteriology*, 192(2): 560-567.

- Javadian, S., Sabouni, F., Haghbeen, K. (2016): *Origanum vulgare* L. extracts versus thymol: An anti-inflammatory study on activated microglial and mixed glial cells. *Journal of Food Biochemistry*, 40(1): 100-108.
- Javed, H., Azimullah, S., Meeran, M.F., Ansari, S.A., Ojha, S. (2019): Neuroprotective effects of thymol, a dietary monoterpene against dopaminergic neurodegeneration in rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7): 1538.
- Javid, H., Moein, S., Moein, M.R. (2021): Evaluating the inhibitory effects of dichloromethane and methanol extracts of *Salvia macilenta* and *Salvia officinalis* on the diabetes marker enzyme, alpha-glucosidase: an approach for the treatment of diabetes. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 16(3): e109694.
- Jeong, Y.U., Lee, H., Park, H., Kim, K., Kim, S., Park, Y.J. (2018): Studies on antioxidant, anti-inflammation and tyrosinase inhibitory activities of *Melissa officinalis* extracts and their fractions. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*, 44(4): 465-475.
- Jooybari, N.M., Amini, K., Falsafi, S. (2020): Determining the L-arabinose isomerase in bacilli isolates from Gandom Beryan area of Kerman (Iran) by Molecular method and its cloning in *Escherichia coli* XL1 blue. *Gene Reports*, 21: 100817.
- Joseph, J.T. (2021): The amygdala in neurodegeneration. *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 48(s1): S5-S6.
- Jovanović, A., Petrović, P., Đorđević, V., Zdunić, G., Šavikin, K., Bugarski, B. (2017): Polyphenols extraction from plant sources. *Lekovite sirovine*, (37): 45-49.
- Jovanović, A.A., Đorđević, V.B., Zdunić, G.M., Pljevljakušić, D.S., Šavikin, K.P., Godevac, D.M., Bugarski, B.M. (2017): Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Separation and Purification Technology*, 179: 369-380.
- Jovanović, A.A., Petrović, P.M., Zdunić, G.M., Šavikin, K.P., Kitić, D., Đorđević, V.B., Bugarski, B.M. and Branković, S. (2021): Influence of lyophilized *Thymus serpyllum* L. extracts on the gastrointestinal system: Spasmolytic, antimicrobial and antioxidant properties. *South African Journal of Botany*, 142: 274-283.
- Jung, U.J., Cho, Y.Y., Choi, M.S. (2016): Apigenin ameliorates dyslipidemia, hepatic steatosis and insulin resistance by modulating metabolic and transcriptional profiles in the liver of high-fat diet-induced obese mice. *Nutrients*, 8(5): 305.
- Kadan, S., Saad, B., Sasson, Y., Zaid, H. (2016): *In vitro* evaluation of anti-diabetic activity and cytotoxicity of chemically analysed *Ocimum basilicum* extracts. *Food Chemistry*, 196: 1066-1074.
- Kadifkova Panovska, T., Kulevanova, S., Stefova, M. (2005): *In vitro* antioxidant activity of some *Teucrium* species (Lamiaceae). *Acta Pharmaceutica*, 55: 207-214.
- Kai, H., Maeda, A., Nagatomo, A., Tahara, N., Koura, S., Matsuno, K. (2015): Ursolic acid and 12-O-methylcarnosic acid from the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. suppressed melanin production with downregulation of tyrosinase expression in HMV-II melanoma cells. *Planta Medica*, 81(16): SL3B_04.
- Kaiki, Y., Kitagawa, H., Hara, T., Nomura, T., Omori, K., Shigemoto, N., Takahashi, S., Ohge, H. (2021): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* contamination of hospital-use-only mobile phones and efficacy of 222-nm ultraviolet disinfection. *American Journal of Infection Control*, 49(6): 800-803.
- Kajaria, D., Ranjana, J.T., Tripathi, Y.B., Tiwari, S. (2013): *In-vitro* α -amylase and glycosidase inhibitory effect of ethanolic extract of antiasthmatic drug – Shirishadi. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4): 206-209.

- Kalemba-Drożdż, M., Cierniak, A. (2019): Antioxidant and genoprotective properties of extracts from edible flowers. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58: 42-50.
- Kamdem, J.P., Adeniran, A., Boligon, A.A., Klimaczewski, C.V., Elekofehinti, O.O., Hassan, W., Ibrahim, M., Waczuk, E.P., Meinerz, D.F., Athayde, M.L. (2013): Antioxidant activity, genotoxicity and cytotoxicity evaluation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ethanolic extract: its potential role in neuroprotection. *Industrial Crops and Products*, 51: 26-34.
- Kapiszewska, M., Soltys, E., Visioli, F., Cierniak, A., Zajac, G. (2005): The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative DNA damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content. *Journal of Physiology and Pharmacology. Supplement*, 56(1): 183-197.
- Kapp, K., Hakala, E., Orav, A., Pohjala, L., Vuorela, P., Püssa, T., Vuorela, H., Raal, A. (2013): Commercial peppermint (*Mentha × piperita* L.) teas: antichlamydial effect and polyphenolic composition. *Food Research International*, 53: 758-766.
- Karapandzova, M., Qazimi, B., Stefkov, G., Bačeva, K., Stafilov, T., Panovska, T.K., Kulevanova, S. (2013): Chemical characterization, mineral content and radical scavenging activity of *Sideritis scardica* and *S. raeseri* from R. Macedonia and R. Albania. *Natural Product Communications*, 8(5): 1934578X1300800525.
- Karimzadeh, S., Farahpour, M.R. (2017): Topical application of *Salvia officinalis* hydroethanolic leaf extract improves wound healing process. *Indian Journal of Experimental Biology*, 55: 98-106.
- Kawabata, J., Mizuhata, K., Sato, E., Nishioka, T., Aoyama, Y., Kasai, T. (2003): 6-Hydroxyflavonoids as α -glucosidase inhibitors from marjoram (*Origanum majorana*) leaves. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(2): 445-447.
- Ke, Z., Zhang, X., Cao, Z., Ding, Y., Li, N., Cao, L., Wang, T., Zhang, C., Ding, G., Wang, Z., Xu, X. (2016): Drug discovery of neurodegenerative disease through network pharmacology approach in herbs. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78: 272-279.
- Kelsey, N.A., Wilkins, H.M., Linseman, D.A. (2010): Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*, 15(11): 7792-7814.
- Khalid, A., Abbasi, U.A., Amber, S., Mirza, F.J., Asif, M., Javed, A., Zahid, S. (2020): Methylphenidate and *Rosmarinus officinalis* improves cognition and regulates inflammation and synaptic gene expression in AlCl₃-induced neurotoxicity mouse model. *Molecular Biology Reports*, 47(10): 7861-7870.
- Khamse, S., Sadr, S.S., Roghani, M., Hasanzadeh, G., Mohammadian, M. (2015): Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharmaceutical Biology*, 53(12): 1818-1825.
- Khan, A., Ikram, M., Hahm, J.R., Kim, M.O. (2020): Antioxidant and anti-inflammatory effects of citrus flavonoid hesperetin: special focus on neurological disorders. *Antioxidants*, 2020, 9(7): 1-15.
- Kianbakht, S., Dabaghian, F.H. (2013): Improved glycemic control and lipid profile in hyperlipidemic type 2 diabetic patients consuming *Salvia officinalis* L. leaf extract: a randomized placebo. Controlled clinical trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 21(5): 441-446.
- Kianbakht, S., Nabati, F., Abasi, B. (2016): *Salvia officinalis* (sage) leaf extract as add-on to statin therapy in hypercholesterolemic type 2 diabetic patients: a randomized clinical trial. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 5(3): 141-148.
- Kianersi, F., Amin Azarm, D., Pour-Aboughadareh, A., Poczai, P. (2022): Change in secondary metabolites and expression pattern of key rosmarinic acid related genes in Iranian lemon balm (*Melissa officinalis* L.) ecotypes using methyl jasmonate treatments. *Molecules*, 27(5): 1715.
- Kim, H.A., Lee, J. (2021): Hispidulin modulates epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells. *Oncology Letters*, 21(2): 1-9.

- Kim, J.S., Yu, I.H., Joo, J.H., Nam, G.H., Jung, K.H., Chung, Y.S., Lee, H.Y. (2016): Biological effects of *Vinca minor* extract; tyrosinase inhibition, stimulation of ROS generation and increasement of cell migration activity in keratinocytes. *Journal of the Korean Applied Science and Technology*, 33(4): 788-794.
- Kim, O.K., Murakami, A., Nakamura, Y., Ohigashi, H. (1998): Screening of edible Japanese plants for nitric oxide generation inhibitory activities in RAW 264.7 cells. *Cancer Letters*, 125(1-2): 199-207.
- Kindl, M., Blažeković, B., Bucar, F., Vladimir-Knežević, S. (2015): Antioxidant and anticholinesterase potential of six *Thymus* species. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015: 403950.
- Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T. (2007): Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145: 155-164.
- Kivilompolo, M., Hyötyläinen, T. (2009): On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction-liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs. *Journal of Chromatography A*, 1216: 892-896.
- Kizil, S., Haşimi, N., Tolun, V., Kilinc, E., Karataş, H. (2010): Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3): 99-103.
- Klockgether, J., Munder, A., Neugebauer, J., Davenport, C.F., Stanke, F., Larbig, K.D., Heeb, S., Schöck, U., Pohl, T.M., Wiehlmann, L., Tümmler, B. (2010): Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of Bacteriology*, 192(4): 1113-1121.
- Knörle, R. (2012): Extracts of *Sideritis scardica* as triple monoamine reuptake inhibitors. *Journal of Neural Transmission*, 119(12): 1477-1482.
- Kolac, U.K., Ustuner, M.C., Tekin, N., Ustuner, D., Colak, E., Entok, E. (2017): The anti-inflammatory and antioxidant effects of *Salvia officinalis* on lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Journal of Medicinal Food*, 20(12): 1193-1200.
- Kolarević, S., Aborgiba, M., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Simonović, P., Simić, V., Milošković, A., Reischer, G., Farnleitner, A., Gačić, Z., Milačić, R. (2016a): Evaluation of genotoxic pressure along the Sava River. *PloS one*, 11(9): e0162450.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Avdović, M., Oalđe, M., Kostić, J., Sunjog, K., Nikolić, B., Knežević-Vukčević, J., Vuković-Gačić, B. (2016b): Optimisation of the microdilution method for detection of minimum inhibitory concentration values in selected bacteria. *Botanica Serbica* 40: 29-36.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Sunjog, K., Martinović, R., Đorđević, J., Novaković, I., Sladić, D., Vuković-Gačić, B. (2018): Evaluation of genotoxic potential of avarol, avarone, and its methoxy and methylamino derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2): 130-139.
- Kolarević, S., Milovanović, D., Kračun-Kolarević, M., Kostić, J., Sunjog, K., Martinović, R., Đorđević, J., Novaković, I., Sladić, D., Vuković-Gačić, B. (2019): Evaluation of genotoxic potential of avarol, avarone, and its methoxy and methylamino derivatives in prokaryotic and eukaryotic test models. *Drug and Chemical Toxicology*, 42(2): 130-139.
- Kolumbayeva, S.Z., Lovinskaya, A.V., Bekmagambetova, N.T., Abilev, S.K. (2020): Antimutagenic activity of medicinal plants *Salvia officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. (family Lamiaceae). *International Journal of Biology and Chemistry*, 12(2): 40-48.
- Komes, A., Belščak-Cvitaović, D., Horzić, G., Rusak, S., Likić, M., Berendika, M. (2011): Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochemical Analysis*, 22: 177-180.

- Kontogianni, V.G., Tomić, G., Nikolić, I., Nerantzaki, A.A., Sayyad, N., Stošić-Grujičić, S., Stojanović, I., Gerothanassis, I.P., Tzakos, A.G. (2013): Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136: 120-129.
- Koshovyi, O., Raal, A., Kireyev, I., Tryshchuk, N., Ilina, T., Romanenko, Y., Kovalenko, S.M., Bunyatyan, N. (2021): Phytochemical and psychotropic research of motherwort (*Leonurus cardiaca* L.) modified dry extracts. *Plants*, 10(2): 230.
- Kovačević, N.N., Lakušić, B.S., Ristić, M.S. (2001) Composition of the essential oils of seven *Teucrium* species from Serbia and Montenegro. *Journal of Essential Oil Research*, 13(3): 163-165.
- Kremer, D., Joze Kosir, I., Kosalec, I., Zovko Koncic, M., Potocnik, T., Cerenak, A., Bezic, N., Srecec, S., Dunkic, V. (2013): Investigation of chemical compounds, antioxidant and antimicrobial properties of *Teucrium arduini* L. (Lamiaceae). *Current Drug Targets*, 14(9): 1006-1014.
- Kremer, J., Alarcon, G., Lightfoot, R. (1994): Methotrexate for rheumatoid arthritis: suggested guidelines for monitoring liver toxicity. *Arthritis & Rheumatology*, 37(3): 316-328.
- Krishnaiah, D., Rosalam, S., Rajesh, N. (2011): A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 217-233.
- Kuby, J. (1994): Cytokines. In *Immunology*, Edited by J. Kuby. New York: W.H. Freeman and Company, pp. 297-322.
- Kuchta, K., Ortwein, J., Rauwald, H.W. (2012): *Leonurus japonicus*, *Leonurus cardiaca*, *Leonotis leonurus*: a novel HPLC study on the occurrence and content of the pharmacologically active guanidino derivative leonurine. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 67(12): 973-979.
- Kuciel-Lewandowska, J., Kasperczak, M., Bogut, B., Heider, R., Laber, W.T., Laber, W., Paprocka-Borowicz, M. (2020): The impact of health resort treatment on the nonenzymatic endogenous antioxidant system. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020: 8423105.
- Kugler, M., Loeffler, W., Rapp, C., Kern, A., Jung, G. (1990): Rhizocticin A, an antifungal phosphono-oligopeptide of *Bacillus subtilis* ATCC 6633: biological properties. *Archives of Microbiology*, 153(3): 276-281.
- Kuhlmann, A., Röhl, C. (2006): Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro*. Cultures of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their anti-inflammatory effect on lipopolysaccharide-activated microglia. *Pharmaceutical Biology*, 44(6): 401-410.
- Kulišić, T., Dragović-Uzelac, V., Miloš, M. (2006): Antioxidant activity of aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild thyme. *Food Technology and Biotechnology*, 44(4): 485-492.
- Kültür, Ş. (2007): Medicinal plants used in Kirklareli Province (Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 341-364.
- Kumar, N., Goel, N. (2019): Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnology Reports*, 24: 1-10.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2002): Biological activity of *Glechoma hederacea*. *Fitoterapia*, 73(7-8): 721-723.
- Kumarasamy, Y., Cox, P.J., Jaspars, M., Nahar, L., Sarker, S.D. (2003): Isolation, structure elucidation and biological activity of hederacine A and B, two unique alkaloids from *Glechoma hederacea*. *Tetrahedron*, 59(34): 6403-6407.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Kong-Thu-lin, P., Jaspars, M., Sarker, S.D. (2006): Hederacine A and hederacine B from *Glechoma hederacea* inhibit the growth of colorectal cancer cells *in vitro*. *Natural Product Communications*, 1(1): 33-35.

- Kundaković, T., Stanojković, T., Kolundžija, B., Marković, S., Šukilović, B., Milenković, M., Lakušić, B. (2014): Cytotoxicity and antimicrobial activity of the essential oil from *Satureja montana* subsp. *pisidica* (Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 9(4): 1934578X1400900437.
- Kurhekar, J.V. (2021): Ancient and modern practices in phytomedicine. In *Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*, Academic Press, Massachusetts, USA, pp. 55-75.
- Kury, L.T.A., Taha, Z., Talib, W.H. (2021): Immunomodulatory and anticancer activities of *Hyacinthus orientalis* L.: An *in vitro* and *in vivo* study. *Plants*, 10(4): 617.
- Kwon, Y.I.I., Vатtem, D.A., Shetty, K. (2006): Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1): 107-117.
- Lagouri, V., Boskou, D. (1996): Nutrient antioxidants in oregano. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 47(6): 493-497.
- Lakušić, B., Stevanović, B., Jančić, R., Lakušić, D. (2010): Habitat-related adaptations in morphology and anatomy of *Teucrium* (Lamiaceae) species from the Balkan peninsula (Serbia and Montenegro). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 205(10): 633-646.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C. (1990): Hydroxycinnamic derivatives and flavonoids in the genus *Prunella* (Lamiaceae): antioxidant activities and chemotaxonomic value. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, 24(3): 152-157.
- Lamaison, J.L., Petitjean-Freytet, C., Carnat, A. (1991): Medicinal Lamiaceae with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 66(7): 185-188.
- Lan, L., Cheng, A., Dunman, P.M., Missiakas, D., He, C. (2010): Golden pigment production and virulence gene expression are affected by metabolisms in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 192(12): 3068-3077.
- Lee, C.J., Chen, L.G., Chang, T.L., Ke, W.M., Lo, Y.F., Wang, C.C. (2011): The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chemistry*, 124(3): 833-841.
- Lee, H.J., Cho, H.S., Park, E., Kim, S., Lee, S.Y., Kim, C.S., Kim, D.K., Kim, S.J., Chun, H.S. (2008): Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*, 250(2-3): 109-115.
- Lee, J., Noh, S., Lim, S., Kim, B. (2021): Plant extracts for type 2 diabetes: From traditional medicine to modern drug discovery. *Antioxidants*, 10(1): 81.
- Lekbach, Y., Li, Z., Xu, D., El Abed, S., Dong, Y., Liu, D., Gu, T., Koraichi, S.I., Yang, K.E., Wang, F., (2019): *Salvia officinalis* extract mitigates the microbiologically influenced corrosion of 304L stainless steel by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Bioelectrochemistry*, 128: 193-203.
- Letessier, M.P., Svoboda, K.P., Walters, D.R. (2001): Antifungal activity of the essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Journal of Phytopathology*, 149: 673-678.
- Lewicka, A., Szymański, Ł., Rusiecka, K., Kucza, A., Jakubczyk, A., Zdanowski, R., Lewicki, S. (2019): Supplementation of plants with immunomodulatory properties during pregnancy and lactation – Maternal and offspring health effects. *Nutrients*, 11(8): 1-21.
- Lewis Oscar, F., Nithya, C., Vismaya, S., Arunkumar, M., Pugazhendhi, A., Nguyen-Tri, P., Alharbi, S.A., Alharbi, N.S., Thajuddin, N. (2021): *In vitro* analysis of green fabricated silver nanoparticles (AgNPs) against *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm formation, their application on urinary catheter. *Progress in Organic Coatings*, 151: 106058.
- Li, J., Guo, W.J., Yang, Q.Y. (2002): Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World Journal of Gastroenterology*, 8(3): 493-495.

- Liang, C.C., Park, A.Y., Guan, J.L. (2007): *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. *Nature Protocols* 2: 329-333.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., Abete, P. (2018): Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*, 13: 757.
- Lim, W., Ham, J., Bazer, F.W., Song, G. (2019): Carvacrol induces mitochondria-mediated apoptosis via disruption of calcium homeostasis in human choriocarcinoma cells. *Journal of Cellular Physiology*, 234(2): 1803-1815.
- Lima, C.F., Azevedo, M.F., Araujo, R., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2006): Metformin-like effect of *Salvia officinalis* (common sage): is it useful in diabetes prevention? *British Journal of Nutrition*, 96(2): 326-333.
- Lin, J.T., Chen, Y.C., Lee, Y.C., Hou, C.W.R., Chen, F.L., Yang, D.J. (2012): Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves. *LWT – Food Science and Technology*, 49: 1-7.
- Lin, L.Z., Harnly, J.M., Upton, R. (2009): Comparison of the phenolic component profiles of skullcap (*Scutellaria lateriflora*) and germander (*Teucrium canadense* and *T. chamaedrys*), a potentially hepatotoxic adulterant. *Phytochemical Analysis*, 20(4): 298-306.
- Liu, K., Zhao, F., Yan, J., Xia, Z., Jiang, D., Ma, P. (2020): Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. *Life Sciences*, 259: 1-9.
- Liu, Q., Liu, F., Zhang, L., Niu, Y., Liu, Z., Liu, X. (2017): Comparison of chicoric acid, and its metabolites caffeic acid and caftaric acid: *In vitro* protection of biological macromolecules and inflammatory responses in BV2 microglial cells. *Food Science and Human Wellness*, 6(4): 155-166.
- Liu, R., Desta, T., He, H., Graves, D.T. (2004): Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology*, 145(6): 2997-3003.
- Lodhi, S., Vadnere, G.P., Sharma, V.K., Usman, M. (2017): *Marrubium vulgare* L.: A review on phytochemical and pharmacological aspects. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(4): 429-452.
- Lopez, D., Vlamakis, H., Kolter, R. (2008): Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1): 152-163.
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M.P., Carretero, M.E., Jäger, A.K., Calvo, M.I. (2009): Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. *Neurochemical Research*, 34(11): 1955-1961.
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M.P., Carretero, M.E., Jäger, A.K., Calvo, M.I. (2010): Neuroprotective and neurochemical properties of mint extracts. *Phytotherapy Research*, 24(6): 869-874.
- López-Cobo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Švarc-Gajić, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2015): Determination of phenolic compounds and antioxidant activity of a Mediterranean plant: the case of *Satureja montana* subsp. *kitaibelii*. *Journal of Functional Foods*, 18: 1167-1178.
- López-Romero, D., Izquierdo-Vega, J.A., Morales-González, J.A., Madrigal-Bujaidar, E., Chamorro-Cevallos, G., Sánchez-Gutiérrez, M., Betanzos-Cabrera, G., Alvarez-Gonzalez, I., Morales-González, Á., Madrigal-Santillán, E. (2018): Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: plants, vegetables, and natural resin. *Nutrients*, 10(12): 1954.
- Lu, Y., Foo, L.Y., Wong, H. (1999): Sagecoumarin, a novel caffeic acid trimer from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 52(6): 1149-1152.

- Lu, Z.H., Yang, C.L., Yang, G.G., Pan, W.X., Tian, L.G., Zheng, J.X., Lv, S., Zhang, S.Y., Zheng, P.Y., Zhang, S.X. (2021): Efficacy of the combination of modern medicine and traditional Chinese medicine in pulmonary fibrosis arising as a sequelae in convalescent COVID-19 patients: a randomized multicenter trial. *Infectious Diseases of Poverty*, 10(1): 1-13.
- Luca, M., Di Mauro, M., Di Mauro, M., Luca, A. (2019): Gut microbiota in Alzheimer's disease, depression, and type 2 diabetes mellitus: The role of oxidative stress. *Oxidative medicine and Cellular Longevity*, 2019: 4730539.
- Luca, T., Napoli, E., Privitera, G., Musso, N., Ruberto, G., Castorina, S. (2020): Antiproliferative effect and cell cycle alterations induced by *Salvia officinalis* essential oil and its three main components in human colon cancer cell lines. *Chemistry & Biodiversity*, 17(8): e2000309.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., Georgiev, M.I. (2017): Terpenoids. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Ma, J.K., Chikwamba, R., Sparrow, P., Fischer, R., Mahoney, R., Twyman, R.M. (2005): Plant-derived pharmaceuticals—the road forward. *Trends in Plant Science*, 10(12): 580-585.
- Mabrouki, H., Duarte, C.M.M., Akretche, D.E. (2018): Estimation of total phenolic contents and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of various solvent extracts of *Melissa officinalis* L. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 43(7): 3349-3357.
- Macelli, A., Vitanza, L., Imbriano, A., Frascchetti, C., Filippi, A., Goldoni, P., Maurizi, L., Ammendolia, M.G., Crestoni, M.E., Fornarini, S., Menghini, L. (2020): *Satureja montana* L. essential oils: chemical profiles/phytochemical screening, antimicrobial activity and O/W NanoEmulsion formulations. *Pharmaceutics*, 12(1): 7.
- Machado, F.D.F., de Oliveira Formiga, R., de Moraes Lima, G.R., de Jesus, N.Z.T., Júnior, E.B.A., Marinho, A.F., Tavares, J.F., Santos, F.A., Viana, A.F.S.C., Araújo, A.A., de Araújo Júnior, R.F., (2021): *Hyptis suaveolens* (L.) Poit protects colon from TNBS-induced inflammation via immunomodulatory, antioxidant and anti-proliferative mechanisms. *Journal of Ethnopharmacology*, 265: 113153.
- Madhusudhanan, J., Suresh, G., Devanathan, V. (2020): Neurodegeneration in type 2 diabetes: Alzheimer's as a case study. *Brain and Behavior*, 10(5): e01577.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D., Clark, D.P. (2012): Brock biology of microorganisms 13th edition. Benjamin Cummings, San Francisco, California, USA.
- Maggi, F., Barboni, L., Caprioli, G., Papa, F., Ricciutelli, M., Sagratini, G., Vittori, S. (2011): HPLC quantification of coumarin in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). *Fitoterapia*, 82(8): 1215-1221.
- Mahdavi, F., Saharkhiz, M.J. (2015): Phytotoxic activity of essential oil and water extract of peppermint (*Mentha × piperita* L. CV. Mitcham). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2: 146-153.
- Mahdi, S., Azzi, R., Lahfa, F.B. (2020): Evaluation of *in vitro* α -amylase and α -glucosidase inhibitory potential and hemolytic effect of phenolic enriched fractions of the aerial part of *Salvia officinalis* L. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 14(4): 689-694.
- Mamadaliyeva, N.Z., Akramov, D.K., Wessjohann, L.A., Hussain, H., Long, C., Tojibaev, K.S., Alshammari, E., Ashour, M.L., Wink, M. (2021): The genus *Lagochilus* (Lamiaceae): A review of its diversity, ethnobotany, phytochemistry, and pharmacology. *Plants*, 10(1): 132.
- Mamadaliyeva, N.Z., Youssef, F.S., Ashour, M.L., Sasmakov, S.A., Tiezzi, A., Azimova, S.S. (2019): Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of three Uzbek Lamiaceae species. *Natural Product Research*, 33(16): 2394-2397.
- Mamfe, J.A., Ojo, B.A., Jombo, G.T.A. (2021): If all microorganisms vanish from the surface of planet Earth, what becomes of man?. *Western Journal of Medical and Biomedical Sciences*, 2(1): XIX-XXII.

- Mandal, S.M., Chakraborty, D., Dey, S. (2010): Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4): 359-368.
- Mansourabadi, A.H., Sadeghi, H.M., Razavi, N., Rezvani, E. (2016): Anti-inflammatory and analgesic properties of salvigenin, *Salvia officinalis* flavonoid extracted. *Advanced Herbal Medicine*, 2(1): 31-41.
- Maraghi, E.T., Kashef, N., Gohari, A.R., Fekrirad, Z. (2021): Antimicrobial activity of extracts from *Satureja khuzistanica*, *Peganum harmala*, *Satureja sahendica* on planktonic growth and biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences*, 28(4): 556-568.
- Marin, M., Novaković, M., Tešević, V., Vučković, I., Milojević, N., Vuković-Gačić, B., Marin, P.D. (2012): Antioxidative, antibacterial and antifungal activity of the essential oil of wild-growing *Satureja montana* L. from Dalmatia, Croatia. *Flavour and Fragrance Journal*, 27(3): 216-223.
- Marin, P.D. (2003): Biohemijska i molekularna sistematika biljaka, NNK International, Beograd.
- Marin, P.D., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C., Harborne, J.B. (2001): Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. *Phytochemistry*, 58(6): 943-947.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Henriques, M., Silva, S., Ferreira, I.C.F.R. (2014): Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 158: 73-80.
- Masuda, A., Takahashi, C., Inai, M., Miura, Y., Masuda, T. (2013): Chemical evidence for potent xanthine oxidase inhibitory activity of *Glechoma hederacea* var. *grandis* leaves (Kakidoushi-Cha). *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59(6): 570-575.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. (2005): Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69: 197-201.
- Matkowski, A. (2008): Antioxidant activity of extracts and different solvent fractions of *Glechoma hederacea* L. and *Orthosiphon stamineus* (Benth.) Kudo. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 17(6): 615-624.
- Matkowski, A., Tasarz, P., Szypuła, E. (2008): Antioxidant activity of herb extracts from five medicinal plants from Lamiaceae, subfamily Lamioideae. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11: 321-330.
- Matos, M.J., Santana, L., Uriarte, E., Abreu, O.A., Molina, E., Yordi, E.G. (2015): Coumarins—an important class of phytochemicals. In *Phytochemicals - isolation, characterisation and role in human health*, Ed. Venketeshwer Rao, Leticia Rao, IntechOpen, pp. 113-140.
- Mesquita, L.S.S.D., Luz, T.R.S.A., Mesquita, J.W.C.D., Coutinho, D.F., Amaral, F.M.M.D., Ribeiro, M.N.D.S., Malik, S. (2019): Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. *Food Reviews International*, 35(2): 105-131.
- Meyers, M. (2005): *Oregano and majoram: An Herb Society of America Guide to the genus Origanum*. The Herb Society of America, Kirtland, Ohio.
- Meylheuc, T., Giovannacci, I., Briandet, R., Bellon-Fontaine, M.N. (2002): Comparison of the cell surface properties and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 65(5): 786-793.
- Michailidou, A.M., Tomou, E.M., Skaltsa, H. (2021): Phytochemical study of *Stachys candida* Bory & Chaubard (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 94: 104208.
- Micota, B., Sadowska, B., Podsędek, A., Paszkiewicz, M., Sosnowska, D., Różalska, B. (2016): Is it true that plant-derived polyphenols are always beneficial for the human? *In vitro* study on *Leonurus*

- cardiaca* extract properties in the context of the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Medical Microbiology*, 65(10): 1171-1181.
- Mićović, T., Topalović, D., Živković, L., Spremo-Potparević, B., Jakovljević, V., Matić, S., Popović, S., Baskić, D., Stešević, D., Samardžić, S., Stojanović, D. (2021): Antioxidant, antigenotoxic and cytotoxic activity of essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (Lamiaceae). *Plants*, 10(4): 711.
- Mihailović, V., Kreft, S., Tavčar Benković, E., Ivanović, N., Stanković, M.S. (2016): Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Industrial Crops and Products*, 89: 141-151.
- Mihajilov-Krstev, T., Radnović, D., Kitić, D., Jovanović, V., Mitić, V., Stojanović-Radić, Z., Zlatković, B. (2014): Chemical composition, antimicrobial, antioxidative and anticholinesterase activity of *Satureja montana* L. ssp. *montana* essential oil. *Open Life Sciences*, 9(7): 668-677.
- Milevskaya, V.V., Temerdashev, Z.A., Butyl'skaya, T.S., Kiseleva, N.V. (2017): Determination of phenolic compounds in medicinal plants from the Lamiaceae family. *Journal of Analytical Chemistry*, 72(3): 342-348.
- Milillo, S.R., Friedly, E.C., Saldivar, J.C., Muthaiyan, A., O'bryan, C., Crandall, P.G., Johnson, M.G., Ricke, S.C. (2012): A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52(8): 712-725.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993): A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84: 407-412.
- Milošević-Đorđević, O., Stošić, I., Stanković, M., Grujičić, D. (2013): Comparative study of genotoxicity and antimutagenicity of methanolic extracts from *Teucrium chamaedrys* and *Teucrium montanum* in human lymphocytes using micronucleus assay. *Cytotechnology*, 65(5): 863-869.
- Milutinović, M.G., Maksimović, V.M., Cvetković, D.M., Nikodijević, D.D., Stanković, M.S., Pešić, M., Marković, S.D. (2019): Potential of *Teucrium chamaedrys* L. to modulate apoptosis and biotransformation in colorectal carcinoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 240: 111951.
- Mir, R.H., Sawhney, G., Verma, R., Ahmad, B., Kumar, P., Ranjana, S., Bhagat, A., Madishetti, S., Ahmed, Z., Jachak, S.M., Choi, S. (2021): *Origanum vulgare* L.: *In vitro* assessment of cytotoxicity, molecular docking studies, antioxidant and anti-inflammatory activity in LPS stimulated RAW 264.7 cells. *Medicinal Chemistry*, 17(9): 983-993.
- Mira, L., Fernandez, M. T., Santos, M., Rocha, R., Florêncio, M.H., Jennings, K.R. (2002): Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radical Research*, 36(11): 1199-1208.
- Miraj, S., Kiani, S. (2016): Study of pharmacological effect of *Ocimum basilicum*: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8(9): 276-280.
- Mirazi, N., Rezaei, M., Mirhoseini, M. (2016): Hypoglycemic effect of *Satureja montanum* L. hydroethanolic extract on diabetic rats. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 5(1): 17-22.
- Miron, T.L., Plaza, M., Bahrim, G., Ibáñez, E., Herrero, M. (2011): Chemical composition of bioactive pressurized extracts of Romanian aromatic plants. *Journal of Chromatography A*, 1218: 4918-4927.
- Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Sholeh, M., Karampoor, S., Abdi, M., Dogan, E., Moghadam, M.S., Kazemi, S., Jalalifar, S., Dalir, A., Yousefimashouf, R. (2020): The importance of intracellular bacterial biofilm in infectious diseases. *Microbial Pathogenesis*: 104393.
- Mirzaei, S., Zarrabi, A., Hashemi, F., Zabolian, A., Saleki, H., Ranjbar, A., Saleh, S.H.S., Bagherian, M., Omid Sharifzadeh, S., Hushmandi, K., Liskova, A. (2021): Regulation of Nuclear Factor-KappaB (NF-

- κB) signaling pathway by non-coding RNAs in cancer: Inhibiting or promoting carcinogenesis? *Cancer Letters*, 509: 63-80.
- Mishchenko, T.A., Balalaeva, I.V., Vedunova, M.V., Krysko, D.V. (2021): Ferroptosis and photodynamic therapy synergism: enhancing anticancer treatment. *Trends in Cancer*, 7(6): 484-487.
- Mitreski, I., Stanoeva, J.P., Stefova, M., Stefkov, G., Kulevanova, S. (2014): Polyphenols in representative *Teucrium* species in the flora of R. Macedonia: LC/DAD/ESI-MS n profile and content. *Natural Product Communications*, 9(2): 175-180.
- Mittal, K., Mani, R.J., Katare, D.P. (2016): Type 3 diabetes: Cross talk between differentially regulated proteins of type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *Scientific Reports*, 6: 1-8.
- Mnonopi, N., Levendal, R.A., Mzilikazi, N., Frost, C.L. (2012): Marrubiin, a constituent of *Leonotis leonurus*, alleviates diabetic symptoms. *Phytomedicine*, 19(6): 488-493.
- Mocan, A., Babotă, M., Pop, A., Fizeşan, I., Diuzheva, A., Locatelli, M., Carradori, S., Campestre, C., Menghini, L., Sisea, C.R., Soković, M., Zengin, G., Păltinean, R., Bădărău, S., Vodnar, D., Crişan, G. (2020): Chemical constituents and biologic activities of sage species: A comparison between *Salvia officinalis* L., *S. glutinosa* L. and *S. transsylvanica* (Schur ex Griseb. & Schenk) Schur. *Antioxidants*, 9(6): 480.
- Moghrovyan, A., Sahakyan, N., Babayan, A., Chichoyan, N., Petrosyan, M., Trchounian, A. (2019): Essential oil and ethanol extract of oregano (*Origanum vulgare* L.) from Armenian flora as a natural source of terpenes, flavonoids and other phytochemicals with antiradical, antioxidant, metal chelating, tyrosinase inhibitory and antibacterial activity. *Current Pharmaceutical Design*, 25(16): 1809-1816.
- Mohebbati, R., Khazdair, M.R., Hedayati, M. (2017): Neuroprotective effects of medicinal plants and their constituents on different induced neurotoxicity methods: A. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 6(1): 34-50.
- Mohsenipour, Z., Hassanshahian, M. (2015): The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 5(4): 309-318.
- Molan, A.L., Mahdy, A.S. (2016): Total phenolics, antioxidant activity and anti-diabetic capacities of selected Iraqi medicinal plants. *American Journal of Life Science Researches*, 4(2): 47-59.
- Moon, H.K., Hong, S.P., Smets, E., Huysmans, S. (2009): Micromorphology and character evolution of nutlets in tribe Menthae (Nepetoideae, Lamiaceae). *Systematic Botany*, 34(4): 760-776.
- Mosafa, E., Yahyaabadi, S., Doudi, M. (2014): *In-vitro* antibacterial properties of sage (*Salvia officinalis*) ethanol extract against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 16(10): 42-46.
- Mosaffa, F., Behravan, J., Karimi, G., Iranshahi, M. (2006): Antigenotoxic effects of *Satureja hortensis* L. on rat lymphocytes exposed to oxidative stress. *Archives of Pharmacal Research*, 29(2): 159-164.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2): 55-63.
- Moura, A., Disson, O., Lavina, M., Thouvenot, P., Huang, L., Leclercq, A., Fredriksson-Ahomaa, M., Eshwar, A.K., Stephan, R., Lecuit, M. (2019): Atypical hemolytic *Listeria innocua* isolates are virulent, albeit less than *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 87(4): e00758-18.
- Mssillou, I., Agour, A., Hamamouch, N., Lyoussi, B., Derwich, E. (2021): Chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Marrubium vulgare* L. *The Scientific World Journal*, 2021: 7011493.

- Mueller, E.A., Egan, A.J., Breukink, E., Vollmer, W., Levin, P.A. (2019): Plasticity of *Escherichia coli* cell wall metabolism promotes fitness and antibiotic resistance across environmental conditions. *Elife*, 8: e40754.
- Mukanganyama, S., Bezabih, M., Robert, M., Ngadjui, B.T., Kapche, G.F., Ngandeu, F., Abegaz, B. (2011): The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 26(4): 460-467.
- Mukherjee, P.K., Nema, N.K., Bhadra, S., Mukherjee, D., Braga, F.C., Matsabisa, M.G. (2014): Immunomodulatory leads from medicinal plants. *Indian Journal of Traditional knowledge*, 13(2): 235-256.
- Nabet, N., Gilbert-López, B., Madani, K., Herrero, M., Ibáñez, E., Mendiola, J.A. (2019): Optimization of microwave-assisted extraction recovery of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* and *Thymus fontanesii*. *Industrial Crops and Products*, 129: 395-404.
- Nadal Jimenez, P., Koch, G., Thompson, J.A., Xavier, K.B., Cool, R.H., Quax, W.J. (2012): The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(1): 46-65.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi Motamed, S., Ghorbani, A. (2005): Labiate family in folk medicine in Iran: from Ethobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2: 63-79.
- Naik, E., Dixit, V.M. (2011): Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *Journal of Experimental Medicine*, 208(3): 417-420.
- Namdeo, A.G. (2018): Cultivation of medicinal and aromatic plants. In *Natural Products and Drug Discovery*. Elsevier, pp. 525-553.
- Namjoyan, F., Jahangiri, A., Azemi, M.E., Arkian, E., Mousavi, H. (2015): Inhibitory effects of *Physalis alkekengi* L., *Alcea rosea* L., *Bunium persicum* B. Fedtsch. and *Marrubium vulgare* L. on nushroom tyrosinase. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 10(1): 1-6.
- Nassar, M., Zerizer, S., Kabouche, Z., Kabouche, A., Bechkri, S. (2015): Antioxidant and the immunomodulatory activities exhibited by three plants from Lamiaceae family. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(9): 331-334.
- Nastić, N., Švarc-Gajića, J., Delerue-Matos, C., Morais, S., Barroso, M.F., Soares, C., Moreira, M.M. (2018): Subcritical water extraction of antioxidants from mountain germander (*Teucrium montanum* L.). *The Journal of Supercritical Fluids*, 138: 200-206.
- Nazir, S., Wani, I.A. (2021): Functional characterization of basil (*Ocimum basilicum* L.) seed mucilage. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 25: 100261.
- Neilson, A.P., Goodrich, K.M., Ferruzzi, M.G. (2017): Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods. In *Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease* (pp. 301-319). Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Nikodijević, D., Milutinović, M., Cvetković, D., Stanković, M., Živanović, M.N., Marković, S. (2016): Effects of *Teucrium polium* L. and *Teucrium montanum* L.: Extracts on mechanisms of apoptosis in breast and colon cancer cells. *Kragujevac Journal of Science*, (38): 147-159.
- Nikolić, M., Glamočlija, J., Ferreira, I.C., Calhelha, R.C., Fernandes, Â., Marković, T., Marković, D., Giweli, A., Soković, M. (2014): Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 52: 183-190.
- Nikšić, H.A., Durić, K., Omeragić, E., Nikšić, H.E., Muratović, S., Bečić, F. (2018): Chemical characterization, antimicrobial and antioxidant properties of *Mentha spicata* L. (Lamiaceae) essential oil. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina*, 50(1): 43-48.

- Ntalli, N.G., Ferrari, F., Giannakou, I., Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010): Phytochemistry and nematocidal activity of the essential oils from 8 Greek Lamiaceae aromatic plants and 13 terpene components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13): 7856-7863.
- Nyegaard, S., Christensen, B., Rasmussen, J.T. (2016): An optimized method for accurate quantification of cell migration using human small intestine cells. *Metabolic Engineering Communications*, 3: 76-83.
- Oda, Y. (2016): Development and progress for three decades in *umu* test systems. *Genes and Environment*, 38(1): 1-14.
- Ognyanov, M., Remoroza, C.A., Schols, H.A., Petkova, N.T., Georgiev, Y.N. (2021): Structural study of a pectic polysaccharide fraction isolated from "mountain tea" (*Sideritis scardica* Griseb.). *Carbohydrate Polymers*, 260: 117798.
- Oniga, I., Pușcaș, C., Silaghi-Dumitrescu, R., Olah, N.K., Sevastre, B., Marica, R., Marcus, I., Sevastre-Berghian, A.C., Benedec, D., Pop, C.E., Hanganu, D. (2018): *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*: Chemical composition and biological studies. *Molecules*, 23(8): 1-14.
- Orhan, I.E., Belhattab, R., Şenol, F.S., Gülpinar, A.R., Hoşbaş, S., Kartal, M. (2010): Profiling of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of *Artemisia absinthium*, *A. herba-alba*, *A. fragrans*, *Marrubium vulgare*, *M. astranicum*, *Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* and essential oil analysis of two *Artemisia* species. *Industrial Crops and Products*, 32(3): 566-571.
- Oyaizu, M. (1986): Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44: 307-315.
- Oyama, K.I., Kimura, Y., Iuchi, S., Koga, N., Yoshida, K., Kondo, T. (2019): Conversion of flavonol glycoside to anthocyanin: an interpretation of the oxidation–reduction relationship of biosynthetic flavonoid-intermediates. *RSC advances*, 9(54): 31435-31439.
- Ożarowski, M., Mikołajczak, P.Ł., Bobkiewlcz-Kozłowska, T., Kujawski, R., Mrozikiewicz, P.M., (2009): Neuroactive compounds from medicinal plants of the Lamiaceae family showing potentially beneficial activity in treatment of Alzheimer's disease. *Herba Polonica*, 55(4): 148-163.
- Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Coşkun, M., Houghton, P.J. (2006): Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species. *Pharmaceutical Biology*, 44(2): 107-112.
- Özkan, A., Erdoğan, A. (2011): A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turkish Journal of Biology*, 35(6): 735-742.
- Pafili, K., Papanas, N., Ziegler, D. (2018): Neuropathy in diabetes: "one cannot begin it too soon". *Angiology*, 69(9): 752-754
- Pandey, K.B., Rizvi, S.I. (2009): Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5): 270-278.
- Pantosti, A., Sanchini, A., Monaco, M. (2007): Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3): 323-334.
- 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*, 40: 97-106.
- Parra, C., Muñoz, P., Bustos, L., Parra, F., Simirgiotis, M.J., Escobar, H. (2021): UHPLC-DAD characterization of *Origanum vulgare* L. from Atacama Desert Andean region and antioxidant, antibacterial and enzyme inhibition activities. *Molecules*, 26(7): 2100.
- Patil, S.R., Patil, R.S., Godghate, A.G. (2016): *Mentha piperita* Linn: Phytochemical, antibacterial and dipterian adulticidal approach. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(3): 352-355.

- Patrignani, F., Prasad, S., Novaković, M., Marin, P.D., Bukvički, D. (2021): Lamiaceae in the treatment of cardiovascular diseases. *Frontiers in Bioscience (Landmark edition)*, 26: 612-643.
- Pavlič, B., Teslić, N., Zengin, G., Đurović, S., Rakić, D., Cvetanović, A., Gunes, A.K., Zeković, Z. (2021): Antioxidant and enzyme-inhibitory activity of peppermint extracts and essential oils obtained by conventional and emerging extraction techniques. *Food Chemistry*, 338: 127724.
- Pedersen, J.A. (2000): Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family Lamiaceae determined by ESR spectroscopy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28: 229-253.
- Pereira, E., Pimenta, A.I., Calhelha, R.C., Antonio, A.I., Verde, S.C., Barros, L., Santos-Buelga, C. (2016): Effects of gamma irradiation on cytotoxicity and phenolic compounds of *Thymus vulgaris* and *Mentha × piperita* L. *LWT – Food Science and Technology*, 71: 370-377.
- Pereira, O.R., Catarino, M.D., Afonso, A.F., Silva, A., Cardoso, S.M. (2018): *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* decoctions: Antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules*, 23(12): 3169.
- Pérez-González, C., Pérez-Ramos, J., Méndez-Cuesta, C.A., Serrano-Vega, R., Martell-Mendoza, M., Pérez-Gutiérrez, S. (2019): Cytotoxic activity of essential oils of some species from Lamiaceae family. In *Cytotoxicity*. IntechOpen.
- Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Ruiz-Torres, V., Agulló-Chazarra, L., Herranz-López, M., Valdés, A., Cifuentes, A., Micol, V. (2019): Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract causes ROS-induced necrotic cell death and inhibits tumor growth *in vivo*. *Scientific Reports*, 9(1): 1-11.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., Migliaccio, A. (2020): ROS in cancer therapy: The bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2): 192-203.
- Perrin, M., Bemer, M., Delamare, C. (2003): Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11): 5308-5309.
- Peter, S.R., Peru, K.M., Fahlman, B., McMartin, D.W., Headley, J.V. (2015): The application of HPLC ESI MS in the investigation of the flavonoids and flavonoid glycosides of a Caribbean Lamiaceae plant with potential for bioaccumulation. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50(11): 819-826.
- Petersmann, A., Müller-Wieland, D., Müller, U.A., Landgraf, R., Nauck, M., Freckmann, G., Heinemann, L., Schleicher, E. (2019): Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 127(S 01): S1-S7.
- Petran, R.L., Swanson, K.M. (1993): Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 56(7): 616-618.
- Petreska, J., Stefova, M., Ferreres, F., Moreno, D.A., Tomás-Barberán, F.A., Stefkov, G., Kulevanova, S., Gil-Izquierdo, A. (2011): Dietary burden of phenolics per serving of “Mountain Tea” (*Sideritis*) from Macedonia and correlation to antioxidant activity. *Natural Product Communications*, 6(9): 1934578X1100600924.
- Petretto, D.R., Carrogu, G.P., Gaviano, L., Pili, L., Pili, R. (2021): Dementia and major neurocognitive disorders: some lessons learned one century after the first Alois Alzheimer’s clinical notes. *Geriatrics*, 6: 1-5.
- Petrova, A., Vladimirov, V. (2010): Balkan endemics in the Bulgarian flora. *Phytologia Balcanica*, 16(2): 293-311.
- Petrovska, B.B. (2012): Historical review of medicinal plants’ usage. *Pharmacognosy reviews*, 6(11): 1-5.

- Petrussa, E., Braidot, E., Zancani, M., Peresson, C., Bertolini, A., Patui, S., Vianello, A. (2013): Plant Flavonoids – Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 14950-14973.
- Pezzani, R., Vitalini, S., Iriti, M. (2017): Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: An update. *Phytochemistry Reviews*, 16(6): 1253-1268.
- Piccaglia, R., Marotti, M., Giovanelli, E., Deans, S.G., Eaglesham, E. (1993): Antibacterial and antioxidant properties of Mediterranean aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 2(1): 47-50.
- Pićurić-Jovanović, K., Milovanović, M., Vrbaski, Z. (1995): *Thymus vulgaris* as a source of natural lipid antioxidants. *Review of Research Work at the Faculty of Agriculture (Yugoslavia)*, 40(2): 141-146.
- Pietta, P.G. (2000): Flavonoids as Antioxidants. *Journal of Natural Products*, 63: 1035-1042.
- Pineda-Ramírez, N., Calzada, F., Alquisiras-Burgos, I., Medina-Campos, O.N., Pedraza-Chaverri, J., Ortiz-Plata, A., Pinzón Estrada, E., Torres, I., Aguilera, P. (2020): Antioxidant properties and protective effects of some species of the Annonaceae, Lamiaceae, and Geraniaceae Families against neuronal damage induced by excitotoxicity and cerebral ischemia. *Antioxidants*, 9(3): 253.
- Pinzon, L., Mylene, U. (2016): Bioactivity studies on the extracts and the phlebotonic diosmetin isolated from *Premna odorata* Blanco (Lamiaceae). *Pharmacology and Life Sciences*, 5: 1-4.
- Piras, A., Gonçalves, M.J., Alves, J., Falconieri, D., Porcedda, S., Maxia, A., Salgueiro, L. (2018): *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. *Industrial Crops and Products*, 113: 89-97.
- Pišlar, A., Božić, B., Zidar, N., Kos, J. (2017): Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology*, 114: 88-100.
- Pitz, H.D.S., Pereira, A., Blasius, M.B., Voytena, A.P.L., Affonso, R.C., Fanan, S., Trevisan, A.C., Ribeiro-do-Valle, R.M., Maraschin, M. (2016): *In vitro* evaluation of the antioxidant activity and wound healing properties of Jaboticaba (*Plinia peruviana*) fruit peel hydroalcoholic extract. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 3403586.
- Plun-Favreau, H., Lewis, P.A., Hardy, J., Martins, L.M., Wood, N.W. (2010): Cancer and neurodegeneration: Between the devil and the deep blue sea. *PLoS Genetics*, 6(12): e1001257.
- Popović, V., Savić, M., Katić, B. (2010): Origanum *Origanum vulgare* L. – svojstva, proizvodnja i promet. *Industrija*, 38(3): 1-17.
- Potterat, O. (1997): Antioxidants and free radical scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry*, 1(4): 415-440.
- Pourhanifeh, M.H., Shafabakhsh, R., Reiter, R.J., Asemi, Z. (2019): The effect of resveratrol on neurodegenerative disorders: possible protective actions against autophagy, apoptosis, inflammation and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Design*, 25(19): 2178-2191.
- Pourmotabed, A., Farshchi, A., Ghiasi, G., Malek, K.P. (2010): Analgesic and anti-inflammatory activity of *Teucrium chamaedrys* leaves aqueous extract in male rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 13(3): 119-125.
- Prabhu, V.V., Sathyamurthy, D., Ramasamy, A., Das, S., Anuradha, M., Pachiappan, S. (2016): Evaluation of protective effects of diosmin (a citrus flavonoid) in chemical-induced urolithiasis in experimental rats. *Pharmaceutical Biology*, 54(9): 1513-1521.
- Pratiwi, S.U., Lagendijk, E.L., Hertiani, T., Weert, S.D., Cornellijs, A.M., Van Den Hondel, J.J. (2015): Antimicrobial effects of Indonesian medicinal plants extracts on planktonic and biofilm growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Horticulture*, 7: 183-191.

- Prieto, M.A., Rodríguez-Amado, I., Vázquez, J.A., Murado, M.A. (2012): β -Carotene assay revisited. Application to characterize and quantify antioxidant and prooxidant activities in a microplate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36): 8983-8993.
- Privitera, G., Luca, T., Castorina, S., Passanisi, R., Ruberto, G., Napoli, E. (2019): Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil and its principal constituents against hormone-dependent tumour cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(1): 24-28.
- Privitera, G., Napoli, E., Luca, T., Ruberto, G., Castorina, S. (2014): *In vitro* anti-proliferative effect of *Salvia officinalis* essential oil and its three main components on human lung cancer cells. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*, 2(10): 1159-1168.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.J., Komaitis, M. (2005): RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4): 1190-1195.
- Prusinowska, R., Śmigielski, K. (2014): Composition, biological properties and therapeutic effects of lavender (*Lavandula angustifolia* L.). A review. *Herba Polonica*, 60(2): 56-66.
- Purushothaman, B., PrasannaSrinivasan, R., Suganthi, P., Ranganathan, B., Gimbin, J., Shanmugam, K. (2018): A comprehensive review on *Ocimum basilicum*. *Journal of Natural Remedies*, 18(3): 71-85.
- Purushothaman, B., Suganthi, N., Jothi, A., Shanmugam, K. (2019): Molecular Docking Studies of potential anticancer agents from *Ocimum basilicum* L. against human colorectal cancer regulating genes: An *in silico* approach. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 12(7): 3423-3427.
- Qi, J., Hong, Z.Y., Xin, H., Zhu, Y.Z. (2010): Neuroprotective effects of leonurine on ischemia/reperfusion-induced mitochondrial dysfunctions in rat cerebral cortex. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 33(12): 1958-1964.
- Qiao, Z., Koizumi, Y., Zhang, M., Natsui, M., Flores, M. J., Gao, L., Yusa, K., Koyota, S., Sugiyama, T. (2012): Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederacea* L. extract on B16 murine melanoma cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 76(10): 1877-1883.
- Qin, L., Liu, Y., Wang, T., Wei, S.J., Block, M.L., Wilson, B., Liu, B., Hong, J.S. (2004): NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2): 1415-1421.
- Quave, C.L., Smeltzer, M. (2009): Anti-biofilm activity of *Marrubium vulgare* L. (Lamiaceae) extract on MRSA. *Planta Medica*, 75(04): P-96.
- Rababah, T.M., Alhamad, M., Al-Mahasneh, M., Ereifej, K., Andrade, J., Altarifi, B., Almajwal, A., Yang, W. (2015): Effects of drying process on total phenolics, antioxidant activity and flavonoid contents of common mediterranean herbs. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 8(2): 145-150.
- Rabiei, Z., Rafieian-Kopaei, M. (2014): Neuroprotective effect of pretreatment with *Lavandula officinalis* ethanolic extract on blood-brain barrier permeability in a rat stroke model. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7: S421-S426.
- Rahbardar, M.G., Amin, B., Mehri, S., Mirnajafi-Zadeh, S.J., Hosseinzadeh, H. (2017): Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86: 441-449.
- Rahbardar, M.G., Hemadeh, B., Razavi, B.M., Eisvand, F., Hosseinzadeh, H. (2020): Effect of carnosic acid on acrylamide induced neurotoxicity: *in vivo* and *in vitro* experiments. *Drug and Chemical Toxicology*, 2020: 1-8.

- Rai, V., Pai, V., Kedilaya, P. (2016): A preliminary evaluation of anticancer and antioxidant potential of two traditional medicinal plants from Lamiaceae – *Pogostemon heyneanus* and *Plectranthus amboinicus*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(8): 73-78.
- Raja, R.R. (2012): Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant* 6(3): 203-213.
- Rajagopalan, P., Wahab, S., Dera, A.A., Chandramoorthy, H.C., Irfan, S., Patel, A.A., Abullias, S.S., Zaman, G.S., Ahmad, I. (2020): Anti-cancer activity of ethanolic leaf extract of *Salvia officinalis* against oral squamous carcinoma cells *in vitro* via caspase mediated mitochondrial apoptosis. *Pharmacognosy Magazine*, 16(5): 546-552.
- Ramanauskienė, K., Raudonis, R., Majiene, D. (2016): Rosmarinic acid and *Melissa officinalis* extracts differently affect glioblastoma cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1564257.
- Ramić, D., Bucar, F., Kunej, U., Dogša, I., Klančnik, A., Smole Možina, S. (2021): Antibiofilm potential of *Lavandula* preparations against *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(19): e01099-21.
- Rao, C.V. (2004): Nitric oxide signaling in colon cancer chemoprevention. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1-2): 107-119.
- Rashad, Y., Aseel, D., Hammad, S. (2020): Phenolic compounds against fungal and viral plant diseases. In *Plant phenolics in sustainable agriculture* (pp. 201-219). Springer, Singapore.
- Ravichandran, A., Ramachandran, M., Suriyanarayanan, T., Wong, C.C., Swarup, S. (2015): Global regulator MorA affects virulence-associated protease secretion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *PloS One*, 10(4): e0123805.
- Razavi-Azarkhiavi, K., Behravan, J., Mosaffa, F., Sehatbakhsh, S., Shirani, K., Karimi, G. (2014): Protective effects of aqueous and ethanol extracts of rosemary on H₂O₂-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes by comet assay. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 11(1): 27-33.
- Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bureau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M.I., Barberan, F.T. (2004): Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4): 395-408.
- Ren, B., Qin, W., Wu, F., Wang, S., Pan, C., Wang, L., Zeng, B., Ma, S., Liang, J. (2016): Apigenin and naringenin regulate glucose and lipid metabolism, and ameliorate vascular dysfunction in type 2 diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 773: 13-23.
- Rezgui, M., Majdoub, N., Mabrouk, B., Baldisserotto, A., Bino, A., Kaab, L.B., Manfredini, S. (2020): Antioxidant and antifungal activities of marrubiin, extracts and essential oil from *Marrubium vulgare* L. against pathogenic dermatophyte strains. *Journal de Mycologie Medicale*, 30(1): 100927.
- Riachi, L.G., De Maria, C.A.B. (2015): Peppermint antioxidants revisited. *Food Chemistry*, 176: 72-81.
- Ríos-Silva, M., Trujillo, X., Trujillo-Hernández, B., Sánchez-Pastor, E., Urzúa, Z., Mancilla, E., Huerta, M. (2014): Effect of chronic administration of forskolin on glycemia and oxidative stress in rats with and without experimental diabetes. *International Journal of Medical Sciences*, 11(5): 448.
- Roby, M.H.H., Sarhan, M.A., Selim, K.A.H., Khalel, K.I. (2013): Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43: 827-831.
- Rocamora, C.R., Ramasamy, K., Lim, S.M., Majeed, A.B.A., Agatonović-Kuštrin, S. (2020): HPTLC based approach for bioassay-guided evaluation of antidiabetic and neuroprotective effects of eight essential oils of the Lamiaceae family plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 178: 112909.

- Rocha, P.R.D.A., Dalmasso, A., Grattarola, C., Casalone, C., Del Piero, F., Bottero, M.T., Capucchio, M.T. (2013): Atypical cerebral listeriosis associated with *Listeria innocua* in a beef bull. *Research in Veterinary Science*, 94(1): 111-114.
- Roma-Marzio, F., Galasso, G. (2019): New combinations for two hybrids in *Salvia* subg. *Rosmarinus* (Lamiaceae). *Italian Botanist*, 7: 31-34.
- Ruiz de Castillo, M.L., Blanch, G.P., Herraiz, M. (2004): Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. *Journal of Chromatography A*, 1052: 87-93.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Acquaviva, R. (2006): Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(2): 103-108.
- Sabahi, Z., Soltani, F., Moein, M. (2018): Insight into DNA protection ability of medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(2): 120-129.
- Sadeghi, H.M., Mansourabadi, A., Rezvani, M.E., Ghobadi, M., Razavi, N., Bagheri, M. (2016): Salvigenin has potential to ameliorate streptozotocin-induced diabetes mellitus and heart complications in rats. *Journal of Advances in Medicine and Medical Research*, 2016: 1-12.
- Sadowska, B., Micota, B., Różalski, M., Redzynia, M., Różalski, M. (2017): The immunomodulatory potential of *Leonurus cardiaca* extract in relation to endothelial cells and platelets. *Innate immunity*, 23(3): 285-295.
- Sahu, R., Kar, R.K., Sunita, P., Bose, P., Kumari, P., Bharti, S., Srivastava, S., Pattanayak, S.P. (2021): LC-MS characterized methanolic extract of *Zanthoxylum armatum* possess anti-breast cancer activity through Nrf2-Keap1 pathway: An *in-silico*, *in-vitro* and *in-vivo* evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 269: 113758.
- Salehi, A., Setorki, M. (2017): Effect of *Hyssopus officinalis* essential oil on chronic stress-induced memory and learning impairment in male mice. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(4): 448-454.
- Salehi, B., Armstrong, L., Rescigno, A., Yeskaliyeva, B., Seitimova, G., Beyatli, A., Sharmeen, J., Mahomoodally, M.F., Sharopov, F., Durazzo, A., Lucarini, M. (2019): *Lamium* plants – A comprehensive review on health benefits and biological activities. *Molecules*, 24(10): 1-23.
- Sales, P.M., Souza, P.M., Simeoni, L.A., Magalhães, P.O., Silveira, D. (2012): α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 15(1): 141-183.
- Salha, G.B., Abderrabba, M., Labidi, J. (2019): A status review of terpenes and their separation methods. *Reviews in Chemical Engineering*, 37(3): 433-447.
- Samanidou, V., Tsagiannidis, A., Sarakatsianos, I. (2012): Simultaneous determination of polyphenols and major purine alkaloids in Greek *Sideritis* species, herbal extracts, green tea, black tea, and coffee by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Journal of Separation Science*, 35(4): 608-615.
- Sandasi, M., Leonard, C.M., Van Vuuren, S.F., Viljoen, A.M. (2011): Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms *in vitro*. *South African Journal of Botany*, 77(1): 80-85.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klätte-Asselmeyer, V., Saukel, J. (2010): Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *Journal of Ethnopharmacology*, 131: 33-55.
- Sarikurkcu, C., Locatelli, M., Mocan, A., Zengin, G., Kirkan, B. (2020): Phenolic profile and bioactivities of *Sideritis perfoliata* L.: The plant, its most active extract, and its broad biological properties. *Frontiers in Pharmacology*, 10: 1642.

- Šavikin, K., Zdunić, G., Menković, N., Živković, J., Čujić, N., Tereščenko, T., Bigović, D. (2013): Ethnobotanical study on traditional use of medicinal plants in South-Western Serbia, Zlatibor district, *Journal of Ethnopharmacology*, 146: 803-810.
- Săvulescu, T., Nyárády, E.I. (1961): *Flora Republicii Populare Române*, VIII. Ediția Academiei Republicii Populare Române, București, pp. 97-393.
- Seca, A.M., Pinto, D.C. (2018): Plant secondary metabolites as anticancer agents: successes in clinical trials and therapeutic application. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1): 1-22.
- Sellami, I.H., Maamouri, E., Chahed, T., Wannas, W.A., Kchouk, M.E., Marzouk, B. (2009): Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). *Industrial Crops and Products*, 30: 395-402.
- Semerdjieva, I.B., Burducea, M., Astatkie, T., Zheljaskov, V.D., Dincheva, I. (2019): Essential oil composition of *Ruta graveolens* L. fruits and *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman biomass as a function of hydrodistillation time. *Molecules*, 24(22): 4047.
- Šeremet, D., Vojvodić Cebin, A., Mandura, A., Žepić, I., Marković, K., Komes, D. (2020): An insight into the chemical composition of ground ivy (*Glechoma hederacea* L.) by means of macrocomponent analysis and fractionation of phenolic compounds. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 15(3-4): 133-138.
- Serrano, C., Matos, O., Teixeira, B., Ramos, C., Neng, N., Nogueira, J., Nunes, M.L., Marques, A., (2011): Antioxidant and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(9): 1554-1560.
- Serrano, C.A., Villena, G.K., Rodríguez, E.F. (2021): Phytochemical profile and rosmarinic acid purification from two Peruvian *Lepechinia* Willd. species (Salviinae, Mentheae, Lamiaceae). *Scientific Reports*, 11(1): 1-10.
- Sevgi, K., Tepe, B., Sarikurkcü, C. (2015): Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 77: 12-21.
- Sewell, R.D., Rafeian-Kopaei, M. (2014): The history and ups and downs of herbal medicines usage. *Journal of HerbMed pharmacology*, 3(1): 1-3.
- Seyed, M.A., Ayesha, S., Azmi, N., Al-Rabae, F.M., Al-Alawy, A.I., Al-Zahrani, O.R., Hawsawi, Y. (2021): The neuroprotective attribution of *Ocimum basilicum*: a review on the prevention and management of neurodegenerative disorders. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1): 1-14.
- Sghaier, M.B., Ismail, M.B., Bouhlel, I., Ghedira, K., Chekir-Ghedira, L. (2015): Leaf extracts from *Teucrium ramosissimum* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant, antigenotoxic and antiproliferative activity, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 44: 44-52.
- Shaheen, F., Rasool, S., Shah, Z.A., Soomro, S., Jabeen, A., Mesaik, M.A., Choudhary, M.I. (2014): Chemical constituents of *Marrubium vulgare* as potential inhibitors of nitric oxide and respiratory burst. *Natural Product Communications*, 9(7): 1934578X1400900705.
- Shahidi, F., Yeo, J. (2018): Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6): 1573.
- Shakeri, A., Sahebkar, A., Javadi, B. (2016): *Melissa officinalis* L. – A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188: 204-228.
- Shanak, S., Bassalat, N., Albzoor, R., Kadan, S., Zaid, H. (2021): *In vitro* and *in silico* evaluation for the inhibitory action of *O. basilicum* methanol extract on α -glucosidase and α -amylase. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021: 1-9.

- Sharifi-Rad, M., Berkay Yilmaz, Y., Antika, G., Salehi, B., Tumer, T.B., Kulandaisamy Venil, C., Das, G., Patra, J.K., Karazhan, N., Akram, M., Iqbal, M. (2020): Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research*, 35(1): 95-121.
- Sharma, L. (2020): Immunomodulatory effect and supportive role of traditional herbs, spices and nutrients in management of COVID-19. Preprints: 2020090026.
- Sharma, P., Kumar, P., Sharma, R., Gupta, G., Chaudhary, A. (2017): Immunomodulators: Role of medicinal plants in immune system. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 7(6): 552-556.
- Sharma, Y., Fagan, J., Schaefer, J. (2019): Ethnobotany, phytochemistry, cultivation and medicinal properties of Garden sage (*Salvia officinalis* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8: 3139-3148.
- Shivakumar, A., Yogendra Kumar, M.S. (2018): Critical review on the analytical mechanistic steps in the evaluation of antioxidant activity. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(3): 214-236.
- Shruthi, S., Shenoy, K.B. (2021): Gallic acid: A promising genoprotective and hepatoprotective bioactive compound against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Environmental Toxicology*, 36(1): 123-131.
- Shukla, S., Bajpai, V.K., Kim, M. (2014): Plants as potential sources of natural immunomodulators. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1): 17-33.
- Sies, H. (1991): *Oxidative stress II: Oxidants and Anti-oxidants*. Academic Press, London.
- Silva, Y.P., Bernardi, A., Frozza, R.L. (2020): The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in Endocrinology*, 11: 25.
- Simić, D., Vuković-Gačić, B., Knežević-Vukčević, J. (1998): Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-system. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402(1-2): 51-57.
- Simo, M., Chen, Z., Siwe, G., Majoumouo, S., Taffou, Donati, M., Toghueo, R., Jazet, P., Sameza, M., Fekam, F., Froidi, G. (2020): Antifungal, Antioxidant activity and phytochemical analysis of extracts from *Vitex rivularis* (Lamiaceae). *Research & Reviews: A Journal of Pharmacognosy*, 7(1): 23-48.
- Simpson, D.S., Oliver, P.L. (2020): ROS generation in microglia: Understanding oxidative stress and inflammation in neurodegenerative disease. *Antioxidants*, 9(8): 743.
- Şimşek Sezer, E.N., Uysal, T. (2018): The effects of the *Sideritis ozturkii* extract on the expression levels of some apoptotic genes. *Current Perspectives on Medicinal and Aromatic Plants (CUPMAP)*, 1(1): 8-12.
- Şimşek Sezer, E.N., Uysal, T. (2021): Phytochemical analysis, antioxidant and anticancer potential of *Sideritis niveotomentosa*: endemic wild species of Turkey. *Molecules*, 26(9): 2420.
- Šimunović, K., Ramić, D., Xu, C., Smole Možina, S. (2020): Modulation of *Campylobacter jejuni* motility, adhesion to polystyrene surfaces, and invasion of INT407 cells by quorum-sensing inhibition. *Microorganisms*, 8(1): 104.
- Singab, A.N.B.I. (2012): Medicinal & aromatic plants. *Medicinal Aromatic Plants* 1(2): e109.
- Singh, N., Tailang, M., Mehta, S.C. (2016): A review on herbal plants as immunomodulators. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(9): 3602-3610.
- Singh, P.P., Jha, S., Irchhaiya, R., Fatima, A., Agarwal, P. (2012): A review on phytochemical and pharmacological potential of *Calamintha officinalis* Moench. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(4): 1001-1004.

- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965): Colometric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.
- Sinha, B.K. (2020): Role of oxygen and nitrogen radicals in the mechanism of anticancer drug cytotoxicity. *Journal of Cancer Science & Therapy*, 12(1): 10-18.
- Sitarek, P., Merecz-Sadowska, A., Śliwiński, T., Zajdel, R., Kowalczyk, T. (2020): An *in vitro* evaluation of the molecular mechanisms of action of medical plants from the Lamiaceae family as effective sources of active compounds against human cancer cell lines. *Cancers*, 12(10): 1-47.
- Sitarek, P., Skała, E., Wysokińska, H., Wielanek, M., Szemraj, J., Toma, M., Śliwiński, T. (2016): The effect of *Leonurus sibiricus* plant extracts on stimulating repair and protective activity against oxidative DNA damage in CHO cells and content of phenolic compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 1-11.
- Sizar, O., Unakal, C.G. (2020): Gram positive bacteria. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida, USA.
- Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P. (2017): Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6: 62-69.
- Skendi, A., Irakli, M., Chatzopoulou, P., Papageorgiou, M. (2019): Aromatic plants of Lamiaceae family in a traditional bread recipe: Effects on quality and phytochemical content. *Journal of Food Biochemistry*, 43(11): e13020.
- Sklias, K., Santos Sousa, J., Girard, P.M. (2021): Role of short-and long-lived reactive species on the selectivity and anti-cancer action of plasma treatment *in vitro*. *Cancers*, 13(4): 615.
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., Tarantilis, P.A. (2014): Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53: 46-54.
- Skoula, M., Grayer, R.J., Kite, G.C. (2005): Surface flavonoids in *Satureja thymbra* and *Satureja spinosa* (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(5): 541-544.
- Skrzypczak-Pietraszek, E., Pietraszek, J. (2012): Chemical profile and seasonal variation of phenolic acid content in bastard balm (*Melittis melissophyllum* L., Lamiaceae). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66: 154-161.
- Slettengren, M., Mohanty, S., Kamolovit, W., Van Der Linden, J., Brauner, A. (2020): Making medical devices safer: Impact of plastic and silicone oil on microbial biofilm formation. *Journal of Hospital Infection*, 106(1): 155-162.
- Slimani, W., Zerizer, S., Kabouche, Z. (2020): Immunomodulatory and anti-arthritic activities of *Stachys circinata*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 13(2): 183-189.
- Smeyne, R.J., Noyce, A.J., Byrne, M., Savica, R., Marras, C. (2021): Infection and risk of Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's Disease*, 11(1): 31-43.
- Sofic, E., Copra-Janicijevic, A., Salihovic, M., Tahirovic, I., Kroyer, G. (2010): Screening of medicinal plant extracts for quercetin-3rutinoside (rutin) in Bosnia and Herzegovina. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 2(2): 97-102.
- Soheili, M., Salami, M. (2019): *Lavandula angustifolia* biological characteristics: An *in vitro* study. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9): 16424-16430.
- Soneja, A., Drews, M., Malinski, T. (2005): Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. *Pharmacological Reports*, 57: 108-119.
- Spiridon, I., Colceru, S., Anghel, N., Teaca, C.A., Bodirlau, R., Armatu, A. (2011): Antioxidant capacity and total phenolic contents of oregano (*Origanum vulgare*), lavender (*Lavandula angustifolia*) and lemon balm (*Melissa officinalis*) from Romania. *Natural Product Research*, 25: 1657-1661.

- Spoering, A.L., Lewis, K.I.M. (2001): Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23): 6746-6751.
- Stagos, D., Portesis, N., Spanou, C., Mossialos, D., Aligiannis, N., Chaita, E., Panagoulis, C., Reri, E., Skaltsounis, L., Tsatsakis, A.M., Kouretas, D. (2012): Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Chemistry and Toxicology*, 50(11): 4115-4124.
- Stanciu, G., Aonofriesei, F., Lupsor, S., Popescu, A., Sirbu, R. (2019): Study of phenolic compounds and antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* L. flowers macerates. *Revista de Chime*, 70(5): 1800-1804.
- Stanković, M. (2012): Biological effects of secondary metabolites of *Teucrium* species of Serbian flora. Doktorska disertacija, Univerzitet u Kragujevcu.
- Stanković, M., Topuzović, M., Marković, A., Pavlović, D., Solujić, S., Nićiforović, N., Mihailović, V. (2010): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of different *Teucrium chamaedrys* L. extracts. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 24: 82-86.
- Stanković, M.S., Ćurčić, M.G., Žižić, J.B., Topuzović, M.D., Solujić, S.R., Marković, S.D. (2011a): *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7): 4190-4205.
- Stanković, M.S., Nićiforović, N., Topuzović, M., Solujić, S. (2011b): Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 25(1): 2222-2227.
- Stanković, M.S., Stefanović, O., Čomić, L., Topuzović, M., Radojević, I., Solujić, S. (2012): Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Central European Journal of Biology*, 7(4): 664-671.
- Stefanović, O., Čomić, L. (2012): Synergistic antibacterial interaction between *Melissa officinalis* extracts and antibiotics. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(01): 1-5.
- Stefkov, G., Karapandzova, M., Stefova, M., Kulevanova, S. (2009): Seasonal variation of flavonoids in *Teucrium polium* L. (Lamiaceae). *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 55(1-2): 33-40.
- Stegăruș, D.I., Lengyel, E., Apostolescu, G.F., Botoran, O.R., Tanase, C. (2021): Phytochemical analysis and biological activity of three *Stachys* species (Lamiaceae) from Romania. *Plants*, 10(12): 2710.
- Stojanović, D., Aleksić, J.M., Jančić, I., Jančić, R. (2015): A Mediterranean medicinal plant in the continental Balkans: A plastid DNA-based phylogeographic survey of *Salvia officinalis* (Lamiaceae) and its conservation implications. *Willdenowia*, 45: 103-118.
- Strain, W.D., Paldánus, P.M. (2018): Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovascular Diabetology*, 17(1): 1-10.
- Strober, W. (2001): Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 21, no. 1, A-3B.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H., Zhang, D. (2020): *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(1): 1-12.
- Subedi, L., Gaire, B.P. (2021): Tanshinone IIA: A phytochemical as a promising drug candidate for neurodegenerative diseases. *Pharmacological Research*: 105661.
- Sumorek-Wiadro, J., Zając, A., Maciejczyk, A., Jakubowicz-Gil, J. (2020): Furanocoumarins in anticancer therapy—For and against. *Fitoterapia*, 142: 104492.

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021): Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, 71(3): 209-249.
- Surguchov, A. (2021): Invertebrate models untangle the mechanism of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cells*, 10(2): 407.
- Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcak, M., Rauh, K., Brestic, M. (2018): Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25: 631-641.
- Taamalli, A., Arráez-Román, D., Abaza, L., Iswaldi, I., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. (2015): LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochemical Analysis*, 26(5): 320-330.
- Tadić, V., Bojović, D., Arsić, I., Đorđević, S., Aksentijević, K., Stamenić, M., Janković, S. (2012a): Chemical and antimicrobial evaluation of supercritical and conventional *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae extracts. *Molecules*, 17(3): 2683-2703.
- Tadić, V.M., Jeremić, I., Dobrić, S., Isaković, A., Marković, I., Trajković, V., Bojović, D., Arsić, I. (2012b): Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of *Sideritis scardica* extracts. *Planta Medica*, 78(05): 415-427.
- Tagde, P., Tagde, S., Tagde, P., Bhattacharya, T., Monzur, S. M., Rahman, M., Otrisal, P., Behl, T., Hassan, S.S., Abdel-Daim, M.M., Aleya, L., Bungau, S. (2021): Nutraceuticals and herbs in reducing the risk and improving the treatment of COVID-19 by targeting SARS-CoV-2. *Biomedicines*, 9(9): 1266.
- Taghouti, M., Martins-Gomes, C., Félix, L.M., Schäfer, J., Santos, J.A., Bunzel, M., Nunes, F.M., Silva, A.M. (2020): Polyphenol composition and biological activity of *Thymus citriodorus* and *Thymus vulgaris*: Comparison with endemic Iberian *Thymus* species. *Food Chemistry*, 331: 1-11.
- Tan, B.K., Vanitha, J. (2004): Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11): 1423-1430.
- Tang, Z., Zeng, Y., Zhou, Y., He, P., Fang, Y., Zang, S. (2006): Determination of active ingredients of *Origanum vulgare* L. and its medicinal preparations by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Analytical Letters*, 39(15): 2861-2875.
- Taram, F., Ignowski, E., Duval, N., Linseman, D.A. (2018): Neuroprotection comparison of rosmarinic acid and carnosic acid in primary cultures of cerebellar granule neurons. *Molecules*, 23(11): 2956.
- Tariq, L., Bhat, B.A., Hamdani, S.S., Mir, R.A. (2021): Phytochemistry, pharmacology and toxicity of medicinal plants. *Medicinal and Aromatic Plants: Healthcare and Industrial Applications*, 2021: 217.
- Tasneem, S., Liu, B., Li, B., Choudhary, M.I., Wang, W. (2019): Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. *Pharmacological Research*, 139: 126-140.
- Taylor, R. (1990): Interpretation of the correlation coefficient: a basic review. *Journal of Diagnostic Medical Sonography*, 6(1): 35-39.
- Taylor, T.A., Unakal, C.G. (2017): *Staphylococcus aureus*. In: StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, Treasure Island, Florida, USA.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., Sarikurkcu, C. (2011): Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82: 237-246.

- Thakur, V.V., Niraj, T., Tiwari, S. (2021): DNA barcoding of some medicinally important plant species of Lamiaceae family in India. *Molecular Biology Reports*, 2021: 1-10.
- Thingore, C., Kshirsagar, V., Juvekar, A. (2021): Amelioration of oxidative stress and neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced memory impairment using rosmarinic acid in mice. *Metabolic Brain Disease*, 36(2): 299-313.
- Thirumurugan, D., Cholarajan, A., Raja, S.S., Vijayakumar, R. (2018): An introductory chapter: secondary metabolites. In: *Secondary Metabolites: Sources and Applications*, pp. 1-21.
- Tirzitis, G., Bartosz, G. (2010): Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochimica Polonica*, 57(1): 139-142.
- Tiwari, S., Dubey, N.K. (2020): Traditional medicinal plants as promising source of immunomodulator against Covid-19. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 8: S128-S138.
- Tiwari, V.J. (2019): Ethnopharmacology of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br., Lamiaceae, used to cure jaundice and liver disorders by Baiga Tribe of Mandla District of Madhya Pradesh. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 11(1): 1-7.
- Todorova, M., Trendafilova, A. (2014): *Sideritis scardica* Griseb., an endemic species of Balkan peninsula: Traditional uses, cultivation, chemical composition, biological activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 152(2): 256-265.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., Lasa, I. (2001): The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4538-4545.
- Treangen, T.J., Maybank, R.A., Enke, S., Friss, M.B., Diviak, L.F., Karaolis, D.K., Koren, S., Ondov, B., Phillippy, A.M., Bergman, N.H., Rosovitz, M.J. (2014): Complete genome sequence of the quality control strain *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* ATCC 25923. *Genome announcements*, 2(6): e01110-14.
- Triantaphyllou, K., Blekas, G., Boskou, D. (2001): Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 52(4): 313-317.
- Trifonova, D., Gavrilova, A., Dyakova, G., Gavrilov, G., Yotova, M., Nikolov, S. (2021): Preliminary *in vitro* study of anti-oxidant activity and anti-diabetic potential of plant extracts from 4 herbal substances not traditionally used for treatment of diabetes mellitus. *Pharmacia*, 68: 755-762.
- Trivellini, A., Lucchesini, M., Maggini, R., Mosadegh, H., Villamarin, T.S.S., Vernieri, P., Mensuali-Sodi, A., Pardossi, A. (2016): Lamiaceae phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Industrial Crops and Products*, 83: 241-254.
- Tsibranska, I., Tylkowski, B., Kochanov, R., Alipieva, K. (2011): Extraction of biologically active compounds from *Sideritis* ssp. L. *Food and Bioproducts Processing*, 89: 273-280.
- Tumbas, V.T., Mandić, A.I., Četković, G.S., Đilas, S.M., Čanadanović-Brunet, J.M. (2004): HPLC analysis of phenolic acids in mountain germander (*Teucrium montanum* L.) extracts. *Acta Periodica Technologica*, 35: 265-73.
- Tundis, R., Iacopetta, D., Sinicropi, M.S., Bonesi, M., Leporini, M., Passalacqua, N.G., Ceramella, J., Menichini, F., Loizzo, M.R. (2017): Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp. *thomasi* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae). *Food and Chemical Toxicology*, 106: 155-164.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Menichini, F. (2010): Natural products as α -amylase and α -glucosidase inhibitors and their hypoglycaemic potential in the treatment of diabetes: an update. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 10(4): 315-331.

- Tundis, R., Loizzo, M.R., Nabavi, S.M., Orhan, I.E., Skalicka-Woźniak, K., D'Onofrio, G., Aiello, F. (2018): Natural compounds and their derivatives as multifunctional agents for the treatment of alzheimer disease. In: Discovery and Development of Neuroprotective Agents from Natural Products, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 63-102.
- Tusevski, O., Kostovska, A., Iloska, A., Trajkovska, L., Simić, S.G. (2014): Phenolic production and antioxidant properties of some Macedonian medicinal plants. Central European Journal of Biology, 9(9): 888-900.
- Tutin, G.T., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (1972): Flora Europea, Vol. 3, Diapensiaceae to Myoporaceae. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, pp. 129-189.
- Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R.S., Oshima, T., Kokubo, K. (2014): Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using β -carotene bleaching assay. Journal of Nanomaterials, 2014: 802596.
- Ugwah-Oguejiofor, C.J., Adebisi, I.M. (2021): Potential medicinal plant remedies and their possible mechanisms against COVID-19: A review. Ife Journal of Science, 23(1): 161-194.
- Ulewicz-Magulska, B., Wesolowski, M. (2019): Total phenolic contents and antioxidant potential of herbs used for medical and culinary purposes. Plant Foods for Human Nutrition, 74(1): 61-67.
- Ullah, R., Al-Zeghayer, Y.S., Haider, S. (2011): Immunomodulatory potential of *Phlomis bracteosa*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5(15): 1811-1812.
- Uritu, C.M., Mihai, C.T., Stanciu, G.D., Dodi, G., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M.M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic S., Tamba, B.I. (2018): Medicinal plants of the family Lamiaceae in pain therapy: A review, Pain Research & Management, 2018: 1-44.
- Vági, E., Rapavi, E., Hadolin, M., Vásárhelyiné Perédi, K., Balázs, A., Blázovics, A., Simándi, B. (2005): Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(1): 17-21.
- Valant-Vetschera, K.M., Roitman, J.N., Wollenweber, E. (2003): Chemodiversity of exudate flavonoids in some members of the Lamiaceae. Biochemical Systematics and Ecology, 31(11): 1279-1289.
- Valdés, A., Sullini, G., Ibáñez, E., Cifuentes, A., García-Cañas, V. (2015): Rosemary polyphenols induce unfolded protein response and changes in cholesterol metabolism in colon cancer cells. Journal of Functional Foods, 15: 429-439.
- van Horssen, J., van Schaik, P., Witte, M. (2019): Inflammation and mitochondrial dysfunction: A vicious circle in neurodegenerative disorders? Neuroscience Letters, 710: 132931.
- van Son, J., Nyklíček, I., Pop, V.J., Pouwer, F. (2011): Testing the effectiveness of a mindfulness-based intervention to reduce emotional distress in outpatients with diabetes (DiaMind): design of a randomized controlled trial. BMC Public Health, 11(1): 1-11.
- Varga, L., Engel, R., Szabó, K., Abrankó, L., Gosztola, B., Zámboriné Németh, É., Sárosi, S. (2016): Seasonal variation in phenolic content and antioxidant activity of *Glechoma hederacea* L. harvested from six Hungarian populations. Acta Alimentaria, 45(2): 268-276.
- Varposhti, M., Abdi, A.A., Mohammadi, P., Saboor, A. (2013): Effects of extracts and an essential oil from some medicinal plants against biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases, 1(1): 36-40.
- Vasić, O. (1997): A survey of the Mediterranean species of Lamiaceae family in the flora of Serbia. Lagasalia, 19(1-2): 263-270.
- Vasudeva, N. (2015): *Origanum majorana* L.-Phyto-pharmacological review. Indian Journal of Natural Products and Resources [Formerly Natural Product Radiance], 6(4): 261-267.

- Veesenmeyer, J.L., Hauser, A.R., Lisboa, T., Rello, J. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* virulence and therapy: Evolving translational strategies. *Critical Care Medicine*, 37(5): 1777.
- Veiga, A., Maria da Graça, T.T., Rossa, L.S., Mengarda, M., Stofella, N.C., Oliveira, L.J., Gonçalves, A.G., Murakami, F.S. (2019): Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC_{50%}, and IC_{90%} of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 162: 50-61.
- Venkateshappa, S.M., Sreenath, K.P. (2013): Some species of Lamiaceae – comparative anatomical studies. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 3(11): 9249-9254.
- Venugopala, K.N., Rashmi, V., Odhav, B. (2013): Review on natural coumarin lead components for their pharmacological activity. *BioMed Research International*, 2013: 1-14.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M., Schué, F. (2012): Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry*, 84(2): 377-410.
- Vidović, S., Zeković, Z., Marošanić, B., Pandurević Todorović, M., Vladić, J. (2014): Influence of pre-treatments on yield, chemical composition and antioxidant activity of *Satureja montana* extracts obtained by supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 95: 468-473.
- Vieira, S.F., Ferreira, H., Neves, N.M. (2020): Antioxidant and anti-inflammatory activities of cytocompatible *Salvia officinalis* extracts: A comparison between traditional and Soxhlet extraction. *Antioxidants*, 9(11): 1-25.
- Vilmosh, N., Georgieva, M., Kandilarov, I., Kostadinov, I. (2021): Anti-inflammatory effect of *Satureja montana* dry extract. *Nauka i mladost*, 2021: 173-176.
- Vitanza, L., Maccelli, A., Marazzato, M., Scazzocchio, F., Comanducci, A., Fornarini, S., Crestoni, M.E., Filippi, A., Frascchetti, C., Rinaldi, F., Aleandri, M. (2019): *Satureja montana* L. essential oil and its antimicrobial activity alone or in combination with gentamicin. *Microbial Pathogenesis*, 126: 323-331.
- Vladić, J., Čebović, T., Vidović, S., Jokić, S. (2020): Evaluation of anticancer activity of *Satureja montana* supercritical and spray-dried extracts on Ehrlich's ascites carcinoma bearing mice. *Plants*, 9(11): 1532.
- Vladimir-Knežević, S., Blažeković, B., Kindl, M., Vladić, J., Lower-Nedza, A.D., Brantner, A.H. (2014): Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules*, 19(1): 767-782.
- Vlase, L., Benedec, D., Hanganu, D., Damian, G., Csillag, I., Sevastre, B., Mot, A.C., Silaghi-Dumitrescu, R., Tilea, I. (2014): Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules*, 19(5): 5490-5507.
- Vujanović, M., Zengin, G., Đurović, S., Mašković, P., Cvetanović, A., Radojković, M. (2019): Biological activity of extracts of traditional wild medicinal plants from the Balkan Peninsula. *South African Journal of Botany*, 120: 213-218.
- Vuković, N., Milošević, T., Sukdolak, S., Solujić, S. (2008): The chemical composition of the essential oil and the antibacterial activities of the essential oil and methanol extract of *Teucrium montanum*. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 73(3): 299-305.
- Vuković-Gačić, B., Nikčević, S., Berić-Bjedov, T., Knežević-Vukčević, J., Simić, D. (2006): Antimutagenic effect of essential oil of sage (*Salvia officinalis* L.) and its monoterpenes against UV-induced mutations in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1730-1738.

- Wagner, H., Proksch, A., Vollmar, A., Kreutzkamp, B., Bauer, J. (1985): *In vitro* phagocytosis stimulation by isolated plant materials in a chemoluminescence-phagocytosis model. *Planta Medica*, 1: 39-44.
- Wahby, M.M., Yacout, G., Kandeel, K., Awad, D. (2015): LPS-induced oxidative inflammation and hyperlipidemia in male rats: the protective role of *Origanum majorana* extract. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(4): 291-298.
- 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, J., Yi, J. (2008): Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biology & Therapy*, 7(12): 1875-1884.
- 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, X., Biswas, S., Paudyal, N., Pan, H., Li, X., Fang, W., Yue, M. (2019): Antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium* isolates recovered from the food chain through national antimicrobial resistance monitoring system between 1996 and 2016. *Frontiers in Microbiology*, 10: 985.
- Wang, Z., Wang, J., Hu, J., Chen, Y., Dong, B., Wang, Y. (2021): A comparative study of acarbose, vildagliptin and saxagliptin intended for better efficacy and safety on type 2 diabetes mellitus treatment. *Life Sciences*, 274: 119069.
- Weidner, C., Rousseau, M., Plauth, A., Wowro, S.J., Fischer, C., Abdel-Aziz, H., Sauer, S. (2015): *Melissa officinalis* extract induces apoptosis and inhibits proliferation in colon cancer cells through formation of reactive oxygen species. *Phytomedicine*, 22(2): 262-270.
- Wojdyło, A., Oszmiański, J., Czemerys, R. (2007): Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105: 940-949.
- Wojtyniak, K., Szymański, M., Matławska, I. (2012): *Leonurus cardiaca* L. (motherwort): a review of its phytochemistry and pharmacology. *Phytotherapy Research*, 27(8): 1115-1120.
- Wong, F.C., Yong, A.L., Ting, E.P.S., Khoo, S.C., Ong, H.C., Chai, T.T. (2014): Antioxidant, metal chelating, anti-glucosidase activities and phytochemical analysis of selected tropical medicinal plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 13(4): 1409-1415.
- Wszelaki, N., Kuciun, A., Kiss, A. (2010): Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharmaceutica*, 60(1): 119-128.
- Wu, M., Luo, Q., Nie, R., Yang, X., Tang, Z., Chen, H. (2021): Potential implications of polyphenols on aging considering oxidative stress, inflammation, autophagy, and gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61(13): 2175-2193.
- Wu, P.P., Zhang, K., Lu, Y.J., He, P., Zhao, S.Q. (2014): *In vitro* and *in vivo* evaluation of the antidiabetic activity of ursolic acid derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 80: 502-508.
- Xie, Z., Liang, Z., Xie, C., Zhao, M., Yu, X., Yang, M., Huang, J., Xu, X. (2014): Separation and purification of rosmarinic acid and rutin from *Glechoma hederacea* L. using high-speed counter-current chromatography. *Separation Science and Technology*, 49: 588-593.
- Xiwen, L., Hedge, I.C. (1994): Lamiaceae. *Flora of China*, 17: 50-299.
- Yadikar, N., Bobakulov, K., Li, G., Aisa, H.A. (2018): Seven new phenolic compounds from *Lavandula angustifolia*. *Phytochemistry Letters*, 23: 149-154.
- Yadikar, N., Bobakulov, K.M., Eshbakova, K.A., Aisa, H.A. (2017): Phenolic compounds from *Lavandula angustifolia*. *Chemistry of Natural Compounds*, 53(3): 562-564.

- Yanagimichi, M., Nishino, K., Sakamoto, A., Kurodai, R., Kojima, K., Eto, N., Isoda, H., Ksouri, R., Irie, K., Kambe, T., Masuda, S. (2020): Analyses of putative anti-cancer potential of three STAT3 signalling inhibitory compounds derived from *Salvia officinalis*. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 25: 1-7.
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z., Yu, X. (2020): Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*, 15(3): 1-13.
- Yang, Z., Rannala, B. (2012): Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5): 303-314.
- Yanishlieva, N.V., Marinova, E.M. (1995): Antioxidant activity of selected species of the family Lamiaceae grown in Bulgaria. *Food/Nahrung*, 39(5-6): 458-464.
- Yao, C., Nash, G.F., Hickish, T. (2014): Management of colorectal cancer and diabetes. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 107(3): 103-109.
- Yeo, J., Shahidi, F. (2019): Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(26): 7526-7529.
- Yezerka, O., Darmograj, R., Hudz, N., Levon, V. (2021): Prospects of the application of some species of the Lamiaceae family and some features of the development of their tinctures: prospects of the application of some species of the Lamiaceae family. *Agrobiodiversity for Improving Nutrition, Health and Life Quality*, 5(1): 72-79.
- Yu, H., Zhang, P., Liu, H., Sun, X., Liang, J., Sun, L., Chen, Y. (2021): Hypoglycemic activity of *Origanum vulgare* L. and its main chemical constituents identified with HPLC-ESI-QTOF-MS. *Food & Function*, 12(6): 2580-2590.
- Yu, S.H., Seol, G.H. (2017): *Lavandula angustifolia* Mill. oil and its active constituent linalyl acetate alleviate pain and urinary residual sense after colorectal cancer surgery: a randomised controlled trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017: 1-7.
- Yumrutas, O., Saygideger, S.D. (2010): Determination of *in vitro* antioxidant activities of different extracts of *Marrubium parviflorum* Fish et Mey. and *Lamium amplexicaule* L. from South east of Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(20): 2164-2172.
- Yuste, J.E., Tarragon, E., Campuzano, C.M., Ros-Bernal, F. (2015): Implications of glial nitric oxide in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9: 1-13.
- Zang, Y., Igarashi, K., Li, Y. (2016): Anti-diabetic effects of luteolin and luteolin-7-O-glucoside on KK-A y mice. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(8): 1580-1586.
- Zarei Yazdeli, M., Ghazaei, C., Seyed Ebrahimi, S.A., Arfaatabar, M., Alipanah, H., Noori, M. (2021): Evaluation of antimicrobial activity and anti-quorum sensing of *Rosmarinus* methanol extract on *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Infection*, 8(1): e108023.
- Zawada, A.E., Moszak, M., Skrzypczak, D., Grzymisławski, M. (2018): Gastrointestinal complications in patients with diabetes mellitus. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 27(4): 567-572.
- Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M. (2006): Toxicity and genotoxicity studies of surface and waste water samples using a bacterial SOS/*umu* test and mammalian MTT and comet assay. *Environmental Toxicology*, 1: 159-168.
- Zenão, S., Aires, A., Dias, C., Saavedra, M.J., Fernandes, C. (2017): Antibacterial potential of *Urtica dioica* and *Lavandula angustifolia* extracts against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from diabetic foot ulcers. *Journal of Herbal Medicine*, 10: 53-58.
- Zengin, G., Cvetanović, A., Gašić, U., Dragičević, M., Stupar, A., Uysal, A., Şenkardes, I., Sinan, K.I., Picot-Allain, M.C.N., Ak, G., Mahomoodally, M.F. (2020): UHPLC-LTQ OrbiTrap MS analysis and biological properties of *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* obtained by different extraction methods. *Industrial Crops and Products*, 154: 1-12.

- Zengin, G., Uysal, A., Gunes, E., Aktumsek, A. (2014): Survey of phytochemical composition and biological effects of three extracts from a wild plant (*Cotoneaster nummularia* Fisch. et Mey.): a potential source for functional food ingredients and drug formulations. *PloS one*, 9(11): e113527.
- Zgórka, G., Głowniak, K. (2001): Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26: 79-87.
- Zhang, L., Zhou, F.M., Dani, J.A. (2004): Cholinergic drugs for Alzheimer's disease enhance *in vitro* dopamine release. *Molecular Pharmacology*, 66(3): 538-544.
- Zhao, J., Xu, F., Huang, H., Ji, T., Li, C., Tan, W., Chen, Y., Ma, L. (2015): Evaluation on bioactivities of total flavonoids from *Lavandula angustifolia*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28: 1245-1251.
- Zhou, Y., He, Y.J., Wang, Z.J., Hu, B.Y., Xie, T.Z., Xiao, X., Zhou, Z.S., Sang, X.Y., Luo, X.D. (2021): A review of plant characteristics, phytochemistry and bioactivities of the genus *Glechoma*. *Journal of Ethnopharmacology*, 271: 1-22.
- Zhu, L., Chen, J., Tan, J., Liu, X., Wang, B. (2017): Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*, 22(3): 195.
- Zowail, M.E., El-Balshy, R.M., Asran, A.E.M.A., Khidr, F.K., Amer, N.H. (2019): Protective effect of *Origanum majorana* against the toxicity of bromadiolone on adult male albino rat. *The Egyptian Journal of Experimental Biology (Zoology)*, 15(2): 263-275.
- Żyżelewicz, D., Kulbat-Warycha, K., Oracz, J., Żyżelewicz, K. (2020): Polyphenols and other bioactive compounds of *Sideritis* plants and their potential biological activity. *Molecules*, 25(16): 3763.

Ukupno 786 literaturna navoda

PRILOZI

PRILOG 1

Ukupan sadržaj fenolnih jedinjenja u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae. Rezultati su prikazani u koncentracijama ekstrakata 500, 250 i 100 µg/mL kao srednja vrednost iz tri ponavljanja ± standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija (µg/mL)	Ukupan sadržaj fenola			Ukupan sadržaj fenolnih kiselina			Ukupan sadržaj flavonoida			Ukupan sadržaj flavonola			Ukupan sadržaj kumarina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	63,23±0,26	44,24±1,25	47,50±0,45	61,22±1,92	43,81±0,74	73,44±1,70	11,12±0,22	13,98±0,14	8,61±0,50	10,13±0,38	4,52±0,09	5,25±0,25	4,08±1,67	37,76±1,95	nd
	250	32,60±0,99	23,27±0,34	23,30±0,06	19,37±2,67	13,07±1,61	35,67±0,64	7,40±0,20	7,83±0,06	3,70±0,23	2,92±0,35	0,22±0,05	2,13±0,17	nd	24,49±1,67	nd
	100	13,22±0,10	9,37±0,13	9,05±0,18	5,11±0,56	7,89±1,28	21,22±1,11	2,67±0,05	1,99±0,08	1,43±0,22	0,92±0,12	nd	0,74±0,07	nd	3,06±1,95	nd
<i>H. officinalis</i>	500	68,44±0,20	46,69±0,98	74,28±1,18	62,70±0,74	55,67±0,64	59,37±1,61	10,01±0,54	7,99±0,67	7,43±1,08	3,98±0,10	6,12±0,08	4,00±0,10	nd	56,12±2,57	nd
	250	37,55±0,72	27,41±0,91	38,73±0,75	12,33±1,28	11,96±1,61	12,70±1,61	7,18±0,11	3,92±0,20	2,71±0,22	1,73±0,14	2,50±0,12	2,07±0,08	nd	11,22±1,95	nd
	100	14,95±0,21	10,94±0,09	16,38±0,14	11,56±2,06	nd	nd	1,25±0,11	1,37±0,05	0,50±0,06	nd	0,69±0,14	0,49±0,13	nd	nd	nd
<i>L. angustifolia</i>	500	82,44±1,83	62,25±1,71	56,02±0,38	55,30±1,34	44,19±2,25	39,37±1,61	11,12±0,78	7,89±0,14	7,21±0,16	7,20±0,10	6,93±0,08	6,70±0,07	nd	11,22±1,95	37,76±1,95
	250	47,96±0,79	33,28±0,40	28,68±0,34	18,26±2,06	17,89±1,28	nd	2,99±0,31	2,99±0,24	2,46±0,11	2,57±0,05	2,07±0,12	1,50±0,24	nd	nd	20,41±1,67
	100	19,94±0,62	13,35±0,09	12,21±0,17	6,04±0,98	nd	nd	0,78±0,11	1,53±0,06	0,81±0,05	1,19±0,20	0,86±0,23	0,24±0,03	nd	nd	nd
<i>L. cardiaca</i>	500	60,16±1,22	57,88±1,82	54,65±0,87	58,26±1,61	31,96±1,96	22,70±0,98	9,10±0,34	15,88±0,40	21,13±0,39	5,50±0,09	10,09±0,20	6,45±0,17	16,33±1,67	30,61±2,63	19,39±1,95
	250	30,41±0,27	29,63±0,80	26,69±0,51	17,15±2,67	nd	nd	5,28±0,16	8,76±0,45	11,09±0,52	0,97±0,10	1,53±0,14	1,11±0,03	nd	9,18±1,95	2,04±1,18
	100	12,50±0,42	11,36±0,34	10,71±0,09	nd	nd	nd	2,05±0,08	3,20±0,03	1,99±0,06	nd	0,24±0,07	nd	nd	nd	nd
<i>M. vulgare</i>	500	32,17±1,10	34,55±0,52	30,21±0,21	11,96±1,96	30,48±0,98	10,85±0,98	10,10±0,28	6,96±0,14	8,64±0,63	1,30±0,15	2,57±0,04	0,08±0,05	nd	18,37±2,63	nd
	250	15,67±0,20	17,30±0,49	14,26±0,12	9,00±0,64	12,70±1,61	4,56±0,64	5,56±0,11	3,76±0,17	3,98±0,19	0,22±0,07	1,34±0,09	0,03±0,02	nd	10,20±1,18	nd
	100	6,21±0,23	7,06±0,17	5,49±0,10	nd	4,56±0,64	nd	1,74±0,11	1,53±0,06	0,28±0,06	nd	nd	nd	nd	nd	nd
<i>M. officinalis</i>	500	147,77±3,31	132,46±0,82	145,85±2,16	176,04±3,70	163,81±3,92	132,70±3,23	21,16±1,18	16,03±1,43	15,19±0,48	4,58±0,13	3,46±0,07	3,88±0,06	108,16±3,53	110,20±2,89	96,94±2,57
	250	79,40±2,18	70,30±0,88	74,22±0,80	61,22±2,80	67,89±1,11	40,48±1,34	11,25±0,65	10,13±0,25	5,97±0,12	0,90±0,17	0,96±0,13	1,30±0,32	44,90±1,67	47,96±1,95	23,47±1,95
	100	32,40±0,71	30,64±0,34	31,72±0,20	19,37±1,34	39,74±0,98	13,81±0,74	4,17±0,14	3,48±0,27	0,87±0,16	0,15±0,08	0,17±0,05	nd	23,47±1,95	21,43±1,95	7,14±1,95
<i>M. piperita</i>	500	144,15±1,54	130,75±0,17	146,01±1,71	123,07±2,43	161,96±1,34	86,41±0,98	57,56±1,64	54,80±0,92	43,02±0,48	21,90±0,20	23,75±0,30	10,07±0,15	87,76±2,63	126,53±2,89	39,80±1,95
	250	77,12±2,37	70,79±1,21	76,27±1,53	51,59±1,61	54,56±1,70	16,41±0,98	32,00±0,25	30,85±0,20	21,31±0,19	11,09±0,12	11,34±0,15	5,33±0,12	42,86±1,18	51,02±1,18	18,37±2,63
	100	33,74±0,91	31,03±1,58	33,15±0,46	8,26±1,48	11,22±1,70	2,33±0,64	12,06±0,16	11,28±0,34	4,32±0,06	3,71±0,24	4,23±0,09	1,26±0,08	26,53±2,63	28,78±3,53	5,10±1,02

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Ukupan sadržaj fenola			Ukupan sadržaj fenolnih kiselina			Ukupan sadržaj flavonoida			Ukupan sadržaj flavonola			Ukupan sadržaj kumarina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>O. basilicum</i>	500	38,76±1,52	55,14±0,88	50,50±0,59	18,26±3,16	10,85±3,03	15,30±1,61	18,92±1,98	18,67±0,45	16,84±0,55	3,58±0,07	5,98±0,04	2,12±0,21	20,41±2,89	26,53±4,86	16,33±1,67
	250	19,71±0,23	29,14±0,21	24,28±0,10	9,00±0,64	19,00±1,92	nd	8,58±0,20	10,28±0,19	8,76±0,33	0,96±0,27	2,67±0,12	0,55±0,31	3,06±1,95	7,14±1,95	2,04±1,18
	100	7,68±0,21	11,59±0,35	9,80±0,15	nd	11,96±0,37	nd	3,02±0,11	3,23±0,11	2,46±0,41	nd	0,36±0,07	0,20±0,11	nd	nd	nd
<i>O. majorana</i>	500	160,69±0,35	122,23±2,37	105,60±0,20	81,59±3,70	117,15±3,16	45,67±2,57	25,13±0,11	35,41±0,43	21,03±0,19	8,86±0,26	9,88±0,25	6,56±0,31	156,12±5,10	91,84±4,86	39,80±2,57
	250	82,60±2,00	64,01±1,52	58,07±1,04	19,74±2,25	52,33±2,31	10,48±0,98	11,65±0,45	17,83±0,37	8,48±0,16	1,96±0,18	5,58±0,11	3,09±0,08	59,18±2,68	12,24±1,67	14,29±1,18
	100	35,14±0,59	26,66±0,72	23,59±0,31	2,70±0,74	25,67±1,92	nd	4,54±0,22	6,37±0,46	6,03±0,35	0,45±0,05	2,02±0,13	1,88±0,17	18,37±2,63	nd	nd
<i>O. vulgare</i>	500	158,24±1,05	236,38±0,20	105,89±1,14	160,85±3,53	137,89±2,31	101,96±2,89	47,03±0,80	42,47±0,51	32,49±0,72	12,30±0,03	16,56±0,13	9,13±0,35	77,55±3,73	40,82±1,67	96,94±3,49
	250	82,14±1,53	129,25±0,60	60,75±0,65	96,04±1,48	74,19±1,61	36,04±2,89	22,49±0,32	19,36±0,11	12,93±0,46	4,73±0,10	7,60±0,14	5,43±0,16	26,53±2,63	33,67±1,95	21,43±1,02
	100	34,46±0,63	51,97±1,61	25,09±0,12	40,48±2,67	27,89±1,28	22,70±0,98	8,36±0,43	6,90±0,22	4,82±0,22	1,17±0,03	3,36±0,13	2,65±0,08	3,06±1,95	4,08±1,67	2,02±1,18
<i>R. officinalis</i>	500	111,53±1,09	109,06±1,47	139,42±1,26	119,37±4,37	140,85±3,03	116,78±3,85	40,76±1,10	23,70±1,09	29,05±0,19	9,36±0,32	5,81±0,17	12,02±0,40	97,96±2,36	82,65±3,49	92,68±3,49
	250	57,32±0,31	54,09±1,35	76,37±0,43	72,33 ±2,31	33,07±0,98	33,44±2,57	18,52±0,66	12,09±0,16	14,82±0,22	3,75±0,08	2,50±0,03	5,77±0,25	41,84±3,49	29,59±3,06	39,80±1,95
	100	23,59±0,06	21,73±0,17	29,82 ±1,43	28,26±1,61	17,52±2,25	23,44±0,64	7,18±0,16	4,17±0,05	6,03±0,23	1,57±0,33	1,32±0,12	2,84±0,13	16,33±1,67	13,27±1,95	14,29±1,18
<i>S. officinalis</i>	500	131,89±0,38	134,89±1,68	84,98±1,08	103,44±1,70	99,00±4,84	64,56±3,21	53,09±1,07	43,86±0,83	39,98±0,49	14,87±0,42	13,83±0,06	14,73±0,04	132,65±2,63	91,84±4,25	97,96±2,89
	250	70,79±1,24	69,26±3,33	44,63±0,37	46,78±3,57	53,81±2,89	30,85±1,34	26,93±0,39	19,95±0,03	20,50±0,08	8,84±0,23	6,91±0,12	8,01±0,17	23,47±1,95	15,31±1,02	21,43±1,95
	100	29,27±0,49	27,87±0,57	16,68±0,51	18,26±0,37	11,59±0,98	0,48±0,37	9,48±0,19	7,09±0,17	8,86±0,53	4,17±0,21	2,54±0,12	3,09±0,10	7,14±1,95	nd	4,08±1,67
<i>S. montana</i>	500	106,67±2,10	134,32±0,28	118,35±1,39	130,11±0,64	101,96±2,06	75,67±3,90	26,16±0,59	28,92±0,33	27,34±0,08	9,09±0,38	8,35±0,32	12,82±0,40	124,49±6,12	59,18±3,91	55,10±2,63
	250	55,17±1,08	66,52±0,70	63,49±0,91	64,56±1,92	44,93±2,06	38,26±2,06	10,47±0,31	12,30±0,12	12,46±0,14	4,39±0,16	4,06±0,18	6,62±0,17	51,02±1,18	26,53±2,63	21,43±3,49
	100	21,99±0,24	28,49±0,45	23,95±0,57	19,74±1,34	5,67±0,64	1,59±0,37	3,85±0,11	4,04±0,14	4,57±0,12	2,48±0,20	1,40±0,07	3,48±0,20	11,22±1,95	8,16±1,67	4,08±1,67
<i>S. scardica</i>	500	87,30±2,12	50,28±0,51	57,26±0,49	36,41±2,67	3,81±1,61	3,81±0,98	26,28±0,54	17,43±0,24	16,87 ±0,31	5,41±0,17	8,24±0,28	8,84±0,14	105,10±1,95	78,57±1,95	39,80±3,49
	250	45,35±1,00	24,83±1,18	30,18±0,24	nd	nd	nd	11,50±0,22	6,87±0,05	6,93±0,24	2,67±0,09	3,60±0,31	4,89±0,22	50,00±1,95	20,41±3,73	12,24±1,67
	100	18,67±0,24	9,57±0,28	12,01±0,46	nd	nd	nd	4,48±0,20	2,43±0,17	2,61±0,28	1,40±0,29	1,48±0,10	2,34±0,12	13,27±1,95	4,08±1,67	nd
<i>T. chamaedrys</i>	500	50,31±0,97	99,04±2,04	110,23±2,09	77,89±3,85	72,33±3,21	57,15±4,17	32,28±0,62	25,94±0,46	30,51±0,65	8,34±0,18	11,76±0,21	7,10±0,47	141,84±4,21	125,51±1,95	69,39±2,89
	250	25,84±0,52	51,25±0,35	61,30±0,97	29,74±1,61	16,41±1,96	11,22±1,70	15,57±0,31	14,82±0,16	15,78±0,24	5,37±0,13	6,81±0,07	3,98±0,07	67,35±2,63	53,06±1,67	27,55±3,86
	100	10,32±0,28	23,17±0,74	25,06±0,34	5,30±0,74	3,81±1,61	nd	4,76±0,06	5,87±0,50	6,00±0,59	3,23±0,02	3,36±0,18	1,40±0,34	15,31±2,57	11,22±1,95	6,12±2,63
<i>T. montanum</i>	500	114,21±0,74	147,74±2,12	46,95±0,47	45,67±2,31	43,81±1,34	48,63±3,92	29,36±0,76	31,47±0,85	15,29±0,14	8,62±0,29	12,81±0,10	8,39±0,03	161,22±1,18	111,22±1,95	79,59±4,86
	250	56,54±2,70	79,21±2,15	24,80±0,21	18,63±0,74	36,41±2,25	24,56±1,11	13,70±0,14	17,37±0,49	7,27±0,03	3,94±0,06	7,53±0,10	3,88±0,17	60,20±3,86	46,94±2,63	39,80±1,02
	100	25,32±1,75	35,37±1,00	10,19±0,49	0,85±0,37	10,11±1,11	5,67±0,64	4,69±0,47	7,02±0,81	2,39±0,25	2,02±0,07	2,32±0,07	1,76±0,12	20,41±1,67	10,20±2,63	7,14±1,95

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Ukupan sadržaj fenola			Ukupan sadržaj fenolnih kiselina			Ukupan sadržaj flavonoida			Ukupan sadržaj flavonola			Ukupan sadržaj kumarina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>Th. serpyllum</i>	500	147,09±0,69	121,87±2,66	78,65±1,43	56,78 ±1,28	43,81±1,61	34,19±2,06	34,48±0,46	32,65±0,41	19,04±0,25	16,29±0,17	14,19±0,15	9,84±0,23	98,98±4,53	75,51±2,63	81,63±4,41
	250	77,15±1,84	64,63±0,73	43,98±0,81	43,81±3,23	21,96±2,25	32,33±3,21	15,29±0,17	14,54±0,43	7,68±0,25	7,47±0,32	5,91±0,15	4,62±0,21	62,24±1,95	44,90±1,67	33,67±1,95
	100	31,39±1,10	26,92±0,06	16,48±0,03	20,85±0,98	nd	5,67±1,92	5,41±0,11	5,72±0,22	3,51±0,05	3,52±0,12	3,13±0,10	2,36±0,18	16,33±3,49	9,18±1,95	7,14±1,02
<i>Th. vulgaris</i>	500	68,38±1,10	110,00±3,13	75,42±0,62	114,56±1,28	68,63±2,25	53,44±4,63	38,87±0,83	37,43±0,75	16,03±0,67	12,03±0,29	14,33±0,37	8,59±0,22	113,27±4,21	90,82±2,57	44,90±2,36
	250	35,08±0,68	59,16±0,95	40,85±0,34	61,22±1,92	43,81±0,74	73,44±1,70	11,12±0,22	13,98±0,14	8,61±0,50	6,83±0,15	8,97±0,03	5,39±0,27	87,76±2,63	56,12±2,57	28,57±3,33
	100	31,36±1,19	25,97±1,16	16,25±0,59	19,37±2,67	13,07±1,61	35,67±0,64	7,40±0,20	7,83±0,06	3,70±0,23	1,86±0,12	3,88±0,07	3,65±0,09	39,80±1,95	15,31±1,95	9,18±1,95

nd – nije detektovano

Ukupan sadržaj fenola – mg GAE/g suvog ekstrakta

Ukupan sadržaj fenolnih kiselina – mg CAE/g suvog ekstrakta

Ukupan sadržaj flavonoida – mg QE/g suvog ekstrakta

Ukupan sadržaj kumarina – mg KE/g suvog ekstrakta

PRILOG 2

Ukupni sadržaj triterpena u metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Rezultati su prikazani za koncentracije ekstrakata 500, 250 i 100 µg/mL kao miligrami ekvivalenata ursolne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg UAE/g) ± standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija (µg/mL)	Ukupni sadržaj triterpena			
	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	9,01±1,66	13,19±0,32	nd
	250	3,86±0,74	4,72±1,14	nd
	100	nd	nd	nd
<i>H. officinalis</i>	500	nd	26,06±2,94	nd
	250	nd	14,16±1,49	nd
	100	nd	nd	nd
<i>L. angustifolia</i>	500	210,42±4,22	109,40±4,90	52,12 ±1,11
	250	90,09±1,49	52,34±3,00	8,15±0,43
	100	13,73±1,55	3,86±0,74	nd
<i>L. cardiaca</i>	500	nd	4,50±1,70	nd
	250	nd	nd	nd
	100	nd	nd	nd
<i>M. vulgare</i>	500	16,73±1,39	41,18±2,03	nd
	250	12,01±1,72	13,73±0,86	nd
	100	nd	nd	nd
<i>M. officinalis</i>	500	15,44±1,17	23,81±1,70	nd
	250	12,44±1,72	14,16±1,29	nd
	100	nd	nd	nd
<i>M. piperita</i>	500	37,32±2,03	54,38±3,21	10,30±2,23
	250	30,89±0,74	24,88±2,39	nd
	100	2,57±0,74	nd	nd
<i>O. basilicum</i>	500	nd	1,61±0,81	nd
	250	nd	nd	nd
	100	nd	nd	nd
<i>O. majorana</i>	500	32,50±1,92	28,96±3,66	2,57±0,53
	250	17,16±0,86	20,16±1,14	nd
	100	nd	nd	nd
<i>O. vulgare</i>	500	24,77±2,19	26,06±1,69	4,50±0,64
	250	19,31±0,74	20,59±1,97	nd
	100	2,57±0,74	nd	nd
<i>R. officinalis</i>	500	39,58±1,22	50,84±1,93	nd
	250	24,88±1,14	35,61±1,14	nd
	100	nd	9,44±1,14	nd
<i>S. officinalis</i>	500	nd	46,01±1,92	nd
	250	nd	32,60±0,43	nd
	100	nd	1,72±0,43	nd

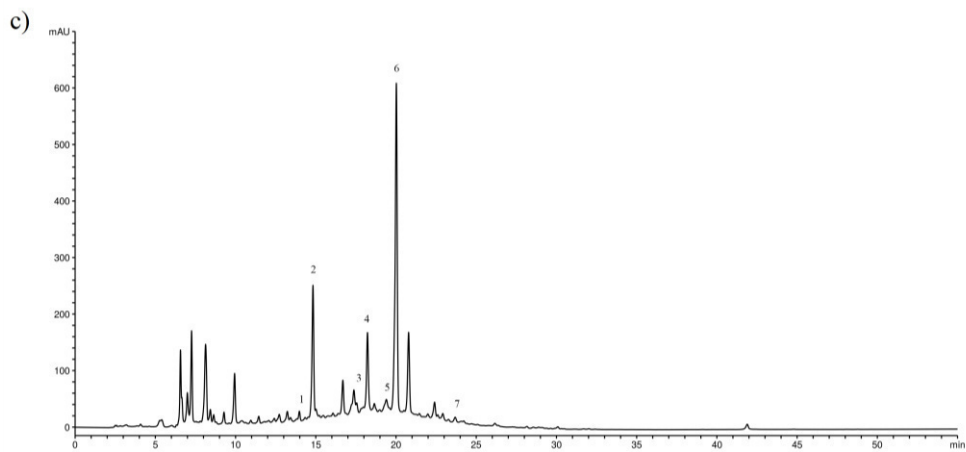
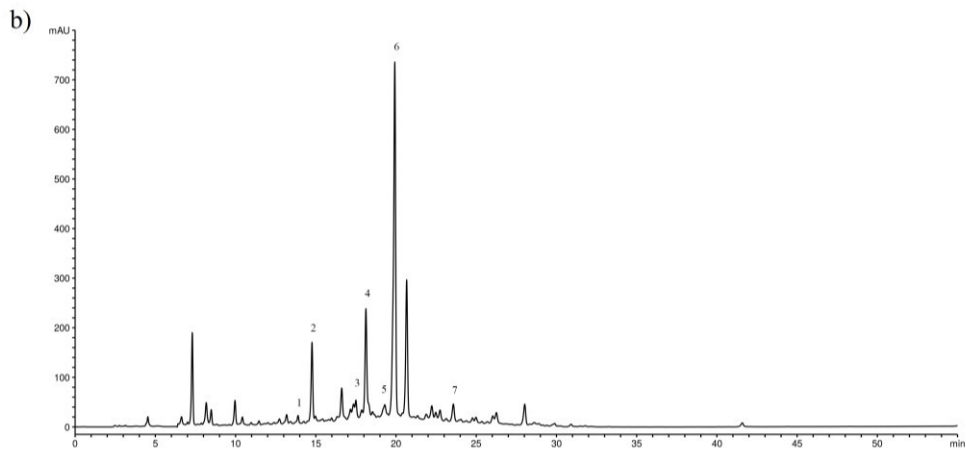
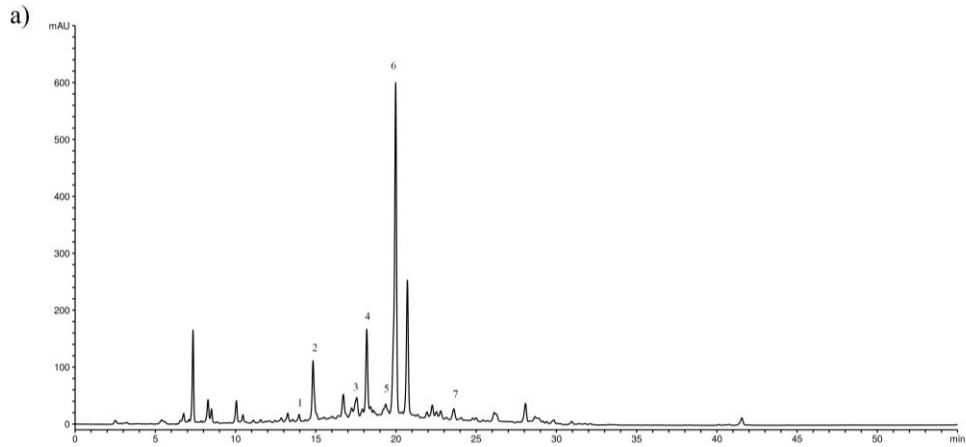
Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Ukupni sadržaj triterpena			
	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>S. montana</i>	500	19,95 \pm 1,11	19,31 \pm 1,89	nd
	250	17,16 \pm 0,43	17,59 \pm 1,14	nd
	100	2,15 \pm 0,43	nd	nd
<i>S. scardica</i>	500	23,17 \pm 0,53	35,39 \pm 2,26	nd
	250	18,88 \pm 0,43	24,88 \pm 1,87	nd
	100	6,86 \pm 0,43	2,57 \pm 0,74	nd
<i>T. chamaedrys</i>	500	28,31 \pm 0,91	27,67 \pm 2,00	4,18 \pm 0,81
	250	27,03 \pm 0,74	26,17 \pm 0,43	nd
	100	13,73 \pm 0,86	7,29 \pm 0,43	nd
<i>T. montanum</i>	500	64,03 \pm 1,61	43,76 \pm 1,74	2,90 \pm 0,81
	250	55,77 \pm 1,14	38,65 \pm 1,31	nd
	100	34,32 \pm 1,14	32,18 \pm 1,49	nd
<i>Th. serpyllum</i>	500	16,41 \pm 1,85	19,31 \pm 2,17	nd
	250	15,87 \pm 0,43	17,59 \pm 2,81	nd
	100	1,72 \pm 0,43	nd	nd
<i>Th. vulgaris</i>	500	53,73 \pm 3,58	41,83 \pm 4,12	15,44 \pm 0,74
	250	24,45 \pm 0,74	22,31 \pm 4,09	nd
	100	1,29 \pm 0,74	nd	nd

nd – nije detektovano

PRILOG 3

HPLC-DAD hromatogram za ekstrakte *Origanum majorana*.

- a) Metanolni ekstrakt *O. majorana*;
- b) Etanolni ekstrakt *O. majorana*;
- c) Vodeni ekstrakt *O. majorana*



PRILOG 4

Polifenolna jedinjenja determinisana HPLC-DAD analizom i njihova retenciona vremena.

Broj pika	Standardno jedinjenje	Retenciono vreme (min)
1	Hlorogena kiselina	13,96
2	Kafena kiselina	14,83
3	Rutin	17,82
4	Luteolin-7- <i>O</i> -glukozid	18,18
5	Naringin	19,47
6	Rozmarinska kiselina	19,98
7	Kvercetin	23,69

PRILOG 5

Antioksidativna aktivnost metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata predstavnika porodice Lamiaceae ispitana DPPH, ABTS i β -karoten/linolna kiselina testovima.

Ekstrakti su ispitani na tri koncentracije, 500, 250 i 100 $\mu\text{g/mL}$, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH			ABTS			β -karoten/linolna kiselina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	67,54 \pm 0,54	81,47 \pm 1,53	68,76 \pm 0,19	37,05 \pm 0,38	43,82 \pm 1,60	51,93 \pm 0,13	79,37 \pm 0,81	61,00 \pm 0,70	62,55 \pm 2,74
	250	38,35 \pm 0,17	54,71 \pm 1,08	38,73 \pm 0,49	20,82 \pm 0,21	17,94 \pm 1,60	22,30 \pm 1,40	65,15 \pm 1,11	42,82 \pm 0,80	42,41 \pm 1,60
	100	12,23 \pm 0,17	20,13 \pm 1,08	15,97 \pm 0,46	12,13 \pm 0,39	11,94 \pm 0,77	11,41 \pm 0,25	28,21 \pm 1,15	13,18 \pm 1,17	19,57 \pm 0,65
<i>H. officinalis</i>	500	59,72 \pm 0,24	69,36 \pm 1,22	72,83 \pm 0,33	44,40 \pm 0,27	57,44 \pm 0,13	65,65 \pm 0,22	70,51 \pm 2,07	69,17 \pm 1,39	73,33 \pm 0,79
	250	41,03 \pm 0,29	40,61 \pm 1,76	43,59 \pm 0,25	18,61 \pm 1,31	25,66 \pm 0,05	29,02 \pm 0,71	55,48 \pm 1,30	46,77 \pm 2,29	30,78 \pm 1,24
	100	13,68 \pm 0,29	17,46 \pm 1,76	18,51 \pm 0,25	15,14 \pm 0,55	15,28 \pm 0,89	14,33 \pm 1,00	32,05 \pm 0,82	7,64 \pm 1,55	12,62 \pm 0,75
<i>L. angustifolia</i>	500	80,31 \pm 0,82	69,08 \pm 0,22	60,16 \pm 0,19	34,73 \pm 0,56	59,57 \pm 1,31	42,85 \pm 0,70	69,00 \pm 1,83	66,80 \pm 1,39	31,39 \pm 0,35
	250	53,70 \pm 0,19	38,27 \pm 1,01	35,26 \pm 0,95	10,22 \pm 0,30	23,93 \pm 0,83	23,50 \pm 0,63	57,23 \pm 1,34	52,83 \pm 1,47	31,06 \pm 1,95
	100	15,16 \pm 0,19	15,16 \pm 1,01	13,54 \pm 0,95	9,26 \pm 0,41	16,43 \pm 0,29	12,51 \pm 0,33	4,08 \pm 1,02	12,78 \pm 2,06	14,75 \pm 1,35
<i>L. cardiaca</i>	500	55,87 \pm 0,42	75,43 \pm 0,54	54,62 \pm 0,57	49,03 \pm 0,21	34,06 \pm 0,42	40,77 \pm 0,32	58,62 \pm 1,91	68,38 \pm 1,60	76,03 \pm 1,74
	250	31,56 \pm 0,28	46,68 \pm 1,70	29,64 \pm 0,30	13,57 \pm 0,34	13,43 \pm 0,75	17,60 \pm 0,53	58,16 \pm 0,71	45,98 \pm 1,30	56,74 \pm 1,42
	100	11,96 \pm 0,28	16,48 \pm 1,70	12,80 \pm 0,30	9,36 \pm 0,31	9,69 \pm 0,13	9,12 \pm 0,61	23,08 \pm 1,12	23,58 \pm 1,30	25,82 \pm 0,99
<i>M. vulgare</i>	500	47,82 \pm 0,41	43,22 \pm 0,14	30,39 \pm 0,17	28,50 \pm 0,32	35,41 \pm 0,27	21,21 \pm 0,83	76,46 \pm 1,11	67,46 \pm 2,07	67,09 \pm 0,14
	250	26,89 \pm 0,38	19,34 \pm 0,46	14,22 \pm 0,46	9,35 \pm 0,30	13,09 \pm 0,25	9,02 \pm 0,29	55,36 \pm 2,74	31,36 \pm 1,03	45,11 \pm 0,98
	100	9,39 \pm 0,38	9,25 \pm 0,46	6,28 \pm 0,46	7,02 \pm 0,30	9,07 \pm 0,55	5,68 \pm 0,46	14,22 \pm 1,52	21,21 \pm 0,35	19,15 \pm 1,61
<i>M. officinalis</i>	500	93,08 \pm 0,17	93,58 \pm 0,17	92,36 \pm 0,38	99,23 \pm 0,17	98,50 \pm 0,27	98,89 \pm 0,13	75,87 \pm 1,46	72,99 \pm 1,26	67,09 \pm 2,12
	250	90,50 \pm 0,60	93,29 \pm 0,07	92,42 \pm 0,39	43,79 \pm 0,93	48,25 \pm 0,42	55,35 \pm 0,29	65,62 \pm 0,58	56,65 \pm 0,92	58,87 \pm 1,64
	100	41,81 \pm 0,60	38,47 \pm 0,08	48,19 \pm 0,39	28,08 \pm 0,38	29,70 \pm 0,67	29,18 \pm 0,31	15,62 \pm 1,31	21,08 \pm 0,86	27,66 \pm 1,37
<i>M. piperita</i>	500	93,33 \pm 0,20	94,46 \pm 0,16	91,99 \pm 0,22	99,42 \pm 0,22	99,18 \pm 0,24	80,39 \pm 0,53	82,10 \pm 1,55	84,05 \pm 1,24	99,53 \pm 1,91
	250	93,40 \pm 0,44	92,80 \pm 0,37	61,27 \pm 1,64	56,50 \pm 0,13	55,49 \pm 1,13	46,09 \pm 1,00	76,17 \pm 0,49	46,30 \pm 2,33	63,05 \pm 1,60
	100	55,86 \pm 0,44	40,09 \pm 0,37	23,88 \pm 1,64	28,22 \pm 0,66	35,00 \pm 0,69	28,13 \pm 0,39	47,160 \pm 1,22	19,94 \pm 0,38	48,38 \pm 0,43

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH			ABTS			β -karoten/linolna kiselina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>O. basilicum</i>	500	69,95 \pm 0,33	54,02 \pm 0,52	51,61 \pm 0,14	51,79 \pm 0,21	48,70 \pm 1,05	35,22 \pm 0,47	79,01 \pm 0,33	68,23 \pm 0,79	97,64 \pm 1,79
	250	42,50 \pm 0,98	34,43 \pm 0,21	27,68 \pm 0,04	20,24 \pm 0,27	21,29 \pm 1,04	14,77 \pm 0,50	62,59 \pm 0,77	47,72 \pm 0,62	63,68 \pm 1,09
	100	15,84 \pm 0,98	14,05 \pm 0,21	11,89 \pm 0,04	11,75 \pm 0,29	13,23 \pm 0,19	10,70 \pm 0,77	37,90 \pm 1,82	25,21 \pm 0,49	44,17 \pm 1,28
<i>O. majorana</i>	500	93,55 \pm 0,25	95,02 \pm 0,05	92,58 \pm 0,14	96,86 \pm 0,41	99,08 \pm 0,17	62,85 \pm 0,87	89,14 \pm 1,01	88,03 \pm 2,22	95,60 \pm 1,29
	250	58,82 \pm 0,41	57,77 \pm 0,82	35,97 \pm 0,90	46,71 \pm 0,47	49,59 \pm 0,62	27,67 \pm 0,75	75,56 \pm 0,77	60,97 \pm 0,38	84,28 \pm 0,57
	100	32,66 \pm 0,41	32,29 \pm 0,82	25,46 \pm 0,90	21,39 \pm 0,54	28,80 \pm 1,14	15,09 \pm 0,10	48,64 \pm 1,05	19,52 \pm 1,27	56,15 \pm 2,53
<i>O. vulgare</i>	500	94,48 \pm 0,28	95,37 \pm 0,14	93,47 \pm 0,08	99,42 \pm 0,22	93,38 \pm 0,19	91,50 \pm 0,46	85,06 \pm 1,10	81,91 \pm 0,38	88,68 \pm 0,82
	250	73,23 \pm 1,24	92,16 \pm 0,10	81,22 \pm 1,35	50,12 \pm 0,39	52,61 \pm 0,62	56,45 \pm 1,23	54,32 \pm 1,60	68,09 \pm 1,11	59,91 \pm 0,54
	100	40,16 \pm 1,24	51,84 \pm 0,10	42,38 \pm 1,35	27,94 \pm 1,12	24,74 \pm 0,37	28,75 \pm 0,10	38,27 \pm 2,35	38,75 \pm 1,17	28,16 \pm 2,24
<i>R. officinalis</i>	500	94,98 \pm 0,05	88,99 \pm 0,03	93,74 \pm 0,08	84,11 \pm 0,76	52,95 \pm 0,29	71,98 \pm 1,34	90,25 \pm 0,54	84,33 \pm 2,50	81,29 \pm 0,69
	250	64,14 \pm 0,59	30,35 \pm 0,76	56,60 \pm 0,76	40,96 \pm 0,67	28,68 \pm 0,70	46,09 \pm 0,21	75,31 \pm 0,54	62,39 \pm 1,96	33,65 \pm 0,96
	100	37,25 \pm 0,59	23,61 \pm 0,76	35,56 \pm 0,76	20,44 \pm 0,19	13,61 \pm 0,25	18,34 \pm 1,95	64,81 \pm 0,93	36,04 \pm 0,38	30,26 \pm 0,98
<i>S. officinalis</i>	500	94,90 \pm 0,08	95,21 \pm 0,85	92,43 \pm 0,05	97,49 \pm 0,56	69,13 \pm 0,25	58,79 \pm 1,01	91,98 \pm 1,10	88,03 \pm 1,13	89,31 \pm 0,31
	250	82,23 \pm 0,24	77,00 \pm 0,32	53,09 \pm 0,68	34,15 \pm 0,74	31,32 \pm 0,62	38,85 \pm 1,42	79,51 \pm 1,25	68,09 \pm 2,16	66,98 \pm 0,27
	100	39,41 \pm 0,24	37,05 \pm 0,32	31,64 \pm 0,68	25,84 \pm 0,34	15,76 \pm 0,46	17,62 \pm 0,74	60,74 \pm 0,86	37,18 \pm 0,89	21,84 \pm 1,48
<i>S. montana</i>	500	94,98 \pm 0,03	95,09 \pm 0,06	93,74 \pm 0,14	81,84 \pm 0,29	70,58 \pm 0,72	72,03 \pm 0,51	66,99 \pm 1,04	71,04 \pm 0,79	62,51 \pm 0,11
	250	61,16 \pm 0,50	63,76 \pm 0,36	62,52 \pm 0,89	39,95 \pm 0,39	37,03 \pm 0,92	45,76 \pm 0,46	61,02 \pm 2,72	57,49 \pm 2,32	47,74 \pm 2,57
	100	32,89 \pm 0,50	30,63 \pm 0,36	37,59 \pm 0,89	18,19 \pm 1,04	16,24 \pm 0,75	22,40 \pm 0,96	28,61 \pm 0,82	37,91 \pm 1,26	37,02 \pm 1,41
<i>S. scardica</i>	500	87,56 \pm 0,27	37,00 \pm 0,14	67,40 \pm 0,88	69,42 \pm 1,10	34,88 \pm 0,43	44,96 \pm 0,68	72,24 \pm 0,66	73,99 \pm 0,61	67,76 \pm 0,95
	250	27,11 \pm 0,83	12,78 \pm 0,35	20,44 \pm 0,10	25,18 \pm 0,46	14,92 \pm 0,94	28,49 \pm 0,51	61,16 \pm 1,49	50,85 \pm 2,33	54,10 \pm 1,67
	100	21,11 \pm 0,83	2,70 \pm 0,35	17,80 \pm 0,43	10,55 \pm 0,42	7,02 \pm 0,72	12,56 \pm 0,05	43,51 \pm 2,29	35,69 \pm 1,64	30,53 \pm 0,92
<i>T. chamaedrys</i>	500	95,25 \pm 0,14	95,25 \pm 0,17	93,86 \pm 0,17	48,16 \pm 0,83	63,48 \pm 1,02	51,93 \pm 0,75	68,42 \pm 0,89	61,53 \pm 2,41	64,81 \pm 0,93
	250	55,13 \pm 0,46	61,27 \pm 0,34	44,31 \pm 0,51	25,85 \pm 0,13	30,26 \pm 0,63	28,11 \pm 0,82	61,30 \pm 2,38	44,92 \pm 0,98	57,20 \pm 2,09
	100	33,74 \pm 0,46	35,09 \pm 0,34	26,38 \pm 0,51	12,94 \pm 0,27	15,62 \pm 0,36	14,33 \pm 0,60	38,94 \pm 1,53	31,27 \pm 2,05	30,97 \pm 1,79
<i>T. montanum</i>	500	95,29 \pm 0,06	94,17 \pm 0,03	89,73 \pm 0,13	42,27 \pm 0,40	50,19 \pm 0,19	42,37 \pm 0,62	68,52 \pm 1,55	60,77 \pm 1,26	64,26 \pm 1,15
	250	68,82 \pm 0,39	56,18 \pm 0,50	22,55 \pm 0,47	18,47 \pm 0,92	27,67 \pm 0,89	21,06 \pm 0,47	58,47 \pm 1,49	51,98 \pm 1,80	47,32 \pm 1,63
	100	30,29 \pm 0,39	27,66 \pm 0,50	21,07 \pm 0,47	11,17 \pm 0,41	9,79 \pm 0,33	10,41 \pm 0,69	33,92 \pm 1,31	22,57 \pm 1,53	27,29 \pm 0,74

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	DPPH			ABTS			β -karoten/linolna kiselina			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>Th. serpyllum</i>	500	94,63 \pm 0,05	94,75 \pm 0,05	92,55 \pm 0,05	87,29 \pm 0,34	77,25 \pm 0,25	74,15 \pm 0,05	70,49 \pm 1,81	72,24 \pm 0,29	68,63 \pm 1,04
	250	60,63 \pm 1,46	68,63 \pm 0,38	43,82 \pm 0,89	34,53 \pm 0,88	42,97 \pm 0,90	42,21 \pm 1,73	63,28 \pm 1,72	59,89 \pm 2,33	58,05 \pm 1,07
	100	31,54 \pm 1,46	34,95 \pm 0,38	27,39 \pm 0,89	15,52 \pm 0,42	16,00 \pm 0,41	19,44 \pm 0,42	39,09 \pm 1,31	34,66 \pm 2,13	36,14 \pm 1,31
<i>Th. vulgaris</i>	500	94,40 \pm 0,03	94,59 \pm 0,14	92,08 \pm 0,27	64,78 \pm 0,08	76,67 \pm 0,36	63,00 \pm 0,41	71,80 \pm 0,05	75,41 \pm 0,50	63,83 \pm 0,48
	250	53,81 \pm 0,49	66,55 \pm 0,20	40,65 \pm 0,72	35,25 \pm 0,08	42,97 \pm 1,13	42,69 \pm 0,84	65,11 \pm 0,62	68,93 \pm 1,23	53,95 \pm 1,26
	100	32,56 \pm 0,49	33,33 \pm 0,20	28,03 \pm 0,72	17,19 \pm 0,22	19,87 \pm 0,31	15,62 \pm 0,22	50,59 \pm 2,73	44,54 \pm 0,39	31,86 \pm 1,93
Pozitivne kontrole		DPPH			ABTS			β-karoten/linolna kiselina		
BHA	500	75,43 \pm 0,67			\approx 100,00			87,58 \pm 0,83		
	250	55,43 \pm 0,79			91,38 \pm 0,60			64,47 \pm 0,31		
	100	36,20 \pm 0,38			64,95 \pm 0,37			57,70 \pm 1,10		
BHT	500	71,90 \pm 1,08			\approx 100,00			80,97 \pm 1,64		
	250	52,01 \pm 0,31			\approx 100,00			59,12 \pm 0,83		
	100	32,73 \pm 0,34			55,11 \pm 0,26			56,29 \pm 0,83		
Vitamin C	500	89,59 \pm 0,10			\approx 100,00			14,15 \pm 0,54		
	250	89,70 \pm 0,06			\approx 100,00			6,92 \pm 0,96		
	100	89,42 \pm 0,10			55,70 \pm 0,40			<1		

DPPH test – procenat (%) inhibicije DPPH radikala

ABTS test – procenat (%) inhibicije ABTS radikala

β -karoten/linolna kiselina test – procenat (%) inhibicije obezbojavanja β -karotena

PRILOG 6

Antioksidativna aktivnost metanolnih, etanolnih i vodenih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana FRAP testom i testom ukupnog redukcionog potencijala.

Ekstrakti su ispitani na tri koncentracije, 500, 250 i 100 µg/mL, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija (µg/mL)	FRAP			Ukupni redukциони potencijal			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	567,87±4,00	454,55±5,03	520,55±2,88	811,48±2,89	760,27±5,33	727,85±2,69
	250	267,75±1,44	223,74±2,99	291,82±2,99	535,12±2,89	366,33±2,69	367,24±4,24
	100	105,02±2,31	116,23±1,66	112,49±0,42	166,64±2,78	184,82±5,45	196,03±1,32
<i>H. officinalis</i>	500	584,06±2,59	501,04±4,39	565,38±1,44	806,03±2,37	703,00±5,25	803,61±1,60
	250	306,35±1,25	262,35±2,53	293,48±0,42	503,91±5,01	343,91±0,52	426,03±1,60
	100	116,65±4,89	117,06±4,49	115,82±1,90	195,42±1,69	166,64±2,92	169,36±3,19
<i>L. angustifolia</i>	500	182,65±2,08	528,02±1,44	432,13±5,43	878,45±1,39	689,97±2,99	631,48±1,32
	250	105,02±3,62	281,44±2,59	237,44±5,20	554,21±2,12	369,06±3,69	315,12±1,60
	100	33,62±1,44	127,85±5,30	85,10±3,69	196,94±5,61	187,55±2,29	159,36±2,78
<i>L. cardiaca</i>	500	249,90±2,53	217,10±2,91	252,37±3,69	619,97±5,39	539,67±5,31	481,48±4,21
	250	116,23±4,68	108,34±2,16	137,40±4,39	370,88±3,94	283,30±4,76	266,03±3,21
	100	41,93±0,83	42,76±2,99	56,04±3,13	106,64±5,01	119,67±4,96	111,79±5,04
<i>M. vulgare</i>	500	139,48±1,25	121,63±2,91	157,33±5,58	375,12±3,08	293,30±3,16	186,33±4,99
	250	67,25±1,90	61,85±3,69	63,51±4,37	259,06±2,37	173,61±2,42	44,52±4,88
	100	16,60±2,20	18,68±2,88	12,87±0,42	100,58±0,80	65,73±1,39	1,18±0,52
<i>M. officinalis</i>	500	1364,88±2,59	1256,12±5,77	1436,28±2,91	1716,64±5,01	1536,64±3,67	1631,18±2,41
	250	800,33±4,09	726,03±2,59	763,39±4,00	1070,88±3,69	785,12±1,69	773,61±2,37
	100	327,94±3,24	405,15±3,40	350,77±2,20	536,33±1,32	400,27±0,91	414,21±1,60
<i>M. piperita</i>	500	1098,38±3,59	1009,55±3,24	843,50±4,21	1521,18±5,25	1434,52±4,21	989,97±5,39
	250	599,00±2,88	568,70±4,68	464,51±5,18	1040,88±3,49	785,12±4,01	579,67±5,61
	100	247,82±2,16	263,59±5,77	154,42±2,59	536,94±4,24	379,36±5,01	249,97±3,21
<i>O. basilicum</i>	500	460,77±3,59	372,77±2,53	348,69±1,90	647,24±3,21	623,91±0,91	612,39±3,87
	250	232,88±1,90	195,10±5,20	161,48±2,91	505,73±4,17	377,55±3,28	339,97±3,94
	100	88,42±2,16	79,70±5,03	77,21±5,75	228,45±5,68	166,33±2,37	132,09±2,92
<i>O. majorana</i>	500	848,90±4,33	831,88±5,03	615,61±3,69	1099,36±1,57	1227,24±2,12	799,97±4,46
	250	453,30±2,49	419,68±4,37	320,46±2,31	775,42±3,49	732,39±2,89	426,63±5,84
	100	172,27±4,09	235,37±3,29	131,17±3,40	397,24±2,89	373,91±5,53	166,64±2,10
<i>O. vulgare</i>	500	1200,50±5,62	819,01±4,68	1161,48±3,96	1532,39±4,27	1553,91±3,19	1461,48±3,41
	250	739,73±3,29	598,17±2,20	605,23±5,18	1261,48±3,49	1091,48±4,99	857,54±3,96
	100	234,12±3,80	277,71±2,59	244,08±3,59	623,91±4,67	475,42±4,21	386,94±1,09
<i>R. officinalis</i>	500	1058,12±2,99	528,44±2,91	1010,38±4,57	1302,10±5,55	1246,33±2,12	1339,06±4,73
	250	600,66±2,08	361,56±3,96	561,23±2,20	926,03±4,24	710,58±2,89	749,97±5,81
	100	244,50±1,50	169,78±3,96	194,69±3,96	433,91±3,44	368,76±3,37	362,67±1,52
<i>S. officinalis</i>	500	1038,19±2,72	853,05±5,18	783,31±2,88	1403,91±4,58	1139,36±1,57	1064,52±2,98
	250	547,53±3,96	417,60±1,50	467,00±3,80	910,58±3,49	708,15±1,60	544,82±2,78
	100	223,74±3,40	187,21±5,05	190,12±2,72	455,12±1,32	346,94±2,42	268,15±4,24

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	FRAP			Ukupni redukcionni potencijal			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>S. montana</i>	500	916,15 \pm 1,81	682,03 \pm 3,24	821,50 \pm 2,53	1561,48 \pm 3,69	1370,88 \pm 2,64	1199,36 \pm 5,25
	250	542,96 \pm 4,71	457,87 \pm 1,81	463,26 \pm 4,71	1065,12 \pm 5,36	927,55 \pm 3,64	765,12 \pm 3,72
	100	239,52 \pm 1,66	234,54 \pm 2,53	203,82 \pm 5,40	494,52 \pm 4,08	384,52 \pm 1,60	311,79 \pm 1,60
<i>S. scardica</i>	500	361,98 \pm 5,05	172,69 \pm 4,39	408,05 \pm 1,81	753,91 \pm 3,78	771,79 \pm 4,37	496,03 \pm 4,96
	250	231,22 \pm 2,31	95,06 \pm 0,42	169,36 \pm 2,59	491,48 \pm 4,46	502,09 \pm 3,44	329,67 \pm 2,37
	100	84,68 \pm 2,88	50,64 \pm 3,62	60,61 \pm 2,99	211,18 \pm 1,39	221,18 \pm 2,29	119,67 \pm 2,19
<i>T. chamaedrys</i>	500	603,57 \pm 2,72	595,68 \pm 1,50	789,54 \pm 3,13	1144,21 \pm 1,99	1118,15 \pm 4,76	945,42 \pm 3,80
	250	378,17 \pm 5,30	384,39 \pm 4,21	400,58 \pm 2,20	826,94 \pm 2,69	646,33 \pm 3,49	550,88 \pm 4,88
	100	140,31 \pm 4,68	194,27 \pm 1,25	129,93 \pm 0,42	299,97 \pm 2,12	301,79 \pm 1,99	283,30 \pm 2,12
<i>T. montanum</i>	500	435,87 \pm 1,44	398,51 \pm 3,29	527,19 \pm 2,31	1091,79 \pm 4,21	844,21 \pm 4,88	723,30 \pm 2,48
	250	301,78 \pm 2,53	291,41 \pm 1,44	228,73 \pm 2,31	786,33 \pm 2,12	532,09 \pm 5,06	446,03 \pm 2,98
	100	112,08 \pm 0,72	142,38 \pm 2,72	88,00 \pm 2,20	373,61 \pm 5,26	256,94 \pm 2,59	163,91 \pm 2,78
<i>Th. serpyllum</i>	500	787,05 \pm 1,44	682,86 \pm 2,91	836,03 \pm 3,69	1394,52 \pm 5,15	1214,82 \pm 5,25	996,33 \pm 4,53
	250	507,68 \pm 2,53	455,79 \pm 4,31	438,36 \pm 3,80	946,03 \pm 5,46	780,58 \pm 2,98	690,88 \pm 4,46
	100	168,12 \pm 5,43	209,22 \pm 1,44	167,70 \pm 2,99	411,79 \pm 5,04	373,00 \pm 3,28	287,24 \pm 4,21
<i>Th. vulgaris</i>	500	879,62 \pm 4,33	837,28 \pm 4,89	758,82 \pm 2,91	1182,40 \pm 5,39	1195,73 \pm 2,78	1098,45 \pm 3,78
	250	538,40 \pm 2,91	504,36 \pm 4,49	396,01 \pm 3,59	816,64 \pm 2,92	780,27 \pm 2,92	639,97 \pm 3,94
	100	212,12 \pm 3,69	225,40 \pm 3,13	183,06 \pm 2,59	373,30 \pm 4,59	363,30 \pm 2,69	275,73 \pm 3,19
Pozitivne kontrole		FRAP			Ukupni redukcionni potencijal		
BHA	500	3304,75 \pm 1,90			-		
	250	1596,33 \pm 0,69			-		
	100	572,85 \pm 3,29			-		
BHT	500	804,73 \pm 0,77			-		
	250	559,00 \pm 0,96			-		
	100	413,03 \pm 1,88			-		
Vitamin C	500	1763,77 \pm 1,16			-		
	250	1021,00 \pm 2,21			-		
	100	576,17 \pm 4,39			-		

FRAP test – $\mu\text{mol Fe(II)/g}$ suvog ekstraktaUkupni redukcionni potencijal – $\mu\text{mol AAE/g}$ suvog ekstrakta

PRILOG 7

Inhibicija aktivnosti enzima α -amilaze i α -glukozidaze metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Ekstrakti su ispitani u tri koncentracije, 500, 250 i 100 $\mu\text{g/mL}$, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	α -amilaza			α -glukozidaza			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	0,27 \pm 0,01	0,75 \pm 0,02	1,19 \pm 0,05	nd	nd	28,74 \pm 0,98
	250	0,19 \pm 0,05	0,41 \pm 0,07	0,29 \pm 0,09	nd	nd	26,19 \pm 0,59
	100	0,20 \pm 0,03	0,29 \pm 0,02	0,30 \pm 0,06	nd	nd	22,36 \pm 1,28
<i>H. officinalis</i>	500	0,18 \pm 0,02	0,86 \pm 0,06	0,22 \pm 0,00	nd	nd	nd
	250	0,42 \pm 0,20	0,40 \pm 0,04	0,21 \pm 0,05	nd	nd	nd
	100	0,13 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	nd	nd	nd
<i>L. angustifolia</i>	500	0,09 \pm 0,06	0,39 \pm 0,04	0,16 \pm 0,00	nd	nd	nd
	250	0,12 \pm 0,04	0,37 \pm 0,05	0,17 \pm 0,05	nd	nd	nd
	100	0,10 \pm 0,04	0,36 \pm 0,07	0,40 \pm 0,03	nd	nd	nd
<i>L. cardiaca</i>	500	1,10 \pm 0,15	0,41 \pm 0,05	0,20 \pm 0,03	nd	nd	nd
	250	0,37 \pm 0,05	0,31 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	nd	nd	nd
	100	0,16 \pm 0,06	0,27 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	nd	nd	nd
<i>M. vulgare</i>	500	0,39 \pm 0,06	0,89 \pm 0,18	1,46 \pm 0,03	nd	nd	nd
	250	0,44 \pm 0,09	0,56 \pm 0,07	0,61 \pm 0,09	nd	nd	nd
	100	0,23 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	0,25 \pm 0,02	nd	nd	nd
<i>M. officinalis</i>	500	0,82 \pm 0,23	1,80 \pm 0,12	0,35 \pm 0,02	34,42 \pm 2,08	56,23 \pm 1,08	34,05 \pm 2,91
	250	0,30 \pm 0,04	0,23 \pm 0,02	0,38 \pm 0,08	35,98 \pm 1,02	58,17 \pm 1,93	34,42 \pm 0,66
	100	0,22 \pm 0,04	0,42 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02	20,01 \pm 1,30	44,34 \pm 0,58	15,36 \pm 1,23
<i>M. piperita</i>	500	1,11 \pm 0,02	1,45 \pm 0,06	0,29 \pm 0,03	69,26 \pm 0,40	50,83 \pm 0,29	92,62 \pm 0,19
	250	0,60 \pm 0,05	0,75 \pm 0,10	0,58 \pm 0,02	27,22 \pm 0,53	17,71 \pm 1,49	82,55 \pm 1,64
	100	0,23 \pm 0,03	0,39 \pm 0,01	0,17 \pm 0,02	4,04 \pm 0,45	nd	53,61 \pm 1,48
<i>O. basilicum</i>	500	0,65 \pm 0,17	0,32 \pm 0,01	0,24 \pm 0,06	4,48 \pm 0,96	nd	27,13 \pm 2,14
	250	0,32 \pm 0,03	0,25 \pm 0,02	0,20 \pm 0,04	nd	nd	6,32 \pm 1,26
	100	0,39 \pm 0,07	0,23 \pm 0,01	0,26 \pm 0,06	nd	nd	nd
<i>O. majorana</i>	500	0,35 \pm 0,03	2,24 \pm 0,13	0,27 \pm 0,03	34,97 \pm 2,66	56,32 \pm 1,24	58,83 \pm 1,02
	250	0,29 \pm 0,01	0,81 \pm 0,06	0,23 \pm 0,01	17,89 \pm 1,83	55,52 \pm 2,22	37,87 \pm 1,68
	100	0,24 \pm 0,03	0,31 \pm 0,00	0,34 \pm 0,10	6,14 \pm 1,06	40,35 \pm 0,86	11,80 \pm 1,17
<i>O. vulgare</i>	500	0,63 \pm 0,07	1,57 \pm 0,16	0,15 \pm 0,02	24,09 \pm 0,60	50,85 \pm 1,17	78,40 \pm 0,25
	250	0,40 \pm 0,04	0,66 \pm 0,10	0,26 \pm 0,05	14,00 \pm 1,82	42,33 \pm 0,22	47,35 \pm 0,89
	100	0,34 \pm 0,08	0,31 \pm 0,05	0,23 \pm 0,02	14,18 \pm 1,05	25,08 \pm 1,36	14,67 \pm 0,27
<i>R. officinalis</i>	500	0,32 \pm 0,14	0,67 \pm 0,31	0,66 \pm 0,06	41,52 \pm 0,70	22,53 \pm 1,88	46,97 \pm 1,45
	250	0,39 \pm 0,12	0,36 \pm 0,05	0,29 \pm 0,03	18,24 \pm 1,08	13,93 \pm 1,04	20,72 \pm 0,36
	100	0,40 \pm 0,08	0,29 \pm 0,01	0,28 \pm 0,02	8,70 \pm 1,90	nd	0,87 \pm 0,07
<i>S. officinalis</i>	500	1,25 \pm 0,60	0,62 \pm 0,06	0,93 \pm 0,10	40,73 \pm 1,43	40,98 \pm 1,15	17,83 \pm 1,14
	250	0,67 \pm 0,01	0,52 \pm 0,07	0,71 \pm 0,03	14,78 \pm 0,57	10,90 \pm 1,57	5,03 \pm 2,86
	100	0,63 \pm 0,05	0,30 \pm 0,03	0,26 \pm 0,01	4,57 \pm 0,52	4,74 \pm 1,16	nd

Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	α -amilaza			α -glukozidaza			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>S. montana</i>	500	1,11 \pm 0,28	1,16 \pm 0,02	0,97 \pm 0,11	32,83 \pm 1,09	39,93 \pm 0,64	89,38 \pm 0,36
	250	0,58 \pm 0,09	0,62 \pm 0,01	0,29 \pm 0,01	29,34 \pm 0,51	37,66 \pm 1,14	72,11 \pm 0,54
	100	0,40 \pm 0,07	0,71 \pm 0,06	0,34 \pm 0,08	7,50 \pm 1,04	17,24 \pm 0,64	38,41 \pm 0,60
<i>S. scardica</i>	500	1,55 \pm 0,20	1,73 \pm 0,05	0,15 \pm 0,03	21,70 \pm 1,06	nd	nd
	250	0,68 \pm 0,06	0,83 \pm 0,04	0,24 \pm 0,03	nd	nd	nd
	100	0,44 \pm 0,04	0,37 \pm 0,08	0,16 \pm 0,03	nd	nd	nd
<i>T. chamaedrys</i>	500	1,35 \pm 0,02	0,88 \pm 0,08	nd	6,63 \pm 1,81	3,80 \pm 0,96	3,37 \pm 0,12
	250	0,67 \pm 0,06	0,39 \pm 0,03	0,22 \pm 0,02	2,15 \pm 0,73	nd	nd
	100	0,28 \pm 0,00	0,24 \pm 0,01	0,23 \pm 0,04	nd	nd	nd
<i>T. montanum</i>	500	1,08 \pm 0,07	2,24 \pm 0,25	0,15 \pm 0,01	9,53 \pm 0,43	11,24 \pm 0,74	11,97 \pm 1,65
	250	0,44 \pm 0,02	0,41 \pm 0,08	0,15 \pm 0,01	3,36 \pm 1,38	nd	nd
	100	0,24 \pm 0,01	0,31 \pm 0,05	0,15 \pm 0,01	nd	nd	nd
<i>Th. serpyllum</i>	500	1,05 \pm 0,09	1,51 \pm 0,09	0,25 \pm 0,02	46,42 \pm 0,81	64,74 \pm 1,05	98,98 \pm 0,24
	250	0,44 \pm 0,02	0,62 \pm 0,03	0,24 \pm 0,02	57,86 \pm 1,42	59,92 \pm 1,77	96,73 \pm 1,11
	100	0,29 \pm 0,03	0,31 \pm 0,04	0,21 \pm 0,01	38,24 \pm 0,50	44,24 \pm 1,15	88,07 \pm 1,26
<i>Th. vulgaris</i>	500	1,60 \pm 0,02	2,27 \pm 0,09	0,25 \pm 0,02	43,41 \pm 1,88	58,93 \pm 1,97	66,34 \pm 1,02
	250	0,51 \pm 0,03	0,76 \pm 0,02	0,21 \pm 0,01	44,34 \pm 1,66	62,31 \pm 2,08	40,18 \pm 1,37
	100	0,29 \pm 0,04	0,34 \pm 0,01	0,22 \pm 0,05	24,20 \pm 0,93	25,91 \pm 1,56	15,06 \pm 0,41
Pozitivne kontrole		α-amilaza			α-glukozidaza		
Akarboza	500	93,24 \pm 0,99			71,35 \pm 0,54		
	250	85,47 \pm 1,53			58,06 \pm 0,58		
	100	43,72 \pm 1,65			36,76 \pm 1,82		

nd – nije detektovano

α -amilaza – procenat (%) inhibicije aktivnosti α -amilaze

α -glukozidaza – procenat (%) inhibicije aktivnosti α -glukozidaze

PRILOG 8

Inhibicija aktivnosti enzima acetilholinesteraze i tirozinaze metanolnim, etanolnim i vodenim ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.

Ekstrakti su ispitani u tri koncentracije, 500, 250 i 100 µg/mL, a rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± standardna greška.

Biljna vrsta i koncentracija (µg/mL)	Acetilholinesteraza			Tirozinaza			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>G. hederacea</i>	500	57,84±1,64	70,36±0,71	74,14±1,08	47,53±0,94	48,17±0,57	46,67±0,78
	250	59,50±0,23	65,63±0,51	73,09±0,79	37,63±0,78	46,24±0,94	41,08±0,57
	100	57,08±0,50	71,11±1,14	71,79±0,70	32,04±1,14	42,37±1,20	36,77±0,37
<i>H. officinalis</i>	500	76,17±1,27	80,64±0,50	88,00±0,62	44,95±0,86	47,31±0,78	43,87±0,37
	250	77,67±0,53	79,59±0,34	84,49±0,43	38,92±0,78	42,58±0,37	39,35±0,37
	100	79,73±0,52	82,70±0,02	87,34±0,45	40,65±1,29	43,23±1,34	38,92±1,20
<i>L. angustifolia</i>	500	40,15±0,61	61,42±0,51	56,96±1,01	40,87±1,60	45,89±0,79	45,66±0,82
	250	53,88±0,76	54,37±0,11	59,40±0,89	40,64±0,23	42,47±0,40	45,66±1,21
	100	62,60±0,05	63,79±0,73	57,49±0,80	37,44±0,60	48,40±1,14	48,86±1,39
<i>L. cardiaca</i>	500	74,00±0,52	76,24±0,40	83,14±0,21	34,93±1,05	36,76±1,14	42,01±1,00
	250	69,61±0,50	77,62±0,72	83,71±0,20	35,16±0,82	36,53±0,82	41,32±1,14
	100	73,86±0,21	78,19±0,28	81,12±0,40	40,41±1,58	44,06±0,82	45,89±1,05
<i>M. vulgare</i>	500	41,64±0,94	45,04±1,07	55,93±0,86	56,69±0,53	47,11±0,80	51,10±1,40
	250	40,26±2,29	52,34±0,88	57,37±0,78	52,10±1,25	49,30±0,53	49,70±1,20
	100	54,52±0,56	55,44±1,38	57,37±0,78	54,09±0,53	44,11±1,11	51,90±1,44
<i>M. officinalis</i>	500	63,46±1,27	68,81±0,42	77,88±0,56	57,68±1,21	56,29±0,35	54,89±0,72
	250	63,05±1,23	69,24±0,87	76,09±0,55	59,88±1,25	59,08±0,53	57,29±1,21
	100	67,22±0,63	70,15±0,87	76,41±0,26	54,89±1,21	54,49±0,60	50,10±1,06
<i>M. piperita</i>	500	59,59±0,74	60,73±0,03	65,27±1,22	53,42±1,10	57,62±0,66	62,91±1,01
	250	62,29±0,32	64,38±0,19	64,80±0,46	49,45±1,17	51,66±1,01	54,53±1,10
	100	57,55±0,29	61,08±0,63	63,01±0,75	50,55±0,58	52,76±0,58	52,98±0,38
<i>O. basilicum</i>	500	71,82±0,75	85,87±0,12	90,52±0,13	61,37±1,17	64,24±1,67	52,32±0,66
	250	71,63±0,38	85,98±0,95	89,96±0,50	58,50±0,58	60,71±1,10	49,01±0,66
	100	71,81±0,62	87,57±1,14	89,30±0,21	56,29±1,01	51,88±1,55	56,07±0,96
<i>O. majorana</i>	500	52,64±0,33	53,13±0,99	68,17±1,18	59,40±1,07	62,18±0,98	60,04±1,13
	250	48,95±1,24	52,86±0,60	56,04±0,77	57,91±0,93	63,03±0,57	57,91±1,54
	100	49,34±1,57	53,06±0,45	60,88±1,45	54,27±0,43	59,19±0,43	56,62±0,77
<i>O. vulgare</i>	500	60,77±1,28	67,45±1,13	75,81±2,72	63,03±0,43	64,53±1,30	58,55±1,30
	250	58,32±0,58	68,81±2,16	70,18±0,69	62,82±1,70	63,46±0,37	59,62±0,74
	100	59,03±0,47	67,88±0,34	73,55±1,82	60,90±1,33	61,11±0,43	58,55±1,40
<i>R. officinalis</i>	500	65,98±1,19	72,48±0,87	66,23±0,27	60,31±1,58	66,89±0,88	66,01±0,58
	250	64,32±0,21	71,96±0,67	65,67±1,27	60,09±0,79	61,40±1,10	59,65±1,58
	100	66,09±0,34	74,47±0,46	71,07±0,45	57,02±1,16	56,36±0,58	60,96±0,79
<i>S. officinalis</i>	500	78,20±0,53	79,69±0,51	78,16±0,53	63,60±0,58	65,13±0,38	59,65±0,79
	250	63,76±1,10	81,78±0,43	78,77±0,42	61,84±0,66	63,60±0,58	55,92±1,00
	100	73,13±1,37	74,04±1,22	78,88±0,28	57,68±1,54	58,33±1,33	56,14±0,58

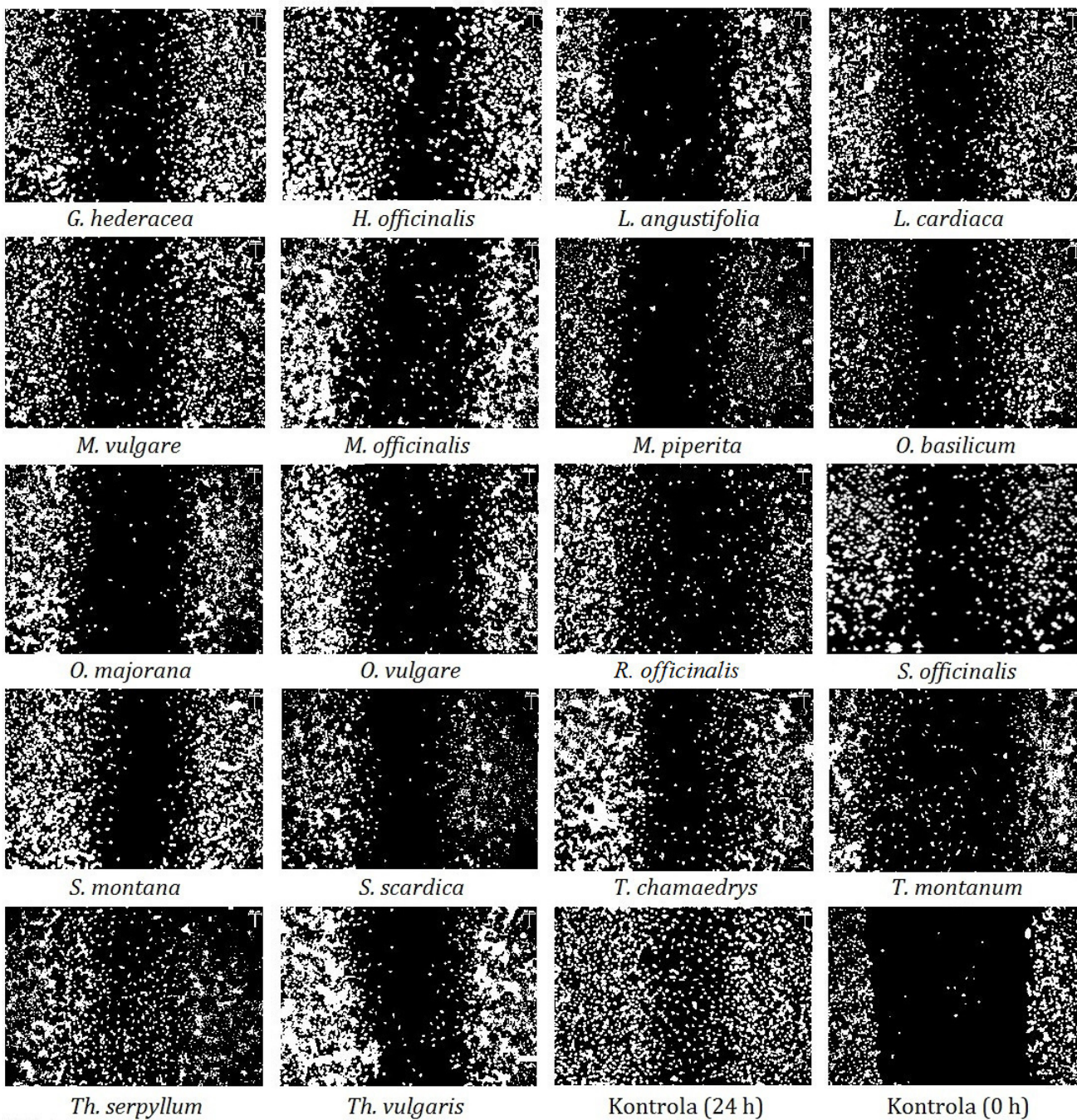
Biljna vrsta i koncentracija ($\mu\text{g/mL}$)	Acetilholinesteraza			Tirozinaza			
	metanolni	etanolni	vodeni	metanolni	etanolni	vodeni	
<i>S. montana</i>	500	70,47 \pm 0,35	69,85 \pm 0,20	71,55 \pm 0,73	62,28 \pm 1,22	60,53 \pm 1,00	61,18 \pm 0,66
	250	67,09 \pm 0,85	67,62 \pm 0,43	73,77 \pm 0,90	76,97 \pm 0,38	60,09 \pm 0,44	59,65 \pm 0,79
	100	67,19 \pm 0,47	71,46 \pm 0,78	73,00 \pm 0,43	55,70 \pm 0,79	58,77 \pm 0,22	60,53 \pm 0,66
<i>S. scardica</i>	500	73,53 \pm 0,36	76,63 \pm 0,16	82,91 \pm 0,74	58,55 \pm 0,66	55,26 \pm 0,66	58,77 \pm 1,33
	250	77,89 \pm 0,20	78,26 \pm 0,55	81,95 \pm 0,98	57,89 \pm 0,76	53,51 \pm 0,22	59,65 \pm 1,44
	100	78,20 \pm 0,85	80,70 \pm 1,35	83,06 \pm 1,04	62,06 \pm 0,58	59,43 \pm 0,88	59,65 \pm 1,16
<i>T. chamaedrys</i>	500	47,49 \pm 0,75	54,79 \pm 0,67	59,97 \pm 0,48	61,15 \pm 1,08	58,49 \pm 0,89	61,15 \pm 0,74
	250	51,71 \pm 0,60	57,63 \pm 0,54	60,86 \pm 0,29	59,51 \pm 0,71	58,90 \pm 0,71	60,12 \pm 1,42
	100	50,78 \pm 1,29	59,49 \pm 0,47	60,91 \pm 0,75	61,35 \pm 0,94	59,71 \pm 1,43	64,01 \pm 0,74
<i>T. montanum</i>	500	61,79 \pm 0,23	62,48 \pm 0,45	70,72 \pm 0,74	64,01 \pm 0,89	55,01 \pm 1,43	62,58 \pm 1,28
	250	60,17 \pm 0,36	66,23 \pm 0,49	72,83 \pm 0,54	63,39 \pm 1,34	59,92 \pm 0,20	61,15 \pm 0,54
	100	64,55 \pm 0,19	68,26 \pm 0,54	71,66 \pm 0,28	70,55 \pm 0,35	60,74 \pm 0,94	63,39 \pm 0,89
<i>Th. serpyllum</i>	500	56,04 \pm 1,50	61,20 \pm 0,42	71,07 \pm 0,52	64,26 \pm 0,72	64,86 \pm 1,12	63,65 \pm 0,53
	250	56,90 \pm 0,80	63,11 \pm 1,15	71,27 \pm 0,61	62,45 \pm 0,53	64,06 \pm 0,53	60,84 \pm 0,60
	100	60,56 \pm 0,69	65,91 \pm 0,34	70,06 \pm 1,01	63,25 \pm 1,04	65,86 \pm 0,20	62,45 \pm 1,06
<i>Th. vulgaris</i>	500	51,06 \pm 0,54	64,96 \pm 0,74	71,61 \pm 1,54	63,65 \pm 0,53	66,27 \pm 0,60	67,47 \pm 1,20
	250	62,18 \pm 0,26	63,31 \pm 0,80	68,61 \pm 0,65	69,68 \pm 0,72	67,27 \pm 1,06	60,64 \pm 1,57
	100	53,57 \pm 0,38	62,31 \pm 0,53	69,69 \pm 1,32	67,27 \pm 1,57	60,64 \pm 1,57	64,46 \pm 1,20
Pozitivne kontrole	Acetilholinesteraza			Tirozinaza			
Galantamin	500	76,00 \pm 0,46			-		
	250	60,97 \pm 1,06			-		
	100	40,69 \pm 1,58			-		
Kojična kiselina	500	-			49,26 \pm 1,12		
	250	-			45,59 \pm 1,12		
	100	-			25,33 \pm 1,87		

Acetilholinesteraza – procenat (%) inhibicije aktivnosti acetilholinesteraze

Tirozinaza – procenat (%) inhibicije aktivnosti tirozinaze

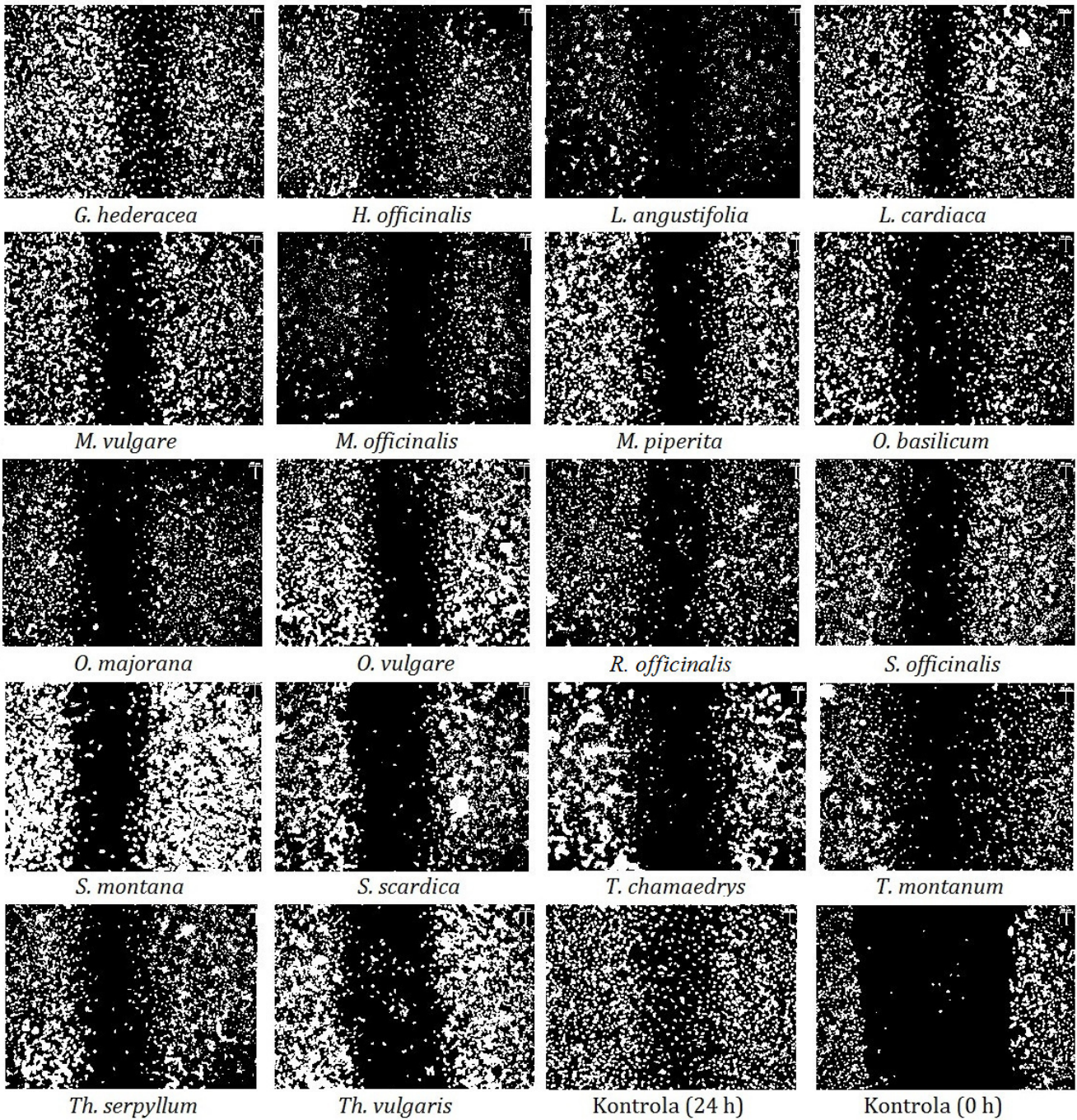
PRILOG 9

Obradene mikrofografije ogrebotina u monosloju MRC-5 ćelija tretiranih metanolnim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae.



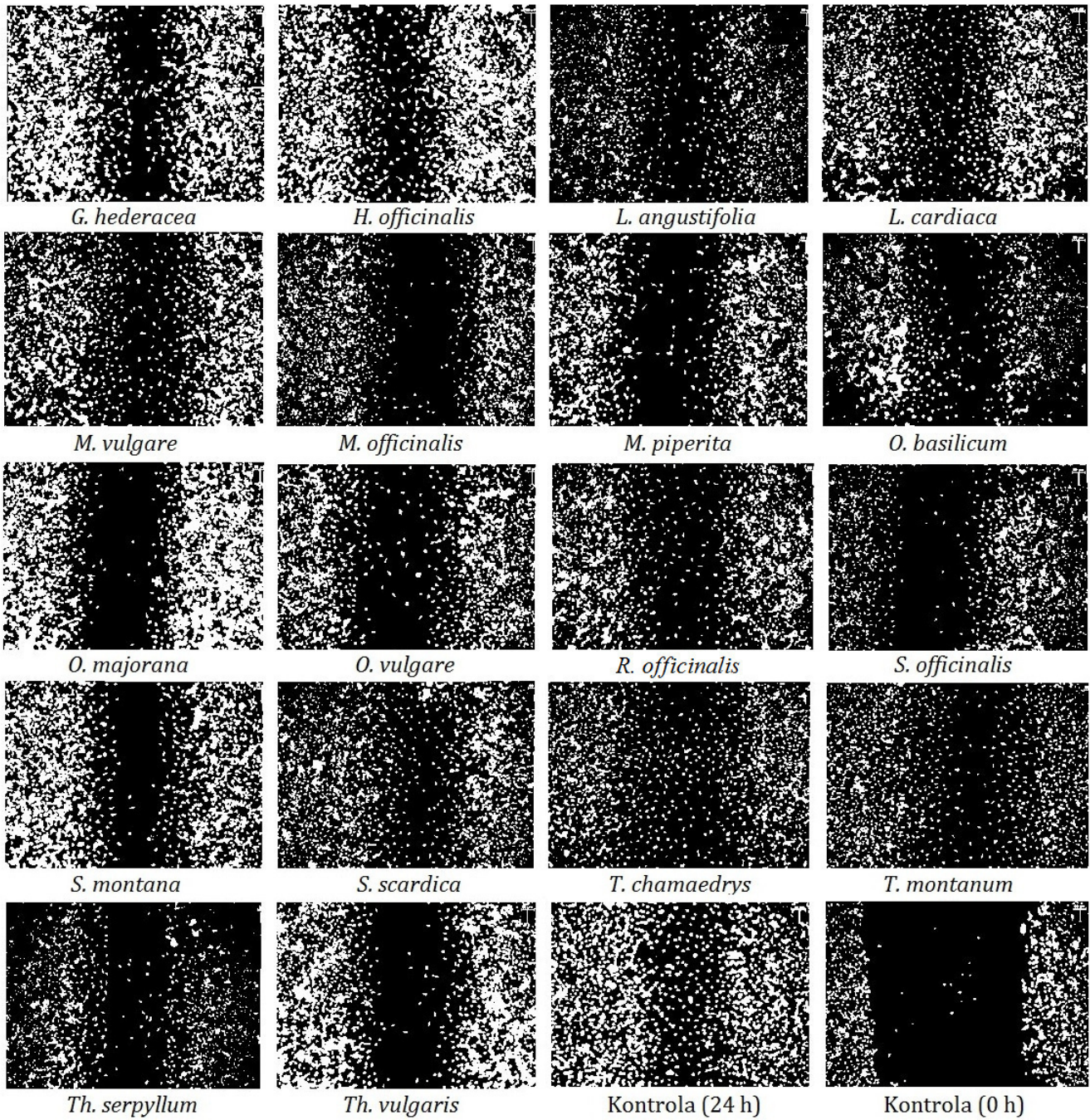
PRILOG 10

Obradene mikrografije ogrebotina u monosloju MRC-5 ćelija tretiranih etanolnim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae.



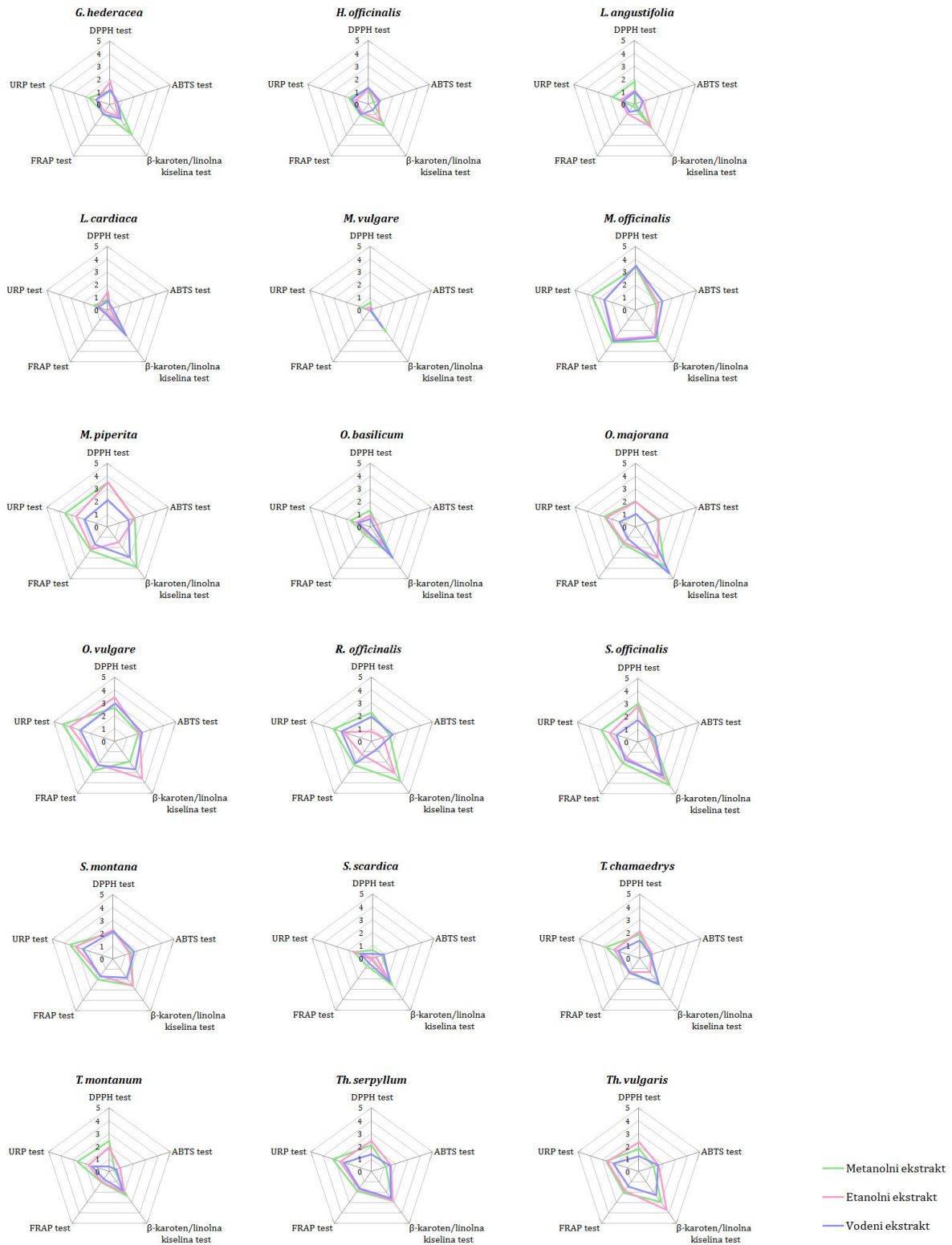
PRILOG 11

Obradene mikrografije ogrebotina u monosloju MRC-5 ćelija tretiranih vodenim ekstraktima biljaka familije Lamiaceae.



PRILOG 12

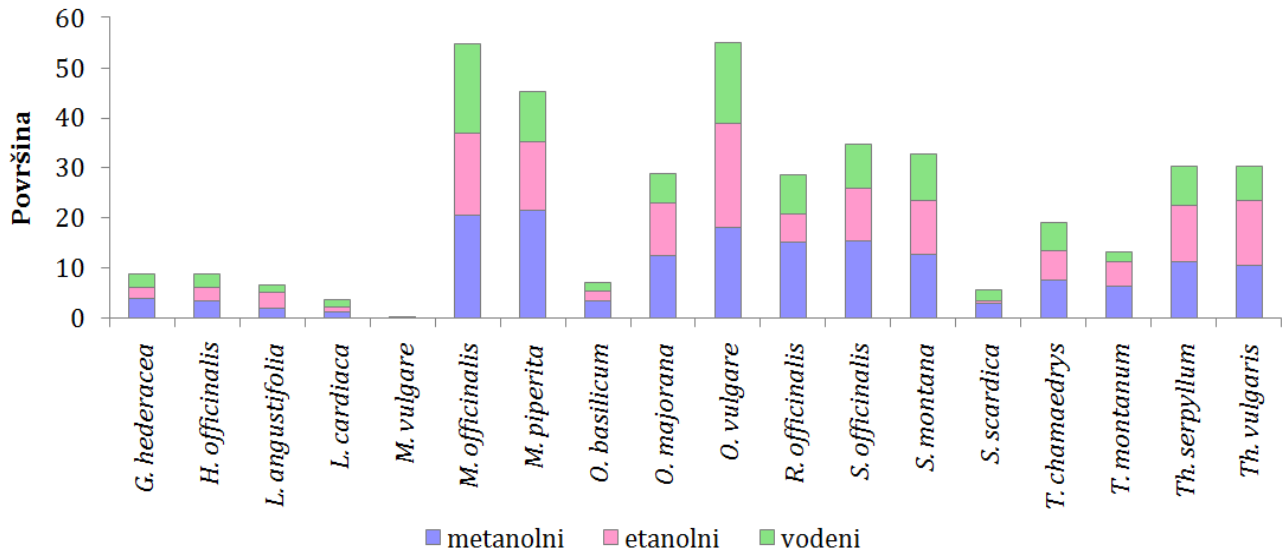
Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata antioksidativne aktivnosti ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.



PRIOLOG 13

Površina radijalnih dijagrama prikazanih u Prilogu 12.

Veća površina ukazuje na veći antioksidativni potencijal ispitanih ekstrakata.



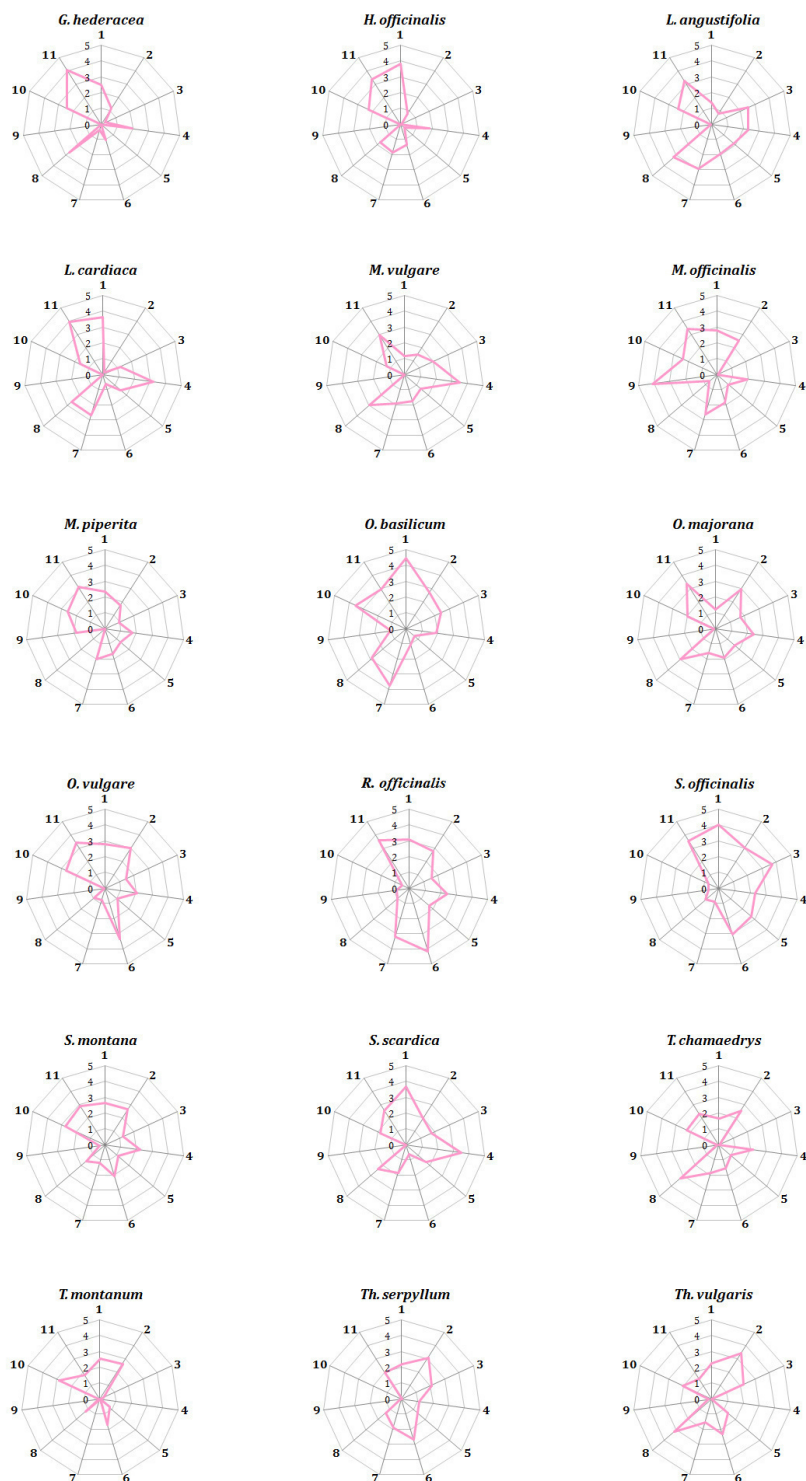
PRILOG 14

IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara za antioksidativnu aktivnost ekstrakata.

Biljna vrsta	Ekstrakt		
	metanolni	etanolni	vodeni
<i>G. hederacea</i>	3,90	2,31	2,53
<i>H. officinalis</i>	3,47	2,66	2,57
<i>L. angustifolia</i>	1,98	3,11	1,47
<i>L. cardiaca</i>	1,15	1,09	1,38
<i>M. vulgare</i>	0,27	0,09	0,01
<i>M. officinalis</i>	20,50	16,39	17,86
<i>M. piperita</i>	21,67	13,61	9,98
<i>O. basilicum</i>	3,49	1,97	1,59
<i>O. majorana</i>	12,40	10,51	6,00
<i>O. vulgare</i>	18,13	20,80	16,16
<i>S. officinalis</i>	15,47	10,55	8,86
<i>S. rosmarinus</i>	15,09	5,78	7,70
<i>S. montana</i>	12,78	10,79	9,36
<i>S. scardica</i>	3,04	0,49	2,00
<i>T. chamaedrys</i>	7,48	6,00	8,73
<i>T. montanum</i>	6,43	4,90	1,94
<i>Th. serpyllum</i>	11,22	11,24	8,03
<i>Th. vulgaris</i>	10,46	13,05	6,75

PRILOG 15

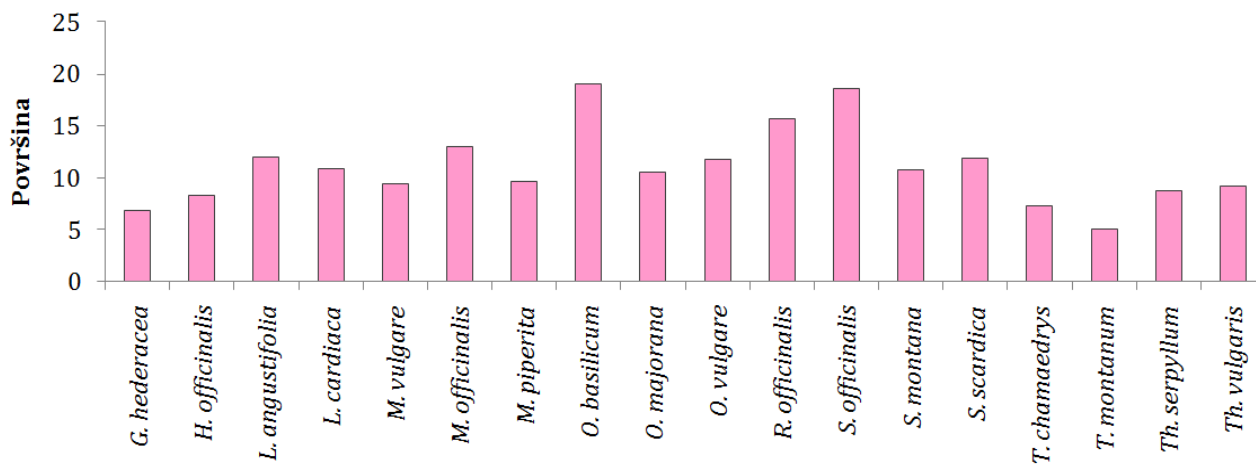
Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata imunomodulatorne aktivnosti etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.



PRILOG 16

Površina radijalnih dijagrama prikazanih u Prilogu 15.

Veća površina ukazuje na veći imunomodulatorni potencijal ispitanih etanolnih ekstrakata.



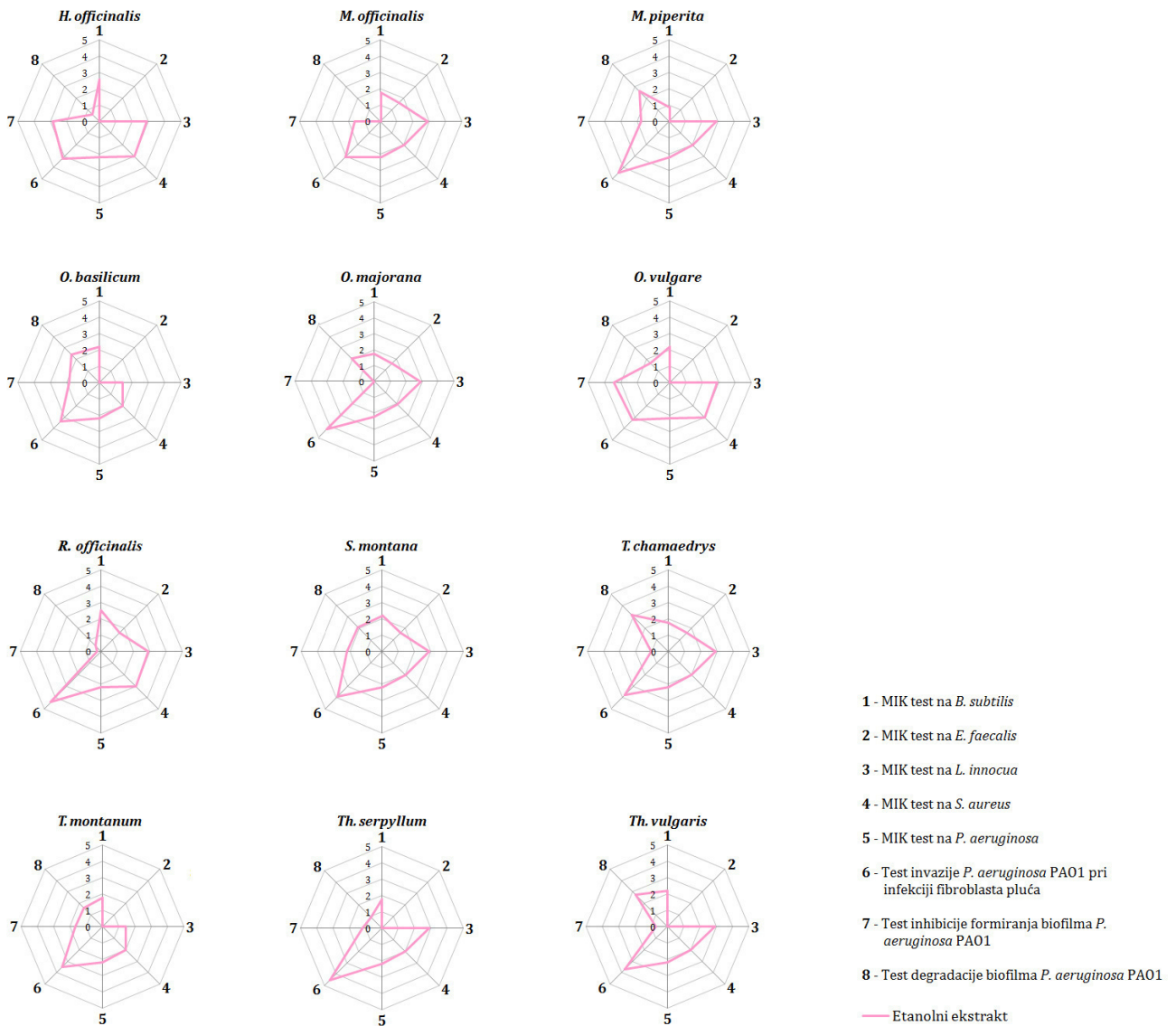
PRILOG 17

IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara za imunomodulatornu aktivnost etanolnih ekstrakata.

Biljna vrsta	Etanolni ekstrakt
<i>G. hederacea</i>	6,83
<i>H. officinalis</i>	8,30
<i>L. angustifolia</i>	12,00
<i>L. cardiaca</i>	10,86
<i>M. vulgare</i>	9,45
<i>M. officinalis</i>	12,96
<i>M. piperita</i>	9,68
<i>O. basilicum</i>	19,10
<i>O. majorana</i>	10,54
<i>O. vulgare</i>	11,77
<i>S. officinalis</i>	18,63
<i>S. rosmarinus</i>	15,70
<i>S. montana</i>	10,71
<i>S. scardica</i>	11,85
<i>T. chamaedrys</i>	7,25
<i>T. montanum</i>	5,03
<i>Th. serpyllum</i>	8,76
<i>Th. vulgaris</i>	9,24

PRILOG 18

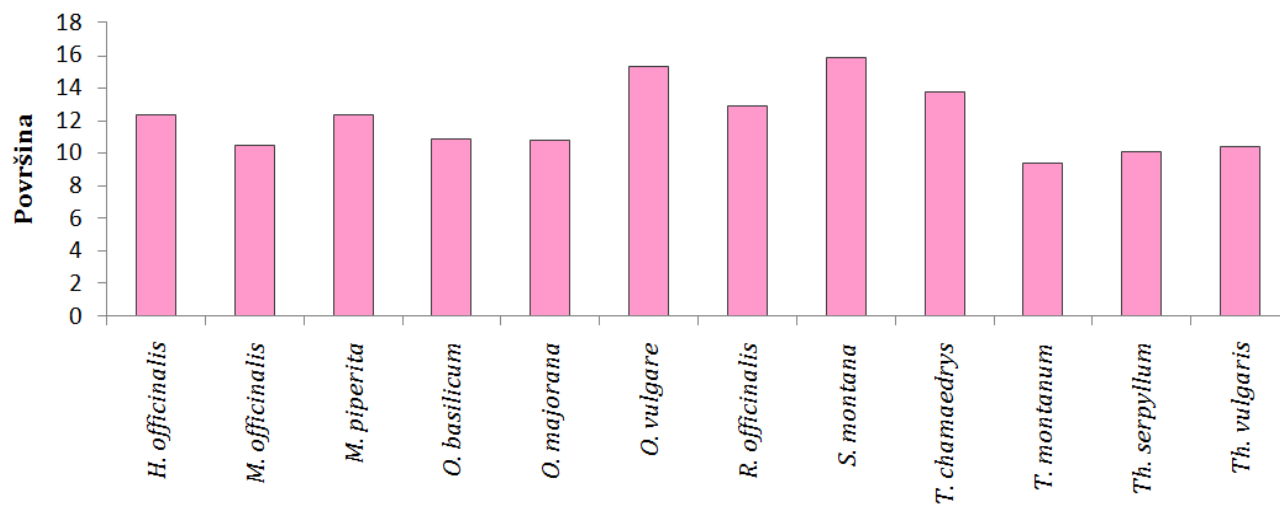
Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata antibakterijske aktivnosti etanolnih ekstrakata odabranih predstavnika porodice Lamiaceae.



PRILOG 19

Površina radijalnih dijagrama prikazanih u Prilogu 18.

Veća površina ukazuje na veći antibakterijski potencijal ispitanih etanolnih ekstrakata.



PRILOG 20

IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara za antibakterijsku aktivnost etanolnih ekstrakata.

Biljna vrsta	Etanolni ekstrakt
<i>H. officinalis</i>	12,40
<i>M. officinalis</i>	10,47
<i>M. piperita</i>	12,37
<i>O. basilicum</i>	10,91
<i>O. majorana</i>	10,84
<i>O. vulgare</i>	15,34
<i>R. officinalis</i>	12,90
<i>S. montana</i>	15,90
<i>T. chamaedrys</i>	13,76
<i>T. montanum</i>	9,41
<i>Th. serpyllum</i>	10,13
<i>Th. vulgaris</i>	10,39

PRILOG 21

IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara za biološku aktivnost ekstrakata.

Biljna vrsta	Ekstrakt		
	metanolni	etanolni	vodeni
<i>G. hederacea</i>	4,31	9,32	4,38
<i>H. officinalis</i>	4,07	10,86	3,55
<i>L. angustifolia</i>	5,46	9,46	2,21
<i>L. cardiaca</i>	4,85	10,85	1,85
<i>M. vulgare</i>	2,08	8,51	1,22
<i>M. officinalis</i>	15,47	19,50	13,29
<i>M. piperita</i>	14,78	15,26	12,22
<i>O. basilicum</i>	6,86	8,32	4,75
<i>O. majorana</i>	13,98	17,30	6,99
<i>O. vulgare</i>	15,24	22,21	13,10
<i>R. officinalis</i>	17,21	17,76	7,21
<i>S. officinalis</i>	13,50	22,96	9,19
<i>S. montana</i>	14,27	17,02	10,55
<i>S. scardica</i>	10,80	11,91	4,83
<i>T. chamaedrys</i>	9,64	12,71	8,26
<i>T. montanum</i>	8,46	10,59	6,01
<i>Th. serpyllum</i>	11,58	15,49	11,76
<i>Th. vulgaris</i>	12,37	15,13	9,76

PRILOG 22

IBR vrednosti dobijene na osnovu standardizovanih parametara za biološku aktivnost etanolnih ekstrakata.

Biljna vrsta	Etanolni ekstrakt
<i>G. hederacea</i>	5,68
<i>H. officinalis</i>	7,52
<i>L. angustifolia</i>	9,18
<i>L. cardiaca</i>	8,58
<i>M. vulgare</i>	7,57
<i>M. officinalis</i>	13,65
<i>M. piperita</i>	12,53
<i>O. basilicum</i>	9,87
<i>O. majorana</i>	13,40
<i>O. vulgare</i>	15,96
<i>R. officinalis</i>	14,06
<i>S. officinalis</i>	17,44
<i>S. montana</i>	13,26
<i>S. scardica</i>	9,41
<i>T. chamaedrys</i>	10,12
<i>T. montanum</i>	7,19
<i>Th. serpyllum</i>	11,69
<i>Th. vulgare</i>	11,74

PRILOG 23

Spisak skraćenica

ABTS – 2,2'-azino**bis**-(3-etil**benzotiazolin**-6-sulfonska kiselina)
AChE – acetilholinesteraza
ORAC – engl. *oxygen radical absorbance capacity*
AK – askorbinska kiselina
ANOVA – engl. *Analysis of Variance*
ATCC – engl. *American Type Culture Collection*
BHA –butil-hidroksianizol
BHI – engl. *Brain-Heart infusion*
BHT –butil-hidroksitoluen
BV2 – normalna ćelijska linija mikroglije miša
Caco-2 – ćelijska linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma
CFU – engl. *Colony-Forming Unit*
CNS – centralni nervni sistem
COX-2 – engl. *Cyclooxygenase-2*
ćel. – ćelija
DAD – višekanalni detektor (engl. *Diode-Array Detector*)
DLD1– ćelijska linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma
DMEM – engl. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO – dimetilsulfoksid
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina
DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DT1 – dijabetes tipa 1
DT2 – dijabetes tipa 2
E – ekvivalent
ECACC – engl. *European Collection of Authenticated Cell Cultures*
EDTA – etilendiamin tetraacetatna kiselina
EtOH – etanol
FBS – engl. *Fetal Bovine Serum*
Fe(II)– fero jon
Fe(III) – feri jon
FRAP – engl. *Ferric-Reducing Ability of Plasma*
Gh – *Glechoma hederacea*
GK – galna kiselina
GSK3β – engl. *Glycogen Synthase Kinase 3β*
H₂O₂ – vodonik peroksid
HCT-116 – ćelijska linija humanog kolorektalnog tumora
Ho – *Hyssopus officinalis*

HPLC – tečna hromatografija pod visokim pritiskom (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*)

HT-29 – ćelijska linija humanog kolorektalnog adenokarcinoma

IBR – engl. *Integrated Biomarker Response*

IC₅₀ – Koncentracija uzorka koja inhibira 50% radikala/aktivnosti enzima/oštećenja DNK/rasta ćelija

IL – interleukin

iNOS – inducibilna NOS

INS-1 ćelije – engl. *Insulin-secreting cell line 1*

IPLB – Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”

IR – engl. *Induction Rate*

iRNK – informaciona RNK

IUPAC – engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*

JAR – ćelijska linija humanog horiokarcinoma

K – kvercetin

KK – kafena kiselina

Ku – kumarin

LA – engl. *Luria Agar*

La – *Lavandula angustifolia*

LB – engl. *Luria Broth*

Lc – *Leonurus cardiaca*

L-DOPA – 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin

LMP – agarozna niske tačke topljenja (engl. *Low Melting Point*)

LPS – lipopolisaharid

LS174 – ćelijska linija humanog kolorektalnog kancera

MBK – minimalna baktericidna koncentracija

MetOH – metanol

MHB – engl. *Mueller-Hintonbroth*

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Mo – *Melissa officinalis*

MOI – engl. *Multiplicity of Infection*

Mp – *Mentha piperita*

MRC-5 – normalna ćelijska linija humanih fibroblasta pluća

MRSA – meticilin-rezistentni soj *Staphylococcus aureus*

MTT – engl. *Methyl-Thiazol-Tetrazolium*

Mv – *Marrubium vulgare*

n.v. – nadmorska visina

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

NBT – engl. *Nitro Blue Tetrazolium*

nd – nije detektovano

NF-κB – engl. *Nuclear Factor κ-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells*

NLRP3 – engl. *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*
NMP – agarozna normalne tačke topljenja (engl. *Normal Melting Point*)
NO – azot oksid
NO· – radikal azot oksida
NOS – engl. *Nitric Oxide Synthases*
O₂⁻ – superoksidni jon
Ob – *Ocimum basilicum*
OD – optička gustina (engl. *Optical Density*)
OH· – hidroksilni jon
Om – *Origanum majorana*
ONOO· – peroksinitrit
Ov – *Origanum vulgare*
p vrednost – vrednost verovatnoće (engl. *probability value*)
p.n.e. – pre nove ere
p65 – transkripcioni faktor p65
PBS – engl. *Phosphate-Buffered Saline*
pH- mera aktivnosti jona vodonika
pNPG – p-nitrofenil-β-D-glukopiranozid
r – Pirsonov koeficijent korelacije
R – rutin
RAW 264.7 – normalna ćelijska linija makrofaga miša
RNK – ribonukleinska kiselina
RVA – reaktivni oblici azota
RVK – reaktivni oblici kiseonika
RPMI – engl. *Roswell Park Memorial Institute*
SAD – Sjedinjene Američke Države
sar. – saradnici
SARS-CoV-2 – engl. *Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus-2*
SCGE – engl. *Single Cell Gel Electrophoresis*
SDS – natrijum dodecil sulfat
SH-SY5Y – ćelijska linija neurona miša
s.l. – lat. *sensu lato*
Sm – *Satureja montana*
So – *Salvia officinalis*
Sr – *Salvia rosmarinus*
Ss – *Sideritis scardica*
SW-480 – ćelijska linija humanog tumora kolona
SZO – Svetska Zdravstvena Organizacija
T25 flask – flask površine 25 cm²
T75 flask – flask površine 75 cm²
T84 – ćelijska linija humanog tumora kolona

Tc – *Teucrium chamaedrys*

Ths – *Thymus serpyllum*

Thv – *Thymus vulgaris*

TI – intenzitet repa komete (engl. *Tail Intensity*)

Tm – *Teucrium montanum*

TNF- α – engl. *Tumor Necrosis Factor A*

LDL – lipoprotein niske gustine

HDL – lipoprotein visoke gustine

TPTZ – 2,4,6-tripiridil-s-triazin

tr – tragovi

UK – ursolna kiselina

URP – ukupni redukциони potencijal

UV – engl. *Ultraviolet*

vs. – u odnosu na (engl. *versus*)

w/v – engl. *weight/volume*

PRILOG 24

Spisak slika

Slika 1. <i>Bacillus subtilis</i> (Ehrenberg) Cohn.	21
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bacillus_subtilis_natto_colonies.png , modifikovano);	
b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom (izvor: https://www.flickr.com/photos/23925401@N06/5558175110/).	
Slika 2. <i>Enterococcus faecalis</i> (Andrewes & Horder) Schleifer & Kilpper-Balz.	22
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1417959903/);	
b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom (izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enterococcus_faecalis_SEM_01.png , modifikovano).	
Slika 3. <i>Listeria monocytogenes</i> (Murray i sar.) Pirie.	23
a) izgled kulture na hromatogenoj selektivnoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/76475368@N04/6847656016/ , modifikovano);	
b) bakterijske ćelije posmatrane mikroskopom (izvor: https://www.flickr.com/photos/avp1990/7864289590/).	
Slika 4. <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach.	23
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50039461832/);	
b) bakterijske ćelije okružene humanim limfocitima, posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Staphylococcus_aureus_bacteria_escape.jpg).	
Slika 5. <i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani & Chalmers.	24
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/13930485@N05/1418842994/);	
b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: https://www.flickr.com/photos/nihgov/24661308922/).	
Slika 6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Schroeter) Migula.	25
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50051412277/in/photostream/ , modifikovano);	
b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pseudomonas.jpg).	
Slika 7. <i>Salmonella typhimurium</i> (Loeffler) Castellani & Chalmers.	25
a) izgled kulture na hranljivoj podlozi (izvor: https://www.flickr.com/photos/therubinlab/50044581602/);	
b) bakterijske ćelije posmatrane skenirajućim elektronskim mikroskopom (izvor: https://www.flickr.com/photos/microbeworld/5807837573/).	
Slika 8. Morfološke karakteristike biljke <i>Glechoma hederacea</i> L.	26
Izvor: https://www.flickr.com/photos/biodivlibrary/27163044570/ .	
Slika 9. Morfološke karakteristike biljke <i>Hyssopus officinalis</i> L.	27
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:256_Hyssopus_officinalis_L.jpg .	

Slika 10. Morfološke karakteristike biljke <i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	28
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lavandula_angustifolia - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-087.jpg .	
Slika 11. Morfološke karakteristike biljke <i>Leonurus cardiaca</i> L.	29
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:263_Leonurus_cardiaca_L.jpg .	
Slika 12. Morfološke karakteristike biljke <i>Marrubium vulgare</i> L.	30
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Marrubium_vulgare - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-224.jpg .	
Slika 13. Morfološke karakteristike biljke <i>Melissa officinalis</i> L.	31
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Melissa_officinalis - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-094.jpg .	
Slika 14. Morfološke karakteristike biljke <i>Mentha × piperita</i> L.	32
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mentha_%C3%97_piperita - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-095.jpg .	
Slika 15. Morfološke karakteristike biljke <i>Ocimum basilicum</i> L.	33
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ocimum_basilicum Blanco2.407-cropped.jpg .	
Slika 16. Morfološke karakteristike biljke <i>Origanum majorana</i> L.	34
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Icones_plantarum_medico-oeconomico- technologicarum_cum_earum_fructus_ususque_descriptione_%3D_(Tab.122)_%288096970445%29.jpg .	
Slika 17. Morfološke karakteristike biljke <i>Origanum vulgare</i> L.	35
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:254_Origanum_vulgare_L.jpg .	
Slika 18. Morfološke karakteristike biljke <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	36
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rosmarinus_officinalis - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-258.jpg .	
Slika 19. Morfološke karakteristike biljke <i>Salvia officinalis</i> L.	37
Izvor: https://www.flickr.com/photos/biodivlibrary/6972241336/ .	
Slika 20. Morfološke karakteristike biljke <i>Satureja montana</i> L.	38
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Satureja_montana - Deutschlands flora in abbildungen nach der natur - vol. 20 - t. 17.jpg .	
Slika 21. <i>Sideritis scardica</i> L.	39
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Sideritis_scardica.jpg .	
Slika 22. Morfološke karakteristike biljke <i>Teucrium chamaedrys</i> L.	40
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Teucrium_chamaedrys - English botany, or, Coloured figures of British plants - vol. 7 - t. 1094.jpg .	
Slika 23. Morfološke karakteristike biljke <i>Teucrium montanum</i> L.	41
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Teucrium_montanum_0074.jpg .	
Slika 24. Morfološke karakteristike biljke <i>Thymus serpyllum</i> L.	42
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:255_Thymus_serpyllum_L.jpg .	
Slika 25. Morfološke karakteristike biljke <i>Thymus vulgaris</i> L.	43
Izvor: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Thymus_vulgaris - K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-271.jpg .	

Slika 26. Šema popunjavanja bunarića u gelu za elektroforezu.....	63
Slika 27. Šema za dodavanje pripremljene reakcione smeše za ispitivanje genoprotektivne aktivnosti na mikrotitracionu ploču.....	64
Slika 28. Karakterističan oblik MRC-5 ćelija u komet testu.....	66
foto: M. M. Oalde Pavlović	
Slika 29. Šema organizacije uzoraka za komet test na mikroskopskoj pločici.....	67
Slika 30. Reprezentativne slike nukleoida HCT-116 ćelija.....	156
foto: M. M. Oalde Pavlović	
Slika 31. Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata bioloških aktivnosti ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	193
Slika 32. Radijalni grafici dobijeni IBR analizom rezultata svih ispitivanih bioloških aktivnosti etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	195

PRILOG 25

Spisak tabela

Tabela 1. Literaturni pregled nazastupljenijih fenolnih kiselina u biljkama familije Lamiaceae.....	9
Tabela 2. Literaturni pregled nazastupljenijih flavonoida u biljkama familije Lamiaceae.....	10
Tabela 3. Biljne vrste korišćene u eksperimentalnom radu i brojevi vaučera herbara IPLB....	48
Tabela 4. Bakterijski sojevi korišćeni u eksperimentalnom radu.....	54
Tabela 5. Prinos ekstrakata ispitivanih predstavnika familije Lamiaceae.....	78
Tabela 6. Fenolne kiseline detektovane pomoću HPLC-DAD analize u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	86
Tabela 7. Flavonoidi detektovani uz pomoć HPLC-DAD analize u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	87
Tabela 8. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije ekstrakata i pozitivnih kontrola za ispitane bakterije.....	166
Tabela 9. Minimalne inhibitorne (MIK) i baktericidne (MBK) koncentracije ekstrakata i pozitivne kontrole za soj <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1.....	167
Tabela 10. Korelacija spektrofotometrijski određenog hemijskog sastava i fenolnih jedinjenja identifikovanih HPLC-DAD analizom sa testovima za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata.....	180
Tabela 11. Međusobna korelacija testova za određivanje biološke aktivnosti ekstrakata.....	185

PRILOG 26

Spisak grafika

Grafik 1. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	80
Grafik 2. Sadržaj ukupnih fenolnih kiselina u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	81
Grafik 3. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	81
Grafik 4. Sadržaj ukupnih flavonola u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	82
Grafik 5. Sadržaj ukupnih kumarina u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	83
Grafik 6. Sadržaj ukupnih triterpena u ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	84
Grafik 7. Inhibicija DPPH radikala ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	103
Grafik 8. Inhibicija ABTS radikala ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	104
Grafik 9. Inhibicija obezbojavanja β -karotena ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	105
Grafik 10. Ukupni antioksidativni kapacitet ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae meren FRAP testom.....	106
Grafik 11. Ukupni redukcionni potencijal ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	106
Grafik 12. Genoprotektivna aktivnost ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	121
a) metanolni ekstrakti	
b) etanolni ekstrakti	
c) vodeni ekstrakti	
Grafik 13. Genoprotektivna aktivnost ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae predstavljena kao IC ₅₀ vrednost ($\mu\text{g/mL}$).....	122
Grafik 14. Antigenotoksična aktivnost ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u prokariotskom modelu.....	125
a) metanolni ekstrakti	
b) etanolni ekstrakti	
c) vodeni ekstrakti	
Grafik 15. Antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.....	126
Grafik 16. Antigenotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.....	127
Grafik 17. Antigenotoksična aktivnost vodenih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae ispitana u eukariotskom modelu.....	128

Grafik 18. Inhibicija aktivnosti enzima α -glukozidaze ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	130
Grafik 19. Inhibicija aktivnosti enzima acetilholinesteraze ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	138
Grafik 20. Inhibicija aktivnosti enzima tirozinaze ekstraktima predstavnika familije Lamiaceae.....	138
Grafik 21. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen MTT testom.....	139
Grafik 22. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen NBT testom.....	140
Grafik 23. Antineuroinflamatorni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae određen Grisovim testom.....	140
Grafik 24. Neuroprotektivni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae.....	141
Grafik 25. Antiproliferativni efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u MTT testu.....	152
Grafik 26. Antitumorski efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u NBT testu.....	153
Grafik 27. Antitumorski efekat etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae u Grisovom testu.....	154
Grafik 28. Genotoksična aktivnost etanolnih ekstrakata predstavnika familije Lamiaceae na HCT-116 ćelijsku liniju.....	155
Grafik 29. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na invaziju <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 pri infekciji ćelija fibroblasta pluća.....	164
Grafik 30. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na formiranje biofilma.....	167
Grafik 31. Uticaj etanolnih ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na već formirani biofilm..	168
Grafik 32. Uticaj metanolnih (a), etanolnih (b) i vodenih (c) ekstrakata biljaka familije Lamiaceae na migraciju ćelija fibroblasta pluća.....	178
Grafik 33. Površina radijalnih dijagrama prikazanih na Slici 31.....	194
Grafik 34. Površina radijalnih dijagrama prikazanih na Slici 32.....	196

Biografija

Mariana Oalđe Pavlović je rođena 20.10.1991. u Pančevu. Osnovnu školu „Sveti Georgije“ je završila u Uzdinu kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“, kao i gimnaziju „Mihajlo Pupin“ u Kovačici, a paralelno je završavala i nižu muzičku školu „Jovan Bandur“ u Pančevu.

Studijski program Molekularna biologija i fiziologija Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu upisala je 2010. godine, a diplomirala je 2014. godine sa prosečnom ocenom 8,72. Master akademske studije upisuje 2014. godine na istom studijskom programu, modulu Eksperimentalna botanika Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Studije je završila 2015. godine sa prosečnom ocenom 10,00 nakon što je odbranila master rad pod nazivom „Antioksidativna i antibakterijska aktivnost ekstrakata *Origanum majorana* L.“ sa ocenom 10.

Doktorske akademske studije je upisala 2015. godine na studijskom programu Biologija, modulu Eksperimentalna i primenjena botanika Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 2017. godine zaposlena je na Katedri za morfologiju i sistematiku biljaka Instituta za botaniku i Botaničku baštu „Jevremovac“ Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Mikromorfološka, fitohemijska i molekularna istraživanja – sistematski, ekološki i primenljivi aspekti“ (OI 173029) kao istraživač-pripravnik, a potom od 2019. kao istraživač saradnik. Od 2015. godine kontinuirano učestvuje u izvođenju praktične nastave na predmetu „Anatomija i morfologija biljaka“ i do sada je bila član komisije za odbranu tri master rada.

Autor je 14 naučnih radova publikovanih u časopisima međunarodnog značaja. Učestvovala je na međunarodnim naučnim skupovima sa 31 saopštenjem, kao i na jednom nacionalnom naučnom skupu sa dva saopštenja.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Мариана Оалђе Павловић _____

број индекса _____ Б3013/2015 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биолошка активност екстраката комерцијалних лековитих биљака фамилије Lamiaceae из Србије“.

- 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, 07.05.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Мариана Оалђе Павловић _____

Број индекса _____ Б3013/2015 _____

Студијски програм _____ Биологија _____

Наслов рада „Биолошка активност екстраката комерцијалних лековитих биљака
фамилије Lamiaceae из Србије“

Ментор _____ др Бранка Вуковић-Гачић и др Немања Рајчевић _____

Потписани/а _____ Мариана Оалђе Павловић _____

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, 07.05.2022.

Изјава о коришћењу

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

„Биолошка активност екстракта комерцијалних лековитих биљака фамилије Lamіaceae из Србије“ 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, 07.05.2022.

1. Ауторство - Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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. Дозвољавање умножавања, 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.