



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Тијана Р. Кокерић

**Хемијска карактеризација, антиоксидациона и
антимикробна активност екстракта и етарског уља
корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* L.**

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Ана Барјактаревић, доцент

Крагујевац, 2022. године



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Tijana R. Kokerić

**Chemical characterization, antioxidative and antimicrobial
activities of extracts and essential oil of root and aerial parts
of *Sanguisorba minor* L.**

Doctoral Dissertation

Supervisor: Ana Barjaktarević, PhD, assistant professor

Kragujevac, 2022.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Тијана Кокерић
Датум и место рођења: 15.06.1990. године, Крагујевац
Садашње запослење: Медицински представник, Хемофарм АД
Докторска дисертација
Наслов: Хемијска карактеризација, антиоксидациона и антимикробна активност екстракта и етарског уља корена и хербе биљне врсте <i>Sanguisorba minor L.</i>
Број страница: 90
Број слика: 5
Број библиографских података: 220
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Природно-математички факултет Универзитета у Нишу и Медицински факултет Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Др сци. мед. Ана Барјактаревић, доцент
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 09.10.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације: IV-03-93/11 од 19.02.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Снежана Цупара, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник;
2. Проф. др Милица Нинковић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Физиологија, члан;
3. Проф. др Весна Станков – Јовановић, редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Аналитичка хемија, члан;
4. Проф. др Марина Томовић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан;
5. Доц. др Слађана Павловић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
.
.
Датум одбране дисертације:

Захвалница

Ова докторска дисертација представља круну мог професионалног развоја због чега желим да искористим јединствену прилику и да се искрено захвалим изузетним људима који су допринели да израда ове дисертације буде драгоцено искуство и који су помогли у реализацији исте.

Неизмерну захвалност упућујем својој менторки, *доц. др Ани Барјактаревић*, на посвећености и залагању у току израде ове докторске дисертације. Захваљујем се на указаном поверењу, подршци и уложеном труду и времену у руковођењу овим радом што је допринело да ово истраживање угледа светло дана. Њена несебична помоћ и корисни савети током конципирања, реализације огледа и писања рада били су од непроцењиве вредности. Сарадња са доц. др Аном Барјактаревић је била континуирано задовољство и сматрам је личном привилегијом.

Посебну захвалност дугујем *проф. др Снежани Цупари* која ме је увела у свет науке и која је била главна инспирација на мом професионалном путу. Њене стручне сугестије и корисне смернице, подржане богатим знањем и искуством, унапредиле су ову докторску дисертацију у огромној мери.

Проф. др Милицы Нинковић захваљујем на искуствима у раду на експерименталним моделима животиња, без којих ова теза не би била могућа.

Проф. др Весни Станков - Јовановић захваљујем на омогућеном експерименталном раду и на стручној помоћи и залагању у свим фазама хемијских експеримената који су омогућили израду ове тезе.

Захваљујем се и *доц. др Снежани Бранковић* на корисним смерницама из области ботанике и на помоћи у прикупљању биљног материјала.

Ову дисертацију посвећујем својим најмилијима, оцу Радомиру и мајци Мирјани, сестрама Дијани и Тамари, сунругу Немањи и ћерки Тари. Захвална сам им на неизмерној љубави, подршци и разумевању које су ми пружили током израде ове дисертације.

САЖЕТАК

Циљ ове докторске дисертације био је хемијска карактеризација екстраката и етарског уља, као и испитивање биолошке активности екстраката корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* L. subsp. *muricata* (Rosaceae) која расте на територији Републике Србије. Одређен је укупни садржај фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима и *HPLC* профили одабраних екстраката корена и хербе *S. minor*. Одређен је и хемијски састав етарског уља корена и хербе *S. minor* *GC-MS* и *HS/GC-MS* техником. Антиоксидациона активност екстраката је процењена помоћу пет различитих тестова *in vitro*, као и *in vivo* на анималном моделу сепсе. Антимикробна активност екстраката је испитана против Грам-позитивних бактерија, Грам-негативних бактерија и против једне гљивице микродилуционом методом. Антиинфламацијски ефекат етанолног екстракта корена *S. minor* је процењен *in vitro* на основу инхибиције ензима циклооксигеназа-1 у присуству индометацина. Метанолни, етанолни и ацетонски екстракти су били супериорнији у односу на хлороформске и хексанске екстракте по питању антиоксидационих параметара *in vitro*. Етанолни екстракт корена *S. minor* имао је позитиван утицај на оксидациони стрес у сепси у смислу умањења нивоа прооксидационих параметара (*TBARS*, *NOx*, O_2^-) и повећања антиоксидационе активности супероксид дисмутазе (*SOD*). Исти екстракт је довео до значајне инхибиције активности ензима циклооксигеназа-1 при чему је показао знатно бољи антиинфламацијски ефекат у поређењу са индометацином. Екстракти *S. minor* испољили су антимикробну активност према свим испитиваним сојевима, при чему је интензитет активности варирао у зависности од врсте микроорганизама и типа екстракта. Обећавајући фармаколошки ефекти *S. minor* комплементирају постојећа сазнања и представљају основу за будућа истраживања испитиване биљне врсте.

Кључне речи: *Sanguisorba minor* subsp. *muricata*, антиоксидациона активност, антимикробна активност, антиинфламацијска активност

ABSTRACT

The main objective of this study was to determine biological activities of different extracts of *Sanguisorba minor* L. subsp. *muricata* (Rosaceae) which grows on the territory of the Republic of Serbia. In addition, chemical characterization of investigated extracts and essential oil of *S. minor* was undertaken. The extracts were characterized by total phenolic and flavonoid content and selected plant extracts were analyzed with *HPLC* method. The chemical composition of the essential oil of *S. minor* root and herba was analyzed by *GC-MS* and *HS/GC-MS*. Antioxidant activity of the extracts was estimated by five different assays *in vitro* and *in vivo* in the animal model of sepsis. The antimicrobial potential was tested against Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria and one fungus by micro-well dilution assay. Cyclooxygenase-1 inhibition assessment of *S. minor* ethanol extract was performed in the presence of indomethacin *in vitro*. Methanol, ethanol and acetone extracts exhibited stronger antioxidant activity *in vitro* than chloroform and hexane extracts. Ethanol extract of the *S. minor* root decreased the level of the oxidative stress parameters in an animal model of sepsis (*TBARS*, *NOx*, *O₂⁻*) and increased *SOD* activity. The same extract also induced significant inhibition of *COX-1* activity and showed better antiinflammatory effect than indomethacin. The values for the antimicrobial activity varied depending on the microbial strain and the type of the extract. The promising pharmacological effects of *S. minor* complement the existing knowledge about this species and also could serve as the ground for future research. The future investigation could be focused on *S. minor* as a potential source of natural bioactive compounds in pharmaceutical and medical treatments.

Key words: *Sanguisorba minor* subsp. *muricata*, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity

Садржај

1. УВОД	1
1.1. Биљна врста <i>Sanguisorba minor</i> subsp. <i>muricata</i> Briq. Таксономија, етимологија, распрострањеност	1
1.2. Ботаничке карактеристике <i>S. minor</i> subsp. <i>muricata</i>	1
1.3. Хемијски састав биљака из рода <i>Sanguisorba</i>	2
1.3.1. Полифенолна једињења	3
1.3.2. Остала биоактивна једињења присутна у биљкама из рода <i>Sanguisorba</i>	4
1.4. Хемијски састав корена и хербе <i>S. minor</i>	4
1.5. Хемијски састав етарског уља <i>S. minor</i>	6
1.6. Употреба биљака из рода <i>Sanguisorba</i> у традиционалној медицини	6
1.7. Фармаколошка активност биљака из рода <i>Sanguisorba</i>	7
1.7.1. Антиоксидациона активност	7
1.7.2. Антимикробна активност	8
1.7.3. Антиинфламацијска активност	9
1.7.4. Антиканцерогена активност	10
1.7.5. Хемостатска активност	10
1.7.6. Улога у пролиферацији хематопоеетских ћелија	10
1.7.7. Хипогликемијска активност	11
1.7.8. Неуропротективна активност	11
1.7.9. Антиулцерозна активност	11
1.8. Улога лековитих биљака у терапији инфективних болести	12
1.9. Улога лековитих биљака у лечењу инфламацијских процеса	12
1.10. Оксидациони стрес и сепса: Улога лековитих биљака	13
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	16
2.1. Циљеви истраживања	16
2.2. Хипотезе истраживања	17
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	18
3.1. Биљни материјал	18
3.2. Израда екстраката	18

3.3. Екстракција етарског уља.....	19
3.4. Хемијска карактеризација екстраката и етарског уља корена и хербе <i>S. minor</i>.....	19
3.4.1. Идентификација одабраних полифенолних једињења <i>HPLC</i> техником	19
3.4.2. Хемијска карактеризација етарског уља корена и хербе <i>S. minor</i>	20
3.4.3. Одређивање садржаја укупних фенола.....	21
3.4.4. Одређивање садржаја укупних флавоноида.....	22
3.5. Испитивање антиоксидационе активности екстраката корена и хербе <i>S. minor - in vitro</i>	22
3.5.1. Одређивање способности неутрализације <i>DPPH</i> радикала.....	22
3.5.2. Одређивање способности неутрализације <i>ABTS</i> радикала	23
3.5.3. Одређивање способности редукције бакарног јона из бакар (II) – неокупроин комплекса (<i>CUPRAC</i> тест).....	23
3.5.4. Одређивање способности редукције јона гвожђа у трипиридил триазин комплексу (<i>FRAP</i> тест)	24
3.5.5. Одређивање укупног редукционог потенцијала (<i>TRP</i> тест)	24
3.5.6. Одређивање индекса антиоксидационог потенцијала.....	25
3.6. Испитивање антиоксидационе активности екстракта <i>S. minor - in vivo</i>	25
3.6.1. Експеримент на анималном моделу сепсе.....	25
3.6.2. Експерименталне животиње	25
3.6.3. Експеримент I – орална администрација екстракта.....	26
3.6.4. Експеримент II – интраперитонеална администрација екстракта.....	26
3.6.5. Одређивање параметара оксидационог стреса.....	27
3.7. Испитивање антимикуробне активности екстраката корена и хербе <i>S. minor</i>	29
3.8. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 (<i>COX-1</i>).....	30
3.9. Снага студије и величина узорка.....	31
3.10. Статистичка обрада података	32
4. РЕЗУЛТАТИ	33
4.1. Хемијска карактеризација екстраката и етарског уља корена и хербе <i>S. minor</i>	33
4.1.1. Идентификација одабраних полифенолних једињења <i>HPLC</i> техником	33
4.1.2. Хемијски састав етарског уља <i>S. minor</i>	37

4.1.3. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима	42
4.2. Антиоксидациона активност екстракта хербе и корена <i>S. minor</i> - <i>in vitro</i>	43
4.2.1. Антиоксидациони потенцијал екстракта хербе <i>S. minor in vitro</i>	43
4.2.2. Антиоксидациони потенцијал екстракта корена <i>S. minor in vitro</i>	45
4.3. Ефекти екстракта <i>S. minor</i> на параметре оксидационог стреса на анималном моделу сепсе	48
4.3.1. Ефекти оралне примене екстракта <i>S. minor</i> на параметре оксидационог стреса...	48
4.3.2. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта <i>S. minor</i> на параметре оксидационог стреса	51
4.4. Антимикробна активност екстракта корена и хербе <i>S. minor</i>	55
4.5. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1	57
5. ДИСКУСИЈА	58
6. ЗАКЉУЧЦИ	76
7. ЛИТЕРАТУРА	78

1. УВОД

1.1. Биљна врста *Sanguisorba minor* subsp. *muricata* Briq. Таксономија, етимологија, распрострањеност

Sanguisorba minor subsp. *muricata* Briq. је вишегодишња зељаста биљка која припада породици ружа (Rosaceae), из рода *Sanguisorba* (1). Род *Sanguisorba* обухвата преко тридесет биљних врста, које су више од две хиљаде година заступљене у традиционалној медицини Европе, Кине, Јапана, Кореје итд. (2, 3). Име рода *Sanguisorba* потиче од латинских речи *sanguis* што значи крв и *sorebere* што значи апсорбовати. Име заправо указује на хемостатску активност биљака из овог рода, које се у ту сврху користе у традиционалној медицини од давнина (4). Највише коришћене и испитиване врсте рода *Sanguisorba* јесу *Sanguisorba officinalis* и *Sanguisorba minor* (2, 5).

Sanguisorba minor је заступљена у великом делу Европе и Азије, одакле и води порекло, а касније је пренесена и у Северну Америку (1, 2). Расте и у северној Африци и на Новом Зеланду (6). Такође је распрострањена и у различитим деловима Републике Србије. Врста *S. minor* је позната под народним називима дињица или мала крвара. Ова биљна врста расте на ораницама и сушним ливадама, понекад и на каменитом терену. Може се наћи и у церовим и боровим шумама. Сакупљају се млади листови у рано пролеће, у време цветања читав надземни део биљке док се корен сакупља у јесен (1). Врста *Sanguisorba minor* има неколико подврста: *Minor* (Scop.), *Magnolii* (Spach) Briq. и *Muricata* (Spach ex Bonnier & Layens) (7).

У Табели 1 је приказан таксономски положај биљне подврсте *Sanguisorba minor* subsp. *muricata* (7).

Табела 1. Таксономија *Sanguisorba minor* subsp. *muricata*

Таксономске категорије	Таксони
<i>Regnum</i> (Царство)	<i>Plantae</i>
<i>Phylum</i> (Раздео)	<i>Tracheophyta</i>
<i>Classis</i> (Класа)	<i>Magnoliopsida</i>
<i>Ordo</i> (Ред)	<i>Rosales</i>
<i>Familia</i> (Фамилија)	<i>Rosaceae</i>
<i>Genus</i> (Род)	<i>Sanguisorba</i> L.
<i>Species</i> (Врста)	<i>Sanguisorba minor</i> Scop.
<i>Subspecies</i> (Подврста)	<i>Sanguisorba minor</i> subsp. <i>muricata</i>

1.2. Ботаничке карактеристике *S. minor* subsp. *muricata*

Стабљика ове биљне врсте је сасвим гола и најчешће усправна, а може бити једноставна или разграната. Достиже висину од 25 до 60 *cm*. Ризом је јак, разгранат и одрвећен. Листови су перасти, са 3 - 13 листића, округластог или елиптичног облика. Листићи су дугачки 0,7 - 2 *cm* и 0,5 - 1,5 *cm* широки, тупо до тестерасто назубљени, са сваке стране са 3 до 9 зубаца. Сасвим су голи, светлозелени, а са доње стране тамнији.

Дршке приземних листова често су дуже у односу на петелјке листова стабљике. Залисци су мали, скоро сасвим срасли са лисном дршком (1).

Цветне главице су мале и са дужим дршкама, богате цветовима, до 2 cm дугачке и широке. У доњем делу главице су мушки цветови, у средњем двополни, а у горњем делу главице најчешће чисто женски. Цветови се отварају од доњег дела главице навише. Грађени су од зелене чашице, често црвенкасто орошене, а после цветања њени листићи опадају. Хипанцијум је мрежасто наборан и четвороугласт, док нектарије недостају. Прашника има 10 - 30, у двополним цветовима најчешће 1 - 4, док их у женским нема уопште. Плод је четвороугласт, ивице су оштре, а по површини се налазе неправилне и удубљене јамице (1, 8).



Слика 1. *Sanguisorba minor* subsp. *muricata*

1.3. Хемијски састав биљака из рода *Sanguisorba*

Sanguisorba врсте представљају богате изворе секундарних метаболита са значајним лековитим својствима. Присуство тих бројних фармаколошки активних једињења у корелацији је са применом *Sanguisorba* биљака у традиционалној медицини у терапији леукопеније, хеморагије, опекотина и инфламације.

Више од 270 једињења која припадају различитим хемијским класама детектовано је у херби и корену ових биљака, посебно у *S. minor* и *S. officinalis* врстама, од којих тритерпеноиди и феноли представљају доминантна хемијска једињења биљака из рода *Sanguisorba* (2, 4, 5).

1.3.1. Полифенолна једињења

Биоактивна својства *Sanguisorba* врста у највећој мери последица су присуства бројних полифенолних једињења (2, 9). У неколико истраживања је и описан садржај фенола у *Sanguisorba* врстама, као и састав њихових надземних и подземних делова (10-12). До сада је изоловано приближно педесет полифенолних једињења из биљака овог рода (2). Најважнији представници ове групе једињења за род *Sanguisorba* јесу фенолне киселине, флавоноиди и танини. Најзаступљеније фенолне киселине су ферулинска, гална и елагинска киселина. Идентификовани су и различити гликозидни деривати галне киселине као и једноставни полифенол фисцион (2, 4, 11).

1.3.1.1. Танини

У прегледу истраживања које су спровели *Jang* и сарадници показано је да међу различитим фитохемијским једињењима изолованим из *S. officinalis* преовладавају танини и њима слична једињења (4). Од хидролизујућих танина углавном су заступљени галотанини и елагитанини, док катехински деривати полимеризују у кондензоване танине (2). Корен *S. officinalis* садржи 12 – 17 % танина, претежно хидролизујућих, као што су дилактон сангвисорбинске киселине, сангвини X-1, X-2, X-3, X-6, проантоцијанидини (7-О-галоил-(+)катехин и 3-О-галоилпроцијанидин-Б-3), β-глукогалин, педункулагин. Еугенин и сангвини су главни елагитанини *S. officinalis*. Представници катехинских танина јесу катехин, галокатехин, процијанидин Б-3 (6-10). Једињења фисетинидол-(4α-8)-катехин и галокатехин, изоловани из корена *S. officinalis*, показала су високу антиоксидациону активност (13).

Сангвин X-6 је репрезентативни полифенолни елагитанин присутан у *S. officinalis* врсти (4). Као и други елагитанини, сангвин X-6 испољава обећавајући протективни потенцијал против оксидационог стреса што је показано у *in vivo* истраживању на пацовима (14). Показана су и антипролиферативна својства сангвина X-6 на туморским ћелијским линијама (15).

1.3.1.2. Флавоноиди

Флавоноиди су у нешто мањој мери распрострањени у роду *Sanguisorba*. Изоловано је укупно шеснаест флавоноида, укључујући кверцетин, кемпферол и катехин, као и њихови деривати (1). Детектован је и репрезентативни флавонолни гликозид рутин у *S. officinalis* (16). Флавоноиди имају важну улогу у антиоксидационој активности рода *Sanguisorba* (2, 13). Још један од корисних ефеката флавоноида јесте *in vitro* супресија миграције ћелија канцера услед високог садржаја кверцетин-3-глукуронида у *S. minor* (17).

1.3.1.3. Тритерпени

Међу фитохемијским компонентама *S. officinalis*, поред танина, тритерпени и њихови гликозиди означени су као значајни конституенти (4). Примарно је из *S. officinalis* врсте изолован урсански тип тритерпена чији су репрезентативни представници *ziyuglycoside I*, *ziyuglycoside II*, сангвисорбини А, Б, Е и помолинска киселина (18-20).

Најистакнутији представници тритерпена јесу управо *ziyuglycoside I* и *ziyuglycoside II*, тритерпенски сапонини, који су изоловани још 1971. године (4, 21). Ова

активна једињења показала су антиканцерску и антиоксидациону активност (13). Показано је и да су једињења *zyuglycoside I* и *II*, која су изолована из корена *S. officinalis*, повезана са апоптозом хумане ћелијске линије канцера желуца и ретинобластома (22, 23). У *Sanguisorba* биљкама присутни су бројни олеанански тритерпени чији је репрезентативни представник арјунинска киселина (2). Неки од изолованих олеананских тритерпена показују антиинфламацијску и антиедематозну активност (2, 24). Тритерпенски гликозиди такође су присутни у корену биљке *S. officinalis* и показали су антиоксидациона, хемостатска и антитуморска својства (13).

1.3.2. Остала биоактивна једињења присутна у биљкама из рода *Sanguisorba*

Поред фенолних једињења и тритерпена, из *Sanguisorba* биљака изоловани су и дисахариди, полисахариди, целулоза, неолигнани, аминокиселине, масне киселине, антрахинони и стероиди (13, 20, 23, 25, 26). Протеини у *Sanguisorba* врстама примарно садрже глутаминску киселину и аспарагинску киселину, док су палмитинска, линолна и линолеинска киселина главни представници масних киселина (4). Антиалергијска, антиоксидациона и антитуморска активност присутних полисахарида је значајна и кореспондира са терапијском применом биљака из рода *Sanguisorba* (27). Дисахариди изоловани из корена *S. officinalis* такође су показали антиалергијску активност (25).

1.4. Хемијски састав корена и хербе *S. minor*

У најактуелнијем истраживању које су спровели аутор *Finimundy* и сарадници 2020. године анализом лишћа и корена *S. minor* са територије централне Грчке откривено је присуство двадесет и два једињења која су подељена у три класе: флавоноиди, танини и фенолне киселине, од којих су хидросолубилни танини доминантни. Једанаест ових једињења детектовано је у лишћу, четрнаест једињења у корену док је присуство седам идентификованих једињења било заједничко и за лишће и за корен испитиване биљке. Овај резултат указује на значајне варијације у профилу фенолних једињења између испитиваних делова биљке (лишћа и корена) (28). Слични фенолни профил хербе и корена документован је и у истраживању аутора *Karkanis* и сарадника из 2019. године који су такође испитивали хемијски састав *S. minor* са територије централне Грчке (9).

Анализа флавоноида је указала на присуство кверцетина, кемпферола, катехина и њихових деривата. *S. minor* је такође и богат извор танина и сродних једињења, од којих су хидросолубилни танини доминантни, као што су хексахидроксиДФеноил деривати (енг. *hexahydroxydiphenoyl*; *HHDP*) и галоил деривати. Детектовано је и присуство кондензованих танина у лишћу *S. minor* (29). Када су у питању фенолне киселине, изоловани су елагинска киселина и њени деривати, гална киселина, *p*-кумароилквинична киселина и фенолне карбоксилне киселине (9, 10, 28, 30, 31). Доминантна фенолна једињења детектована у херби *S. minor* јесу сангвин X-10, ламбертианин Ц и педункулагин (*bis-HHDP*-глукозид), а затим и галоил-*HHDP*-гликозид, кверцетин-*O*-глукуронид и кемпферол-*O*-глукуронид. Наведена фенолна једињења детектована су и у корену испитиване биљке, али у већим количинама, осим у случају кемпферол-*O*-глукуронида који није детектован у корену. Генерално, у досадашњим истраживањима је показано да корен *S. minor* садржи већу количину укупних фенолних киселина, укупних хидросолубилних танина и укупних флавоноида у односу на хербу (9, 28).

Табела 2. Преглед резултата истраживања хемијског састава *S. minor*

	Једињење	Коришћени биљни материјал <i>S. minor</i>	Референца
Флавоноиди и њихови деривати	Кверцетин	Цела биљка	10, 28
	Кемпферол	Цела биљка	10, 28
	(+) – Катехин	Херба и корен	9, 28
	Кверцетин-галоил-хексозид	Херба	9, 28
	Апигенин- <i>O</i> -дезоксихексозид	Лишће	9
	Кверцетин- <i>O</i> -глукуронид	Лишће	9, 28
	Кверцетин-3- <i>O</i> -гликозид	Цела биљка	10
	Кверцетин-3- <i>O</i> -(600-галоилглукоза)	Цела биљка	10
	Кемпферол- <i>O</i> -глукуронид	Херба и корен	9, 28
	<i>B</i> -тип (<i>epi</i>)катехин димер	Херба и корен	9, 28
	<i>B</i> -тип (<i>epi</i>)катехин тетрамер	Корен	28
Танини	Дигалоил-гликозид	Херба и корен	9, 28
	Сангвин X-10	Херба и корен	9, 28
	Ламбертианин Ц	Херба и корен	9, 28
	Педункулагин (<i>bis-HHDP</i> -глукозид)	Херба и корен	9, 28
	Галоил- <i>bis-HHDP</i> -гликозид	Корен	9, 28
	Галоил- <i>HHPD</i> -гликозид	Лишће	28
	Пуникалагин галат	Корен	9, 28
	<i>b</i> -Глукогалин	Цела биљка	10
	2,3-Хексахидроксидифеноил-(<i>a/b</i>)-глукоза	Цела биљка	10
1-Галоил-2,3-хексахидроксидифеноил-(<i>a/b</i>)-глукоза	Цела биљка	10	
Фенолне киселине и њихови деривати	Елагинска киселина	Корен	9, 10, 28
	Гална киселина	Цела биљка	10
	Хексозид елагинске киселине	Херба	9, 28
	Пентозид елагинске киселине	Корен	
	<i>p</i> -Кумароилхинска киселина	Лишће и корен	28
	4,8-Диметокси-7-хидрокси-2-оксо-2 <i>H</i> -1-бензопиран-5,6-дикарбоксилна киселина	Цела биљка	10
	2-(4-Карбокси-3-метоксирил)-2-метоксисукцинска киселина	Цела биљка	10

1.5. Хемијски састав етарског уља *S. minor*

Већина досадашњих истраживања на тему хемијског састава *Sanguisorba* биљака анализирали су примарно екстракте биљака овог рода. Једино доступно испитивање хемијског састава етарског уља *S. minor* је истраживање етарског уља лишћа ове биљне врсте са територије Ирана. Идентификовано је око 93% компоненти испитиваног етарског уља тј. укупно 17 компоненти, од којих су најзаступљенији алифатични угљоводоници, а присутно је било и пет сесквитерпена, један оксидовани монотерпен и један алифатични алдехид. Као главне компоненте у овом уљу означени су Е, Е-фарнезил-ацетат (13,4 %), нонадекан (11,2 %) и докосан (11 %), а за њима и β -кариофилен (9,7 %), нонанал (8,5 %) и линалоол (7,3 %) (32).

1.6. Употреба биљака из рода *Sanguisorba* у традиционалној медицини

Биљне врсте које припадају роду *Sanguisorba* користе се од давнина у медицинске сврхе, посебно врста *Sanguisorba officinalis*. Употреба ове биљке је први пут описана у кинеским медицинским записима још пре две хиљаде година (4). У традиционалној кинеској медицини *S. officinalis* се користи као хемостатик и у терапији опекотина (33, 34). Кинеска фармакопеја прописује два препарата корена *Sanguisorbae* која се користе у ове сврхе (35). Поред тога, најпрописиванији лек у Кини који се не издаје на рецепт базиран је на формули која комбинује управо *S. officinalis* и још две традиционалне кинеске биљке и препоручује се у терапији хемороида и констипације (36). У Кореји, препарати корена *S. officinalis* традиционално се употребљавају за ублажавање симптома дијареје, хроничних интестиналних инфекција, дуоденалног улкуса и крварења (37). У Анатолији се *S. officinalis* користи у терапији струме, као диуретик, стимуланс апетита и као стомахик и антидијароик (38, 39).

У литератури се *S. officinalis* често наводи као биљка која се може применити код свих врста хеморагија (40). Такође, овој биљној врсти се у традиционалној медицини приписује и да помаже код бола у стомаку, против мамурлука, у терапији хематемезе, емболије, постпарталне хеморагије и дизентерије (41). Ова биљка се користи и у третману хемороида, флебитиса и варикозних вена, као и у терапији менорагије током менопаузе (13). Забележена је и примена препарата ове биљке у лечењу хепатитиса Б (42). Литературни подаци који се односе на спољашњу примену *S. officinalis* указују на њен значај у лечењу рана, опекотина и улцера, као и у терапији крварења као што је крварење из носа (13). Корен *S. officinalis* показује хемостатска, антиалергијска, аналгетичка и адстрингентна својства (43).

Биљна врста *Sanguisorba minor* такође има своју примену у традиционалној медицини. Њена лековита својства против дијареје и хемороида позната су још од 16. века (6). *S. minor* се користила и као диуретик и стимуланс апетита код деце (39). Надземни део *S. minor* се у традиционалној медицини најчешће користи у облику инфуза и тинктуре и то у олакшању симптома коњуكتивитиса, грознице, дијареје и абдоминалних тегоба (44). *S. minor* subsp. *muricata* се традиционално користи у терапији рана и опекотина (45).

У многим државама света *Sanguisorba* биљке се такође широко користе и у исхрани (6). Млади изданци и лишће *S. minor* и *S. officinalis* често се користе као свежа салата у медитеранској исхрани (9).

1.7. Фармаколошка активност биљака из рода *Sanguisorba*

1.7.1. Антиоксидациона активност

Антиоксидациона активност биљака из рода *Sanguisorba* добро је документована у литератури. *Sanguisorba* биљке су богате природним антиоксидантима па могу бити потенцијално коришћене као лекови у превенцији или терапији болести узрокованих оксидационим стресом као што су кардиоваскуларна обољења, метаболички синдром, тумор, инфламација, итд. (2, 4). Антиоксидациони потенцијал *Sanguisorba* врста одређиван је различитим *in vitro* методама заснованим на неутрализацији *DPPH* (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) радикала, *ABTS* (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина) радикала, хидроксил радикала (*OH*) и водоник-пероксида (H_2O_2) као и *FRAP* (*Ferric reducing antioxidant potential*) методом заснованој на редукцији Fe^{3+} до Fe^{2+} комплекса (2, 12, 42, 46, 47).

Етанолни, метанолни и водени екстракти *S. officinalis* показали су значајну способност неутралисања слободних радикала (2, 42). Фенолна једињења и танин, сангвин Н-6, су репрезентативна једињења присутна у *S. officinalis* врсти која су повезана са њеном јаком антиоксидационом активношћу (4). Такође, и полисахариди из етанолног екстракта *S. officinalis* показују значајну способност неутралисања слободних радикала (26). Показано је и да је *zyuglycoside I*, изолован из етанолног екстракта *S. officinalis*, утицао на велики пораст експресије колагена тип I до нивоа који је упоредив са аскорбинском киселином, указујући да ово једињење може да се користи као активни састојак у новим козметичким препаратима против бора (42).

Антиоксидациона активност *S. officinalis* потврђена је и *in vivo* експериментима и то у правцу ублажавања симптома оксидационог стреса (2). Водени екстракт *S. officinalis* снизио је ниво азот-моноксида (*NO*) у исхемијско-реперфузионом моделу оксидационог стреса код пацова (48).

Екстракт лишћа *S. minor* такође је показао значајну способност неутралисања хидроксил и пероксил радикала, са стопом инхибиције 34 % и 64 % у концентрацији 5 mg/ml (46). Ни антиоксидациона активност мерена *FRAP* методом није била занемарљива (47). Висок антиоксидациони капацитет врсте *S. minor* приписује се високом садржају фитонутријената, посебно фенолних једињења (49, 50).

Табела 3. Преглед резултата истраживања која су испитивала *in vitro* антиоксидациону активност екстраката *S. minor*

Биљни материјал	Метода	Резултат	Референца
Есенцијално уље хербе <i>S. minor</i> , из Португала (0,1 mg/ml)	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	11 % инхибиције	
	Инхибиција липидне пероксидације (β-каротен/линолна киселина систем)	99 % инхибиције	
Етанолни екстракт хербе <i>S. minor</i> , из Португала (0,1 mg/ml)	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	93 % инхибиције	(44)
Декокт хербе <i>S. minor</i> , из Португала (0,1 mg/ml)	Одређивање капацитета неутрализације DPPH•	93 % инхибиције	
	Инхибиција липидне пероксидације (β-каротен/линолна киселина систем)	95 % инхибиције	
Екстракт лишћа <i>S. minor</i> , из Шпаније (5 mg/ml)	Одређивање капацитета неутрализације H ₂ O ₂	64.35 ± 5.52 % инхибиције	(46)
	Одређивање капацитета неутрализације OH•	33.50 ± 3.09 % инхибиције	
Етанолни екстракт лишћа <i>S. minor</i> , из Италије (0,1 – 0,01 g/mL)	Инхибиција липидне пероксидације (Одређивање капацитета неутрализације пероксил радикала LOO•)	212 ± 10 mm LOO•/kg свеже биљке	(47)
	Способност редукције јона гвожђа Fe ³⁺ (FRAP тест)	257 ± 12 mmol Fe ²⁺ /kg	

1.7.2. Антимикробна активност

Антимикробна активност *S. officinalis* предмет је бројних истраживања. Доказана антимикробна активност, посебно инхибиција раста микроорганизама који узрокују инфекцију и инфламацију коже и слузокоже, оправдава употребу *S. officinalis* у традиционалној медицини (13). Досадашње студије сведоче о антибактеријској активности екстраката *S. officinalis* према различитим сојевима Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија, без велике разлике у активности. Ипак потенцијал ове биљке у лечењу гљивичних инфекција је умерен (51).

Документовано је да екстракти *S. officinalis* имају антибактеријску активност према бројним бактеријама као што су *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* са вредностима минималне инхибиторне концентрације (МИК) у опсегу од 0,07 до 2,50 mg/ml (13). Такође, показано је да је *S. officinalis* активна и против сојева *Shigella dysenteriae*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella anatum*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio vulnificus* (2, 4, 13, 43, 52). Што се тиче антифунгалне активности *S. officinalis*, показана је фунгицидна активност

на сој *Candida guilliermondii* и умерена фунгиостатска активност на сој *Candida albicans* (13).

Екстракти корена и лишћа *S. minor* такође показују антибактеријску и антифунгалну активност. Екстракти *S. minor* остварују деловање против сојева *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Salmonella typhimurium*, при минималној инхибиторној концентрацији од 0,075 до 0,45 mg/ml (9). Антигљивичну активност *S. minor* екстракти показују на следећим гљивицама: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrocloron*, *Penicillium verrucosum var. cyclopium*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, при минималној инхибиторној концентрацији од 0,05 до 0,45 mg/ml (53). Присуство фенолних једињења, као што су деривати кофеинске киселине и различити флавоноиди, доприноси антимикуробном ефекту *Sanguisorba* биљака (28).

Биљне врсте *S. officinalis* и *S. minor* показале су и антивирусну активност на одређене сојеве. Екстракти биљке *S. minor* показали су значајни антивирусни ефекат против *Herpes simplex* вируса-а тип 1 и вируса везикуларног стоматитиса (54). Такође, водени екстракт *S. minor magnolii* у концентрацији 50 µg/ml показује инхибиторни ефекат на активност вируса хумане имунодефицијенције (ХИВ) (55).

У истраживањима спроведеним како *in vitro* тако и *in vivo* уочена је значајна инхибиторна активност против РНК вируса, као што су корона вирус и ХИВ вирус, али и против ДНК вируса, укључујући хепатитис Б вирус (56 - 58). У истраживању спроведеном 2010. године *in vitro*, документовано је да 50 µg/ml метанолног екстракта *S. officinalis* може инхибирати мишији вирус хепатитиса, који припада породици корона вируса, ефикасније од рибавирина умањујући синтезу вирусних протеина. Експеримент је извршен на *DBT* и *Vero* ћелијским линијама коришћењем *MTT* теста за одређивање *IC₅₀* вредности испитиваног екстракта које су износиле 3,7±1,4 µg/ml. Добијени резултати су указали да *S. officinalis* има значајан потенцијал против ове врсте корона вируса (56).

1.7.3. Антиинфламацијска активност

Истраживања су показала да биљке *Sanguisorba* рода показују антиинфламацијску активност, што оправдава и њихову традиционалну примену у терапији рана и опекотина. Подаци у литератури указују на улогу фенолних једињења у антиинфламацијској активности ових биљака (3). Препарати биљне врсте *S. officinalis* се користе у одржавању симптома инфламацијских болести, као што су хроничне интестиналне инфекције, астма и дерматитис, под контролом. Неколико досадашњих *in vivo* и *in vitro* истраживања пружио је значајне доказе да ова биљка поседује антиинфламацијска својства (4).

Етанолни екстракт *S. officinalis* нисходно је регулисао нивое проинфламацијских цитокина у хуманим ћелијама кератиноцита (59). Такође, етанолни екстракт *S. officinalis* значајно је и дозно-зависно инхибирао липополисахаридом стимулисану продукцију азот-моноксида и простагландина Е2 у ћелијској линији моноцита/макрофага (60). Ови антиинфламацијски ефекти *S. officinalis* у складу су и са резултатима истраживања на експерименталним моделима атопијског дерматитиса, контактеног дерматитиса и алергијских кожних обољења укључујући екцем, уртикарију и алергијски дерматитис (61 - 63). Антиинфламацијски ефекат *S. officinalis* дао је позитивне резултате и у терапији гастритиса (4).

Интраперитонеална апликација воденог екстракта хербе *S. minor subsp. muricata* на анималном моделу инфламације индуковане карагенином резултирала је дозно-

зависном антиинфламацијском активношћу. Примена екстракта интраперитонеално у дози од 25, 50 и 100 mg/kg резултовала је инхибицијом едема шапе пацова у вредности 41,9, 76,4 и 83,4% (3).

1.7.4. Антикancerогена активност

Литературно доступни су и докази о антикancerогеним ефектима врсте *S. officinalis* (2). Водени екстракт ове биљке инхибирао је раст и индуковао апоптозу у хуманим ћелијским линијама оралног канцера и канцера дојке (37, 65). Такође, метанолни екстракт *S. officinalis* испољио је значајну цитотоксичну активност и на ћелијским линијама хуманог канцера простате (55). Једињење *ziuglycoside II* изоловано из *S. officinalis* показало је инхибиторни ефекат на раст гастричних ћелија канцера као и хуманих ћелија тумора дојке (22, 66). Показано је и да полисахариди из *S. officinalis* имају инхибиторни ефекат на пролиферацију саркома код мишева (33, 34).

1.7.5. Хемостатска активност

Биљке рода *Sanguisorba*, посебно врста *S. officinalis*, коришћене су традиционално у Кини у третирању хеморагијских болести, као што су дуоденални улкуси, опекотине, унутрашња крварења и фебрилне хеморагијске болести. У складу са традиционалном употребом, многе студије потврдиле су да биљке овог рода поседују хемостатске ефекте како у истраживањима *in vivo*, тако и *in vitro*, идентификујући полифеноле и танине као главна једињења која доприносе том ефекту (2). Документована је и значајна антикоагулантна активност једињења *ziuglycoside I* и *ziuglycoside II* изолованих из корена *S. officinalis* (20, 67).

У неколико *in vivo* студија показана је прокоагулантна активност *S. officinalis*, где је време коагулације крви, протромбинско време и активирано парцијално тромбoplastинско време било значајно скраћено након примене воденог екстракта *S. officinalis* на моделу варфарином - индуковане хипопротромбинемije пацова (68). Потврђено је и да *S. officinalis* значајно скраћује време крварења и време рекалцификације и код мишева соја *ICR* показујући пожељне антихеморагијске ефекте (69).

1.7.6. Улога у пролиферацији хематопоетских ћелија

Корен *S. officinalis* врсте традиционално је коришћен у Кини у терапији неутропеније (70). Екстракти и нека једињења из *Sanguisorba* биљака потврдила су њихова промовишућа хематопоетска својства. У неколико клиничких истраживања показан је профилактички и терапијски ефекат корена *Sanguisorbae* на мијелосупресију индуковану хемотерапијом или радиотерапијом (71 - 74). Документовано је да су сапонини из корена *Sanguisorbae* главна активна једињења која доприносе наведеном ефекту, а њихови карактеристични представници су једињења *ziuglycoside I* и *ziuglycoside II*. У испитивању спроведеном на мишевима, свакодневна орална примена укупних сапонина изолованих из корена *Sanguisorbae* позитивно је утицала на пролиферацију ћелија костне сржи, при чему је дошло и до повећаног броја еритроцита и леукоцита (75). Подаци у литератури указују да је модулација продукције цитокина механизам на ком се заснива хематопоетска активност сапонина изолованих из *S. officinalis* (76).

1.7.7. Хипогликемијска активност

У традиционалној кинеској медицини *Sanguisorba* биљке се користе и због свог хипогликемијског ефекта (2). Једињења *ziuuglycoside I* и *ziuuglycoside II*, изолована из метанолног екстракта *S. officinalis*, ефикасно су снизила параметре дијабетеса као што су ниво глукозе у крви, гликозилирани хемоглобин и ниво инсулина код мишева са дијабетесом тип II. Показано је и да орална примена једињења *ziuuglycoside II*, поред хипогликемијских својстава, има и антихиперлипидемијску активност (35). Додатно, показана је и инхибиторна активност тритерпена изолованих из *S. tenuifolia* на ензим α -глукозидазу, од којих је једињење *p*-кумароилурсолна киселина показало најзначајнију инхибицију овог ензима (77).

1.7.8. Неуропротективна активност

Етанолни екстракт *S. minor* показао је снажну инхибицију ензима ацетилхолинестеразе у *in vitro* условима (57,1% у концентрацији 0,5 mg/ml и 77,5% у концентрацији 1 mg/ml). Такође, у истом истраживању, и етарско уље *S. minor* показало је нешто нижу, али ипак значајну инхибицију овог ензима (44). Овај податак је од значаја јер висока инхибиција ацетилхолинестеразе може помоћи у превенцији или олакшању симптома код пацијената који пате од Алцхајмерове болести (2).

Документовано је и да корен *S. officinalis* показује неуропротективни ефекат у култури кортикалних неурона пацова са индукованим оксидационим стресом *in vitro* као и на исхемично оштећење мозга код пацова *in vivo*. У концентрацијама 10 μ g/ml до 50 μ g/ml корен *S. officinalis* је допринео инхибицији водоник-пероксидом индуковане неуронске смрти. Додатно, појава исхемичног инфаркта и едема била је значајно редукована код пацова који су добијали корен *S. officinalis* (10 или 30 mg/kg, оралним путем), са последичним побољшањем у неуролошкој функцији. Једињење кверцетин-3-(β -D-глукофуранозид) изоловано из корена *S. officinalis* означено је као главно једињење које доприноси овом ефекту (78).

1.7.9. Антиулцерозна активност

Представници *Sanguisorba* рода користе се у традиционалној медицини већ две хиљаде година због својих гастропротективних својстава (79). Декокт хербе *S. minor* subsp. *muricata* у употреби је у традиционалној турској медицини у третману абдоминалних болова, горушице и сличних гастроинтестиналних симптома. Студија спроведена у Турској потврдила је да орално примењени водени екстракт хербе *S. minor* subsp. *muricata* показује значајан антиулцерозни ефекат (62%) код етанолом индукованог улцера на моделу пацова *in vivo*. Желудац једног од шест испитиваних пацова био је комплетно заштићен од појаве крварења или лезија применом екстракта *S. minor*. Антиулцерозни ефекат потврђен је фармаколошки и хистопатолошки, а објашњен је присуством танина и флавоноида који испољавају гастропротективна својства (80). Показано је да *S. minor* снажно инхибира еластазу управо услед високог садржаја танина (81). Познато је да у патогенези улцерозних и ерозивних лезија гастроинтестиналног тракта слободни радикали имају важну улогу, па садржај флавоноида који се сматрају природним “чистачима” слободних радикала доприноси антиулцерозном ефекту *S. minor* (80, 82).

1.8. Улога лековитих биљака у терапији инфективних болести

Резистенција бројних патогена на постојеће антибиотике, а последично и растућа учесталост инфекција, представља један од главних глобалних здравствених проблема још од краја двадесетог века. Овом проблему у великој мери доприноси нерационална употреба антибиотика (83, 84). Такође, појава биофилма представља велику препреку у лечењу многих хроничних инфекција које се карактеришу пролонгираном инфламацијом и slabим одговором на конвенционалну терапију. Биофилм представља комплексну сесилну заједницу микроорганизама уграђену у сопствени екстрацелуларни матрикс. Структура биофилма чини безбедно окружење за раст и заштиту патогена, како од имунског одговора домаћина, тако и од адекватног деловања антибиотика. Додатно, измењени фенотип доприноси неосетљивости бактеријског биофилма на антибиотике која је вишеструко већа у односу на кореспондирајуће планктонске микроорганизме (43). Осим код метицилин - резистентног *S. aureus* и ванкомицин - резистентног ентерокока, високи ниво бактеријске резистенције показан је и код сојева *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* (84).

Растући број резистентних бактеријских сојева као и бројни нежељени ефекти доступних антибиотика указују на изразиту потребу за новим ефикасним антимикуробним агенсима (51). Биљке се у традиционалној медицини од давнина користе у превенцији или третману инфективних болести, а бројна истраживања потврдила су оправданост те примене (84, 85). Биљни екстракти и изолована фитохемијска једињења могу бити од великог значаја у третману резистентних сојева, због чега су предмет све већег броја истраживања (86).

Антимикуробни агенси пореклом из биљака сматрају се и безбеднијим у поређењу са синтетичким једињењима због свог природног порекла (87, 88). Такође, они могу инхибирати раст бактерија механизмима који се разликују у односу на механизме дејства синтетичких антибиотика (89, 90). Терапијска ефикасност биљака указује да бактерије могу имати редуковану способност адаптације на антимикуробни режим на биљној бази услед присуства хемијски комплексних фитоконституената у екстрактима биљака (84). Управо секундарни метаболити присутни у биљкама у највећој мери доприносе њиховој антимикуробној активности (91). Велике групе фитохемијских једињења за које је у *in vitro* истраживањима показано да поседују антимикуробна својства јесу фенолна једињења, флавоноиди, хинони, танини, кумарини, терпени и алкалоиди (51).

Упркос континуираним истраживањима све је мањи број новооткривених синтетичких антибиотика, а све већи проблем резистенција бактерија која представља глобалну здравствену претњу и изазов за научнике (83). Редукована ефикасност и растућа токсичност постојећих антибиотика додатно отежава овај проблем. У светлу ових чињеница, антимикуробни агенси биљног порекла могу представљати терапијску алтернативу у третману инфекција што указује на потребу за даљим истраживањима (52, 92).

1.9. Улога лековитих биљака у лечењу инфламацијских процеса

Инфламација представља комплексни заштитни одговор организма на присуство иритације, повреде ткива, ћелијске смрти, исхемије и дегенерације (93). Може бити и последица присуства инфективних узрочника (бактерија, вируса, гљивица) у ткивима и/или циркулацији. Инфламацијски процес утиче на повећану васкуларну пропустљивост, узрокује промене у протоку крви као и оштећење ткива, што се

манифестује црвенилом, отоком, губитком функције и осећајем бола (3, 94). Бројни инфламацијски медијатори различитог типа, као што су цитокини, хемокини, простагландини и леукотриени, синтетишу се и ослобађају током инфламацијског одговора. Значајну улогу у инфламацији имају и проинфламацијски ензими као што су азот-моноксид синтаза, фосфолипаза А₂, липооксигеназа и циклооксигеназа (енгл. *cyclooxygenase* - COX). Међу три изоформе циклооксигеназе (COX-1, COX-2 и COX-3), индуцибилни ензим COX-2 је најактивнија форма током запаљенског процеса (94).

Истраживања су потврдила повезаност хроничне инфламације са бројним обољењима као што су Алцхајмерова болест, тумор, кардиоваскуларна обољења, дијабетес, неуродегенеративна обољења и дегенеративне болести зглобова (95 - 97). Иако се у савременој терапији акутних инфламацијских обољења користе стероидни и нестероидни антиинфламаторни лекови, они нису довољно ефикасни у лечењу хроничних инфламацијских болести (3). Такође, примена ових лекова праћена је и озбиљним нежељеним ефектима због чега је већина неадекватна за хроничну употребу. Ургентна потреба за новим, ефикасним и безбедним антиинфламацијским лековима усмерила је истраживања ка новим терапијским приступима. Управо биљке могу представљати ризницу за откриће и развој нових потенцијално корисних антиинфламацијских агенаса (97).

Биљке са антизапаљенском активношћу традиционално се користе у патолошким стањима као што су грозница, мигрена и артритис. У терапији инфламације традиционално су се користиле и биљке које садрже салицилате што је и довело до открића најпознатијег антиинфламацијског лека - ацетилсалицилне киселине, која је у великој мери заступљена у клиничкој пракси (98).

Стотине истраживања спроведено је у циљу проучавања антиинфламацијске активности биљака, а она су данас интензивнија него икада (94, 99). Показано је да је за овакву активност биљака одговоран широки спектар фитоконституената као што су фенолна једињења, алкалоиди и терпеноиди, што је показано у истраживањима *in vitro* и *in vivo* (100). Антиинфламацијска активност биљних активних принципа објашњава се модулацијом активности ћелија повезаних са инфламацијом, као што су мастоцити, макрофаги, лимфоцити и неутрофили. Такође, ова једињења утичу и на активност кључних проинфламацијских ензима и медијатора (101, 102). Интензивна научна истраживања одвијају се у циљу проналазка, екстраховања и испитивања фармаколошких ефеката и механизма којим природни производи испољавају своју антиинфламацијску активност (98). Континуирани истраживачки напори обезбедиће нови поглед на антиинфламацијску активност биљних једињења и евентуално водити ка открићу нове класе антиинфламацијских агенаса (94).

1.10. Оксидациони стрес и сепса: улога лековитих биљака

Редокс реакције представљају основу бројних биохемијских механизма неопходних за физиолошку ћелијску функцију. Прооксиданси и антиоксиданси имају кључну улогу у поменутих механизмима. Појам антиоксиданс односи се на супстанцу која донира електрон, док прооксиданс прима електрон (103). Током нормалних метаболичких процеса долази до стварања слободних радикала, прооксиданса који при ниским концентрацијама у организму остварују своју физиолошку улогу, посебно у регулацији ћелијске сигнализације, али у неконтролисаним условима могу бити узрок оксидационог оштећења ћелија. Слободни радикали су високо реактивни атоми, атомске групе или молекули који садрже један или више неспарених електрона у последњој молекулској, односно атомској орбитали (104). У физиолошким условима постоји равнотежа између стварања и уклањања слободних радикала. Када се та

равнотежа наруши, услед повећане продукције слободних радикала или због недовољне ефикасности антиоксидационог система заштите, настаје оксидациони стрес, а последице су промена фенотипа, оштећење или смрт ћелије (103, 104). У литератури се све чешће уместо термина слободни радикали користи појам реактивне врсте који обухвата сва електрофилна једињења високе реактивности која могу бити и нерадикалског типа. У зависности од активног центра они се деле на реактивне врсте са кисеоником, азотом, угљеником и сумпором (106). У биолошким системима највећи значај имају реактивне кисеоничне врсте (енгл. *reactive oxygen species* - *ROS*) и реактивне азотне врсте (енгл. *reactive nitrogen species* - *RNS*) (107).

Током процеса еволуције створен је систем антиоксидационе заштите који је усмерен на уклањање повећаних концентрација слободних радикала тј. на њихово одржавање у физиолошким границама (106). Главни антиоксидациони ензими су супероксид дисмутаза, глутатион пероксидаза, и каталаза. Супероксид дисмутаза (*SOD*) је ензим задужен за конверзију O_2^- до O_2 или до мање реактивног H_2O_2 . Глутатион пероксидаза (*GPx*) у присуству редукованог глутатиона (*GSH*) катализује редуkcију H_2O_2 на два молекула воде. Каталаза (*CAT*) је ензим који катализује потпуну редуkcију H_2O_2 до воде и кисеоника. Водоник-пероксид може бити и делимично редукован до токсичног хидроксил радикала (OH^\bullet). Поред наведених ензима значајну антиоксидациону улогу имају и аскорбинска киселина (витамин Ц), α -токоферол (витамин Е) и глутатион (*GSH*) (103). Дуготрајна изложеност ћелије прекомерном стварању слободних радикала може премашити антиоксидациони капацитет заштите када настају оксидациона оштећења (105).

Оксидациони стрес се препознаје као важан фактор у настанку озбиљних патолошких промена и системских обољења као што су кардиоваскуларне болести, дијабетес мелитус, неуродегенеративне и аутоимуне болести, карцином, итд. (103, 107). Такође, све је већи број истраживања која говоре у прилог хипотези да се оксидациони стрес налази и у самој основи патогенезе сепсе (108).

Сепса се дефинише као системски инфламаторни одговор изазван инфекцијом и представља водећи узрок смрти у јединицама интензивне неге (109). Упркос бројним истраживањима патогенеза сепсе и даље није потпуно јасна. Сепса се карактерише прекомерном продукцијом прооксиданаса, а потврђена је и улога *ROS* у патофизиологији системске инфламације (103). Са једне стране *ROS* представљају прву линију одбране организма од инфективних агенаса, а са друге стране узрокују функционална и структурна оштећења (110). У сепси *ROS* настају примарно као резултат активирања неутрофила и макрофага (103). Важне реактивне врсте кисеоника у патогенези сепсе укључују супероксид анјон радикал (O_2^-), водоник пероксид (H_2O_2) и хидроксил радикал (OH^\bullet). На ефекте стварања оксидационог стреса у сепси надовезује се повећано стварање реактивних врста азота: азот-мооксида (*NO*) и пероксинитрит анјона ($ONOO^-$) (103 - 105). У сепси је смањен и антиоксидациони капацитет што се огледа у нижем нивоу антиоксиданаса као што су аскорбинска киселина, α -токоферол и *GSH* у плазми пацијената оболелих од сепсе. Оксидациони стрес узрокује и појачану синтезу протеина укључених у инфламацију (108). Поред системских ефеката оксидационог стреса у сепси, његови ефекти региструју се и у централном нервном систему. На експерименталном моделу сепсе код пацова (метод цекалне лигације и перфорације) у можданим капиларима пацова уочено је повећање липидне пероксидације у раној фази сепсе (105).

Бројна истраживања су показала да различите биљке и њихова фитохемијска једињења имају висок садржај антиоксидационих састојака. Ова сазнања указују да управо биљке могу имати кључну улогу у развоју нових лекова против агресивних *ROS* (4). Антиоксидациони ефекти биљних екстраката процењују се, између осталог, и на

различитим анималним моделима сепсе у чијој патогенези значајну улогу има оксидациони стрес. Различити антиоксиданси, као што су витамин Ц и витамин Е, показали су се ефикасним у регулацији параметара оксидационог стреса на анималним моделима сепсе (111). Такође, потврђена је и улога једињења сангвин Х-6 изолованог из врсте *S. officinalis* у заштити против оксидационог оштећења у реналним ћелијама, као и у супресији прекомерног ослобађања NO и O_2^- који се сматрају битним чиниоцима у оксидационом оштећењу (14). Показано је да су одређене биљке, као што су ђумбир, куркума, црни бибер и каранфилић, показале потенцијал у терапији сепсе (112). Како *S. minor* има већ потврђена антиоксидациона својства *in vitro*, као и знатне количине витамина Ц и Е и сангвина Х-6, а обзиром на преваленцу сепсе и висок степен смртности од исте, од значаја би било испитати ефекте ове биљне врсте на параметре оксидационог стреса у стању сепсе (110).

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

Предмет овог истраживања је хемијска карактеризација екстраката и етарског уља, као и испитивање биолошке активности екстраката биљне врсте *Sanguisorba minor* L. subsp. *muricata* (Rosaceae) која расте на територији Републике Србије. Мотив за постављање истраживачког питања заснован је на употреби ове лековите биљке у традиционалној медицини, као и на проналажењу потенцијално нових терапијских могућности на основу показане биолошке активности.

2.1. Циљеви истраживања

Израда, испитивање и поређење ефеката различитих екстраката корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* subsp. *muricata*, као и израда и хемијска карактеризација етарског уља корена и хербе наведене биљке, постављени су као главни циљ ове дисертације, у оквиру ког су постављени следећи конкретни циљеви:

1. Припрема метанолног, етанолног, хлороформског, хексанског и ацетонског екстракта корена и метанолног, хлороформског, хексанског и ацетонског екстракта хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata*.
2. Хемијска карактеризација екстраката корена и хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* – одређивање садржаја укупних фенола и флавоноида, *HPLC* профили, идентификација одабраних полифенолних једињења.
3. Екстракција етарског уља из корена и хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata*.
4. Хемијски састав и квантификација компоненти етарског уља корена и хербе *S. minor* subsp. *muricata*.
5. Испитивање биолошке активности екстраката биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* *in vitro* и *in vivo*:
 - 5.1. Процена и поређење антиоксидационе активности различитих екстраката биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* *in vitro* методама.
 - 5.2. Процена и поређење антиоксидационе активности примењених доза етанолног екстракта корена биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* *in vivo* на основу оствареног ефекта на параметре оксидационог стреса на анималном моделу сепсе.
 - 5.3. Процена и поређење антибактеријске и антифунгалне активности различитих екстраката биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* *in vitro*.
 - 5.4. Процена антиинфламацијске активности етанолног екстракта корена биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* на основу способности инхибиције активности ензима циклооксигеназе-1 *in vitro*.

2.2. Хипотезе истраживања

1. Укупни садржај фенола и флавоноида у различитим екстрактима *S. minor* subsp. *muricata* разликује се у зависности од типа екстракта и коришћеног дела биљке.
2. Екстракти биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* испољавају антиоксидациону активност *in vitro*.
3. Постоји разлика у испољеној *in vitro* антиоксидационој активности различитих екстраката корена и хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* у зависности од типа екстракта и коришћеног дела биљке.
4. Етанолни екстракт корена биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* остварује позитиван ефекат на параметре оксидационог стреса на анималном моделу сепсе.
5. Утицај етанолног екстракта корена *S. minor* на испитиване параметре оксидационог стреса зависи од примењене концентрације екстракта и пута примене екстракта (орални и интраперитонеални).
6. Екстракти корена и хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* испољавају антимикубно деловање.
7. Постоји разлика у испољеној антимикубној активности различитих екстраката корена и хербе биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* у зависности од врсте микроорганизма и типа екстракта. .
8. Етанолни екстракт корена биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata* инхибира *COX-1* ензим.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Биљни материјал

Биљни материјал је сакупљен са природних станишта на подручју села Каменица (Краљево, Србија) и планине Селичевеце (околина Ниша, Србија), на местима највеће покривености и по повољним временским условима. Сакупљање корена биљне врсте *Sanguisorba minor* subsp. *muricata* обављено је у априлу 2018. године, док се херба биљке сакупљала у јуну и јулу исте године. Бирани су доминантни таксони у циљу стварања репрезентативног узорка. Идентификација биљног материјала је извршена на Катедри за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Крагујевцу и Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, према дихотомним ботаничким кључевима „Флоре СР Србије“ и „Флоре Европе“ (1, 8). Узорци су депоновани у хербаријуму Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу под бројем ваучера 13869. Непосредно након сакупљања у природи корен је био добро очишћен од земље и заједно са хербом осушен на собној температури на тамном и добро проветреном месту.

3.2. Израда екстраката

Након сушења биљног материјала корен и херба испитиване биљке самлевени су до степена грубог прашка (млин IKA® A11 В, Немачка). Екстраховање је вршено на температури кључања уз рефлукс помоћу следећих растварача: етанол, метанол, хлороформ, хексан, ацетон. На овај начин добијени су следећи екстракти:

- Метанолни екстракт *Sanguisorbae radix/herba*
- Етанолни екстракт *Sanguisorbae radix*
- Ацетонски екстракт *Sanguisorbae radix/herba*
- Хлороформски екстракт *Sanguisorbae radix/herba*
- Хексански екстракт *Sanguisorbae radix/herba*

У Табели 4 наведени су сви испитивани екстракти и њихове ознаке, као и део биљке, количина дроге и запремина растварача који су коришћени за израду истих. Екстракти су филтрирани и упарени помоћу ротационог вакуум упаривача (*RV05 basic IKA*, Немачка) под сниженим притиском до константне масе. До почетка експеримента екстракти су чувани у десикатору.

Принос екстракције (број грама добијеног екстракта у односу на 100 g дроге) изражен је у % и приказан у Табели 4 за сваки испитивани екстракт.

Табела 4. Припрема испитиваних екстраката и принос екстракције употребом растварача различите поларности

Ознака екстракта	Део биљке <i>S. minor</i>	Растварач	Количине дроге и растварача за екстраховање	Принос (%)
СК1	Корен	Метанол	35 g дроге + 300 ml метанола	7,49
СК2	Корен	Етанол	128 g дроге + 1000 ml етанола	10,72
СК3	Корен	Ацетон	35 g дроге + 300 ml ацетона	3,82
СК4	Корен	Хлороформ	35 g дроге + 300 ml метанола	2,85
СК5	Корен	Хексан	35 g дроге + 300 ml хексана	1,18
СХ1	Херба	Метанол	35 g дроге + 300 ml метанола	7,03
СХ3	Херба	Ацетон	35 g дроге + 300 ml ацетона	2,57
СХ4	Херба	Хлороформ	35 g дроге + 300 ml метанола	1,74
СХ5	Херба	Хексан	35 g дроге + 300 ml хексана	2,21

3.3. Екстракција етарског уља

За добијање етарског уља коришћена је метода хидродестилације у апаратури по *Clevenger*-у (113). Осушен, одмерен и уситњен биљни материјал преливен је дестилованом водом у балону за дестилацију. Процес дестилације уља трајао је око три сата. Уље је одвојено од водене фазе помоћу етра у левку за одвајање. Остатак воде уклоњен је помоћу анхидрованог натријум-сулфата (Na_2SO_4). Упаравање етра извршено је помоћу вакуум упаривача. Измерена је маса чистог уља и израчунат његов удео у односу на укупну количину осушеног биљног материјала.

3.4. Хемијска карактеризација екстраката и етарског уља корена и хербе *S. minor*

3.4.1. Идентификација одабраних полифенолних једињења *HPLC* техником

Високо-ефикасна течна хроматографија *HPLC* (енгл. „*high-performance liquid chromatography*“) коришћена је за раздвајање, идентификацију и квантификацију појединих конституената екстраката корена и хербе *S. minor*. Хроматографија је извођена коришћењем *Phenomenex Kinetex® C18* колоне (димензија 10 cm × 4,6 mm, величина честица 2,7 μm) на 40°C и проток мобилне фазе је подешен на 2 ml/min.

У Табели 5 наведене су карактеристике мобилне фазе А и Б и градијента који су коришћени за *HPLC* анализу испитиваних екстраката. Инјекциона запремина за све узорке била је 5 μL, а раздвајање је извршено на *Agilent-Eclipse XDB C-18* (4.6 x 150 mm) колони која је термостатирана на 25°C.

Табела 5. Протокол *HPLC* анализе испитиваних екстраката (састав мобилних фаза А и Б и градијент)

Мобилна фаза	А ($H_2O + 5\% HCOOH$) Б ($80\% ACN + 5\% HCOOH + H_2O$)
Градијент	0 - 10 мин. 0 % Б 10 - 28 мин. 0-25 % Б 28 - 30 мин. 25 % Б 30 - 35 мин. 25-50 % Б 35 - 40 мин. 50-80 % Б 40 - 45 мин. 80-0 % Б

Детекција фенолних једињења вршена је на таласној дужини од 320 и 360 *nm*. Фенолна једињења у узорцима идентификована су упоређивањем ретенционих времена и апсорпционих спектра непознатих пикова са ретенционим временима и спектрима референтних стандарда за сваку компоненту. За идентификацију пикова коришћен је *Agilent Chemstation* софтвер. Квантитативна анализа извршена је на основу калибрационих кривих. За сваки стандард полазни раствори су припремљени у 10% (v/v) метанолу. Узорци за *HPLC* анализу припремљени су тако што су испитивани екстракти растворени у одговарајућем растварачу (етанол и ацетон) на ултразвучном воденом купатилу.

Квантификација фенолних једињења у екстрактима извршена је помоћу калибрационих крива референтних стандарда: хлорогенска киселина, кафена киселина, кверцетин и *p*-кумарна киселина (Табела 6). Квантификација појединачних фенолних једињења извршена је помоћу *HPLC Agilent-1200 series* са *UV-Vis DAD* детектором.

Табела 6. Калибрационе криве референтних стандарда

Једињење	Једначина калибрациона криве	(R^2)	<i>LOD</i> ($\mu g/\mu l$)	<i>LOQ</i> ($\mu g/\mu l$)
Кафена киселина	$y = 33621x - 0,154$	1,0000	0,009	0,030
Хлорогена киселина	$y = 10491,8x - 0,525$	0,9998	0,035	0,116
Рутин	$y = 4589x - 0,674$	0,9999	0,052	0,173
Кверцетин	$y = 10336,2x + 0,320$	0,9996	0,033	0,110

3.4.2. Хемијска карактеризација етарског уља корена и хербе *S. minor*

Хемијски састав етарског уља корена и хербе *S. minor* анализиран је комбинованом техником гасна хроматографија/масена спектроскопија (*GC/MS*) и *Headspace/GC-MS* техником. Комбинација *GC/MS* представља једну од најефикаснијих метода за идентификацију компоненти сложених органских смеша у којој је улога гасне хроматографије да раздвоји, а улога масене спектрометрије да идентификује компоненте смеше. Гаснохроматографска колона је повезана са масеним спектрометром који је изразито осетљив и има велику брзину снимања масених

спектра елуираних једињења (114). *Headspace* метода за екстракцију је погодна за идентификовање лако испарљивих компоненти (тачка кључања до 250°C) у хетерогеним чврстим или течним узорцима. Ова техника се заснива на анализи гасне фазе која се налази у равнотежи са течном фазом у затвореној гаснохроматографској вијали. Загревањем испитиваног узорка на температури до 100°C испарљиве компоненте дифундују у празан простор изнад узорка у вијали при чему се формира „*headspace* гас“ који се даље инјектује у колону гасног хроматографа и анализира.

Анализа узорака је спроведена коришћењем *Agilent 7890* гасног хроматографа куплованог са *7000B GC-MS-MS* триплквадрипол масеним спектрометром опремљеним *Combi PAL* уређајем за узорковање и *Headspace*-ом *G6501B-G6509B*. Раздвајање је извршено помоћу *HP-5MS* капиларне колоне (5 % фенилметилсилоксан, 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm дебљина филма). Колона је програмирана у опсегу 50-290°C са брзином загревања од 4°C/min. Као носећи гас коришћен је хелијум при константном протоку од 1 ml/min. Температура инјектора износила је 250°C, а инјектована запремина *headspace* паре била је 500 μL. Пулсно је инјектирано 1 μl раствора етарског уља у хексану (1:100), при чему је однос био 1:40. Јонизација је вршена при напону од 70 eV, а масено скенирање је било у распону 50-650.

Компоненте етарског уља одређене су упоређивањем ретенционих индекса у односу на ретенциона времена C₈-C₄₄ алкана са литературним вредностима (115 - 118). Даља идентификација је рађена поређењем масених спектра са спектрима једињења из библиотека масених спектара (*NIST 11*, *Wiley 6*) након чега су подаци обрађени применом *AMDIS (version 2,1)* софтвера и ко-инјектовањем стандарда, када је то било могуће.

3.4.3. Одређивање садржаја укупних фенола

У оквиру хемијске карактеризације екстракта биљне врсте *S. minor* одређен је и садржај укупних фенола методом по *Folin-Ciocalteu*-у. У присуству *Folin-Ciocalteu* реагенса долази до оксидације фенолних једињења при чему се реагенс редукује, а реакција редукције реагенса је праћена променом боје из жуте у плаву. Настала плава боја је стабилна и њен интензитет је сразмеран количини фенолних једињења. Интензитет боје одређен је спектрофотометријски на таласној дужини 750 nm. За сваки екстракт одређивање је извршено у три понављања. Као референтна супстанца коришћена је гална киселина (119, 120).

Поступак

Реакциона смеша је садржала 0,05 ml екстракта, 0,05 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса и 2 ml раствора Na₂CO₃. Припремљена смеша је допуњена водом до укупне запремине од 7,55 ml. Након 30 минута на тамном месту апсорбанца је очитана спектрофотометријски на таласној дужини 750 nm. Слепа проба је припремљена са растварачем (метанол/50% метанол/дестилована H₂O) уместо екстракта. Садржај фенолних једињења израчунат је на основу калибрационе криве стандардног раствора галне киселине. Резултат представља средњу вредност три мерења изражену у mg еквивалента галне киселине по g сувог екстракта (121).

3.4.4. Одређивање садржаја укупних флавоноида

У оквиру хемијске карактеризације екстракта биљне врсте *S. minor* одређен је и садржај укупних флавоноида колориметријском методом коришћењем $AlCl_3$ реагенса. Метода се заснива на особини флавоноида да комплексирају јоне метала (Al^{3+}) при чему боја раствора прелази из жуте у жуто-зелену. Интензитет боје одређен је спектрофотометријски на таласној дужини 510 nm. За сваки екстракт одређивање се вршило у три понављања. Као референтна супстанца коришћен је рутин (120).

Поступак

Екстракт у запремини 50 μL (1 mg/ml) екстракта помешан је са 1 ml метанола, 4 ml дестиловане воде и 0,3 ml 5% раствора $NaNO_2$. Након 5 минута инкубирања смеси је додато 0,3 ml 10% раствора $AlCl_3$, а након 6 минута додато је и 2 ml раствора $NaOH$ 1 mol/l. Смеша је допуњена водом до укупне запремине од 10 ml. Апсорбанца је измерена након 15 минута на таласној дужини од 510 nm. Садржај укупних флавоноида израчунат је на основу калибрационе криве стандардног раствора рутина. Резултат је представљен као средња вредност три мерења и изражен је као еквивалент рутина у mg/g сувог екстракта.

3.5. Испитивање антиоксидационе активности екстракта корена и хербе *S. minor* - *in vitro*

3.5.1. Одређивање способности неутрализације DPPH радикала

Капацитет испитиваних екстракта за неутралисање слободних радикала одређен је коришћењем спектрофотометријске DPPH методе којом је измерена способност екстракта да неутралише стабилни DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикал. Због своје једноставности и осетљивости DPPH метода је једна од највише примењиваних за одређивање антиоксидационе способности природних производа. Овом методом се испитује способност једињења да „хватају“ слободне радикале (енгл. *free radical "scavenging" activity*) односно да донирају протон и електрон.

Метода се заснива на праћењу трансформације љубичасто обојеног, стабилног DPPH радикала у редуковану, жуто обојену форму (DPPH-H) која настаје након преузимања атома водоника од антиоксиданта. DPPH тест је изведен према методи аутора Димитријевић и сарадници (119).

Поступак

Припремљена је смеша 1,5 ml метанолног раствора DPPH радикала у концентрацији 100 $\mu mol/l$, 0,1 ml тестираног екстракта у концентрацији 20 mg/ml и метанола до укупне запремине од 4 ml. Након мешања, реакциона смеша остављена је у мраку 60 минута, а способност неутрализације DPPH радикала одређена је мерењем апсорбанце на таласној дужини од 515 nm помоћу спектрофотометра у тами на собној температури. Сва мерења извршена су у три понављања. Способност екстракта да неутралише DPPH радикал (енгл. *radical scavenging capacity - RSC*) одређена је помоћу калибрационе криве коришћењем Тролокса (6 -хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина) као позитивне контроле, у концентрацији 1–16 mmol/l.

Резултати су изражени у μg Тролокс еквивалента (ТЕ) по mg сувог екстракта. Способност неутралисања *DPPH* радикала изражена је помоћу следеће формуле:

$$\% \text{ неутрализације} = 100 \times ((A_0 - A_1) / A_0)$$

A_0 : апсорбанца контроле, A_1 : апсорбанца екстракта.

3.5.2. Одређивање способности неутрализације *ABTS* радикала

Капацитет испитиваних екстраката за неутралисање слободних радикала одређен је и коришћењем методе која мери способност екстракта да неутралише *ABTS* (2,2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) радикал. Метода се заснива на праћењу обезбојавања раствора стабилног радикал катјона (*ABTS*+•) добијеног оксидацијом *ABTS*-а са калијум персулфатом, у присуству неког антиоксиданта као донора водоника. Додавањем антиоксиданта *ABTS*+• узорку долази до обезбојавања плаво-зеленог раствора, а настала промена се детектује спектрофотометријски при таласној дужини од 734 nm . Смањење интензитета боје сразмерно је количини присутних антиоксиданата. *ABTS* тест је изведен према методи аутора Димитријевић и сарадници (119).

Поступак

У циљу добијања *ABTS*+• радикала, водени раствор амонијумове соли *ABTS* (2,2'-азинобис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) помеша се са раствором калијум-персулфата ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) и остави у мраку на собној температури 12-16 h да се реакција одвије. Раствор добијеног *ABTS*+• запремине 7 ml разблажи се са 120 ml метанола. Испитивани екстракт у концентрацији 20 mg/ml помешан је са $1,8 \text{ ml}$ *ABTS* раствора у концентрацији 7 mmol/l и допуњен метанолом до укупне запремине 4 ml . Након 6 минута на собној температури измерена је апсорбанца на $\lambda=734 \text{ nm}$. Сва мерења извршена су у три понављања. Степен инхибиције се пореди са степеном инхибиције за синтетски антиоксидант (Тролокс) а резултати су изражени у μg ТЕ / mg сувог екстракта.

Формула за израчунавање процента инхибиције *ABTS* радикал катјона је:

$$\% \text{ Инхибиције} = 100 \times ((A_0 - A_1) / A_0)$$

A_0 : апсорбанца контроле, A_1 : апсорбанца екстракта.

3.5.3. Одређивање способности редукције бакарног јона из бакар (II) – неокупроин комплекса (*CUPRAC* тест)

CUPRAC (енгл. *cupric reducing antioxidant capacity*) метода се заснива на редукцији бакарног јона из бакар (II) - неокупроин комплекса. Бакар (II) јон са неокупроином (2,9-диметил-1,10-фенантролин) при рН 7,0 гради безбојни бис(неокупроин)бакар(II) комплекс, *Cu(II)-Nc*. У присуству антиоксиданта долази до редукције бакарног јона при чему настаје *Cu(I)-Nc*, комплексно једињење наранцасто-црвене боје које показује максимум апсорбанце на 450 nm . Већа вредност апсорбанце

указује на већу редукциону способност узорка. *CUPRAC* тест је изведен према методи аутора Димитријевић и сарадници (119).

Поступак

Реакциона смеша је припремљена од 0,05 ml екстракта, 1 ml фосфатног пуфера (pH 7.0), неокупроин бакар(II)-хлорида и допуњена је водом до укупне запремине од 4 ml. Смеша је након тога остављена 30 минута на собној температури након чега је измерена апсорбанца на 450 nm. Као референтна супстанца коришћен је Тролокс а резултати су изражени у $\mu\text{g TE/mg}$ сувог екстракта (119).

3.5.4. Одређивање способности редукције јона гвожђа у трипиридил триазин комплексу (*FRAP* тест)

FRAP (енгл. *ferric-reducing antioxidant power*) метода се заснива на способности антиоксиданаса да редукују јон гвожђа у гвожђе-2,4,6-трипиридил-S-триазин комплексу $[\text{Fe(III)}-(\text{TPTZ})_2]^{3+}$ до интензивно плаво обојеног комплекса $[\text{Fe(II)}-(\text{TPTZ})_2]^{2+}$ у киселој средини. *FRAP* метода је изведена према методи аутора Димитријевић и сарадници (119).

Поступак

Припремљени *FRAP* реагенс (1 ml) помеша се 0,05 ml узорка, концентрације 20 mg/ml, након чега се смеша допуни водом до укупне запремине 4 ml. Након 5 минута инкубације на 37°C апсорбанца се мери спектрофотометријски на 595 nm. Сва мерења урађена су у трипликату. Израчуната је разлика између апсорбанце узорка и апсорбанце контроле у циљу добијања *FRAP* вредности. Резултати су добијени коришћењем стандардне калибрационе криве и изражени су у $\mu\text{g Fe(II)}$ еквивалента/mg сувог екстракта.

3.5.5. Одређивање укупног редукционог потенцијала (*TRP* тест)

Укупни редукциони потенцијал екстраката одређен је методом која се заснива на редукцији *Fe(III)*-хексацијаната до *Fe(II)*-хексацијаната. Ова реакција узрокује пораст апсорбанце што указује на већу антиоксидациону активност. *TRP* метода је изведена према методи аутора Димитријевић и сарадници (119).

Поступак

Реакциона смеша је припремљена помоћу 0,01 ml екстракта, 1 ml 1% раствора калијум–хексацијаноферата (III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), фосфатног пуфера (pH 6,6) и воде. Смеша је инкубирана на 50°C 30 минута, након чега је додато 1 ml 10% раствора трихлороацетатне киселине и 0,6 ml FeCl_3 . Апсорбанца је измерена на 700 nm. Сва мерења урађена су у трипликату. Резултати су изражени као еквивалент аскорбинске киселине (енг. *ascorbic acid equivalent, AAE*) у $\mu\text{g/mg}$ сувог екстракта.

Резултати свих антиоксидационих тестова су изражени као средње вредности три мерења \pm стандардна девијација.

3.5.6. Одређивање индекса антиоксидационог потенцијала

Индекс антиоксидационог потенцијала одређен је коришћењем методе коју су описали аутор *Seeram* и сарадници 2008. године, на основу резултата пет различитих *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за сваки испитивани екстракт *S. minor* (121). Сваком тесту је приписана максимална вредност индекса у износу 100, након чега је израчуната вредност за испитиване екстракте у оквиру сваког теста према следећој формули:

$$(A_x / A) \times 100$$

A_x - резултат одређеног екстракта у оквиру једног теста

A - најбољи резултат истог теста

Вредност индекса антиоксидационог потенцијала за сваки испитивани екстракт израчуната је као средња вредност резултата свих пет *in vitro* тестова за испитивани екстракт. Сви тестови су имали подједнак допринос у рачунању вредности индекса.

3.6. Испитивање антиоксидационе активности екстракта *S. minor* - *in vivo*

3.6.1. Експеримент на анималном моделу сепсе

У оквиру одређивања антиоксидационе активности *in vivo* процењен је ефекат етанолног екстракта корена *S. minor* subsp. *muricata* на анималном моделу сепсе. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора за добробит експерименталних животиња Војномедицинске академије и Министарства за пољопривреду и заштиту животне средине Републике Србије (број 323-07-7363/2014-05) а у складу са прописаним актима Директиве 2010/63/EU Европског Парламента о заштити животиња које се користе у научне сврхе. Сепса је индукована *CLP* методом (цекална лигација и пункција) код пацова. Оперативна процедура укључила је неколико фаза: средњом линијом абдомена урађена је лапаротомија, а затим лигација и пункција цекума (122). За преоперативну анестезију животиња коришћен је натријум-пентобарбитал интраперитонеално у дози од 45 mg/kg. Животиње су жртвоване 24 сата након индуковања сепсе, лажне операције или примене последње дозе екстракта.

3.6.2. Експерименталне животиње

Експеримент је спроведен на одраслим *Wistar* пацовима мушког пола, старости 11 недеља, телесне масе између 250 и 300 g. Животиње су чуване под стандардним лабораторијским условима (собна температура, циклус светлост:тама 13h:11h) најмање седам дана пре почетка експеримента. Приступ води и храни био је слободан и у довољној количини како би животиње могле да их узимају по потреби (*ad libitum*) пре експеримента. Обухваћено је 96 животиња рандомизирано подељених у две групе, експерименталну *CLP* групу (животиње којима је индукована сепса *CLP* методом) и контролну групу (лажно оперисане животиње, *sham*), са одговарајућим подгрупама у зависности од начина примене екстракта (орално и интраперитонеално) и примењене дозе (100 и 300 mg/kg). Свака група/подгрупа је бројала по 6 животиња.

Експеримент је подељен у два дела у зависности од тога да ли је екстракт примењен оралним или интраперитонеалним путем.

3.6.3. Експеримент I – орална администрација екстракта

Протокол је укључио оралну примену 1 ml екстракта једном дневно у две концентрације, 100 mg/kg или 300 mg/kg током седам дана. Суви екстракт је суспендован у 50% етанолу и примењен као суспензија. Експеримент је укључио следеће групе животиња (по 6 у свакој групи):

1. **Контрола** - Контролна група код које није индукована сепса и није примењен екстракт
2. **CLP** - Контролна група код које је индукована сепса али није примењен екстракт
3. **Sham** - Контролна група лажно оперисаних животиња које су 2 h пре операције конзумирале 0,5 ml H₂O
4. **50% EtOH** - Контролна група која је третирана 7 дана са 1 ml 50% етанола
5. **S1** - Група код које је примењен само екстракт у концентрацији 100 mg/kg
6. **S1 + CLP** - Група код које је екстракт у концентрацији 100 mg/kg примењен у стању сепсе
7. **S2** - Група код које је примењен само екстракт у концентрацији 300 mg/kg
8. **S1 + CLP** - Група код које је екстракт у концентрацији 300 mg/kg примењен у стању сепсе

3.6.4. Експеримент II – интраперитонеална администрација екстракта

Експеримент II је укључио интраперитонеалну примену (*i.p.*) 0,5 ml екстракта у концентрацији од 100 mg/kg једнократно. Суви екстракт је суспендован у 35% етанолу и примењен као суспензија. Експеримент је укључио следеће групе животиња (по 6 у свакој групи):

1. **Контрола** - Контролна група код које није индукована сепса и није примењен екстракт
2. **CLP** - Контролна група код које је индукована сепса, али није примењен екстракт
3. **Sham** - Контролна група лажно оперисаних животиња којима је 2 h пре операције апликовано 0,5 ml H₂O
4. **35% EtOH** - Контролна група која је третирана *i.p.* са 0,5 ml 35% етанола
5. **35% EtOH + Sham** - Група код које је 2 h пре лажне операције *i.p.* примењено 0,5 ml 35% етанола
6. **S1** - Група код које је примењено *i.p.* само екстракт у концентрацији 100 mg/kg
7. **S1 + CLP** - Група код које је екстракт у концентрацији 100 mg/kg примењен *i.p.* 2h пре сепсе
8. **S1 + Sham** - Група код које је екстракт у концентрацији 100 mg/kg примењен код лажно оперисаних животиња 2 h пре лажне операције

3.6.5. Одређивање параметара оксидационог стреса

У узорцима крвне плазме животиња одређени су нивои параметара оксидационог стреса и то прооксиданаса (укупан садржај сулфхидрилних група, липидна пероксидација мерена као ниво реактивних супстанци тиобарбитурне киселине (енгл. *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*; *TBARS*), укупни нитрати и нитрити, супероксид анјон радикал) и параметра антиоксидационе заштите (супероксид дисмутаза).

3.6.5.1. Одређивање садржаја укупних сулфхидрила

Садржај укупних сулфхидрилних група (*SH*) у плазми је одређен методом коју је описао аутор *Ellman* (123). Метода се заснива на редукцији *DTNB* реагенса (2,2'-динитро-5,5'-дитио-бензоева киселина) тиолном (*SH*-) групом до интензивно жуто обојене 2-нитро-5-меркаптобензоеве киселине (*NTB*) у алкалној средини (*pH* 9,0). Садржај укупних сулфхидрила мерен је спектрофотометријски на 412 *nm*. Резултати су изражени у *mM/l*.

Поступак

Реакциона смеша је садржала 0,05 *ml* узорка, 0,9 *ml* пуфера (0,2 *mol/l* дикалијум-хидрогенфосфата K_2HPO_4 , 2 *mmol/l* етилендиаминотетрасирћетне киселине (*EDTA*, *pH* 9,0)) и 0,02 *ml* *DTNB* (0,01 *mol/l* *DTNB* растворен у 50 *mmol/l* фосфатног пуфера, *pH* 7,0). Слепа проба је садржала 0,95 *ml* пуфера и 0,02 *ml* *DTNB*. Након мешања на вортексу узорци су инкубирани 25 минута на собној температури, а затим је апсорбанца измерена на 412 *nm* према слепој проби. Концентрација укупног садржаја *SH* група у плазми израчуната је коришћењем моларног екстинкционог коефицијента *p*-нитрофенола на 412 *nm*, који за дате услове има вредност од $13\ 600 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$. Концентрација укупних *SH* група изражена је у *mM/l* плазме.

3.6.5.2. Одређивање липидне пероксидације (*TBARS*)

Липидна пероксидација израчуната је индиректно, мерењем крајњих продуката реакције липидне пероксидације са тиобарбитурном киселином, односно мерењем нивоа *TBARS*. Метода се заснива на одређивању нивоа липидних пероксида на основу реакције једног од њих, малонилдиалдехида (*MDA*), са тиобарбитурном киселином (*TBA*). Ниво *TBARS* измерен је спектрофотометријским тестом на 532 *nm*. Резултати су изражени у *uM/l* (124).

Поступак

У епрувету је додато 800 μl узорка и 400 μl 28% трихлорсирћетне киселине, након чега је епрувета остављена на леду у периоду од 15 минута. Узорци су центрифугирани на 6000 обртаја 15 минута. У 800 μl супернатанта додато је 200 μl 1% тиобарбитурне киселине након чега су добијени узорци инкубирани у воденом купатилу 15 минута на 100°C. Апсорбанца насталог ружичасто обојеног комплекса мерена је на $\lambda=532 \text{ nm}$. Дестилована вода је коришћена као слепа проба, у количини еквивалентној запремини плазме.

Концентрација ослобођених *TBARS* израчуната је на основу следеће једначине:

$$\Delta A (A_1 - A_0) / 1,56 \times 1,25$$

A_0 : апсорбанца слепе пробе, A_1 : апсорбанца узорка.

3.6.5.3. Одређивање концентрације нитрита и нитрата (*NOx*)

Нитрити и нитрати представљају крајње деградационе продукте ендогено створеног азот-моноксида. Концентрација нитрита и нитрата (*NOx*) одређена је спектрофотометријском методом која се биохемијски заснива на употреби *Griess*-реагенса, који са нитритима гради диазо-комплекс који даје љубичасту боју. Метода се заснива на реакцији између сулфанилне киселине (реагенс *Griess I, Merck*) и нитритног јона у веома киселој средини, при чему настали диазонијум реагује (при *pH* 2,0–2,5) са α -нафтиламином (реагенс *Griess II, Merck*) стварајући азо-једињење љубичасте боје, чија се апсорбанца мери спектрофотометријски на 492 *nm*. Концентрација нитрита изражена је у *nmol/ml* плазме (125).

3.6.5.4. Одређивање концентрације супероксидног анјона ($O_2^{\bullet-}$)

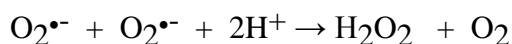
Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\bullet-}$) у плазми заснива се на реакцији $O_2^{\bullet-}$ са нитро-тетразолијум плавим (*Nitro Blue Tetrazolium - NBT*) до нитроформаза плавог (126).

Поступак

Реакциона смеша садржала је *NBT* (0,1 *mM*, *Merck*) у фосфатном пуферу (50 *mM*, *pH* 8,6), *EDTA* (0,1 *mM*, *Serva*) и желатин (0,1 *mg/ml*, *Sigma*). Реакција је започета додавањем 0,05 *ml* узорка у 1 *ml* припремљене реакционе смеше, а промена екстинкције праћена је у току 5 минута на таласној дужини 515 *nm*. Резултати су изражени у *nM NBT/min/ml* плазме.

3.6.5.5. Одређивање активности укупне супероксид дисмутазе (*SOD*)

Супероксид дисмутаза (енг. *superoxide dismutase*; *SOD*) је ензим који има улогу у антиоксидационој заштити. Поменути ензим катализује реакцију диспропорционисања супероксидног анјона на водоник пероксид и кисеоник, уклањајући тако супероксидни анјон-радикал и инхибирајући реакцију спонтане аутооксидације адреналина у алкалној средини. Услов за реакцију аутооксидације адреналина је присуство супероксидног анјона (127).



Активност *SOD* израчунава се као проценат инхибиције аутооксидације адреналина у базној средини. Брзина аутооксидације адреналина прати се спектрофотометријски преко промене апсорбанце на таласној дужини од 480 *nm*. Резултати су изражени у *U/ml* (128).

Поступак:

Активност *SOD* одређивана је као промена апсорбанце у времену (10 минута) на таласној дужини од 480 *nm*. Реакциона смеша садржала је натријум-бикарбонатни пуфер (50 *mM*, *pH* 10,2), 1 *mmol EDTA* и 0,1 *ml* узорка. Реакција је започета додавањем 0,1 *ml* адреналина (0,01 *M*, *Serva*, у 0,01 *M HCl*), након чега је реакција праћена спектрофотометријски. Као слепа проба узимана је промена екстинкције исте реакционе смеше којој је уместо узорка додато 0,1 *ml* воде. Активност *SOD* изражена је у интернационалним јединицама (*IU/ml*) плазме. Интернационална јединица је дефинисана као активност ензима која за 50 % инхибира аутооксидацију адреналина.

3.7. Испитивање антимикробне активности екстраката корена и хербе *S. minor*

Коришћени микроорганизми

Антимикробна активност екстраката корена и хербе *S. minor* subsp. *muricata* испитана је у *in vitro* условима на десет стандардних сојева микроорганизама (бактерије и гљивице) из Лабораторије Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу:

- Грам-позитивне бактерије: *Bacillus subtilis* ATCC 6633
Staphylococcus aureus ATCC 6538
Enterococcus faecalis ATCC 19433
- Грам-негативне бактерије: *Escherichia coli* ATCC 25922
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027
Enterobacter aerogenes ATCC 13048
Proteus mirabilis ATCC 12453
Klebsiella pneumoniae ATCC 10031
Salmonella enteritidis ATCC 13076
- Гљивица: *Candida albicans* ATCC 1405

Припрема екстраката и етарског уља

Изолована етарска уља и суви екстракти растворени су у 10% воденом раствору диметил-сулфооксида (*DMSO*). Почетна концентрација за екстракте износила је 100 *mg/mL*. Испитивање је вршено на серији од 12 двоструких разблажења екстраката.

Поступак

Антимикробна активност је испитана коришћењем микродилуционе методе која је спроведена према методологији прописаној од стране „*Clinical and Laboratory Standards Institute*“ (*CLSI*, 2009), са одређеним модификацијама. У стерилне микротитар плоче са 96 отвора (произвођач Спектар, Чачак), у течној хранљивој подлози *Mueller-Hinton* бујон (Институт „Торлак“, Београд), припремљена је серија од 12 двоструких разблажења екстраката тако да је опсег концентрација био од 100 *mg/ml* у првом реду до 0,04 *mg/ml* у последњем реду.

Затим су припремљене суспензије од преконоћних култура испитиваних бактерија у стерилном физиолошком раствору, турбидитета 0,5 *McFarland*-а (што одговара садржају бактеријске суспензије од 10^8 *CFU/ml*) уз помоћ којих је инокулисана хранљива подлога. Укупна запремина у сваком отвору је била 100 μ l, а густина инокулата 1×10^6 *CFU/ml*. За сваку бактеријску културу испитиван је раст у два засебна отвора (позитивна контрола) а такође је испитивана и стерилност услова (контрола стерилности). Иста процедура је поновљена и за фунгални сој *C. albicans* на хранљивој подлози *Sabouraud Dextrose* бујон (Институт „Торлак“, Београд, Србија).

У експерименту су коришћене четири контроле:

- Контрола стерилности подлоге – бунарићи са незасејаном подлогом
- Контрола раста – бунарићи са засејаном подлогом али без апликације узорака
- Негативна контрола – серија разблажења воденог раствора *DMSO* у хранљивој подлози, у опсегу концентрација 50-0,02 %
- Позитивна контрола – антибиотик широког спектра доксициклин (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у опсегу концентрација 20,0-0,01 μ g/ml и нистатин (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) за фунгални сој, у истом опсегу концентрација.

Сви експерименти су спроведени у три понављања. Бактеријски и фунгални раст детектован је након додавања по 20 μ l 0,5% воденог раствора трифенил-тетразолиум-хлорида. Одређена је минимална инхибиторна и минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација, изражена у *mg/ml*. Минимална инхибиторна концентрација (МИК) дефинисана је као најнижа концентрација испитиваног екстракта при којој је изостао видљиви раст и размножавање микроорганизама. Да би се одредила МБЦ и МФЦ, садржај удубљења у којима није било видљивог раста пренет је на Петри плоче са *Mueller-Hinton* агаром, тј. у случају *C. albicans* са *Sabouraud Dextrose* агаром. Након тога, Петри плоче су инкубиране 24 h на 37°C а затим су бројане порасле колоније. Минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација (МБЦ/МФЦ) дефинише се као најнижа концентрација екстракта при којој долази до смрти 99.9% инокулираних микроорганизама. Резултати су изражени као средње вредности три узастопна мерења.

3.8. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1

Антиинфламацијска активност етанолног екстракта корена *S. minor* процењена је *in vitro* на основу мерења инхибиције активности ензима циклооксигеназа-1 (*COX-1*) у присуству наведеног екстракта, према методи коју су описали аутор *Fiebich* и сарадници (129). Метода се заснива на формирању простагландина *PGE₂* преко каскаде арахидонске киселине. Као позитивна контрола коришћен је *COX-1* инхибитор индометацин. Формирани *PGE₂* квантификован је помоћу *ELISA* теста, а количина насталог *PGE₂* сразмерна је способности екстракта да инхибира ензим *COX-1*.

Поступак

Испитивање инхибиције ензимске активности *COX-1* изведено је у микротитарској плочи. Инкубациона смеша садржала је 180 μ l 0,1M *TRIS/HCl* пуфера (0.1 M, pH 8,0), 18 mM епинефрин-хидроген-тартарата (*Fluka, Buchs, Швајцарска*, 0,2 U ензима), 5 mM хематина (*ICN, Aurora, Ohio, САД*) као и 10 μ l испитиваног етанолног екстракта корена *S. minor* (50 μ g/mL) и 0,2 јединице *COX-1* ензима (из семених кесица овна (*Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, САД*)), раствореног у 10 μ l ензимског пуфера (0,08 M *TRIS/HCl*-пуфер, 0,1% *Tween 20* и 0,3 mM

натријумдиетилдитиокарбамат трихидрата (pH 8,0)). Смеша се након тога инкубира 5 минута на собној температури. Да би реакција започела додатно је $10 \mu l$ раствора арахидонске киселине (*Cayman Chemical Co*, $5 \mu M$, у етанолу) након чега се смеша инкубира 20 минута на $37^\circ C$. Реакција формирања PGE_2 заустављена је додатком $10 \mu l$ 10% мравље киселине (у дестилованој води).

Концентрација PGE_2 одређена је употребом ензимске имуноанализе, на начин описан од стране произвођача *Cayman Chemical company, Ann Arbor (Cayman Chemical Company, 1998)*. Сви узорци растворени су у односу 1:100 у ензимском пуферу. Апсорбанца је обрнуто пропорционална концентрацији PGE_2 и мери се помоћу UV читача микротитарских плоча (*Tecan Rainbow, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Швајцарска*). Резултат је изражен као проценат инхибиције $COX-1$. Инхибиција активности $COX-1$ односи се на редукцију производње PGE_2 у поређењу са бланко пробом без инхибитора. Процент инхибиције израчунава се помоћу следеће формуле (131):

$$\% \text{ Инхибиције} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$$

A_0 - апсорбанца бланко пробе без инхибитора; A_1 - апсорбанца узорка.

Резултати су изражени као средње вредности три мерења \pm стандардна девијација.

3.9. Снага студије и величина узорка

Величина узорка за експеримент на анималном моделу сепсе је израчуната помоћу одговарајућег статистичког програма *G*Power 3*, а на основу параметара из претходно публикованих резултата сличних истраживања. У студији која се бавила испитивањем ефекта екстракта *Carum carvi* L. на параметре оксидационог стреса код пацова са индукованом сепсом, средња вредност концентрације $TBARS$ у експерименталној групи је износила $7,33 \pm 0,3 \text{ nmol/g}$, а у контролној групи је ова вредност била статистички значајно виша ($9,77 \pm 0,84 \text{ nmol/g}$) (130). Користећи наведене податке као и одговарајући статистички тест, t -тест за два независна узорка, уз претпоставку алфа грешке од 0,05, снаге студије 0,95 и односа 1:1 у две групе, добијен је број од по 4 експерименталне животиње у свакој групи (укупно 64 животиња). Због могућности искључивања неких животиња из завршне анализе или могућег угинућа, укупни студијски узорак је утврђен на 96 експерименталних животиња (по 6 животиња у свакој групи).

3.10. Статистичка обрада података

Статистичка обрада података извршена је у програмском пакету *IBM SPSS 19.0* применом одговарајућих параметарских и непараметарских тестова. За поређење антиоксидационе активности екстракта корена и хербе *S. minor in vitro*, као и садржаја укупних фенола и флавоноида, коришћени су анализа варијанси (*ANOVA* тест) или *Kruskal-Wallis* тест у зависности од нормалности расподеле. Утврђивање статистички значајне разлике између конкретних група извршено је *post-hoc* анализом (*Bonfferoni* или *Mann-Whitney* тестом). Подаци добијени за антиоксидациону активност екстракта *in vivo* анализирани су помоћу Студентовог *t*-теста, анализе варијанси (*ANOVA*) или одговарајућим непараметарским тестом (*Mann-Whitney*). Антиоксидациона активност екстракта изражена као индекс антиоксидационог потенцијала корелирана је са укупним садржајем фенола и флавоноида. Разлике између добијених резултата сматрају се статистички значајним уколико је $p < 0,05$, односно високо статистички значајним уколико је $p < 0,01$. Резултати су изражени као средња вредност \pm стандардна девијација (*S.D.*) и приказани су табеларно и/или графички.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Хемијска карактеризација екстракта и етарског уља корена и хербе *S. minor*

4.1.1. Идентификација одабраних полифенолних једињења *HPLC* техником

За анализу хемијског састава одабраних екстракта *S. minor* и квантификацију одређених полифенолних једињења примењена је течна хроматографија високих перформанси (*HPLC*). Чиста фенолна једињења су коришћена као стандарди за *HPLC* анализу. Једињења у екстрактима су идентификована на основу детекције раздвојених пикова на таласној дужини од 320 и 360 nm, поређењем са апсорпционим *UV-VIS* спектрима стандардних једињења као и њиховим ретенционим временима. За анализу су одабрани екстракти различите поларности. Испитиван је поларни етанолни екстракт који је коришћен и у анималном моделу сепсе као и за испитивање антиинфламацијске активности *in vitro*. Како хексан, као најмање поларни растварач од коришћених, није дао никакве резултате, анализиран је ацетонски екстракт добијен помоћу растварача средње поларности.

У етанолном и ацетонском екстракту хербе *S. minor* идентификовано је осам фенолних једињења: неохлорогена киселина, кафена киселина, хлорогена киселина, кафеоилхинска киселина, кверцетин-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-хексозид, кверцетин-3-глукуронид. Резултати квантитативне *HPLC* анализе садржаја наведених фенолних једињења у испитиваним екстрактима хербе изражени су у микрограмима супстанце по милиграму сувог екстракта ($\mu\text{g}/\text{mg}$) и приказани су у Табели 7. Анализирањем резултата етанолног екстракта хербе, уочава се да су доминантна фенолна једињења кверцетин-3-рутинозид ($18,71 \mu\text{g}/\text{mg}$) и кверцетин-3-софорозид ($14,37 \mu\text{g}/\text{mg}$). Уочава се да су сва идентификована једињења присутна у мањој количини у ацетонском у односу на етанолни екстракт, изузев кверцетин-хексозида.

У етанолном и ацетонском екстракту корена *S. minor* идентификована су следећа једињења: кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-3-софорозид и кумароилхинска киселина. Резултати квантитативне *HPLC* анализе садржаја наведених фенолних једињења у испитиваним екстрактима хербе изражени су у микрограмима супстанце по милиграму сувог екстракта ($\mu\text{g}/\text{mg}$) и приказани су у Табели 8. Доминантна фенолна једињења у етанолном екстракту корена били су кверцетин-3-рутинозид ($25,27 \mu\text{g}/\text{mg}$) и кверцетин-3-софорозид ($18,24 \mu\text{g}/\text{mg}$). Наведена једињења доминирају и у ацетонском екстракту корена, али су присутна у мањим количинама у односу на етанолни екстракт корена. У свим анализираним екстрактима хербе и корена *S. minor* забележено је присуство кверцетин-3-рутинозида и кверцетин-3-софорозида.

HPLC хроматограми етанолног и ацетонског екстракта хербе и корена *S. minor* приказани су на Слици 2, 3, 4 и 5.

Табела 7. Концентрација одабраних полифенолних једињења у етанолном и ацетонском екстракту **хербе** *S. minor* изражена као $\mu\text{g}/\text{mg}$ сувог екстракта

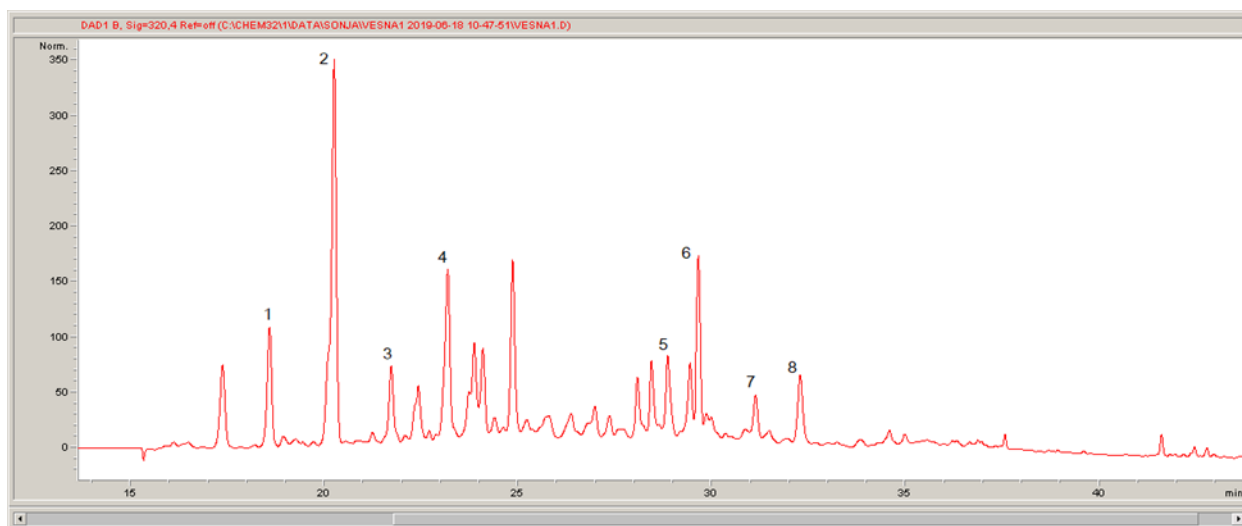
Компонента	Етанолни екстракт (CX2)		Ацетонски екстракт (CX3)	
	RT	Суви екстракт ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	RT	Суви екстракт ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Неохлорогена киселина ¹	18,568	4,71	18,464	3,57
Кафена киселина	20,247	4,97	20,127	0,49
Хлорогена киселина	21,708	2,78	21,558	0,33
Кафеоилхинска киселина ²	23,183	2,10	22,976	0,46
Кверцетин-3-софорозид	28,844	14,37	28,443	1,52
Кверцетин-3-рутинозид	29,658	18,71	29,202	2,87
Кверцетин-хексозид	31,122	2,15	30,803	4,26
Кверцетин-3-глукуронид	32,267	3,14	32,069	2,61

¹израчунава се као еквивалент хлорогене киселине, ²израчунава се као еквивалент кафеине киселине, RT- Ретенционо време

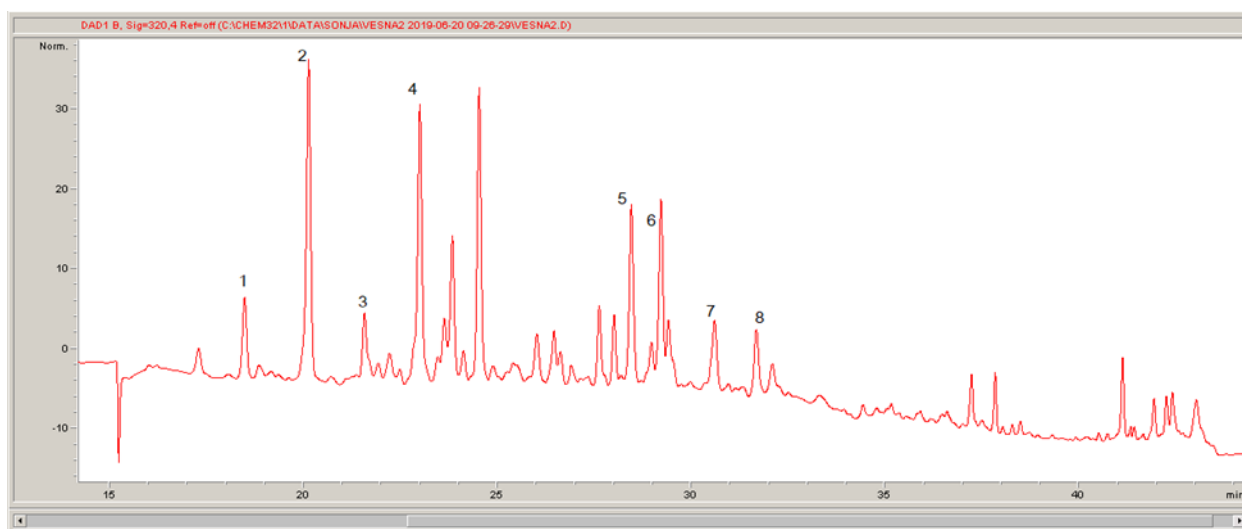
Табела 8. Концентрација одабраних полифенолних једињења у етанолном и ацетонском екстракту **корена** *S. minor* изражена као $\mu\text{g}/\text{mg}$ сувог екстракта

Компонента	Етанолни екстракт (CK2)		Ацетонски екстракт (CK3)	
	RT	Суви екстракт ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	RT	Суви екстракт ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Кумароилхинска киселина ¹	24,117	3,97	23,743	5,72
Кверцетин-3-софорозид ²	28,685	18,24	28,247	7,79
Кверцетин-3-рутинозид	29,136	25,27	28,704	11,51

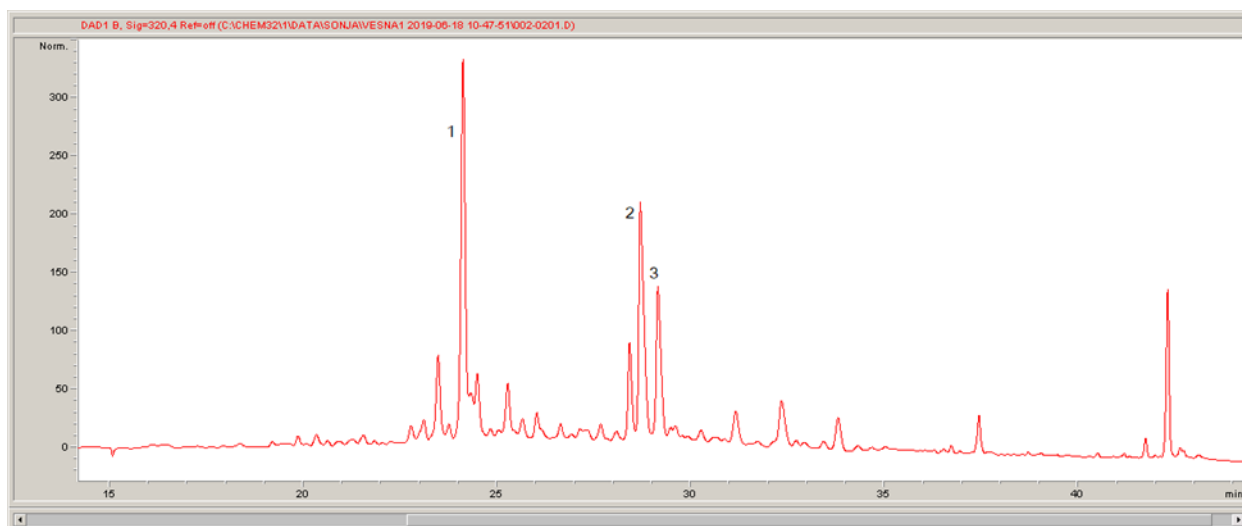
¹израчунава се као еквивалент *p*-кумаринске киселине, ²израчунава се као еквивалент кверцетина, RT- Ретенционо време



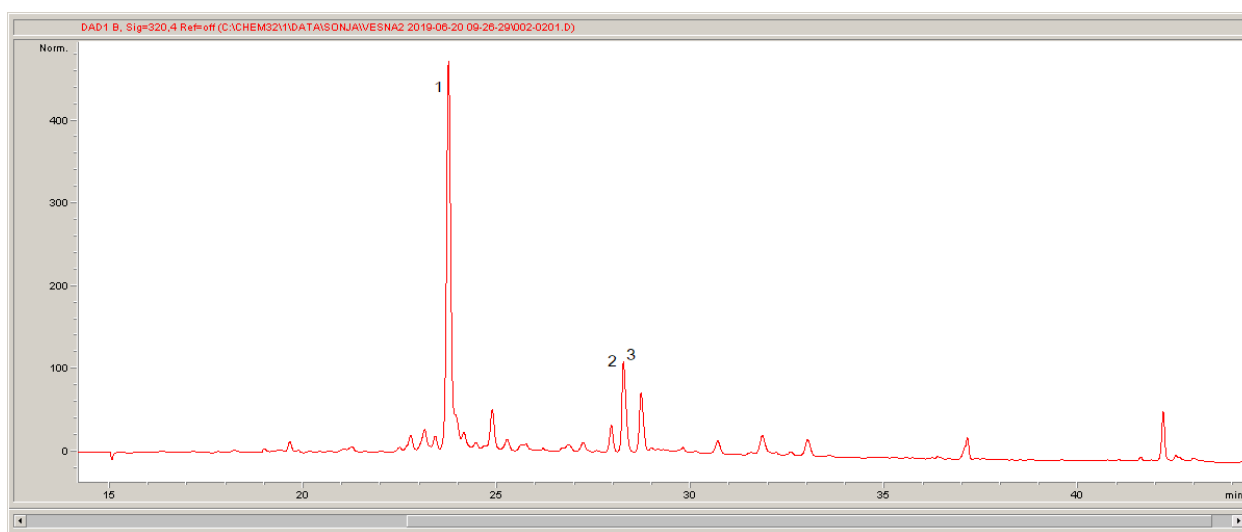
Слика 2. Хроматограм етанолног екстракта хербе *S. minor* добијен *HPLC* методом: једињење **1** - Неохлорогена киселина; једињење **2** - Кафена киселина; једињење **3** - Хлорогена киселина; једињење **4** - Кафеоилхинска киселина; једињење **5** - Кверцетин-3-софорозид; једињење **6** - Кверцетин-3-рутинозид; једињење **7** - Кверцетин-хексозид; једињење **8** - Кверцетин-3-глукуронид



Слика 3. Хроматограм ацетонског екстракта хербе *S. minor* добијен *HPLC* методом: једињење **1** - Неохлорогена киселина; једињење **2** - Кафена киселина; једињење **3** - Хлорогена киселина; једињење **4** - Кафеоилхинска киселина; једињење **5** - Кверцетин-3-софорозид; једињење **6** - Кверцетин-3-рутинозид; једињење **7** - Кверцетин-хексозид; једињење **8** - Кверцетин-3-глукуронид



Слика 4. Хроматограм етанолног екстракта корена *S. minor* добијен *HPLC* методом: једињење 1- Кумароилхинска киселина; једињење 2- Кверцетин-3-софорозид; једињење 3- Кверцетин-3-рутинозид



Слика 5. Хроматограм ацетонског екстракта корена *S. minor* добијен *HPLC* методом: једињење 1- Кумароилхинска киселина; једињење 2- Кверцетин-3-софорозид; једињење 3- Кверцетин-3-рутинозид

4.1.2. Хемијски састав етарског уља *S. minor*

Применом *GC-MS* и *HS/GC-MS* техника анализиран је састав етарског уља и испарљивих компоненти корена и хербе испитиване биљке *S. minor subsp. muricata*. Компоненте етарског уља су груписане у три групе: угљоводонични монотерпени, оксидовани монотерпени и друга једињења.

4.1.2.1. Хемијски састав етарског уља хербе *S. minor subsp. muricata*

У етарском уљу хербе *S. minor* техником *GC-MS* је идентификовано 67 једињења (81,72%) док је *HS/GC-MS* техником идентификовано 12 компоненти (100%). Доминантне компоненте у етарском уљу хербе испитиване биљке су: салицилалдехид 27,4 %, карвакрол 9,28 % и линалоол 6,87 % (Табела 9). Најзаступљенија једињења етарског уља хербе регистрована *HS/GC-MS* техником су артемисиа кетон 24,58 %, хексанал 23,11 %, α -пинен 15,56 %, хептанал 10,25 % и β -пинен 9,23 % (Табела 10).

Табела 9. Састав етарског уља хербе *S. minor subsp. muricata* идентификован *GC-MS* техником (%)

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
1.	<i>n</i> -Октан	Друго	5,922	800	797	2,55
2.	2,4-диметил-Хептан	Друго	6,486	822*	817	Тр
3.	4-хидрокси-4-метил-2-Пентанон	Друго	7,088	844*	838	0,12
4.	(<i>Z</i>)-3-Хексен-1-ол	Друго	7,470	856*	852	0,32
5.	1-Хексанол	Друго	7,830	860*	863	0,18
6.	α -Тујен	ХМ	9,971	931	931	Тр
7.	(<i>E</i>)-2-Хептенал	Друго	10,741	947*	953	0,07
8.	Бензалдехид	Друго	10,903	959	958	0,21
9.	5-(<i>Z</i>)-Окта-1,5-диен-3-ол	Друго	11,320	977*	970	0,12
10.	1-Октен-3-ол	Друго	11,502	978	975	0,38
11.	2,3-Октанедион	Друго	11,677	982*	980	0,06
12.	6-Метил-5-хептен-2-он	Друго	11,800	985	984	0,11
13.	2-Метил-2-хептен-6-ол	Друго	11,978	985*	989	2,24
14.	(<i>E,E</i>)-2,4-Хептадиенал	Друго	12,642	1012	1008	0,60
15.	<i>p</i> -Цимен	ХМ	13,149	1022	1022	Тр
16.	Лимонен	ХМ	13,296	1031	1026	0,14
17.	3-Октен-2-он	Друго	13,662	1030	1036	Тр
18.	Салицилалдехид	Друго	13,827	1047*	1041	27,40

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
19.	(Z)-2-Октен-1-ол	Друго	14,697	1065*	1065	Тр
20.	(E,E)-3,5-Октадиен-2-он	Друго	14,804	1068*	1068	Тр
21.	cis-Линалоол оксид (фураноид)	ОМ	14,902	1066*	1070	4,21
22.	trans-Линалоол оксид (фураноид)	ОМ	15,469	1089*	1086	1,47
23.	3,5-Октадиен-2-он	Друго	15,647	1093*	1091	Тр
24.	Линалоол	ОМ	15,848	1098	1096	6,87
25.	Нонанал	Друго	15,993	1002	1100	1,49
26.	4-хидрокси-4-метил-Циклохексанон	Друго	16,201		1106	0,58
27.	Бензетанол	Друго	16,379	1112*	1111	0,68
28.	(E, Z)-2,6-Нонадиенал	Друго	17,774	1154*	1151	0,11
29.	Борнеол	ОМ	18,273	1165	1165	0,14
30.	1-Нонанол	Друго	18,380	1172*	1168	0,20
31.	Терпинен-4-ол	ОМ	18,668	1177	1176	0,23
32.	α-Терпинеол	ОМ	19,122	1189	1189	4,26
33.	Метил-салицилат	Друго	19,264	1195*	1193	0,83
34.	Сафранал	ОМ	19,452	1201*	1198	0,14
35.	Деканал	Друго	19,575	1203*	1202	0,28
36.	Нерол	Друго	20,385	1228	1225	3,63
37.	Гераниол	Друго	21,259	1250*	1251	1,35
38.	(E)-2-Деценал	Друго	21,502	1256*	1258	0,35
39.	5-пентил-2(3H)-Фуранон	Друго	21,641	1266*	1263	0,15
40.	Карвакрол	ОМ	22,830	1298	1298	9,28
41.	Ундеканал	Друго	23,001	1305*	1303	0,61
42.	(E, E)-2,4-Декадиенал	Друго	23,335	1314	1313	0,63
43.	Еугенол	ОМ	24,688	1356	1356	1,07
44.	(E)-2-Ундекенал	Друго	24,844	1357	1360	0,72
45.	β-Дамасценон	ОМ	25,592	1386	1384	0,18
46.	Тетрадекан	Друго	25,942	1400	1395	0,13
47.	6,10-Диметилундекан-2-он	Друго	26,133	1407*	1401	0,08
48.	Додеканал	Друго	26,249	1411	1404	0,17

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
49.	<i>trans</i> -β-Кариофилен	ОМ	26,761	1418	1421	0,18
50.	2-Метил-бутил-бензоат	Друго	27,195	1438	1436	0,05
51.	Геранилацетон	Друго	27,622	1455	1450	0,77
52.	<i>trans</i> -β-Јонон	ОМ	28,707	1485*	1485	2,04
53.	Пентадекан	Друго	28,879	1500	1492	0,09
54.	Тридеканал	Друго	29,329	1513	1506	0,64
55.	Дихидроактинидиолид	Друго	30,090	1532*	1532	0,31
56.	Спагуленол	ОМ	30,462	1577	1579	0,05
57.	Кариофилен оксид	ОМ	31,651	1582	1586	0,27
58.	Хексадекан	Друго	31,881	1600	1594	0,15
59.	Тетрадеканал	Друго	32,260	1609*	1607	0,07
60.	Хептадекан	Друго	34,611	1700	1693	0,09
61.	Пентадеканал	Друго	35,019	1715*	1709	0,33
62.	Бензил-бензоат	Друго	36,479	1763*	1765	0,23
63.	Фенантрен	Друго	36,829	1788*	1778	0,12
64.	Октадекан	Друго	37,204	1800	1793	0,07
65.	6,10,14-Триметил-2-пентадеканон	Друго	38,377	1843*	1840	1,40
66.	Метил палмитат	Друго	40,329	1926	1920	0,07
67.	Фитол	Друго	44,688	2117	2107	0,45
Укупно						81,72

Редослед једињења у табели уређен је према редоследу елуације (колони *HP-5MS*); *RT*: ретенционо време; *RL*: ретенциони индекс из литературе; *RI*: ретенциони индекс добијен експериментално на колони *HP-5MS* ко-инјектирањем *n*-алкана *C*₈-*C*₂₀ и *C*₂₁-*C*₄₄; тр: присуство компоненте у траговима (<0,05 %); * За идентификацију компоненти коришћена је *NIST* база (*National Institute of Standards and Technology* 2005) а за остала једињења *Adams* 2007; XM – угљоводонични монотерпени; OM – оксидовани монотерпени

Табела 10. Састав етарског уља хербе *S. minor* subsp. *muricata* идентификован *HS/GC-MS* техником (%)

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
1.	Хексанал	Друго	6,017	802*	801	23,11
2.	Хептанал	Друго	8,927	899	901	10,25
3.	α -Пинен	ХМ	10,024	932	932	15,56
4.	Камфен	ХМ	10,538	943*	947	2,69
5.	β -Пинен	ХМ	11,509	980	975	9,23
6.	2-Пентил-фуран	Друго	11,996	990	989	3,78
7.	<i>p</i> -Цимен	ХМ	13,202	1022	1023	2,87
8.	D-Лимонен	ХМ	13,352	1031	1027	1,28
9.	1,8-Цинеол	ОМ	13,478	1032	1031	1,11
10.	Артемисија кетон	Друго	14,508	1061*	1059	24,58
11.	Линалоол	ОМ	15,899	1098	1098	2,87
12.	Камфор	ОМ	17,582	1143	1145	2,67
Укупно						100

Редослед једињења у табели уређен је према редоследу елуације (колана *HP-5MS*); *RT*: ретенционо време; *RL*: ретенциони индекс из литературе; *RI*: ретенциони индекс добијен експериментално на колони *HP-5MS* ко-инјектирањем *n*-алкана *C*₈-*C*₂₀ и *C*₂₁-*C*₄₄; тр: присуство компоненте у траговима (<0,05 %); * За идентификацију компоненти коришћена је *NIST* база (*National Institute of Standards and Technology* 2005) а за остала једињења *Adams* 2007; ХМ – угљоводонични монотерпени; ОМ – оксидовани монотерпени

4.1.2.2. Хемијски састав етарског уља корена *S. minor* subsp. *muricata*

У етарском уљу корена *S. minor* регистроване су 62 компоненте (80,79%) *GC-MS* техником и 8 компоненти (100%) применом *HS/GC-MS* технике. Доминантне компоненте у етарском уљу корена су борнеол 19,83 %, миртенол 7,93 % и α -камфоленол 4,2 % (Табела 11). Применом *HS/GC-MS* технике утврђено је да су најзаступљеније компоненте хексанал 68,27 % и артемисија кетон 20,74 % (Табела 12).

Табела 11. Састав етарског уља корена *S. minor* subsp. *muricata* идентификован *GC-MS* техником (%)

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
1.	<i>n</i> -Октан	Друго	5,922	800	797	1,33
2.	2,4-диметил-Хептан	Друго	6,486	822*	817	Тр
3.	4-хидрокси-4-метил-2-Пентанон	Друго	7,087	844*	838	0,52
4.	Етилбензен	Друго	7,654	857*	857	Тр
5.	1-Октен-3-ол	Друго	11,500	978	975	3,77
6.	2-метил-3-Октанон	Друго	11,662	985*	980	0,45
7.	2,3-Октанедион	Друго	11,674	982*	980	0,47
8.	6-Метил-5-хептен-2-он	Друго	11,785	985	983	1,36
9.	2-Метил-3-хептен-6-ол	Друго	11,992	985*	989	0,9
10.	(<i>E,E</i>)-2,4-Хептадиенал	Друго	12,64	1012*	1008	1,57
13.	Бензен ацеталдехид	Друго	13,832	1046*	1041	3,28
15.	Апетофенон	Друго	14,685	1066*	1065	1,43
16.	(<i>E,E</i>)-3,5-Октадиен-2-он	Друго	14,804	1071*	1068	Тр

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
18.	<i>o</i> -Гуаиакол (2-метокси-Фенол)	Друго	15,491	1087	1087	2,65
19.	3,5-Октадиен-2-он	Друго	15,647	1093*	1091	1,41
20.	Линалоол	ОМ	15,845	1098	1096	0,99
21.	Нонанал	Друго	15,989	1102	1100	2,46
22.	<i>trans</i> -Ветроцитрал Ц	ОМ	16,160	1102*	1105	Тр
23.	7,7-Диметил--- бицикло[2,2,1]хептан-2-ол	Друго	16,621		1118	0,82
24.	α -Камфоленал	ОМ	16,835	1122	1125	1,45
25.	<i>trans</i> -Пинокарвеол	ОМ	17,314	1139	1138	0,48
26.	Камфор	ОМ	17,515	1143	1143	0,76
27.	Борнеол	ОМ	18,268	1165	1165	19,83
29.	<i>p</i> -Цимен-8-ол	ОМ	18,905	1183	1183	0,94
30.	α -Терпинеол	ОМ	19,124	1189	1189	1,94
31.	Метил-салицилат	Друго	19,263	1195*	1193	0,44
32.	Миртенол	ОМ	19,340	1194	1195	7,93
33.	α -Камфоленол	ОМ	19,544	1202*	1201	4,20
34.	Фрагранол	ОМ	19,938	1214*	1213	0,79
35.	γ -Изогераниол	ОМ	20,063	1222*	1216	1,11
36.	Нерол	ОМ	20,396	1228	1226	1,07
39.	<i>cis</i> -Миртанол	ОМ	21,291	1250	1252	0,43
40.	<i>trans</i> -Миртанол	ОМ	21,518	1258	1259	0,22
41.	5-пентил-2(3 <i>H</i>)-Фуранон	Друго	21,642	1266*	1263	0,43
42.	Нонанска киселина	Друго		1272*	1266	1,01
45.	Карвакрол	ОМ	22,831	1298	1298	2,24
46.	Ундеканал	Друго	22,995	1305*	1303	0,46
47.	(<i>E,E</i>)-2,4-Декадиенал	Друго	23,325	1314	1313	2,26
49.	Еугенол	ОМ	24,705	1356	1356	0,43
50.	1-Тетрадекен	Друго	25,693	1892*	1387	Тр
51.	(<i>Z</i>)-Јасмон	ОМ	26,043	1399*	1398	0,47
52.	Додеканал	Друго	26,242	1411	1404	0,48
53.	Геранилацетон	Друго	27,622	1455	1450	1,36
54.	1-Додеканол	Друго	28,256	1475*	1470	Тр
55.	<i>trans</i> - β -Јонон	ОМ	28,707	1485*	1485	0,43
56.	Пентадекен	Друго	28,891	1500	1492	1,44
58.	Бензофенон	Друго	32,814	1624	1628	0,43
59.	<i>cis</i> -Метил дихидројасмонат	ОМ	33,462	1652	1654	Тр
60.	Хептадекен	Друго	34,595	1700	1693	1,49
61.	Бензил бензоат	Друго	36,476	1772*	1765	1,28
62.	Октадекен	Друго	37,198	1800	1793	0,5
Укупно						80,79

Редослед једињења у табели уређен је према редоследу елуације (колана *HP-5MS*); *RT*: ретенционо време; *RL*: ретенциони индекс из литературе; *RI*: ретенциони индекс добијен експериментално на колони *HP-5MS* ко-инјектирањем *n*-алкана *C*₈-*C*₂₀ и *C*₂₁-*C*₄₄; тр: присуство компоненте у траговима (<0,05 %); * За идентификацију компоненти коришћена је *NIST* база (*National Institute of Standards and Technology* 2005) а за остала једињења *Adams* 2007; ХМ – угљоводонични монотерпени; ОМ – оксидовани монотерпени

Табела 12. Састав етарског уља корена *S. minor* subsp. *muricata* идентификован *HS/GC-MS* техником (%)

Редни број	Једињење	Класа једињења	<i>RT</i>	<i>RL</i>	<i>RI</i>	%
1.	Хексанал	Друго	6,020	802*	801	68,27
2.	α -Пинен	ХМ	10,024	932	932	1,58
3.	2-Пентил-фуран	Друго	11,996	990	989	2,78
4.	D-Лимонен	ХМ	13,352	1031	1027	0,96
5.	1,8-Цинеол	ОМ	13,478	1032	1031	2,04
6.	Артемисиа кетон	Друго	14,508	1061*	1059	20,74
7.	Линалоол	ОМ	15,899	1098	1098	1,99
8.	Камфор	ОМ	17,567	1143	1145	1,64
Укупно						100

Редослед једињења у табели уређен је према редоследу елуације (колана *HP-5MS*); *RT*: ретенционо време; *RL*: ретенциони индекс из литературе; *RI*: ретенциони индекс добијен експериментално на колони *HP-5MS* ко-инјектирањем *n*-алкана C_8 - C_{20} и C_{21} - C_{44} ; тр: присуство компоненте у траговима (<0,05 %); * За идентификацију компоненти коришћена је *NIST* база (*National Institute of Standards and Technology* 2005) а за остала једињења *Adams* 2007; ХМ – угљоводонични монотерпени; ОМ – оксидовани монотерпени

4.1.3. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима

Резултати испитивања укупног садржаја фенолних једињења помоћу *Folin-Ciocalteu*-ове методе приказани су у Табели 13. Највећа количина фенола била је присутна у метанолном екстракту корена *S. minor* ($497,47 \pm 3,80$ mg GAE/g). Нешто нижа количина фенолних једињења забележена је у етанолном екстракту корена испитиване биљке ($457,45 \pm 4,59$ mg GAE/g). Када су у питању екстракти хербе, највећи укупни фенолни садржај забележен је у метанолном екстракту хербе *S. minor* ($269,19 \pm 0,76$ mg GAE/g).

Са друге стране, најмања количина укупних фенолних једињења била је присутна у хексанском екстракту хербе *S. minor* ($1,38 \pm 0,11$ mg GAE/g) и у хексанском екстракту корена *S. minor* ($3,66 \pm 0,29$ mg GAE/g). Екстракти корена и хербе *S. minor* се статистички значајно разликују по укупном садржају фенола ($p = 0,001$). Разлике у садржају фенола између појединачних екстраката су приказане у Табели 13. Метанолни и етанолни екстракт корена имају приближно исти садржај фенола. Када се упореди садржај фенола у екстрактима добијеним истим растварачем али од различитих дрога (корен и херба), само ацетонски екстракт корена има статистички значајно већу количину фенола у односу на екстракт хербе ($p < 0,05$).

Резултати испитивања укупног садржаја флавоноида екстраката *S. minor* приказани су у Табели 13. Највећа количина флавоноида квантификована је у метанолном екстракту хербе *S. minor* ($1117,33 \pm 6,29$ mg RE/g). Најниже вредности забележене су код хексанског екстракта корена *S. minor* ($41,50 \pm 4,33$ mg RE/g) и хексанског екстракта хербе ове биљке ($57,33 \pm 2,89$ mg RE/g). Разлике у садржају флавоноида између појединачних екстраката су приказане у Табели 13. Ацетонски екстракт корена показао је статистички значајно већу количину флавоноида у односу на екстракт хербе ($p < 0,05$). Није било значајне разлике у садржају флавоноида између осталих екстраката направљених помоћу истих растварача а од различитих биљних дрога.

Табела 13. Укупни садржај фенола (*TPC*) и флавоноида (*TFC*) у испитиваним екстрактима *S. minor*

Екстракти <i>S. minor</i>	<i>TPC</i> (<i>mg GAE^a/g</i>)	<i>TFC</i> (<i>mg RE^b/g</i>)
СК1	497,47 ± 3,80*	836,50 ± 18,92 [†]
СК2	457,45 ± 4,59 [*]	936,50 ± 17,50
СК3	184,13 ± 0,85 [#]	714,00 ± 6,61
СК4	41,45 ± 0,54 [◇]	939,00 ± 13,92
СК5	3,66 ± 0,29	41,50 ± 4,33 [‡]
СХ1	269,19 ± 0,76 [§]	1117,33 ± 6,29
СХ3	52,40 ± 0,33	462,33 ± 1,44 [°]
СХ4	67,87 ± 0,77 [*]	889,00 ± 43,30
СХ5	1,38 ± 0,11	57,33 ± 2,89 [▼]

Резултати су изражени као средња вредност три независна мерења ± *S.D.*

^a *GAE* – еквиваленти галне киселине

^b *RE* - еквиваленти рутина

* статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК4, СК5, СХ4;

▪ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК4, СК5;

статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК5 и СХ3;

◇ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК5;

§ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СХ3, СХ4 и СХ5;

• статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СХ3 и СХ5;

† статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК5;

‡ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СК2, СК3 и СК4;

° статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СХ1, СХ4, СХ5 и СК3;

▼ статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$ у односу на СХ1, СХ3 и СХ4.

4.2. Антиоксидациона активност екстраката хербе и корена *S. minor* - *in vitro*

4.2.1. Антиоксидациони потенцијал екстраката хербе *S. minor* - *in vitro*

За испитиване екстракте хербе *S. minor* израчунат је индекс антиоксидационог потенцијала и изражен као средња вредност пет различитих вредности добијених помоћу *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за сваки испитивани екстракт. Највећи индекс антиоксидационог потенцијала имао је метанолни екстракт хербе *S. minor* (99,06), затим ацетонски екстракт хербе (60,96),

хлороформски екстракт (32,98) док је најмању вредност имао хексански екстракт хербе *S. minor* (3,14). (Табела 14)

Табела 14. Индекс антиоксидационог потенцијала екстраката хербе *S. minor*

Екстракти	ABTS	DPPH	CUPRAC	FRAP	TRP	Индекс антиоксидационог потенцијала
CX1	95,29	100,00	100,00	100,00	100,00	99,06
CX3	100,00	9,71	58,72	98,94	37,43	60,96
CX4	65,10	32,50	28,03	38,45	0,81	32,98
CX5	6,09	2,39	2,33	3,67	1,22	3,14

Индекс антиоксидационог потенцијала изражен је као средња вредност пет различитих вредности добијених помоћу *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за сваки испитивани екстракт.

Корелација индекса антиоксидационог потенцијала и укупног садржаја фенола

Корелација између укупног садржаја фенола и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката хербе *S. minor* приказана је на Графику 1. Постоји јака позитивна корелација између поменутих параметара ($r^2 = 0,77$; $r = 0,87$).

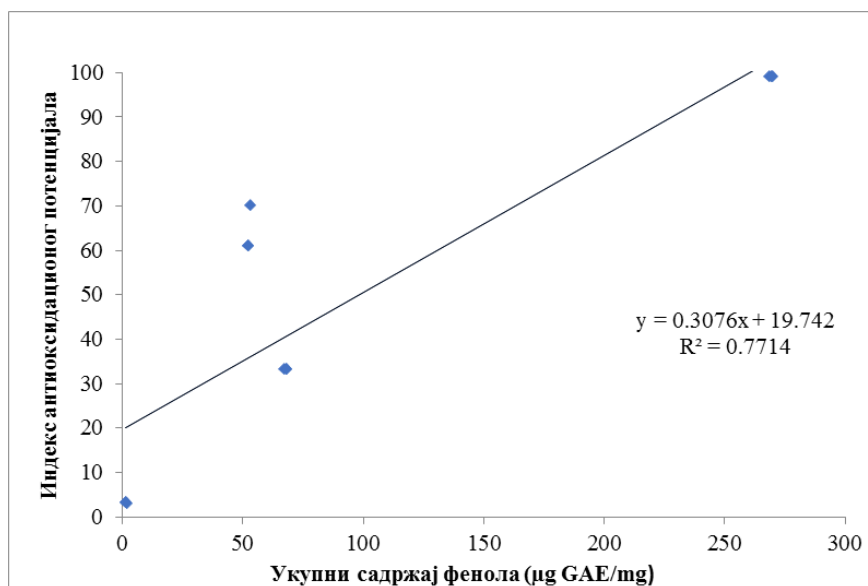


График 1. Корелација између укупног садржаја фенола и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката хербе *S. minor*

Корелација индекса антиоксидационог потенцијала и укупног садржаја флавоноида

Корелација између укупног садржаја флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката хербе *S. minor* приказана је на Графику 2. Постоји јака позитивна корелација између поменутих параметара ($r^2 = 0,573$; $r = 0,76$).

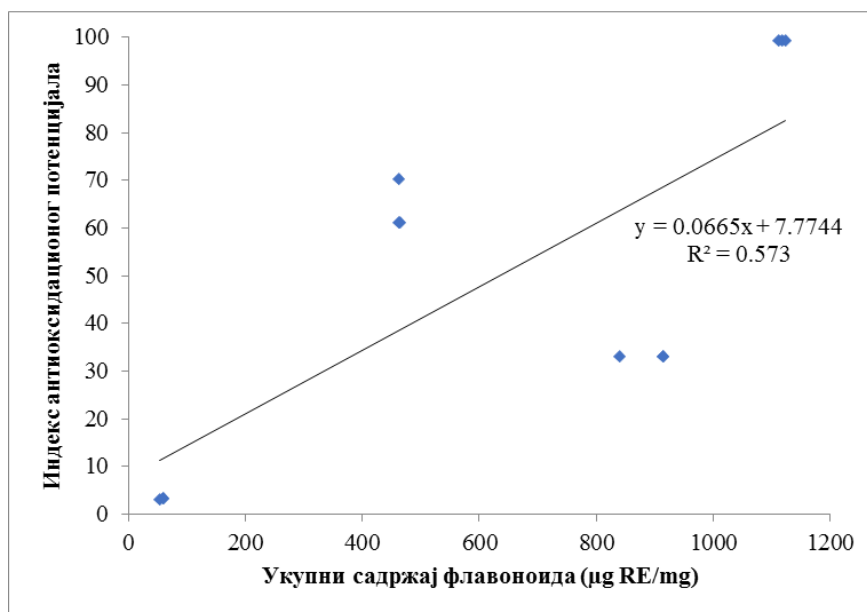


График 2. Корелација између укупног садржаја флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстракта хербе *S. minor*

4.2.2. Антиоксидациони потенцијал екстракта корена *S. minor in vitro*

За испитиване екстракте корена *S. minor* израчунат је индекс антиоксидационог потенцијала и изражен као средња вредност пет различитих вредности добијених помоћу *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за сваки испитивани екстракт. Највећи индекс антиоксидационог потенцијала имао је ацетонски екстракт корена *S. minor* (91,65), затим етанолни екстракт корена (81,85), метанолни екстракт (67,52), хлороформски екстракт (26,10) док је најмању вредност имао хексански екстракт корена *S. minor* (5,14). (Табела 15)

Табела 15. Индекс антиоксидационог потенцијала екстракта корена *S. minor*

Екстракти	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>	<i>CUPRAC</i>	<i>FRAP</i>	<i>TRP</i>	Индекс антиоксидационог потенцијала
СК1	100,00	76,33	53,87	87,94	19,46	67,52
СК2	99,26	100,00	94,08	100,00	15,89	81,85
СК3	73,64	98,73	100,00	85,87	100,00	91,65
СК4	59,46	32,04	15,05	22,44	1,51	26,10
СК5	10,96	5,61	3,48	5,12	2,74	5,14

Индекс антиоксидационог потенцијала изражен је као средња вредност пет различитих вредности добијених помоћу *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за сваки испитивани екстракт.

Корелација индекса антиоксидационог потенцијала и укупног садржаја фенола

Корелација између укупног садржаја фенола и индекса антиоксидационог потенцијала екстракта корена *S. minor* приказана је на Графику 3. Постоји јака позитивна корелација између поменутих параметара ($r^2 = 0,51$; $r = 0,71$).

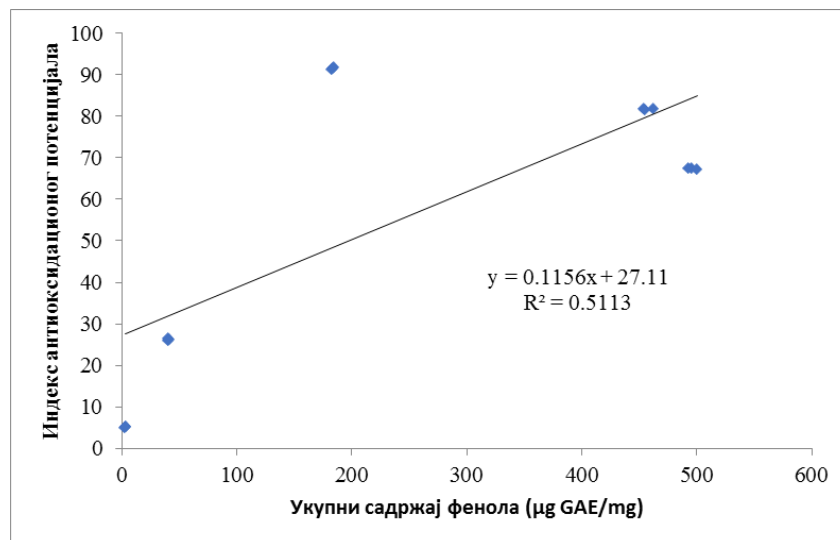


График 3. Корелација између укупног садржаја фенола и индекса антиоксидационог потенцијала екстракта корена *S. minor*

Корелација индекса антиоксидационог потенцијала и укупног садржаја флавоноида

Корелација између укупног садржаја флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстракта корена *S. minor* приказана је на Графику 4. Постоји јака позитивна корелација између поменутих параметара ($r^2 = 0,38$; $r = 0,61$).

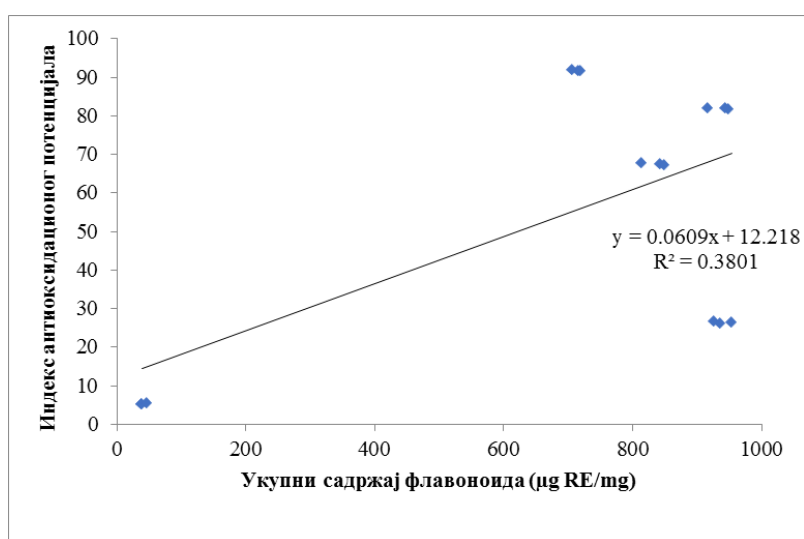


График 4. Корелација између укупног садржаја флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстракта корена *S. minor*

Вредности антиоксидационе активности испитиваних екстраката корена *S. minor* добијене применом свих пет различитих метода се статистички значајно разликују. Екстракти корена *S. minor* добијени растварачима различите поларности се статистички значајно разликују у способности неутрализације *ABTS* радикала ($p=0,014$), способности неутрализације *DPPH* радикала ($p=0,009$), способности редукције бакарног јона ($p=0,009$), способности редукције јона гвожђа ($p=0,008$) и укупном редукционом потенцијалу ($p=0,009$). Разлике између појединачних група у оквиру антиоксидационог теста приказане су у Табели 16. Вредности антиоксидационе активности испитиваних екстраката хербе *S. minor* добијене применом свих пет различитих метода се статистички значајно разликују. Екстракти хербе *S. minor* добијени растварачима различите поларности се статистички значајно разликују у способности неутрализације *ABTS* радикала ($p=0,016$), способности неутрализације *DPPH* радикала ($p=0,015$), способности редукције бакарног јона ($p<0,01$), способности редукције јона гвожђа ($p=0,016$) и укупном редукционом потенцијалу ($p=0,016$).

Табела 16. *In vitro* антиоксидациона активност екстраката *S. minor*

Екстракти <i>S. minor</i>	<i>ABTS</i> ($\mu\text{g TE/mg}$)	<i>DPPH</i> ($\mu\text{g TE/mg}$)	<i>CUPRAC</i> ($\mu\text{g TE/mg}$)	<i>FRAP</i> ($\mu\text{g Fe/mg}$)	<i>TRP</i> ($\mu\text{g AAE/mg}$)
СК1	76,97 ± 10,23*	126,44 ± 0,46 ^o	605,14 ± 0,86 [†]	214,02 ± 0,32 ^β	5,96 ± 0,01
СК2	77,54 ± 0,16	96,51 ± 0,07	346,49 ± 0,14 [‡]	188,22 ± 0,50 ^γ	1,16 ± 0,01
СК3	57,10 ± 0,49	124,83 ± 0,46	643,18 ± 0,14 ^o	183,79 ± 0,43 [▲]	7,30 ± 0,13 [▲]
СК4	46,11 ± 1,03	40,51 ± 0,12	96,80 ± 0,14	48,02 ± 0,63	0,11 ± 0,02
СК5	8,50 ± 0,49	7,10 ± 1,29	22,41 ± 0,38	10,96 ± 0,29	0,20 ± 0,01
СХ1	78,81 ± 0,82 [*]	124,03 ± 0,83 [§]	652,53 ± 0,50 ^{**}	205,62 ± 2,53	7,40 ± 0,02 [▼]
СХ3	82,70 ± 0,50 [#]	120,43 ± 0,46 [*]	383,16 ± 0,38 ^{**}	203,44 ± 0,53	2,77 ± 0,00
СХ4	53,83 ± 1,35	40,31 ± 0,54	182,90 ± 0,55	78,22 ± 0,44 ^η	0,06 ± 0,01
СХ5	5,04 ± 0,50	2,96 ± 1,06	15,22 ± 0,38	7,55 ± 0,22	0,09 ± 0,01

Вредности у табели су приказане као средња вредност три мерења ± стандардна девијација. *ABTS* * статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК3, СК4 и СК5; ■ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СХ5; # статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СХ5.

DPPH ◊ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК4 и СК5; § статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СХ4 и СХ5; • статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СХ4 и СХ5;

CUPRAC † статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК2, СК4 и СК5; ‡ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК3, СК4 и СК5; ° статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК4 и СК5; ** статистички значајна разлика на нивоу $p<0,01$ у односу на СХ3, СХ4 и СХ5; ■ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,01$ у односу на СХ4 и СХ5; β статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК4 и СК5; γ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК5;

▲ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК4; η статистички значајна разлика на нивоу $p<0,01$ у односу на СХ1 и СХ3;

TRP ▲ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СК1, СК2, СК4 и СК5;

▼ статистички значајна разлика на нивоу $p<0,05$ у односу на СХ3, СХ4 и СХ5.

4.3. Ефекти екстракта *S. minor* на параметре оксидационог стреса на анималном моделу сепсе

4.3.1. Ефекти оралне примене екстракта *S. minor* на параметре оксидационог стреса

Ефекат оралне примене етанолног екстракта корена *S. minor* на прооксидационе параметре (укупни сулфхидрили (*TSH*), *TBARS*, *NOx*, O_2^-) и антиоксидациону активност супероксид дисмутазе (*SOD*) код пацова са индукованом сепсом приказан је на Графицима 5, 6, 7, 8 и 9. Тестирани екстракт је примењен у две различите концентрације: 100 mg/kg и 300 mg/kg.

Вредности укупних сулфхидрила у контролним групама и групама које су третиране оралном применом екстракта представљене су графички (График 5). Орална примена испитиваног екстракта (100 mg/kg и 300 mg/kg) није имала значајан ефекат на вредност укупних сулфхидрила у *CLP* групи. Постојало је значајно смањење вредности укупних сулфхидрила код животиња са сепсом које су третиране пероралним путем са 100 mg/kg екстракта корена *S. minor* (*S1+CLP*) у поређењу са *S1* групом ($p = 0,007$). Значајно смањење вредности укупних сулфхидрила било је присутно и код животиња са сепсом које су третиране екстрактом корена *S. minor* у концентрацији 300 mg/kg пероралним путем (*S2+CLP*) у поређењу са *S2* групом ($p = 0,034$). Показано је да разлика у коришћеним концентрацијама екстракта није значајно утицала на ниво *TSH* ($p > 0,05$).

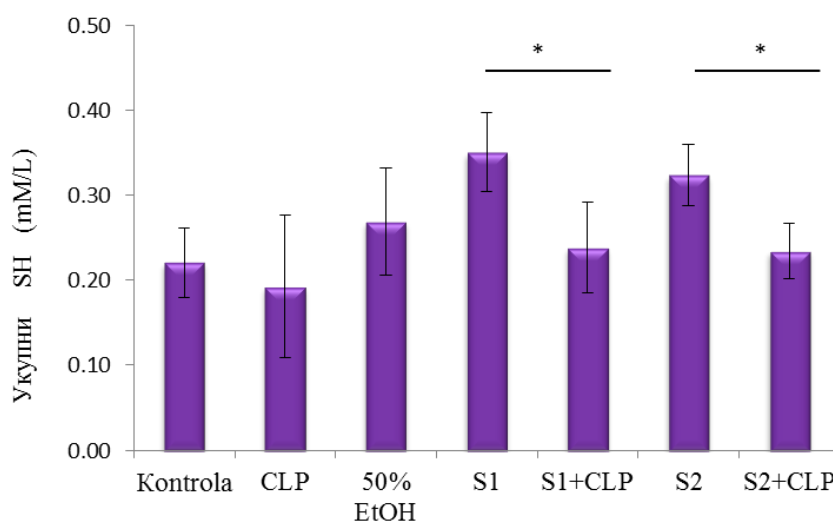


График 5. Ефекти пероралне примене екстракта *S. minor* на укупни садржај сулфхидрила у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност $\pm S.D.$

* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$.

Концентрација *TBARS* мерене у контролним групама и групама које су третиране оралном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 6). У односу на контролну групу животиња, код животиња са индукованом сепсом (*CLP*), концентрација *TBARS* се значајно повећала ($p < 0,01$).

Постојала је значајна разлика у нивоу *TBARS* у групи са сепсом која је третирана екстрактом веће концентрације (*S2+CLP*) у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$). Овакав тренд међутим није примећен између групе третиране нижом концентрацијом екстракта (*S1+CLP*) и *CLP* групе. Ниво *TBARS* у контролној групи значајно се разликовао у односу на *TBARS* у *CLP* групама третираним оралном применом екстракта у обе концентрације - 100 mg/kg ($p = 0,008$) и 300 mg/kg ($p = 0,04$).

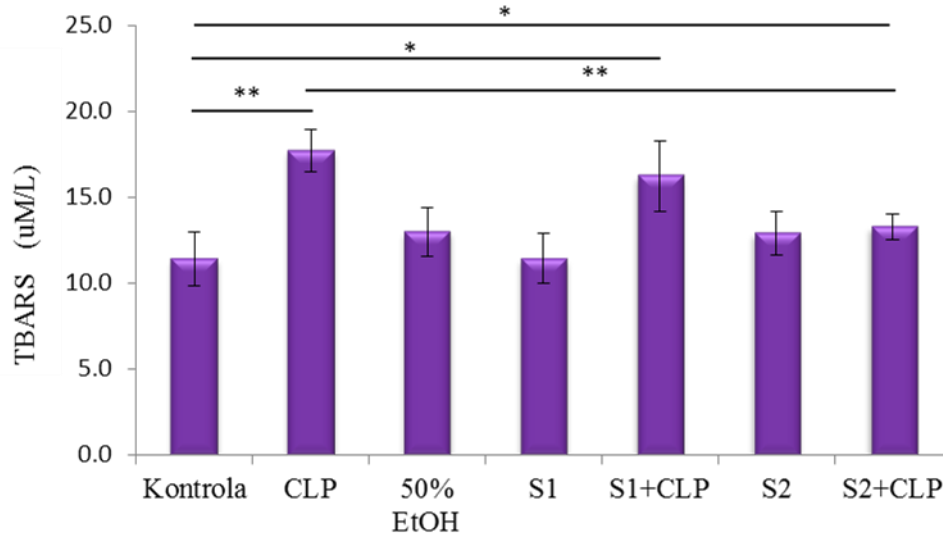


График 6. Ефекти пероралне примене екстракта *S. minor* на вредности *TBARS* у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност $\pm S.D.$

* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$.

** Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$.

Средње вредности укупних нитрата и нитрита (NO_x) у крвној плазми животиња у контролним групама и групама које су третиране оралном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 7). Концентрација NO_x у контролној групи са сепсом (*CLP*) била је значајно виша у поређењу са контролном, лажно оперисаном групом ($p < 0,01$). Екстракт у концентрацији 100 mg/kg значајно је смањив вредности NO_x у *S1+CLP* групи у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$). Ниво NO_x у *CLP* групи третираној оралном применом екстракта у концентрацији 300 mg/kg (*S2+CLP*) био је значајно нижи у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$).

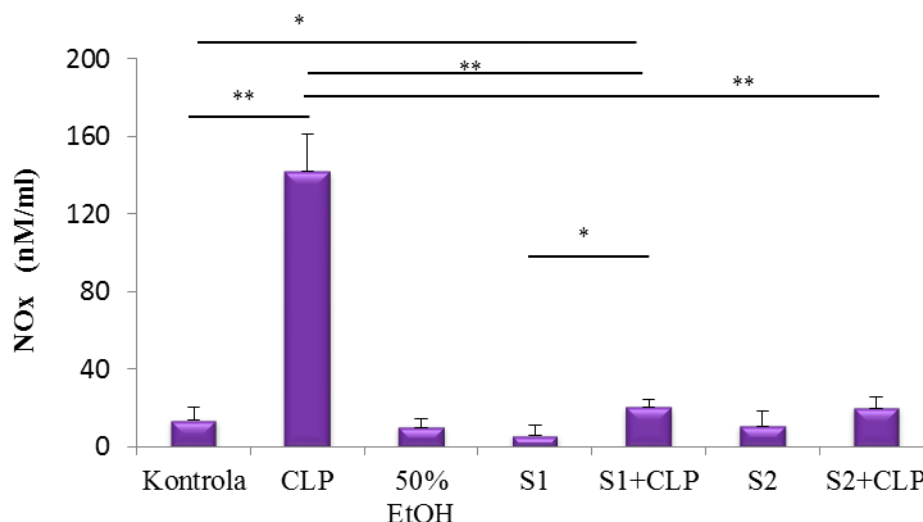


График 7. Ефекти пероралне примене екстракта *S. minor* на вредности укупних нитрата и нитрита (NO_x) у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност $\pm S.D.$

* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$.

** Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$.

Средње вредности нивоа супероксидног анион радикала у плазми у контролним групама и групама које су третиране оралном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 8). Ниво O_2^- је био значајно виши у *S1+CLP* и *S2+CLP* групи у поређењу са контролном групом, независно од начина примене екстракта ($p < 0.01$). Орално примењени екстракт у сепси (*S1+CLP* и *S2+CLP* група) довео је до значајног пада нивоа O_2^- у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,05$).

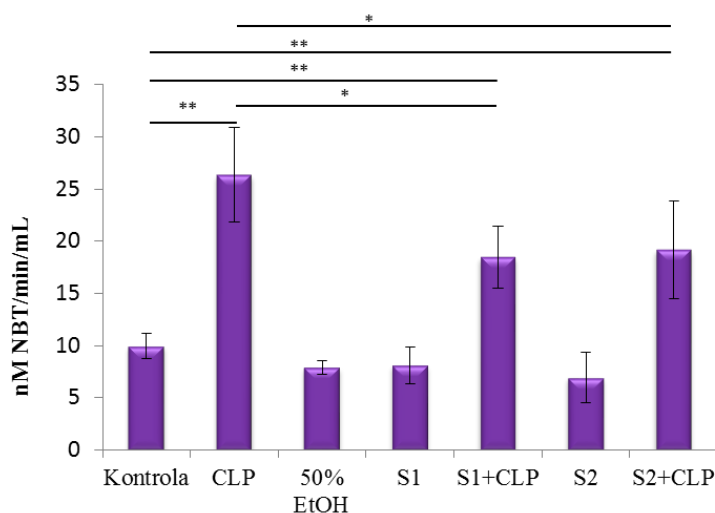


График 8. Ефекти пероралне примене екстракта *S. minor* на вредности нивоа супероксидног анион радикала у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност $\pm S.D.$

* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$.

** Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$.

Средње вредности активности супероксид дисмутазе (*SOD*) у контролним групама и групама које су третиране оралном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 9). Активност супероксид дисмутазе у групи са сепсом која је третирана оралном применом екстракта у нижој концентрацији (*S1+CLP*) била је значајно виша у поређењу са *CLP* групом. Ипак овакав ефекат није примећен у групи животиња које су биле на третману екстрактом више концентрације.

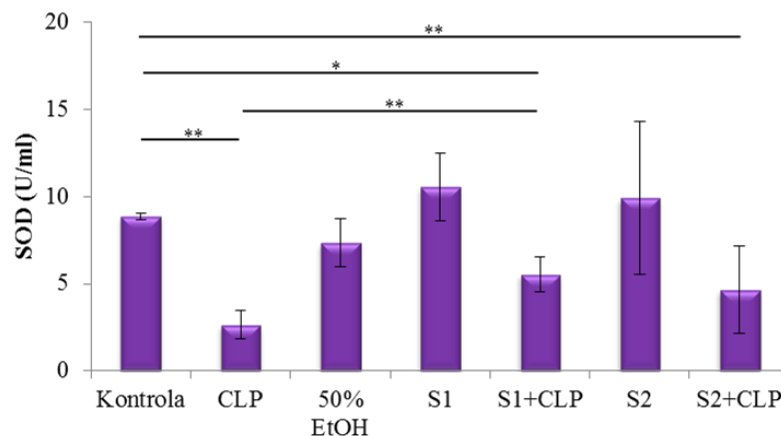


График 9. Ефекти пероралне примене екстракта *S. minor* на активност супероксид дисмутазе (*SOD*) на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

* Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,05$.

** Статистички значајна разлика на нивоу $p < 0,01$.

4.3.2. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на параметре оксидационог стреса

Ефекат интраперитонеалне примене етанолног екстракта корена *S. minor* у концентрацији 100 mg/kg на прооксидационе параметре (*TSH*, *TBARS*, *NOx*, $O_2^{\cdot-}$) и антиоксидациону активност *SOD* код пацова са индукованом сепсом приказан је на Графицима 10, 11, 12, 13 и 14.

Средње вредности укупних сулфхидрила мерене у контролним групама и групи која је третирана интраперитонеалном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 10). Интраперитонеална примена испитиваног екстракта (100 mg/kg) није имала значајан ефекат на вредност укупних сулфхидрила у *CLP* групи. Примећен је исти образац, као и у случају орално примењених екстраката – уочава се значајно смањење *TSH* код животиња са сепсом које су третиране *i.p.* применом екстракта (*S1+CLP*), у поређењу са *S1* групом здравих животиња код којих је примећен само екстракт ($p = 0,027$).

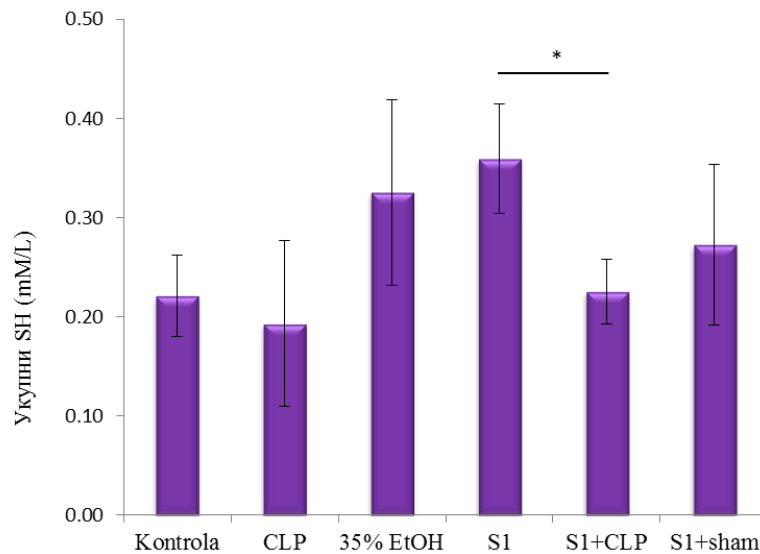


График 10. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на укупни садржај сулфхидрила у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

Концентрације *TBARS* мерене у контролним групама и групи која је третирана интраперитонеалном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 11). Ниво *TBARS* у групи са сепсом након *i.p.* примене тестираног екстракта (*S1+CLP*) била је значајно нижа у поређењу са *CLP* групом ($p = 0,004$).

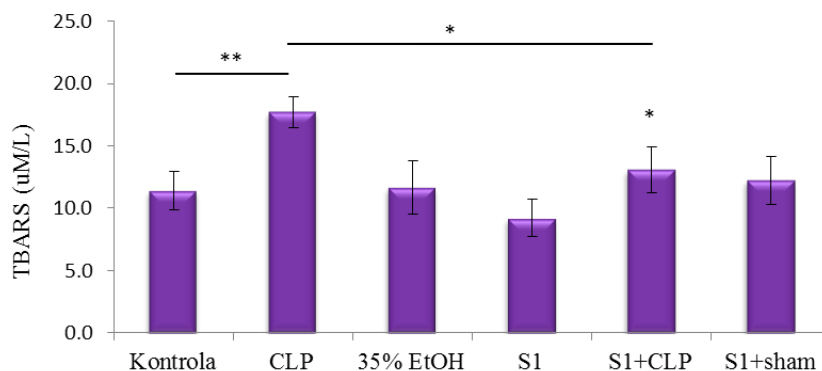


График 11. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на вредности *TBARS* у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

Средње вредности укупних нитрата и нитрита (NO_x) мерене у контролним групама и групи која је третирана интраперитонеалном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 12). Интраперитонеална примена екстракта *S. minor* није утицала на ниво NO_x у *S1+CLP* групи у поређењу са *CLP* или контролним групама.

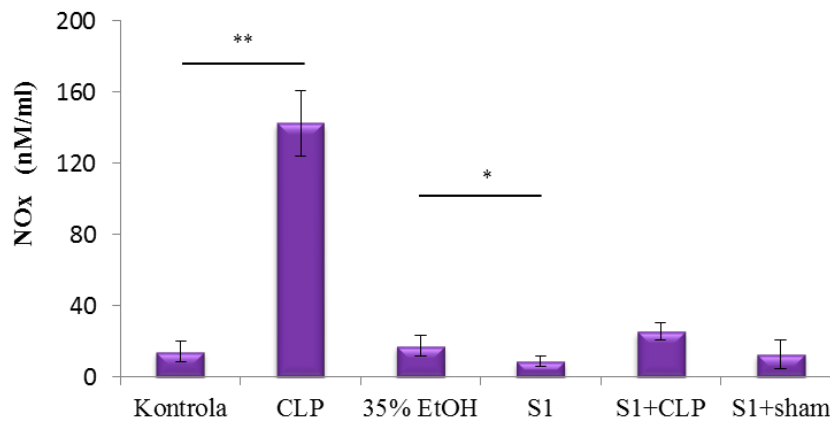


График 12. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на вредности укупних нитрата и нитрита (NO_x) у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

Средње вредности нивоа супероксидног анион радикала мерене у контролним групама и групи која је третирана интраперитонеалном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 13). Интраперитонеална примена екстракта у групи са сепсом (*S1+CLP*) није утицала на ниво супероксидног аниона у поређењу са контролним или *CLP* групама.

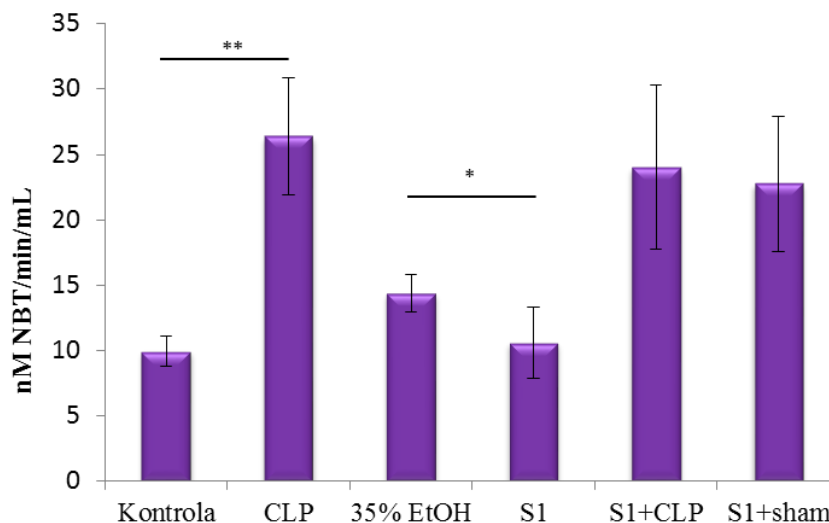


График 13. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на вредности супероксидног анион радикала у крвној плазми пацова на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

Средње вредности активности супероксид дисмутазе мерене у контролним групама и групи која је третирана интраперитонеалном применом екстракта корена *S. minor* представљене су табеларно и графички (График 14). Постојала је значајна разлика у активности *SOD* између контролне и *S1+CLP* групе након интраперитонеалне примене екстракта.

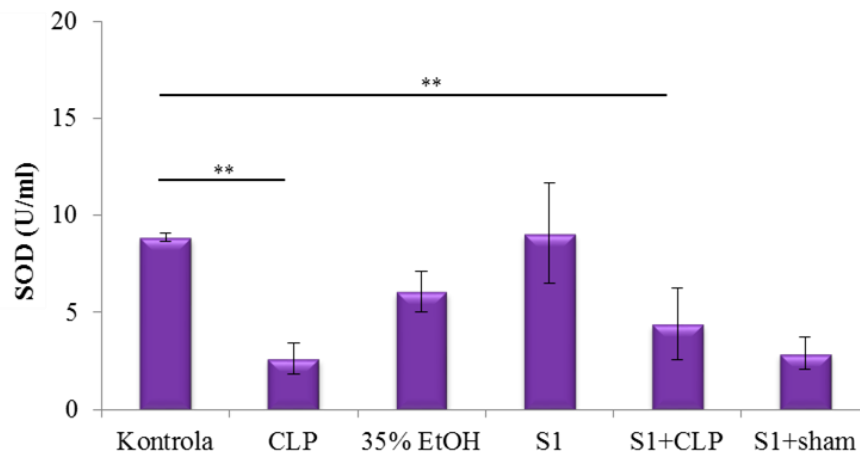


График 14. Ефекти интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на вредности активности супероксид дисмутазе на анималном моделу сепсе. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

Значајно смањење вредности *TBARS* показано је у *CLP* групи након *i.p.* примене екстракта *S. minor* (100 mg/kg) у поређењу са орално примењеним екстрактом у истој концентрацији ($p < 0,05$). Није било значајне разлике у вредностима *TSH*, *NOx*, O_2^- и *SOD* између *CLP* група након оралне и интраперитонеалне примене екстракта у истој концентрацији. (График 15)

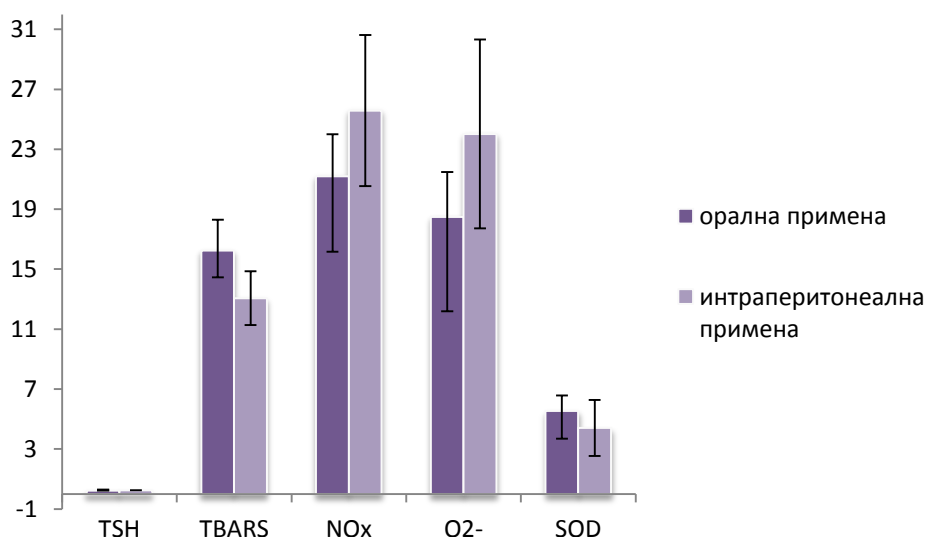


График 15. Поређење ефеката оралне и интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* на параметре оксидационог стреса и активност *SOD*. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

4.4. Антимикробна активност екстраката корена и хербе *S. minor*

Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности екстраката *S. minor* subsp. *turicata* уз коришћење стандардних позитивних контрола (доксидина и нистатина) и негативне контроле (диметилсулфоксида), спроведеног на девет сојева бактерија и једном соју гљива, приказани су у Табели 17. Резултати су изражени као минимална инхибиторна концентрација (МИК) и минимална бактерицидна/фунгицидна концентрација (МБК/МФК) испитиваног узорка. Антимикробна активност се разликовала у зависности од тестираног микроорганизама и типа екстракта.

МИК вредности испитиваних екстраката варирале су од 0,08 до 50,0 *mg/ml*, а МБК вредности су биле у распону од 0,39 до 50,0 *mg/ml*. Најосетљивији су били сојеви *S. aureus* и *B. cereus*. Међу испитиваним екстрактима, хлороформски екстракт корена *S. minor* је показао најјачу антибактеријску активност, са МИК вредностима у распону 0,1 – 1,56 *mg/ml*, и МБК концентрацијама у опсегу 0,39 – 6,25 *mg/ml*. Показана је значајна антибактеријска активност овог екстракта на све испитиване бактеријске сојеве, од којих су сојеви *B. cereus* и *S. aureus* показали највишу сензитивност, са вредношћу МИК 0,10 *mg/ml* и МБК 0,39 *mg/ml*. Поред хлороформског екстракта корена, високу антибактеријску активност на свим испитиваним сојевима су показали и метанолни екстракт хербе (МИК 0,1-3,13 *mg/ml*; МБК 0,39-3,13 *mg/ml*) и хлороформски екстракт хербе *S. minor* (МИК 0,39-6,25 *mg/ml*; МБК 3,13-25,00 *mg/ml*).

Метанолни екстракт корена показао је значајну активност на бактеријским сојевима *S. aureus*, *B. cereus*, *S. enteritidis*. Ацетонски екстракт корена је показао значајну активност на све три Грам (+) бактерије (*S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis*), а када су у питању Грам (-) бактерије, показана је значајна активност на сојевима *S. enteritidis* и *E. coli*. Етанолни и хексански екстракт корена нису показали значајну активност на испитиваним сојевима бактерија. Хексански екстракт хербе није показао значајну антибактеријску активност осим у случају инхибиције активности *S. aureus*. Ацетонски екстракт хербе је показао значајну активност на све три Грам (-) бактерије, а када су у питању Грам (+) бактерије, показана је значајна активност на *S. enteritidis*.

У циљу испитивања антифунгалне активности екстраката, коришћена је гљивица *Candida albicans*. Добијени резултати приказани су у Табели 17. МИК вредности екстраката су биле у опсегу 0,32-12,5 *mg/ml*, а МФК вредности 0,64-25 *mg/ml*. Значајну антифунгалну активност испољили су ацетонски екстракт хербе (МИК 0,32 *mg/ml*; МФК 0,64 *mg/ml*) и хексански екстракт хербе (МИК 0,64 *mg/ml*; МФК 1,29 *mg/ml*). Метанолни, ацетонски и хексански екстракт корена су показали умерену и подједнаку антифунгалну активност (МИК 6,25 *mg/ml*; МФК 6,25 *mg/ml*).

МИК и МБК вредности екстраката биле су знатно више од вредности добијених за позитивне контроле чије су вредности изражене у $\mu\text{g/ml}$. Доксидин је испољио најбољи антибактеријски ефекат на сојеве *S. enteritidis* и *E. faecalis* (МИК 0,90 $\mu\text{g/ml}$; МБК 1,90 $\mu\text{g/ml}$). Антимикотик нистатин је коришћен као позитивна контрола и испољио је МИК вредност 7,81 $\mu\text{g/ml}$ и МФК вредност 15,61 $\mu\text{g/ml}$.

Табела 17. Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности екстраката *S. minor*

Сојеви	МИК/МБК (mg/ml)					Контроле (µg/ml)					
	СК1	СК2	СК3	СК4	СК5	СХ1	СХ3	СХ4	СХ5	DMSO %	Доксициклин (МИК/МБК)
Грам (-) бактерије											
<i>S. enteritidis</i>	3,13/ 6,25	12,50/ 25,0	3,13/ 6,25	0,78/ 0,78	6,25/ 12,5	3,13/ 3,13	0,16/ 5,15	3,13/ 12,50	10,30/ 20,6	12,5/ 12,5	0,90/ 1,90
<i>E. coli</i>	12,5/ 12,5	12,50/ 50,0	0,78/ 12,5	0,20/ 6,25	12,5/ 25,0	3,13/ 3,13	2,58/ 20,69	3,13/ 12,5	20,6/ 41,2	12,5/ 12,5	15,61/ 15,61
<i>P. aeruginosa</i>	12,5/ 12,5	12,5/ 25,0	50,0/ 50,0	0,39/ 1,56	6,25/ 50,0	1,56/ 3,13	5,15/ 5,15	3,13/ 6,25	41,2/ 41,2	12,5/ 12,5	15,61/ 15,61
<i>P. mirabilis</i>	12,5/ 50,0	12,5/ 25,0	50,0/ 50,0	0,39/ 6,25	6,25/ 50,0	3,13/ 3,13	5,15/ 10,3	6,25/ 6,25	20,6/ 41,2	12,5/ 12,5	7,81/ 15,61
<i>K. pneumoniae</i>	12,5/ 12,5	12,5/ 25,0	6,25/ 12,5	0,39/ 6,25	12,5/ 25,0	3,13/ 3,13	10,3/ 20,69	6,25/ 6,25	20,6/ 41,2	12,5/ 12,5	15,61/ 15,61
<i>E. aerogenes</i>	12,5/ 12,5	12,5/ 25,0	12,5/ 12,5	1,56/ 6,25	20,6/ 20,6	1,56/ 3,13	10,3/ 10,3	3,13/ 25,0	10,3/ 20,6	12,5/ 12,5	7,81/ 15,61
Грам (+) бактерије											
<i>B. cereus</i>	1,56/ 3,13	12,5/ 50,0	0,78/ 0,78	0,10/ 0,39	6,25/ 25,0	0,39/ 0,39	1,29/ 2,58	1,56/ 3,13	5,15/ 20,6	12,5/ 12,5	0,90/ 15,61
<i>S. aureus</i>	0,39/ 6,25	25,0/ 25,0	0,39/ 1,56	0,10/ 0,39	6,25/ 12,5	0,10/ 0,39	0,08/ 2,58	0,78/ 12,5	0,64/ 20,6	12,5/ 12,5	7,81/ 15,61
<i>E. faecalis</i>	6,25/ 12,5	6,25/ 12,5	0,39/ 0,78	0,39/ 0,39	6,25/ 12,5	0,39/ 0,39	0,32/ 0,64	0,39/ 6,25	10,3/ 20,6	12,5/ 12,5	0,90/ 1,90
Гљивица											
<i>C. albicans</i>	6,25/ 6,25	12,5/ 25,0	6,25/ 6,25	12,5/ 25,0	6,25/ 6,25	6,25/ 12,5	0,32/ 0,64	6,25/ 12,5	0,64/ 1,29	12,5/ 12,5	7,81/ 15,61

4.5. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 (COX-1)

Антиинфламацијска активност етанолног екстракта корена биљке *S. minor* испитана је у *in vitro* условима мерењем способности инхибиције активности ензима циклооксигеназа-1. Резултати су изражени у процентима (%) инхибиције активности *COX-1* и представљају средњу вредност три мерења \pm стандардна девијација. Добијени резултати указују да је екстракт у концентрацији $50 \mu\text{g/mL}$ показао $76 \pm 3,76$ % инхибиције активности *COX-1* ензима у присуству инхибитора *COX*, индометацина, као позитивне контроле. Индометацин је инхибирао ензимску активност *COX-1* за $32 \pm 4,76$ % што је више него два пута слабија инхибиторна активност у односу на ефекат етанолног екстракта *S. minor*.

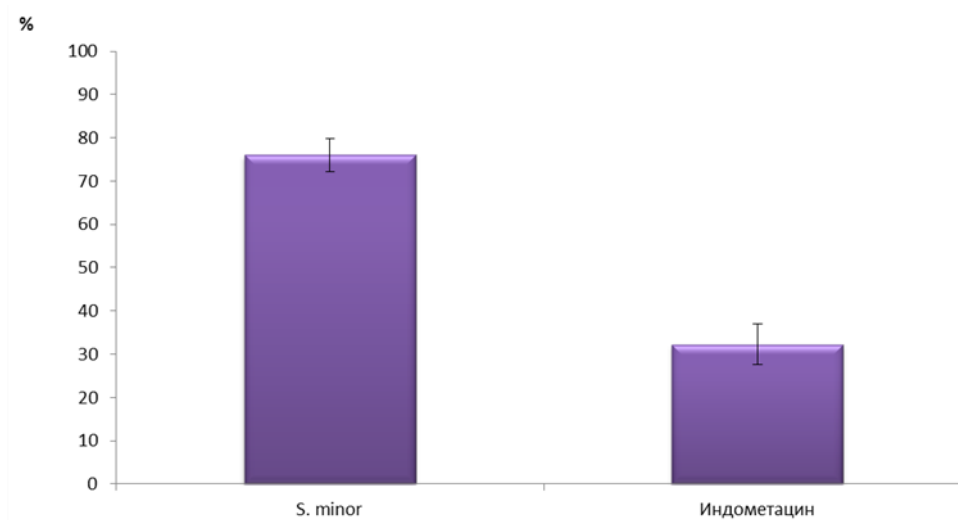


График 16. *In vitro* инхибиција ензимске активности екстракта биљке *S. minor* и индометацина, изражена у процентима инхибиције (%) активности *COX-1* ензима. Вредности су приказане као средња вредност \pm *S.D.*

5. ДИСКУСИЈА

Род *Sanguisorba* обухвата бројне биљне врсте које примарно настањују просторе Европе и Азије и имају своју примену у традиционалној медицини од давнина. Досадашња истраживања су највише била фокусирана на врсту *Sanguisorba officinalis*, док је литературних података о врсти *Sanguisorba minor* знатно мање. *S. minor* се традиционално користи у облику инфуза или тинктуре, због своје диуретичке и дигестивне активности, али и у терапији грознице и дијареје (39, 44). Литературни подаци о подврсти *Sanguisorba minor* subsp. *muricata* су оскудни. Како наведена биљка расте на територији Републике Србије и користи се у традиционалној медицини, циљ ове докторске дисертације била је хемијска карактеризација различитих екстраката хербе и корена ове биљке, као и процена њиховог фармаколошког потенцијала заснованог на употреби у традиционалној медицини (1, 2, 11).

Укупни садржај фенола и флавоноида у екстрактима *S. minor*

Sanguisorba врсте представљају богате изворе секундарних метаболита са значајним лековитим својствима због којих имају широку примену у традиционалној медицини од давнина. Више од 120 једињења која припадају различитим хемијским класама детектовано је у херби и корену ових биљака, посебно у *S. minor* и *S. officinalis* врстама, од којих феноли и тритерпени представљају доминантне секундарне метаболите (2, 4). Биоактивна својства *Sanguisorba* биљака су у највећој мери последица присуства бројних полифенолних једињења (2, 9). У неколико истраживања је и описан садржај фенола у *Sanguisorba* врстама, као и састав њихових надземних и подземних делова (10 - 12). До сада је изоловано приближно педесет полифенолних једињења из биљака овог рода (2). Најважнији представници полифенолних једињења за род *Sanguisorba* јесу фенолне киселине, флавоноиди и танини (2, 4, 11).

Код свих испитиваних екстраката *S. minor* укупни садржај фенолних једињења и флавоноида се разликовао у зависности од типа екстракта и коришћеног дела биљке. Метанолни и етанолни екстракт корена *S. minor* били су најбогатији фенолним једињењима са приближно истим садржајем, а потом следе и метанолни екстракт хербе и ацетонски екстракт корена. Са друге стране, најмања количина укупних фенолних једињења била је присутна у неполарном, хексанском екстракту како хербе тако и корена *S. minor*. Укупни садржај фенола је генерално био виши у екстрактима корена у односу на екстракте хербе *S. minor* (Табела 13). Такође, у најактуелнијем истраживању аутора *Finimundy* и сарадника из 2020. године потврђено је да је метанолни екстракт корена *S. minor* имао већи садржај фенола у односу на метанолни екстракт лишћа (28). Ако посматрамо садржај фенола у екстрактима од различитих биљних делова, у овом случају од корена и хербе *S. minor*, који су добијени истим растварачем, само ацетонски екстракт корена има статистички значајно већу количину фенола у односу на екстракт хербе.

Сви испитивани екстракти *S. minor* су садржали значајну количину флавоноида, изузев хексанских екстраката корена и хербе. Највећа количина флавоноида откривена је у метанолном екстракту хербе *S. minor*. Када се упореди садржај флавоноида у екстрактима добијеним истим растварачем, али од различитих дрога (корен и херба),

само ацетонски екстракт корена је имао значајно већу количину флавоноида у односу на екстракт хербе (Табела 13).

С обзиром да су литературни подаци о садржају фенола и флавоноида у биљци *S. minor* subsp. *muricata* оскудни, добијени резултати се могу тумачити у светлу података доступних за врсту *S. minor*. У складу са нашим резултатима, досадашња истраживања су такође показала да су екстракти *S. minor* богати фенолним једињењима (48, 131). Управо су фенолна једињења од главног значаја за биоактивна својства врсте *S. minor* а у неколико истраживања је поред укупног садржаја наведен и састав фенола корена и хербе ове биљке (9, 10).

Испитивани су метанолни екстракти корена и хербе/лишћа *S. minor* са територије централне Грчке у којима је, као и у нашем истраживању, показан висок садржај фенолних једињења који је варирао у зависности од различитих услова раста наведене биљке (9, 28). Услови за раст могу значајно да утичу на хемијски састав биљке, па и на укупни садржај фенола (132). Генерално, годишње доба у коме је одређена биљна врста убрана значајно утиче на садржај биоактивних компоненти те биљке (28, 133). Ипак, поређење садржаја фенолних једињења добијеног у нашем и у претходно наведеним истраживањима није једноставно изводљиво услед различитих еквивалената коришћених за изражавање резултата. Суви екстракт лишћа *S. minor* са територије Шпаније имао је такође висок садржај укупних фенола ($5305,1 \pm 21,12 \text{ mg GAE/g}$) али треба нагласити да је овај резултат изражен по јединици масе свеже биљке, па се не може извршити поређење са резултатима нашег истраживања (46). Иста ситуација је у истраживању где је показано да водено-етанолни екстракт лишћа *S. minor* има укупни садржај фенола 17 mg GAE/g свеже биљке (47).

Једно од ретких истраживања чије резултате можемо упоредити са нашим у смислу истих јединица изражавања резултата је истраживање спроведено у Ирану 2019. године. Метанолни екстракт хербе *S. minor* са територије Ирана имао је знатно нижи укупни садржај фенола ($0,11 \text{ mg GAE/g}$) у односу на метанолни екстракт хербе *S. minor* из Србије ($269,19 \text{ mg GAE/g}$) (131). Ако поредимо *S. minor* и *S. officinalis*, као најиспитиванију биљку рода *Sanguisorba*, уочава се да метанолни екстракт корена *S. officinalis* показује знатно нижи садржај укупних фенола у три различита истраживања ($158,7 \text{ mg GAE/g}$, 159 mg GAE/g и $46,1 \text{ mg GAE/g}$ сувог екстракта) у односу на метанолни екстракт корена *S. minor* у нашем истраживању ($497,4 \text{ mg GAE/g}$ сувог екстракта) (134 - 136).

У неколико досадашњих истраживања такође је испитан и показан висок садржај флавоноида у различитим екстрактима *S. minor* и *S. officinalis*, али поређење са нашим резултатима није изводљиво услед различитих еквивалената коришћених за изражавање резултата (9, 13, 28, 42). Наиме, у већини публикованих радова за изражавање садржаја флавоноида коришћен је кверцетин или катехин, док је у овој докторској дисертацији као еквивалент коришћен рутин.

На садржај укупних фенола и антиоксиданаса у највећој мери утичу поларност растварача за екстракцију, метода екстракције и хемијски састав узорка (137, 138). Фенолна једињења се генерално боље растварају у растварачима веће поларности, а растварачи као што су поларни алкохоли дају већи принос ових једињења у односу на неке друге типове растварача. У више студија је показано да су најефикаснији растварачи за екстракцију фенолних једињења метанол, етанол, ацетон и етил-ацетат,

чиме смо се водили при дизајнирању ове студије (139). Метанол успешно екстрахује полифеноле мање молекулске масе, а ацетон је погодан за екстракцију антиоксиданаса веће молекулске масе (138). Мање поларни растварачи, као што су хлороформ и хексан, имају способност екстракције примарно неполарних једињења као што су тритерпеноиди. Екстракција хексаном је најмање оптимална метода за екстракцију фенолних једињења што објашњава и најмањи садржај фенола у испитиваним хексанским екстрактима *S. minor* (140).

Хемијска карактеризација одабраних екстраката *S. minor*

Биолошка активност врсте *S. minor* у великој мери се приписује присуству полифенолних једињења (17). Сходно томе, пре процене њиховог фармаколошког потенцијала, извршена је хемијска карактеризација екстраката корена и хербе испитиване биљне врсте *S. minor* subsp. *muricata*.

Фенолна једињења значајно варирају по питању типа, броја и позиције функционалних група, што резултира њиховом различитом растворљивошћу у различитим растварачима (141). Као што је већ поменуто, поларност растварача је кључан фактор који утиче на способност растварања биљних полифенолних компоненти. Од избора растварача зависи принос екстракта и његова биолошка активност (142). Из тог разлога за хемијску анализу и испитивање утицаја растварача првобитно су одабрани екстракти добијени помоћу растварача различите поларности тј. етанола као поларног растварача, ацетона као растварача средње поларности и хексана као неполарног растварача. Како у хексанском екстракту нису идентификована испитивана полифенолна једињења, резултати нису приказани у дисертацији. Неполарни растварач, у овом случају хексан, доказано није погодан за екстракцију фенолних једињења што потврђује и најмањи забележен садржај фенола у нашим хексанским екстрактима (4, 140). За анализу хемијског састава екстраката *S. minor* и квантификацију идентификованих полифенолних једињења примењена је *HPLC* метода.

У етанолном и ацетонском екстракту хербе *S. minor* идентификовано је и квантифицирано осам фенолних једињења: хлорогена киселина, неохлаорогена киселина, кафена киселина, кафеоилхинска киселина, кверцетин-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-хексозид и кверцетин-3-глукуронид. Уочено је да су доминантна фенолна једињења у етанолном екстракту хербе били кверцетин-3-рутинозид и кверцетин-3-софорозид. Сва идентификована једињења била су присутна у мањој количини у ацетонском у односу на етанолни екстракт, изузев кверцетин-хексозида (Табела 7). У етанолном и ацетонском екстракту корена *S. minor* идентификовани су кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-3-софорозид и кумароилхинска киселина. Доминантна фенолна једињења у етанолном екстракту корена били су такође кверцетин-3-рутинозид и кверцетин-3-софорозид. Наведена једињења су била доминантна и у ацетонском екстракту корена али су била присутна у мањим количинама у односу на етанолни екстракт корена (Табела 8). У свим анализираним екстрактима хербе и корена *S. minor* забележено је присуство кверцетин-3-рутинозида и кверцетин-3-софорозида.

Бројна досадашња истраживања су потврдила фармаколошки потенцијал полифенолних једињења, нарочито флавоноида и фенолних киселина чији су представници идентификовани у испитиваним екстрактима (143). Фенолне киселине су

секундарни метаболити који су моћни антиоксиданси, а показано је и да поседују антимикубно, антиинфламацијско и антитуморско дејство (144). Од идентификованих фенолних киселина у овом истраживању до сада су највише испитиване хлорогена и кафена киселина, које су показале претходно наведена фармаколошка својства (145, 146).

Флавоноиди такође остварују бројна фармаколошка дејства као што су антиоксидационо, антимикубно, антиинфламацијско и антитуморско дејство (147, 148). Међу детектованим флавоноидима у екстрактима *S. minor*, кверцетин-3-рутинозид (рутин) је до сада највише испитиван при чему је показао антиоксидациона, антимикубна, цитопротективна, вазопротективна, антитуморска и неуропротективна својства (149). У студији аутора *Cuccioloni* и сарадника из 2017. године, кверцетин-3-глукуронид, изолован из етанолног екстракта *S. minor*, испољио је антитуморско дејство *in vitro* (17). Како су претходно наведена једињења идентификована у испитиваним екстрактима *S. minor*, може се претпоставити да су управо они носиоци биоактивних својстава.

Анализом резултата констатовано је да су етанол и ацетон екстраховали иста једињења, али у различитим количинама тј. етанол је екстраховао већу количину фенолних једињења у односу на ацетон. Наиме, етанол има хидроксилну групу која формира водоничну везу са хидроксилном групом присутном у фенолним једињењима и тиме повећава њихову растворљивост (150). Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима која су показала да природа растварача има значајан утицај на профил фенолних једињења изолованих из биљака (151 - 155).

Флавоноиди и фенолне киселине представљају главне идентификоване полифенолне компоненте у корену и херби *S. minor* у овој докторској дисертацији, што је у сагласности и са претходним истраживањима хемијског састава *S. minor* (9, 28). Добијени резултати указују на присуство високе количине репрезентативног флавонолног гликозида кверцетин-3-рутинозида у херби и корену *S. minor*. У досадашњим истраживањима присуство ове компоненте није забележено у екстрактима врсте *S. minor*, али је рутин идентификован у метанолном екстракту надземног дела врсте *S. officinalis* (16). Поред рутина, у анализираним екстрактима детектована су још три деривата кверцетина (кверцетин-3-софорозид, кверцетин-3-глукуронид и кверцетин-хексозид) од којих је кверцетин-3-глукуронид раније забележен као једна од доминантних компоненти у лишћу *S. minor* са територије Грчке (9, 28). Такође, и у истраживању етанолног екстракта *S. minor* које су спровели аутор *Cuccioloni M.* и сарадници детектован је кверцетин-3-глукуронид и означен као главни носилац антитуморске активности ове биљке (17).

Поред флавоноида, фенолне киселине и њени деривати су у значајној мери присутне у *Sanguisorba* биљкама (2, 4, 11). Из ове групе једињења у херби *S. minor* су идентификоване: хлорогена, неохлаорогена, кафена и кафеоилхинска киселина, док је кумароилхинска киселина детектована у екстрактима корена *S. minor*. Од наведених компоненти, до сада је једино детектовано присуство *p*-кумароилхинске киселине у екстрактима лишћа и корена *S. minor* са територије Грчке и кафеене киселине у воденом екстракту корена *S. officinalis*, док остале фенолне киселине нису претходно пронађене у екстрактима *Sanguisorba* биљака (28, 154).

Две студије које су испитивале хемијски састав лишћа и корена *S. minor* са територије централне Грчке потврдиле су и присуство танина поред флавоноида и

фенолних киселина (28, 9). Анализа флавоноида у тим истраживањима је указала на присуство кверцетина, кемпферола, катехина и њихових деривата, а када су у питању фенолне киселине, поред већ поменуте *p*-кумароилхинске киселине која је изолована и у нашим екстрактима (Табела 8), детектовани су и елагинска киселина и њени деривати, гална киселина и фенолне карбоксилне киселине (9, 10, 28 - 30). Постојале су значајне варијације у профилу фенолних једињења између лишћа и корена испитиване *S. minor* (28).

Допринос ове докторске дисертације огледа се у допуни постојећих сазнања о хемијском саставу биљне врсте *S. minor*, с обзиром да су у испитиваним екстрактима идентификоване четири фенолне киселине (хлорогена киселина, неохлаорогена киселина, кафена киселина, кафеоилхинска киселина) и три деривата флавоноида кверцетина (кверцетин-3-софорозид, кверцетин-3-рутинозид, кверцетин-хексозид), чије присуство није раније детектовано у екстрактима *S. minor*.

Хемијски састав етарског уља корена и хербе *S. minor*

У етарском уљу хербе *S. minor* *GC-MS* техником је идентификовано 67 једињења, док је *HS/GC-MS* техником идентификовано 12 компоненти. Доминантне компоненте у етарском уљу хербе испитиване биљке биле су: салицилалдехид 27,4 %, карвакрол 9,28 % и линалоол 6,87 % (Табела 9). Најзаступљенија једињења етарског уља хербе регистрована *HS/GC-MS* техником била су артемисиа кетон 24,58 %, хексанал 23,11 %, α -пинен 15,56 %, хептанал 10,25 % и β -пинен 9,23 % (Табела 10). “*Head-space*“ анализа испарљивих компоненти корена и хербе *S. minor* први пут је представљена у овом истраживању. Досадашња испитивања хемијског састава *Sanguisorba* биљака базирала су се на анализи екстракта биљака овог рода. Једино до сада доступно испитивање хемијског састава етарског уља *S. minor* јесте *GC-MS* анализа етарског уља лишћа ове биљне врсте са територије Ирана из 2010. године (32). *Esmaeili A.* и сарадници су идентификовали знатно мањи број једињења у односу на наше добијене резултате (17 компоненти). Као доминантна једињења у овом уљу означени су *E*, *E*-фарнезил ацетат (13,4%), нонадекан (11,2 %) и докосан (11,0 %), а за њима и β -кариофилен (9,7 %), нонанал (8,5 %) и линалоол (7,3 %) (32). Линалоол је такође био једна од доминантних компоненти и у етарском уљу хербе наше испитиване *S. minor* (6,87 %), док су ноналал и β -кариофилен били заступљени у знатно мањем проценту у односу на наведене резултате (1,49 % и 0,18 %). Са друге стране, *E*, *E* - фарнезил ацетат, нонадекан и докосан нису идентификовани у нашем етарском уљу. Преостале компоненте из етарског уља *S. minor* из Ирана, које су идентификоване и у нашем истраживању, јесу тетрадекан (3,8%), кариофилен-оксид (5,1%), хексадекан (0,1%), хептадекан (1,2 %) и октадекан (2,4 %) (32).

Антиоксидациона активност екстракта *S. minor in vitro*

Бројна *in vitro* и *in vivo* истраживања наводе да феноли и флавоноиди значајно доприносе антиоксидационој активности биљака (4, 42, 155). Фенолна једињења имају способност редукације оксиданаса и показано је да су потентнији антиоксиданси чак и од витамина Ц, Е и каротеноида. Ова група једињења поседује идеалну хемијску структуру за “хватање” слободних радикалских врста услед изражене склоности фенолних хидроксилних група ка предаји атома водоника или електрона слободним радикалима у циљу њихове стабилизације. Још један од механизма којим полифеноли остварују своје антиоксидационо дејство је хелирање прооксидационих металних јона (*Fe*, *Cu*) чиме спречавају њихову улогу у реакцијама настајања слободних радикала

(156, 157). Наиме, слободни метални јони поспешују настајање *ROS* редукцијом водоник-пероксида чиме се генеришу високо реактивни хидроксил радикали (158). Редукциони потенцијал фенолних једињења умногоме зависи од њихове структуре. У случају фенолних киселина и флавоноида, чији су представници идентификовани у анализираним екстрактима *S. minor*, њихова редукциона активност примарно зависи од броја, положаја и супституције хидроксилних група у молекулу (157, 158).

Велики број аутора пронашао је висок степен корелације између антиоксидационе активности и укупног фенолног садржаја и/или присуства одређених фенолних компоненти у биљном екстракту (156). С обзиром да се садржај укупних фенола може сматрати параметром за процену антиоксидационе моћи биљног материјала, а како је у испитиваним екстрактима *S. minor* генерално забележен висок садржај полифенолних једињења, од интереса је било размотрити њихову антиоксидациону активност. Такође, у наведеним екстрактима идентификовано је неколико типова биоактивних једињења познатих по својој антиоксидационој активности укључујући флавоноиде (рутин и деривати кверцетина) као и фенолне киселине (хлорогена киселина, кафена киселина) што је додатно подстакло на испитивање антиоксидационе активности екстракта *S. minor* у овој докторској дисертацији (158).

Услед хемијске разноврсности фенолних једињења и сложености хемијског састава биљних екстракта испитивање антиоксидационог ефекта појединачних фенолних компоненти није сврсисходно и довољно ефикасно. Кориснија је процена укупне антиоксидационе моћи комплексног узорка услед синергистичког деловања присутних антиоксиданаса (156). За процену антиоксидационе активности биљних екстракта богатих фенолним једињењима *in vitro* описан је велики број различитих метода које се према механизму којим антиоксидационе активне компоненте остварују своје дејство заснивају на трансферу атома водоника или електрона у циљу стабилизације слободних радикала, као и на способности хелирања металних јона (155 - 157). Најчешће коришћене методе за процену антиоксидационе активности генерално су *DPPH*, *ABTS*, *FRAP* и *CUPRAC* (155). Због комплексности оксидационог процеса потребна је примена различитих метода у процени антиоксидационе активности одређеног биљног екстракта (159, 160). Наиме, не постоји једна *in vitro* метода којом се може одредити “укупни” антиоксидациони ефекат (155). Из наведеног разлога, у овој дисертацији определили смо се за пет *in vitro* антиоксидационих тестова (*ABTS*, *DPPH*, *CUPRAC*, *FRAP* и *TRP*) за процену антиоксидационе активности различитих екстракта корена и хербе *S. minor*.

За сваки испитивани екстракт израчунат је индекс антиоксидационог потенцијала изражен као средња вредност пет различитих вредности добијених помоћу наведених метода. Како биолошка активност екстракта у великој мери зависи од поларности екстракционог растварача, испитиван је и поређен антиоксидациони потенцијал метанолног, ацетонског, хлороформског, хексанског екстракта корена и хербе *S. minor* и етанолног екстракта корена ове биљке (138). Поредећи екстракте хербе *S. minor*, највећи индекс антиоксидационог потенцијала имао је метанолни екстракт, а затим ацетонски и хлороформски екстракт, док је најмању вредност имао хексански екстракт хербе (Табела 14). Када су у питању екстракти корена *S. minor*, највећи индекс антиоксидационог потенцијала имао је ацетонски екстракт корена, затим етанолни екстракт корена, метанолни екстракт, хлороформски екстракт док је најмању вредност имао хексански екстракт корена *S. minor* (Табела 15). Генерално, метанолни, етанолни

и ацетонски екстракти су били супериорнији у односу на хлороформске и хексанске екстракте по питању испитиваних антиоксидационих параметара *in vitro*. Може се претпоставити да хлороформ и хексан, услед ниске поларности, нису могли да ефикасно екстрахују сва једињења која доприносе антиоксидационој активности *S. minor* (161). Овакав резултат се објашњава чињеницом да поларни и средње поларни растварачи имају већу способност екстракције антиоксидационих супстанци, као што су феноли, у поређењу са неполарним растварачима (4).

У овој докторској дисертацији је запажена јака позитивна корелација између индекса антиоксидационог потенцијала испитиваних екстраката и укупног садржаја како фенола тако и флавоноида (Графици 1 - 4). На основу добијених резултата може се претпоставити да и феноли и флавоноиди синергистички доприносе антиоксидационој активности испитиваних екстраката *S. minor* (42). У претходно спроведеним истраживањима високи антиоксидациони капацитет врсте *S. minor* такође је приписан високом садржају фитонутријената, посебно фенолних једињења (28, 46).

Генерално, антиоксидациони ефекти биљака из рода *Sanguisorba* описани су у литератури. Највише испитивана је *S. officinalis* која поседује значајну антиоксидациону активност *in vitro* (2, 26, 42, 162). *S. minor*, која је предмет ове докторске дисертације, ипак је у мањој мери испитивана али резултати такође показују значајну антиоксидациону активност. Антиоксидациона активност подврсте *S. minor* subsp. *muricata* први пут је презентована у овој докторској дисертацији. Резултати нашег истраживања у сагласности су са другим студијама које су показале антиоксидациону активност *S. minor*. Екстракт лишћа *S. minor* са територије Шпаније је показао значајан капацитет хватања хидроксил и пероксил радикала, са стопом инхибиције 34 % и 64 % у концентрацији 5 mg/ml (46). Водено-етанолни екстракт лишћа *S. minor* из Италије показао је изражену способност редукције Fe^{3+} мерену *FRAP* методом ($257 \pm 12 \text{ mmol } Fe^{2+}/kg$) као и способност хватања пероксил радикала. Етанолни екстракт и декокт хербе *S. minor* из Португалије у концентрацији од 0,1 mg/ml у великој мери су неутралисали *DPPH* радикал (93 % инхибиције). Есенцијално уље и декокт хербе *S. minor* у истом истраживању показали су значајну инхибицију липидне пероксидације. Резултати нашег истраживања не могу се упоредити са резултатима претходно наведених студија због различитог дизајна студије, метода екстракције и начина изражавања резултата.

Интересовање за антиоксидансе биљног порекла значајно је порасло широм света. Биљке продукују различита једињења са антиоксидационим деловањем као што су фенолне киселине и флавоноиди. Ова једињења немају нежељене ефекте или су они благи у поређењу са синтетским антиоксидансима (160). Резултати ове докторске дисертације потврдили су антиоксидациону активност биљке *S. minor* subsp. *muricata* у *in vitro* условима, а хемијски састав и присуство одређених полифенолних компоненти се сматрају главним предиктором исте. Обећавајући резултати како нашег тако и претходно спроведених истраживања квалификују *S. minor* за потенцијалног природног антиоксиданса (46).

Испитивање антиоксидационе активности екстраката *S. minor in vivo*

Sanguisorba врсте су богате природним антиоксидансима због чега се могу сматрати корисним у превенцији или терапији обољења повезаних са оксидационим стресом (2, 4). Протективни ефекат биљне врсте *S. minor* на оксидациони стрес

приписује се управо њеним доказаним антиоксидационим својствима (4). Како је до сада спроведен недовољан број истраживања која су испитивала биолошку активност *S. minor in vivo*, наведени антиоксидациони ефекти се могу тумачити са аспекта присутних фитоконституената.

Наиме, у бројним истраживањима показано је да полифенолна једињења и флавоноиди имају потенцијал да ублаже оксидациони стрес (163 - 172). Њихова антиоксидациона активност се објашњава способношћу да инхибирају одређене ензиме укључене у стварање реактивних кисеоничних врста, као што су ксантин-оксидаза и никотинамид-аденин-динуклеотид-фосфат (*NADPH*) оксидаза. Такође, полифеноли доводе и до усходне регулације ендогених антиоксидационих ензима као што су *SOD*, *CAT* и глутатион-пероксидаза, а утичу и на активност азот-моноксид синтазе. Полифенолна једињења имају и изражену способност „хватања“ слободних радикала чиме такође утичу на умањење оксидационог стреса (157). Биолошка својства полифенола *in vivo* могу бити значајно измењена услед метаболичких модификација. Иако су доступна бројна *in vitro* истраживања која су потврдила антиоксидациону активност полифенола и флавоноида, веома је значајно проценити до ког степена одређена једињења и њихови метаболити испољавају своју активност *in vivo* за шта још увек нема довољно доступних података.

Флавоноиди имају способност инактивације супероксидног ањона и стабилизације слободних радикала укључених у оксидациони процес, захваљујући својој хемијској структури богатој хидроксилним групама (172). У истраживању које су спровели аутор *Сапо А.* и сарадници процењена је способност „хватања“ O_2^- од стране одређених флавонола (кверцетина, кемпферола и њихових деривата) применом методе која је коришћена и у овој докторској дисертацији (172). Међу испитиваним дериватима кверцетина, кверцетин-3-софорозид и рутин су имали највећи антиоксидациони капацитет против супероксидног ањона. Резултати поменутог истраживања су показали да коњугација на позицији 3 кверцетина има кључни значај за капацитет „хватања“ O_2^- . Ова два гликозидно везана облика кверцетина, рутин и кверцетин-3-софорозид, била су квантитативно доминантна у нашем испитиваном екстракту *S. minor*. Висок садржај рутина (25,27 $\mu\text{g}/\text{mg}$ екстракта) и кверцетин-3-софорозида (18,24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ сувог екстракта) у етанолоном екстракту *S. minor* може бити узрок смањења нивоа O_2^- у стању сепсе на животињском моделу.

Механизам антиоксидационе активности рутина испитиван је у великом броју студија. Рутин ублажава оксидациони стрес тако што повећава активност антиоксидационих ензима (*SOD* и *CAT*) и смањује ниво маркера оксидационог стреса и инфламацијских фактора у сепси (173 – 175). Са друге стране, рутин показује инхибиторни ефекат на активност индуцибилне азот-моноксид синтазе као и на ослобађање оксидационих продуката малондиалдехида и H_2O_2 у оксидационом стресу. Такође, утиче на повећање садржаја тиола што додатно доприноси умањењу оксидационог стреса (173, 175).

Сепса представља глобално-здравствени проблем и према подацима Светске здравствене организације узрок је више од шест милиона смртних случајева у свету на годишњем нивоу, посебно у јединицама интензивне неге. Узимајући у обзир ову чињеницу, многа савремена научна истраживања су фокусирана на проналазак успешне терапије сепсе јер је потреба за новим терапијским алтернативама ургентна (176). Сепса се дефинише као синдром узрокован дисрегулисаним имунским одговором на

инфекцију, који је праћен дисбалансом између прооксидационих и антиоксидационих механизма у одговору на проинфламацијске цитокине, азот-моноксид и реактивне кисеоничне врсте, што може довести до липидне пероксидације, оштећења ДНК, митохондријске дисфункције и оштећења органа (112, 177). Управо оксидациони стрес има важну и потенцијално круцијалну улогу у патофизиологији и прогнози сепсе (178, 179). До сада је објављен значајан број доказа о присуству редокс дисбаланса и оксидационог стреса у стању сепсе код људи. У сепси су повишени маркери оксидационог оштећења, повећана је продукција слободних радикала, као и активност ксантин оксидазе, супероксид дисмутазе и глутатион-пероксидазе, а присутан је и снижени ниво антиоксиданата. Такође, повишени ниво тиобарбитурних реактивних врста код пацијената у стању сепсе указује и на повишену липидну пероксидацију (176, 178).

Клинички значај оксидационог стреса у сепси потврђен је у неколико истраживања, при чему је показана корелација између сниженог антиоксидационог капацитета пацијената и повишене стопе морталитета (180). Прекомерна продукција прооксиданаса у сепси може бити генератор бројних патолошких промена које воде повећаном морталитету. У том контексту, потенцијално нове терапије, које су базиране на једињењима са антиоксидационим својствима и које су усмерене ка постизању редокс хомеостазе, могу се сматрати ефикасном алтернативном терапијом сепсе (176, 179). Пажња савремених истраживања усмерена је управо ка антиоксидационој терапији која би могла успешно да прати конвенционалну терапију сепсе, а биљни екстракти представљају богати извор једињења са антиоксидационим и антиинфламацијским својствима која могу наћи своје место у терапији сепсе (180).

Као што је већ наведено у резултатима овог истраживања, у испитиваном етанолном екстракту корена *S. minor* откривен је висок садржај укупних фенола и флавоноида. Висок садржај фенола и флавоноида са доказаним антиоксидационим ефектом, као и дизајн студије који укључује оралну и интраперитонеалну администрацију екстракта, били су разлози да се одредимо за испитивање утицаја етанолног екстракта *S. minor* на анималном моделу сепсе. Из тог разлога, један од циљева ове дисертације био је да се испита да ли примена етанолног екстракта корена *S. minor* код пацова у стању сепсе може допринети повећању антиоксидационог капацитета код испитиваних животиња.

Испитивани су параметри оксидационог стреса јер су они неспецифични, али круцијални индикатори инфламације током сепсе (112, 181). Ефекат оралне и интраперитонеалне примене етанолног екстракта корена *S. minor* испитиван је на прооксидационе параметре (*TSH*, *TBARS*, *NOx*, $O_2^{\cdot-}$) и антиоксидациону активност *SOD* код пацова са индукованом сепсом. У циљу испитивања патогенезе и терапеутских таргета у сепси користи се неколико анималних модела, а процедура заснована на цекалној лигацији и пункцији, која је коришћена у нашем експерименту, сматра се једним од најрелевантнијих модела експерименталне сепсе (182).

Присуство тиола (сулфхидрила) је круцијално у метаболичком изазову попут сепсе, јер тиоли значајно доприносе одбрани организма против реактивних кисеоничних врста (183). Поред антиоксидационе активности, тиоли учествују и у другим процесима као што су сигнална трансдукција, детоксификација и апоптоза. Управо је смањен ниво тиола повезан са разним обољењима, укључујући и сепсу (184). Ефекат повећаних сулфхидрила код здравих животиња може бити одраз значајног

антиоксидационог потенцијала тестираног екстракта (111). Међутим, примена екстракта *S. minor* у концентрацији од 100 и 300 mg/kg у групи животиња са сепсом није утицала значајно на укупну концентрацију сулфхидрила (Графици 5 и 10). Не треба одбацити могућност да би више концентрације екстракта ипак позитивно утицале на повећање нивоа тиола (сулфхидрила).

Ћелијске дисфункције узроковане оксидационим стресом посредоване су крајњим продуктима липидне пероксидације. Малондиалдехид, генерисан током липидне пероксидације, сматра се најбитнијим медијатором токсичних ефеката који настају у ћелији, а који су узроковани оксидационим стресом. Прекомерна акумулација малондиалдехида повезана је са компликацијама у сепси (185, 186). Резултати ове дисертације указују да је екстракт *S. minor*, примењен како орално тако и интраперитонеално, имао значајан ефекат на ниво *TBARS*, што заправо указује на његов антиоксидациони потенцијал. Орално примењен екстракт у вишој концентрацији (300 mg/kg) значајно је умањео ниво *TBARS* у сепси у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$), а ова корелација није била примењена у случају примене ниже концентрације екстракта (100 mg/kg) (График 6). Показано је да је интраперитонеална примена екстракта *S. minor* била супериорнија у односу на оралну примену, узимајући у обзир да је ниво *TBARS* у сепси након интраперитонеалне примене екстракта био значајно редукован у поређењу са контролном *CLP* групом ($p < 0,01$) (График 11). Такав позитивни ефекат испитиваног екстракта приписује се присуству високог садржаја фенола у испитиваном екстракту *S. minor* ($457,45 \pm 4,59$ mg GAE/g) (118, 120, 134). Добијени резултат иде у прилог показаном високом степену корелације између антиоксидационе активности и укупног фенолног садржаја у биљном екстракту. Како је испитивани екстракт *S. minor* индуковао смањење нивоа *TBARS*, може се размотрити његова потенцијална улога у адјувантној терапији сепсе.

Вредности нитрита и нитрата, као крајњих продуката оксидације азот-моноксида, такође су повећани у крвној плазми у стању сепсе (187). Орално примењени екстракт *S. minor* у обе концентрације значајно је умањео ниво нитрита и нитрата у плазми у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$) (График 7), док интраперитонеална примена екстракта није имала значајан утицај на ниво ових параметара.

У сепси је повећан и ниво супероксидног анјона, оксидационог параметра који је такође испитиван у овој дисертацији, а који подстиче липидну пероксидацију, доводи до оштећења ћелијских мембрана и укључен је у неколико реакција чији продукти представљају варијетете реактивних кисеоничних и азотних врста. Динамика $O_2^{\cdot-}$ се свакако треба тумачити и са аспекта активности антиоксидационог заштитног ензима као што је *SOD* која контролише ниво $O_2^{\cdot-}$ путем његове конверзије у мање активни кисеоник и водоник пероксид (188). И у случају овог испитиваног параметра, орална примена екстракта *S. minor* у обе концентрације значајно је умањила ниво супероксидног анјона у плазми у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,05$) (График 8), док интраперитонеална примена није имала значајан утицај.

Активност *SOD* у групи са сепсом која је третирана оралном применом екстракта у нижој концентрацији била је значајно виша у поређењу са *CLP* групом ($p < 0,01$), док овакав ефекат није примењен у групи животиња на третману екстрактом више концентрације (График 9).

Добијени резултати су показали да није било значајне промене у вредностима испитиваних параметара оксидационог стреса између контролне групе без третмана и контролних група третираних применом екстракта *S. minor*. То указује да примена екстракта није битно утицала на физиолошко окружење у коме се одвија ћелијска сигнализација (183, 185). Може се закључити и да пут примене екстракта *S. minor* није утицао на добијене резултате у редукцији оксидационих параметара, јер није било значајне разлике у вредностима укупних SH , NOx , O_2^- и SOD између CLP група након оралне и интраперитонеалне примене екстракта у истој концентрацији. Једини изузетак је значајно смањење вредности $TBARS$ у сепси након интраперитонеалне примене екстракта *S. minor* (100 mg/kg) у поређењу са орално примењеним екстрактом у истој концентрацији ($p < 0,05$) (График 15).

Резултати ове дисертације представљају прве резултате антиоксидационе активности екстракта *S. minor* у сепси. Према нашим сазнањима, једино истраживање у коме је је испитиван утицај врсте *S. minor* на параметре оксидационог стреса јесте недавно спроведено истраживање *in vitro* у коме су процењени неуропротективни ефекти метанолног екстракта (75 $\mu\text{g/mL}$) хербе *S. minor* са територије Ирана 2019. године. Резултати ове студије су показали да екстракт *S. minor* може значајно утицати на побољшање неуротоксичности која је индукована бета-амилоид ($A\beta$) протеином у примарним културама церебралних грануларних неурона ($CGNs$), а у чијој основи се налази управо оксидациони стрес. Примена екстракта *S. minor* довела је до значајно смањене продукције реактивних кисеоничних врста и повећане активности антиоксидационог ензима глутатион-пероксидазе што указује да је $A\beta$ -индуковани оксидациони стрес био значајно умањен применом овог екстракта (131).

Неколико истраживања је потврдило и улогу *S. officinalis* врсте, као главног представника *Sanguisorba* рода, против оксидационог стреса. Примена корена ове биљке показала је протективну улогу код оксидационог стреса изазваног водоник-пероксидом у култури кортикалних неурона (78). Такође, водени екстракт корена *S. officinalis* позитивно је утицао на снижење нивоа NO у исхемијско-реперфузионом моделу оксидационог стреса код пацова. Примена овог екстракта довела је до супресије липидне пероксидације и стимулације антиоксидационих одбрамбених механизма што указује да ова биљка може бити ефикасан агенс у ублажавању патолошких стања повезаних са прекомерном продукцијом слободних радикала и оксидационим оштећењем, посебно у процесу старења (48).

Антибактеријска активност екстракта *S. minor*

Резистенција бактерија на антибиотике постала је један од главних глобалних јавно-здравствених проблема, због чега је драматично порасла потреба за новим антимикуробним агенсима. Управо се биљке сматрају једним од потенцијално највећих извора за откриће нових антимикуробних једињења, а у традиционалној медицини се у те сврхе користе још од давнина (51). Документовано је да бројна природна полифенолна једињења присутна у биљкама имају капацитет да инхибирају бактеријски раст, као и да повећају сензитивност резистентних сојева на широки спектар антибиотика (189, 190). Чињеница да су многи биљни екстракти богати фенолним једињењима може бити значајна за откриће антимикуробних супстанци природног порекла као алтернативе постојећим синтетским антибиотцима (191). Механизми антибактеријске активности фенолних једињења још увек нису у потпуности откривени. Неколико аутора је објаснило ову активност модификацијом

пермеабилности ћелијске мембране, инхибицијом интраћелијских ензима и модификацијом ригидности ћелијског зида праћеног губитком ћелијског интегритета. Испитивана је и повезаност антибактеријске активности фенолних једињења са њиховом структуром при чему је показан значај хидрофобног и амфифилног карактера ових молекула, броја и позиције хидроксилних група као и величине и типа алкил група. Са повећањем липофилног карактера фенолних једињења повећава се и њихова антимикробна активност фаворизовањем њихове интеракције са ћелијском мембраном (192).

Спектрофотометријским и хроматографским методама у испитиваним екстрактима *S. minor* потврђено је присуство фенолних једињења за које су бројна истраживања показала да поседују изузетна антимикробна својства (193). Последњих година приметан је пораст броја публикација које су испитивале антимикробну активност биљних екстраката богатих полифенолним једињењима која су детектована и у нашим екстрактима *S. minor* као што су флавоноиди и фенолне киселине. Показано је да фенолне киселине своје антимикробно дејство остварују тако што нарушавају интегритет мембране и узрокују последично истицање интрацелуларног садржаја док флавоноиди могу инхибирати енергетски метаболизам и синтезу ДНК чиме се утиче на синтезу протеина и РНК (190). Може се закључити да хидроксилне групе на одређеним позицијама на ароматичним прстеновима флавоноида побољшавају њихов антибактеријски ефекат (194). Структура флавоноида подразумева два фенолна прстена (А и Б) повезана са једним хетероцикличним прстеном (Ц). Запажено је да најмање једна хидроксилна група у прстену А (посебно на позицији С-7) јесте витална за антибактеријско дејство флавоноида (195).

Услед огромног богатства биљних врста и природних једињења степен испитивања полифенолних једињења је још увек недовољан, као и број публикација које су испитивале антибактеријску активност појединачних фенолних компоненти (190). У наставку ће бити дискутовани резултати доступних истраживања антимикробне активности одређених једињења која су идентификована у испитиваним екстрактима *S. minor*, као што су кафена киселина, хлорогена киселина, рутин и кверцетин-3-глукуронид.

Показано је да је међу многим полифенолним једињењима кафена киселина једно од најпотентнијих са антимикробним дејством. Антимикробни ефекат кафене киселине повезује се са њеном структуром тј. супституцијом једне хидроксилне групе више у фенолном прстену (196). Документовано је да ова фенолна киселина показује антимикробни потенцијал и/или синергистичке ефекте са антибиотцима против бројних сојева међу којима су и они на којима је испитиван ефекат екстраката *S. minor* у овој дисертацији: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* и *B. cereus*. Кафена киселина, као мање поларно и липофилно једињење, може нарушити интегритет ћелијске мембране и довести до повећане мембранске пропустљивости, као и до инхибиције секреције алфа-хемолизина у случају *S. aureus* (196, 197). Једно истраживање је показало да кафена киселина значајно повећава антимикробни ефекат антибиотика тиме што умањује њихове МИК вредности и последично дозвољава њену употребу у комбинацији са антибиотиком што може допринети редукцији нежељених ефеката антибиотика (194).

Хлорогена киселина, такође идентификована у испитиваним екстрактима *S. minor*, испољава антибактеријско дејство (198, 199). Ово једињење доказано поседује

антибактеријски ефекат према сојевима *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* (190). Молекул хлорогене киселине може да утиче на активност метаболичких ензима и тиме доведе до нарушавања метаболичке равнотеже и инхибиције активности бактерија (200). Због своје изразите поларности њени молекули могу да се везују за липиде на површини бактерија, у циљу мењања пермеабилности бактеријске мембране, што резултира ослобађањем ћелијског садржаја (201).

Антимикробно дејство флавоноида рутина проучавано је у великој мери против различитих сојева бактерија. Показана је значајна инхибиција раста бактерије *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella sp.* У једном истраживању показан је синергистички ефекат рутина са другим флавоноидима против сојева *B. cereus* и *S. enteritidis*. Документовано је да рутин остварује своју антибактеријску активност на сој *E. coli* инхибицијом ДНК изомеразе IV (149). Још један од флавоноида присутних у испитиваним екстрактима, кверцетин-3-глукуронид, остварује своје антибактеријско дејство инхибицијом формирања биофилма (202). Ипак, као што је већ показано у претходним истраживањима па и у нашем, природни производи имају мањи антибактеријски потенцијал у поређењу са антибиотицима (189).

Генерално, у великом броју истраживања потврђена је антимикробна ефикасност биљака *Sanguisorba* рода (2). Испитивања су најчешће вршена против *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa*, које представљају мултирезистентне бактерије са перзистентним присуством у болничким условима (203). Антимикробна ефикасност *S. minor* је потврђена у неколико истраживања, али њен антимикробни потенцијал још увек није довољно испитан (9, 28, 51-53). Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације указују да је *S. minor* испољила антимикробну активност према свим испитиваним сојевима, при чему је интензитет активности варирао у зависности од врсте микроорганизма и типа екстракта (Табела 17). Када је реч о антибактеријској активности, испитивани екстракти су били најефикаснији против стандардних сојева Грам-позитивних бактерија *B. cereus* и *S. aureus*, а затим и против *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. Aerogenes* (наведено по опадајућој сензитивности).

У доступној литератури се може запазити да избор растварача приликом екстракције у великој мери одређује антимикробну активност биљног екстракта (204, 205). У циљу испитивања утицаја поларности растварача на антимикробни потенцијал екстракта *S. minor* испитиван је метанолни, ацетонски, хлороформски и хексански екстракт корена и хербе *S. minor* и етанолни екстракт корена *S. minor*. Према досадашњим сазнањима, доступни су једино подаци о антимикробној ефикасности метанолних екстракта корена и лишћа *S. minor*, док су у овој докторској дисертацији први пут испитивани етанолни, ацетонски, хлороформски и хексански екстракти испитиване биљке (9, 28).

Хлороформски екстракт корена *S. minor* показао је најјачу антибактеријску активност на свим испитиваним сојевима, а високу антибактеријску активност су показали и метанолни и хлороформски екстракт хербе *S. minor*. Може се претпоставити да наведени екстракти садрже једињења са широким спектром антибактеријске активности (206). Метанолни екстракт корена је показао антибактеријску активност на сојевима *S. aureus*, *S. enteritidis* и *B. cereus*. Ацетонски екстракти корена и хербе су показали значајну активност на све три испитиване Грам (+) бактерије, а када су у

питању Грам (-) бактерије показана је активност на *S. enteritidis* и *E. coli*. Етанолни и хексански екстракти су показали занемарљиву активност на испитиваним сојевима бактерија, осим хексанског екстракта хербе који је показао значајну инхибицију активности *S. aureus*. Добијени резултати указују да је екстракција активних компоненти *S. minor* са антибактеријским ефектом ефикаснија употребом хлороформа, ацетона и метанола у односу на етанол и хексан. Исти тип екстракта је показао различиту активност на различите сојеве преваходно због разлике у осетљивости микроорганизама на специфичне активне компоненте екстракта (206).

Степен антимикробне активности биљних екстраката може варирати у зависности од квантитативне и квалитативне заступљености фенолних једињења (204). У више истраживања је показано да међу бројним растварачима, као што су нпр. метанол, етанол, ацетон и хлороформ, хлороформски екстракти имају највишу антимикробну активност што су аутори приписали великом садржају екстрахованих активних компоненти као што су флавоноиди (205, 206). И у нашем истраживању је запажен високи укупни садржај флавоноида у хлороформским екстрактима. Ацетон се такође показао као високо ефикасан растварач за екстракцију широког спектра активних компоненти из биљака, укључујући и хидрофилне и хидрофобне компоненте, што је у сагласности и са нашим резултатима (207, 208). Неки аутори су запазили да средње поларни и неполарни растварачи поспешују екстракцију једињења са антибактеријском активношћу (51, 206). Са друге стране, у неким истраживањима је показано да одређена једињења са антимикробним својствима ипак имају већи афинитет ка поларним растварачима у односу на неполарне (13, 51).

У нашем истраживању активност испитиваних екстраката је била благо израженија према Грам-позитивним бактеријама у односу на Грам-негативне бактерије. Разлика између Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија у осетљивости на полифеноле присутне у биљним екстрактима и даље представља контроверзно истраживачко питање. Са једне стране, многи аутори закључују да су полифеноли генерално активнији против Грам-позитивних бактерија, док се већа резистенција Грам-негативних бактерија, као што је нпр. *P. aeruginosa*, на биљне секундарне метаболите укључујући и феноле, објашњава ограниченом пропустљивошћу њихове спољашње мембране (209). Неки аутори ипак нису приметили јасну разлику између осетљивости два типа бактерија по Граму на полифеноле (206, 210).

Резултати ове дисертације у сагласности су и са резултатима других истраживача који су потврдили антимикробну активност биљне врсте *S. minor* (9, 28). У истраживању које су спровели аутор *Finimundu* и сарадници 2020. године, употребом микродилуционе методе аутори су потврдили значајан антибактеријски потенцијал метанолног екстракта корена и лишћа *S. minor* са територије централне Грчке против сојева *S. aureus*, *E. coli* и *P. aeruginosa* који су испитивани и у нашем истраживању. Добијене МИК/МБК вредности за *S. aureus* су биле сличне нашим резултатима, док је метанолни екстракт корена био знатно активнији у третману *E. coli* (МИК/МБК 1,15/2,31 mg/ml) и *P. aeruginosa* (МИК/МБК 0,88/1,75 mg/ml) у односу на наше екстракте (28). Антибактеријска активност метанолних екстраката корена и лишћа врсте *S. minor*, такође са територије централне Грчке, потврђена је и у истраживању аутора *Karkanis* и сарадника 2019. године против сојева *S. aureus* и *E. coli*. Испитивани екстракти *S. minor* су показали антибактеријско дејство и на сојеве *B. cereus*, *M. flavus*, *L. monocytogenes*, *E. cloacae* и *S. typhimurium* који нису испитивани у овој дисертацији (9, 28). У оба претходно наведена истраживања спроведена у Грчкој екстракти корена

S. minor су генерално показали јачу антибактеријску активност у поређењу са екстрактима лишћа за разлику од резултата у овој дисертацији, где су за наведене сојеве метанолни екстракти хербе испољили бољу антимикробну активност у односу на екстракте корена. Све претходно поменуте разлике између добијених резултата наведених истраживања и нашег истраживања могу се приписати различитим условима раста врсте *S. minor* који могу да утичу на биосинтезу секундарних метаболита, а самим тим и на биоактивна својства биљке (9, 28). Наиме, биљни екстракти су комплексне смеше које садрже широки спектар примарних и секундарних метаболита и њихова својства могу бити резултат синергистичког деловања различитих хемијских компоненти. Како биљке интерагују са окружењем у ком се налазе као и са другим организмима, њихов хемијски састав и садржај активних супстанци се могу веома разликовати у зависности од подручја на ком расту, а последично и њихова биолошка активност (190). Треба напоменути и да различити ланци исте бактеријске врсте имају различиту осетљивост на исте антимикробне компоненте (206).

Ако се упореде резултати ове докторске дисертације са резултатима антимикробне активности *S. officinalis* у истраживању аутора *Kokoska* и сарадника из 2002. године може се закључити следеће: испитивани етанолни екстракт врсте *S. minor* испољио је бољу активност против сојева *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* и *E. coli* (МИК = 12,5 - 25 mg/ml) у односу на етанолни екстракт *S. officinalis* (МИК = 15,63 - 250 mg/ml) (87).

Антифунгална активност екстраката *S. minor*

У нашем истраживању је први пут испитана и показана антифунгална активност *S. minor* на сој *C. albicans* при чему су највећи потенцијал испољили ацетонски (МИК/МФК 0,32/0,64 mg/ml) и хексански екстракт хербе *S. minor* (МИК/МФК 0,64/1,29 mg/ml), док су остали екстракти показали слабу антифунгалну активност (Табела 17).

Candida врсте су велика група фунгалних патогена присутних код људи, примарно код имунокомпромитованих и болничких пацијената (204). Међу њима, сој *C. albicans* је највише заступљен и одговоран за приближно 50–90 % кандидијаза. У нормалним физиолошким условима *Candida* врсте су присутне у мањој мери у организму, али одређене индивидуалне карактеристике пацијента условљавају њихов претерани раст и настанак инфекције (211). Само неколико група антифунгалних лекова је доступно за третман *Candida* инфекција, који су са друге стране праћени великим бројем нежељених ефеката. Не треба занемарити ни растућу резистенцију на наведене агенсе, посебно код *Candida* сојева које формирају високо резистентни биофилм. Потребно је открити нове антифунгалне агенсе или безбедније алтернативе у циљу побољшања ефикасности терапије *Candida* инфекција. У том смислу, антифунгални препарати базирани на природним изворима, као што су фенолна једињења, могу бити алтернативна и безбедна стратегија у циљу смањења растуће резистенције. Бројна истраживања су истакла значајан антифунгални потенцијал полифенолних једињења који могу деловати синергистички и тиме повећати укупни антифунгални ефекат (204). Не треба занемарити ни профилактички ефекат биљних екстраката богатих фенолним једињењима, као и појединачних фенолних компоненти. Превенција гљивичних инфекција се чак може сматрати подједнако важном као и терапијска интервенција (211).

Главни фактори вируленције *Candida* сојева јесу продукција егзоензима, формирање биофилма, способност адхеренције и диморфизам. Механизми антифунгалне активности полифенолних једињења на *Candida* сојеве су широко документовани и укључују анти-биофилм ефекат, анти-адхезиона својства и инхибиторну активност на морфогенезу и продукцију егзоензима *Candida* врста (204). Наведени механизми антифунгалног дејства доказани су и код одређених једињења која су заступљена и у нашим испитиваним екстрактима *S. minor* (204, 212). Кафена и хлорогена киселина, које су присутне у екстрактима *S. minor*, доказано испољавају антифунгална својства против *Candida* сојева (189, 190, 204). Међу флавоноидима се по својим антифунгалним својствима посебно истиче рутин који умањује експресију одређених гена одговорних за резистенцију фунгалних патогена (211). Показана је и оправданост употребе рутина у терапији септичног артритиса узрокованог управо гљивицом *C. albicans* (149). Будућа истраживања би могла додатно разјаснити антифунгални капацитет полифенолних једињења, посебно на различитим моделима кандидијазе *in vivo* (211).

Генерално, биљке *Sanguisorba* рода испољавају антифунгална својства. Највише испитивана свакако на свим пољима је *S. officinalis*, па се резултати антифунгалне активности могу упоредити са резултатима испитиване *S. minor*. Метанолни екстракт *S. officinalis* испољио је умерени фунгиостатски потенцијал на *C. albicans* (МИК 0,6 mg/ml) (13). Приликом испитивања антифунгалне активности *S. officinalis* са територије Јерменије, ацетонски, метанолни, хлороформски и хексански екстракти су испољили активност на *C. albicans* WT-174 изоловану са вагиналне микробиоте хоспитализованих пацијенткиња (МИК 512 µg/ml) (51). За разлику од *S. officinalis*, антифунгална активност врсте *S. minor* до сада је потврђена на различитим сојевима гљивица (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *P. ochrochloron*, *P. funiculosum*, *P. verrucosum* var. *cyclopium*), али је у овој докторској дисертацији први пут испитивана активност ове биљне врсте на *C. albicans* (9, 28). Резултати су показали да је етанолни екстракт корена *S. minor* показао бољу активност против *C. albicans* (МИК 12,5 mg/ml) у односу на етанолни екстракт корена *S. officinalis* (МИК 250 mg/ml) у истраживању аутора *Kokoska* и сарадника (88).

Чињеница је да постоји снажна и још увек растућа потреба за проналаском алтернативе стандардној антимикуробној терапији. Инфекције узроковане резистентним сојевима представљају озбиљан медицински проблем и до сада није пронађено задовољавајуће решење. Откриће нових антимикуробних лекова и њихова имплементација јесте скуп и временски захтеван процес, а чини се да се по питању проналаска нове класе антибиотика наилази на зид. У светлу претходно наведеног, секундарни биљни метаболити могу бити алтернатива која обећава (189, 190).

Антиинфламацијска активност екстракта *S. minor*

Предмет овог истраживања била је и антиинфламацијска активност биљне врсте *S. minor*. У традиционалној медицини основна примене ове биљке је у терапији рана и опекотина, где се очекује испољавање антиинфламацијског ефекта (3). Дизајн *in vitro* испитивања антиинфламацијске активности биљке *S. minor* subsp. *muricata* базиран је на традиционалној употреби ове биљке у облику тинктуре тј. етанолног екстракта у Републици Србији. Инхибиција ензимске активности циклооксигеназе-1 представља један од значајних антиинфламацијских механизма на коме се заснива специфична *in vitro* метода коришћена у овој дисертацији. Испитивани етанолни екстракт корена *S.*

minor је у високом степену инхибирао активност *COX-1* са $76 \pm 3,76$ % инхибиције, што потврђује оправданост традиционалне примене ове биљке у антиинфламацијске сврхе (График 16). Испитивани екстракт је показао знатно бољи антиинфламацијски ефекат у поређењу са стандардним инхибитором индометацином (32%) (212). Истраживање би требало употпунити *in vivo* анализама и тако дефинитивно потврдити антиинфламацијску активност екстракта.

Неколико досадашњих *in vivo* и *in vitro* истраживања пружило је значајне доказе да биљка *S. officinalis* поседује антиинфламацијска својства, а препарати ове биљке се користе у терапији инфламацијских болести, као што су хроничне интестиналне инфекције, астма и дерматитис (4). Ипак, када је реч о врсти *S. minor*, доступна је само једна студија која се бавила проценом антиинфламацијске активности биљке *S. minor* subsp. *muricata*, која је проучавана у овој дисертацији (3). *In vivo* антиинфламацијска активности *S. minor* subsp. *muricata* са територије Турске односила се на мерење способности редукције едема изазваног λ -карагенаном код експерименталних пацова. Интраперитонеална апликација воденог екстракта хербе *S. minor* subsp. *muricata* на анималном моделу инфламације индуковане карагенаном резултирала је дозно-зависном антиинфламацијском активношћу. Разлика у дебљини ткива третираних наспрам нетретираних пацова служила је као мера постигнутог антиинфламацијског ефекта. Примена екстракта у дози од 25, 50 и 100 *mg/kg* резултовала је значајном инхибицијом едема шапе пацова у вредности 41,9, 76,4 и 83,4 % у односу на контролну групу која је третирана само карагенаном (1,1 %). Индометацин је примењен као позитивна контрола интраперитонелно (3 *mg/kg*) и показао је очекивано снажну антиинфламацијску активност (96%). Иако се индометацин показао као снажнији антиинфламацијски агенс у односу на испитивани екстракт, треба узети у обзир и његове озбиљне нежељене ефекте (3). Ипак, инхибиција активности *COX* ензима од стране екстракта *S. minor* subsp. *muricata* први пут је описана у овој докторској дисертацији.

Добијени резултати за етанолни екстракт *S. minor* у складу су са истраживањима која су показала и да етанолни екстракт *S. officinalis* такође има значајна антиинфламацијска својства. Овај екстракт је на транскрипционом нивоу генерисао значајну блокаду ензима циклооксигеназе – 2 и азот-моноксид синтазе (60, 213). *Yang* и сарадници показали су антиинфламацијски ефекат етанолног екстракта *S. officinalis* (100 $\mu\text{g/ml}$) - нисходна регулација нивоа проинфламацијских цитокина у хуманим ћелијама кератиноцита стимулираним *TNF α* и *IFN* (59).

Како нема довољно података о антиинфламацијској активности *S. minor*, ефекат екстракта у нашем експерименту се може тумачити са аспекта садржаја одређених полифенолних једињења. Полифенолна једињења биљног порекла су показала антиинфламацијску активност како *in vitro* тако и *in vivo* чиме се истиче корист њихове примене у разним акутним и хроничним обољењима. Способност полифенола да инхибирају ензиме као што су фосфолипаза А2, *COX* и липооксигеназа (*LOX*) сматра се једним од њихових најважнијих антизапаљенских механизма. Такође, ова група природних једињења има способност и да модификује експресију различитих проинфламацијских цитокина као и да инхибира азот-моноксид синтазу. Наведени механизми у комбинацији са антиоксидационим карактеристикама полифенола доприносе регулацији инфламацијске сигнализације. Занимљиво је да одређени полифеноли показују структурне и функционалне сличности са неким антиинфламацијским лековима. Фенолно једињење олеокантал демонстрира природну

антиинфламацијску активност и испољава структурне сличности са ибупрофеном, добро познатим антиинфламацијским агенсом. Олеокантал, баш као и ибупрофен, инхибира активност *COX-1* и *COX-2* на дозно зависан начин (214). Документовано је и да флавоноиди имају способност ихибиције ензима *COX* и *LOX* који метаболишу фосфолипазу А2 до медијатора запаљенског процеса као што су простагландини, тромбоксан А2 и леукотриени (102). На основу показаног високог садржаја фенолних једињења и флавоноида у етанолном екстракту корена *S. minor* може се претпоставити да су ова једињења одговорна за инхибиторни ефекат испитиваног екстракта на *COX-1*.

Истраживања су показала да се међу полифенолним једињењима кверцетин и његови деривати посебно истичу по свом антиинфламацијском потенцијалу и инхибицији *COX-1* између осталог (213 – 217). Дериват кверцетина, кверцетин-3-метокси-4'-гликозил-7-глукозид ($15 \mu\text{g}/\text{mL}$) показао је 77,25 % инхибиције *COX-1* у поређењу са стандардном компонентом ибупрофеном који је показао 91,56 % инхибиције наведеног ензима (217). Гликозидни деривати кверцетина, рутин и кверцетин-3-софорозид, квантитативно су доминантни у нашем етанолном екстракту па се може претпоставити и да је њихов допринос уоченом антиинфламацијском ефекту значајан. Бројни су литературни докази да рутин показује значајни антиинфламацијски ефекат који остварује путем различитих механизма (218, 219). Агликонски део рутина има дуални инхибиторни потенцијал на активност *COX* и *LOX*. У једном истраживању је показано да рутин ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) инхибира ензимску активност *COX-1* са 75,63 % ихибиције (220).

Како је биљка *S. minor* недовољно проучена са аспекта антиинфламацијске активности, резултати ове дисертације би могли бити основа за будућа испитивања. Потребне су даље континуиране анализе испитиване врсте и осталих врста *Sanguisorba* рода како би се утврдило који су молекули у испитиваним екстрактима одговорни за антиинфламацијску активност.

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата ове докторске дисертације могу се извести следећи закључци:

- Укупни садржај фенола и флавоноида у испитиваним екстрактима разликује се у зависности од типа екстракта и коришћеног дела биљке. Метанолни и етанолни екстракт корена *S. minor* су најбогатији фенолним једињењима. Најмања количина укупних фенолних једињења присутна је у хексанском екстракту хербе и корена *S. minor*. Укупни садржај фенола је виши у екстрактима корена у односу на екстракте хербе *S. minor*.
- Испитивани метанолни, етанолни, хлороформски и ацетонски екстракти *S. minor* су садржали значајну количину флавоноида, а изузетак су хексански екстракти корена и хербе *S. minor* код којих су забележене најниже вредности. Највећа количина флавоноида откривена је у метанолном екстракту хербе *S. minor*.
- У анализираним екстрактима корена и хербе *S. minor* доминантне компоненте су кверцетин-3-рутинозид и кверцетин-3-софорозид. Концентрација свих идентификованих једињења зависила је од поларности екстракционог растварача.
- У етарском уљу хербе *S. minor* GC-MS техником је идентификовано 67 једињења (81,72%), док је HS/GC-MS техником идентификовано 12 компоненти (100%). У етарском уљу корена *S. minor* регистроване су 62 компоненте (80,79%) GC-MS техником и 8 компоненти (100%) применом HS/GC-MS технике.
- Постоји јака позитивна корелација између индекса антиоксидационог потенцијала испитиваних екстраката и њиховог укупног садржаја фенола и флавоноида.
- Метанолни, етанолни и ацетонски екстракти су били супериорнији у односу на хлороформске и хексанске екстракте по питању испитиваних антиоксидационих параметара *in vitro*, што је у функцији поларности растварача.
- Етанолни екстракт корена *S. minor* испољио је позитиван утицај на настанак оксидационог стреса у сепси смањивши прооксидационе параметре - *TBARS*, *NOx*, O_2^- и повећавши активност *SOD* код пацова са индукованом сепсом.
- Утицај етанолног екстракта корена *S. minor* на испитиване параметре оксидационог стреса зависио је од примењене концентрације екстракта и пута примене екстракта (орални и интраперитонеални).
- Екстракти *S. minor* испољавају антимикробну активност према свим испитиваним сојевима, при чему интензитет активности варира у зависности од врсте микроорганизма и типа екстракта.

- Када је реч о антибактеријској активности, испитивани екстракти корена и хербе су били најефикаснији против стандардних сојева Грам-позитивних бактерија *B. cereus* и *S. aureus*, а затим и против *E. faecalis*, *S. enteritidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes*, при чему су хлороформски, ацетонски и метанолни екстракти генерално били ефикаснији у односу на етанолне и хексанске екстракте корена и хербе *S. minor*.
- Екстракти *S. minor* испољавају антифунгалну активност на сој *C. albicans* при чему су највећи потенцијал испољили ацетонски и хексански екстракт хербе *S. minor*, док су остали екстракти показали слабу антифунгалну активност.
- Етанолни екстракт корена *S. minor* у високом степену инхибира активност *COX-1 in vitro*, при чему испољава бољи антиинфламацијски ефекат у поређењу са стандардним инхибитором индометацином.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Gajic M. Rod *Sanguisorba* L. In: Josifovic M (ed.). Flora RS Srbije. IV. Beograd: Srpska akademija nauke u umetnosti; 1972.
2. Zhao Z, He X, Zhang Q, Wei X, Huang L, Fang JC et al. Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Sanguisorba* L. *Am J Chin Med.* 2017; 45(2): 199-224.
3. Arihan O, Özbek H, Özkan AG. Anti-inflammatory effects of *Sanguisorba minor* Scop. subsp. *muricata* (Spach) Briq. and *Cirsium libanoticum* DC. subsp. *lycaonicum* (Boiss. & Heldr.) Davis & Parris in rat. *East J Med.* 2015; 20(2) :81-5.
4. Jang E, Inn KS, Jang YP, Lee KT, Lee JH. Phytotherapeutic activities of *Sanguisorba officinalis* and its chemical constituents: A review. *Am J Chin Med.* 2018; 46(2) :299-318.
5. Zhou P, Li J, Chen Q, et al. A Comprehensive Review of Genus *Sanguisorba*: Traditional Uses, Chemical Constituents and Medical Applications. *Front Pharmacol.* 2021;12:750165.
6. Viano J, Masotti V, Gaydou EM. Nutritional value of Mediterranean sheep's burnet (*Sanguisorba minor* ssp. *muricata*). *Journal of agricultural and food chemistry.* 1999; 47(11) :4645-8.
7. Integrated Taxonomic Information System – Report. Dostupno na: <https://www.itis.gov>.
8. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea*. Volume 2. Cambridge: University press; 1968. pp. 33-34.
9. Karkanis AC, Fernandes Â, Vaz J, Petropoulos S, Georgiou E, Ciric A et al. Chemical composition and bioactive properties of *Sanguisorba minor* Scop. under Mediterranean growing conditions. *Food Funct.* 2019; 10(3): 1340-51.
10. Ayoub NA. Unique phenolic carboxylic acids from *Sanguisorba minor*. *Phytochemistry.* 2003; 63(4): 433-6.
11. Biernasiuk A, Wozniak M, Bogucka-Kocka A. Determination of free and bounded phenolic acids in the rhizomes and herb of *Sanguisorba officinalis* L. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences.* 2015; 28(4): 254-6.
12. Zhang S, Liu X, Zhang ZL, He L, Wang Z, Wang GS. Isolation and identification of the phenolic compounds from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their antioxidant activities. *Molecules.* 2012; 17(12): 13917-22.
13. Gawron-Gzella A, Witkowska-Banaszczak E, Bylka W, Dudek-Makuch M, Odwrot A, Skrodzka N. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of *Sanguisorba officinalis* L. extracts. *Pharm Chem J.* 2016; 50(4): 244-9.
14. Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T, Kitani K. Effects of sanguinin H-6, a component of *Sanguisorbae Radix*, on lipopolysaccharide-stimulated nitric oxide production. *Biochem Pharmacol.* 2002; 63(5): 853-8.
15. Lee SJ, Lee HK. Sanguinin H-6 blocks endothelial cell growth through inhibition of VEGF binding to VEGF receptor. *Arch Pharm Res.* 2005; 28(11): 1270-4.
16. Kaneta M, Hikichi H, Endo S, Sugiyama N. Identification of flavones in nineteen Rosaceae species. *Agric Biol Chem.* 1979; 43(3): 657-8.
17. Cuccioloni M, Bonfili L, Mozzicafreddo M, Cekarini V, Eleuteri AM, Angeletti M. *Sanguisorba minor* extract suppresses plasmin-mediated mechanisms of cancer cell migration. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2012; 1820(7): 1027-34.

18. Bukharov VG, Karneeva LN. Triterpene glycosides from *Sanguisorba officinalis* L. Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR, Division of chemical science. 1970; 19(10): 2265-7.
19. Mimaki Y, Fukushima M, Yokosuka A, Sashida Y, Furuya S, Sakagami H. Triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. Phytochemistry. 2001; 57(5): 773-9.
20. Sun W, Zhang ZL, Liu X, Zhang S, He L, Wang Z, Wang GS. Terpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis* L. and their hemostatic activities. Molecules. 2012; 17(7): 7629-36.
21. Yosioka I, Sugawara T, Ohsuka A, Kitagawa I. Soil bacterial hydrolysis leading to genuine aglycone. III. The structures of glycosides and genuine aglycone of *Sanguisorbae radix*. Chem Pharm Bull. 1971; 19(8): 1700-7.
22. Zhu AK, Zhou H, Xia JZ, Jin HC, Wang K, Yan J et al. Ziyuglycoside II-induced apoptosis in human gastric carcinoma BGC-823 cells by regulating Bax/Bcl-2 expression and activating caspase-3 pathway. Braz J Med Biol Res. 2013; 46: 670-5.
23. Zhu X, Wang K, Yao Y, Zhang K, Zhou F, Zhu L. Triggering p53 activation is essential in ziyuglycoside I-induced human retinoblastoma WERI-Rb-1 cell apoptosis. J Biochem Mol Toxicol. 2018; 32(1): e22001.
24. Han WA, Zhong YU. Triterpenes of *Sanguisorba officinalis* L. Chinese Journal of Medicinal Chemistry. 2009; 19: 52–54.
25. Park KH, Koh D, Kim K, Park J, Lim Y. Antiallergic activity of a disaccharide isolated from *Sanguisorba officinalis*. Phytother Res. 2004; 18(8) :658-62.
26. Zhang L, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Smith PT, Ananthan R, Longvah T. Antioxidant and immunomodulatory activities of polysaccharides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. Int J Biol Macromol. 2012; 51(5): 1057-62.
27. Wu Z, Sun H, Li J, Ma C, Zhao S, Guo Z et al. A polysaccharide from *Sanguisorbae radix* induces caspase-dependent apoptosis in human leukemia HL-60 cells. Int J Biol Macromol. 2014; 70: 615-20.
28. Finimundy TC, Karkanis A, Fernandes Â, Petropoulos SA, Calhelha R, Petrović J et al. Bioactive properties of *Sanguisorba minor* L. cultivated in central Greece under different fertilization regimes. Food Chem. 2020; 327: 127043.
29. Kaplan M, Kamalak A, Kasra AA, Güven İ. Effect of maturity stages on potential nutritive value, methane production and condensed tannin content of *Sanguisorba minor* hay. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2014, 20: 445–449.
30. El-Mousallamy AM. Polyphenols of Egyptian Rosaceae plants-two new flavonoid glycosides from *Sanguisorba minor* Scop. Pharmazie. 2002; 57(10): 702-4.
31. Karkanis A, Vellios E, Thomaidis T, Bilalis D, Efthimiadou A, Travlos I. Phytochemistry and biological properties of burnet weed (*Sanguisorba* spp.): A review. Not Sci Biol. 2014; 6(4): 395-8.
32. Esmaeili A, Masoudi S, Masnabadi N, Rustaiyan A. Chemical Constituents of the Essential oil of *Sanguisorba minor* Scop. Leaves, from Iran. J Med Plants. 2010; 9 (35): 67-70.
33. Cai Z, Li W, Wang H, Yan W, Zhou Y, Wang G et al. Anti-tumor and immunomodulating activities of a polysaccharide from the root of *Sanguisorba officinalis* L. Int J Biol Macromol. 2012; 51(4): 484-8.
34. Liu X, Cui Y, Yu Q, Yu B. Triterpenoids from *Sanguisorba officinalis*. Phytochemistry. 2005; 66(14): 1671-9.
35. Son DJ, Hwang SY, Kim MH, Park UK, Kim BS. Anti-diabetic and hepato-renal protective effects of Ziyuglycoside II methyl ester in type 2 diabetic mice. Nutrients. 2015; 7(7): 5469-83.

36. Liu BG, Jia XM, Cao YY, Chen SH, Gao PH, Wang Y et al. Changtai granule, a traditional Chinese drug, protects hapten-induced colitis by attenuating inflammatory and immune dysfunctions. *J Ethnopharmacol.* 2008; 115(1): 1-8.
37. Shin J, Kim JS, Kwon KH, Nam JS, Jung JY, Cho NP, Cho SD. Apoptotic effect of hot water extract of *Sanguisorba officinalis* L. in human oral cancer cells. *Oncol Lett.* 2012; 4(3): 489-94.
38. Tuzlacı E, Erol MK. Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia.* 1999; 70(6): 593-610.
39. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey. Istanbul: Istanbul University Press; 1984.
40. Yuan ZH, Sun LL. Modern research progress of *Sanguisorba* L. *Chin J Informat TCM.* 2007; 14: 90-2.
41. Nordborg G. The genus *Sanguisorba* section *Poterium*. Experimental studies and taxonomy. *Opera Bot.* 1967; 16: 1-166.
42. Ravipati AS, Zhang L, Koyyalamudi SR, Jeong SC, Reddy N, Bartlett J et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. *BMC Complement Altern Med.* 2012; 12(1): 1-4.
43. Chen X, Shang F, Meng Y, Li L, Cui Y, Zhang M et al. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. *J Dairy Sci.* 2015; 98(12): 8486-91.
44. Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araujo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J Ethnopharmacol.* 2006; 108(1): 31-7.
45. Gençler Ozkan AM, Koyuncu M. Traditional medicinal plants used in Pinarbai Area (Kayseri-Turkey). *Turk J Pharm Sci.* 2005; 2(2): 63-82.
46. Romojaro A, Botella MÁ, Obón C, Pretel MT. Nutritional and antioxidant properties of wild edible plants and their use as potential ingredients in the modern diet. *Int J Food Sci Nutr.* 2013; 64(8): 944-52.
47. Vanzani P, Rossetto M, De Marco V, Sacchetti LE, Paoletti MG, Rigo A. Wild Mediterranean plants as traditional food: a valuable source of antioxidants. *J Food Sci.* 2011; 76(1): C46-51.
48. Yokozawa T, Chen CP. Evidence suggesting a nitric oxide-scavenging activity for traditional crude drugs, and action mechanisms of *Sanguisorbae Radix* against oxidative stress and aging. *J Am Aging Assoc.* 2001; 24(1): 19-30.
49. García-Alonso M, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. *Food Chem.* 2004; 84(1): 13-8.
50. Serrano M, Di'az-Mula HM, Zapata PJ, Castillo S, Guille'n F, Marti'nez-Romero D et al. Maturity stage at harvest determines the fruit quality and antioxidant potential after storage of sweet cherry cultivars. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 3240-6.
51. Ginovyan M, Petrosyan M, Trchounian A. Antimicrobial activity of some plant materials used in Armenian traditional medicine. *BMC Complement Altern Med.* 2017; 17(1): 1-9.
52. Janovska D, Kubikova K, Kokoška L. Screening for antimicrobial activity of some medicinal plants species of traditional Chinese medicine. *Czech J Food Sci.* 2003; 21(3): 107.
53. Gatto MA, Ippolito A, Linsalata V, Cascarano NA, Nigro F, Vanadia S, Di Venere D. Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biol Technol.* 2011; 61(1): 72-82.

54. Choi ES, Kim JS, Kwon KH, Kim HS, Cho NP, Cho SD. Methanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. with cytotoxic activity against PC3 human prostate cancer cells. *Mol Med Rep.* 2012; 6(3): 670-4.
55. Bedoya LM, Sanchez-Palomino S, Abad MJ, Bermejo P, Alcamí J. Anti-HIV activity of medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77(1): 113-6.
56. Kim HY, Eo EY, Park H, Kim YC, Park S, Shin HJ, Kim K. Medicinal herbal extracts of *Sophorae radix* *Acanthopanax cortex* *Sanguisorbae radix* and *Torilis fructus* inhibit coronavirus replication in vitro. *Antivir Ther.* 2010; 15(5): 697-709.
57. Liang J, Chen J, Tan Z. Extracts of medicinal herb inhibit the entry of human immunodeficiency virus type one. *Yao Wu Shi Pin Fen Xi.* 2013; 21: S52-S58.
58. Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM, Kim SH. Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz., *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytother Res.* 2001; 15(8): 718-20.
59. Yang JH, Hwang YH, Gu MJ, Cho WK, Ma JY. Ethanol extracts of *Sanguisorba officinalis* L. suppress TNF- α /IFN- γ -induced pro-inflammatory chemokine production in HaCaT cells. *Phytomedicine.* 2015; 22(14): 1262-8.
60. Yu T, Lee YJ, Yang HM, Han S, Kim JH, Lee Y et al. Inhibitory effect of *Sanguisorba officinalis* ethanol extract on NO and PGE2 production is mediated by suppression of NF- κ B and AP-1 activation signaling cascade. *J Ethnopharmacol.* 2011; 134(1): 11-7.
61. Park S, Kim DS, Kang S, Shin BK. Synergistic topical application of salt-processed *Phellodendron amurense* and *Sanguisorba officinalis* Linne alleviates atopic dermatitis symptoms by reducing levels of immunoglobulin E and pro-inflammatory cytokines in NC/Nga mice. *Mol Med Rep.* 2015; 12(5): 7657-64.
62. Yang JH, Yoo JM, Cho WK, Ma JY. Ethanol extract of *Sanguisorbae Radix* inhibits mast cell degranulation and suppresses 2, 4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016(1): 1-8.
63. Jo S, Ryu J, Kim H, Kim M, Ryu MH, Kim H, Cho SI. Anti-inflammatory Effects of *Sanguisorbae Radix* on Contact Dermatitis Induced by Dinitrofluorobenzene in Mice. *Chin J Integr Med.* 2020; 26(9): 688-693.
64. Shin TY, Lee KB, Kim SH. Anti-allergic effects of *Sanguisorba officinalis* on animal models of allergic reactions. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2002; 24(3): 455-68.
65. Wang Z, Loo WT, Wang N, Chow LW, Wang D, Han F et al. Effect of *Sanguisorba officinalis* L on breast cancer growth and angiogenesis. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16(sup1): S79-89.
66. Zhu X, Wang K, Zhang K, Huang B, Zhang J, Zhang Y et al. Ziyuglycoside II inhibits the growth of human breast carcinoma MDA-MB-435 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through the mitochondria dependent pathway. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(9): 18041-55.
67. Cho JY, Yoo ES, Cha BC, Park HJ, Rhee MH, Han YN. The inhibitory effect of triterpenoid glycosides originating from *Sanguisorba officinalis* on tissue factor activity and the production of TNF- α . *Planta Med.* 2006; 72(14): 1279-84.
68. Jeong HS, Lee KS, Song BK. Hemostatic effects of *Sanguisorbae Radix* and *Nepetae Herba* aqua-acupuncture. *J Oriental Gynecol.* 2000; 13(13): 18-34.
69. Zhou Y, Fei Y. Research of the affection of the raw and the processed *Sanguisorba officinalis* L. on their bleeding time and coagulation time of mice. *Lishizhen Med Materia-Med Res.* 2014; 25:1386-1387.
70. Liang JQ, Wang HR, Xiong JH. Observation of therapeutic efficacy of *Diyushengbai* in treating leucopenia - 240 cases report. *West Chin Med J.* 2008;23:858.

71. Li HS, Wang YD, He WX, Hong J, Yan BC. Clinical study of the prophylactic effects of Diyu Shengbai tablet on the decrease in peripheral blood cell count induced by neoadjuvant chemotherapy for patients with breast cancer. *Chin J Prim Med Pharm.* 2005; 12: 397-8.
72. Zhang R, Tang Y, Yu L, Wu B. A systematic review of Garden burnet root leukopoietic tablets treatment and prevention of radiotherapy-induced leukopenia. *Chin Hosp Pharm J.* 2012; 32: 719-22.
73. Fu LR. Diyu shengbai tablets in the treatment of malignant tumors after radiotherapy leukopenia randomized parallel controlled study. *J Pract Tradit Chin Intern Med.* 2014; 28: 71-73.
74. Jiang DX, Weng YJ, Liang CX, Pang YJ, Chen GQ. Function of garden burnet root leukopoietic tablets to prevent myelosuppression induced by FOLFOX Chemotherapy in patients with colorectal cancer. *Clin Med Eng.* 2015; 22: 286-288.
75. Chen X, Li B, Gao Y, Ji J, Wu Z, Chen S. Saponins from *Sanguisorba officinalis* improve hematopoiesis by promoting survival through FAK and Erk1/2 activation and modulating cytokine production in bone marrow. *Frontiers in Pharmacology.* 2017; 8: 130.
76. Gao XP, Wu JM, Zou WJ, Liu ZR, Li BG. Screening of the active fractions from *Sanguisorba officinalis* promoting hematopoiesis. *Chin J Nat Med.* 2006; 4: 137-40.
77. Kuang HX, Li HW, Wang QH, Yang BY, Wang ZB, Xia YG. Triterpenoids from the roots of *Sanguisorba tenuifolia* var. *alba*. *Molecules.* 2011; 16(6): 4642-51.
78. Nguyen TT, Cho SO, Ban JY, Kim JY, Ju HS, Koh SB et al. Neuroprotective effect of *Sanguisorbae radix* against oxidative stress-induced brain damage: in vitro and in vivo. *Biol Pharm Bull.* 2008; 31(11): 2028-35.
79. Gunther RT. *The Greek Herbal of Dioscorides.* New York: Hafner Publishing Co; 1959.
80. Gürbüz I, Özkan AM, Yesilada E, Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2005; 101(1-3): 313-8.
81. Lamaison JL, Carnat A, Petitjean-Freytet C. Tannin content and inhibiting activity of elastase in Rosaceae. *Ann Pharm Fr.* 1990; 48(6): 335-40.
82. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res.* 2000; 14(8): 581-91.
83. Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Gohari A, Farimani MM, Rivière C et al. Antimicrobial activity of selected Iranian medicinal plants against a broad spectrum of pathogenic and drug multiresistant micro-organisms. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59(4): 412-21.
84. Gupta PD, Birdi TJ. Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and integrative medicine.* 2017; 8(4): 266-75.
85. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(4): 564-82.
86. Silva NC, Fernandes Júnior AJ. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2010; 16(3): 402-13.
87. Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A, Vanek T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 2002; 82(1): 51-3.
88. Rajeh MA, Zuraini Z, Sasidharan S, Latha LY, Amutha S. Assessment of *Euphorbia hirta* L. leaf, flower, stem and root extracts for their antibacterial and antifungal activity and brine shrimp lethality. *Molecules.* 2010; 15(9): 6008-18.

89. Upadhyay A, Upadhyaya I, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Combating pathogenic microorganisms using plant-derived antimicrobials: a minireview of the mechanistic basis. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 18.
90. Eloff JN. Which extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants?. *J Ethnopharmacol.* 1998; 60(1): 1-8.
91. Petrosyan M, Shcherbakova Y, Sahakyan N, Vardanyan Z, Poladyan A, Popov Y, Trchounian A. *Alkanna orientalis* (L.) Boiss. plant isolated cultures and antimicrobial activity of their extracts: phenomenon, dependence on different factors and effects on some membrane-associated properties of bacteria. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2015; 122(3): 727-38.
92. Savoia D. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 979-90.
93. Gautam R, Jachak SM. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev.* 2009; 29(5): 767-820.
94. Bellik Y, Boukraâ L, Alzahrani HA, Bakhotmah BA, Abdellah F, Hammoudi SM, Iguer-Ouada M. Molecular mechanism underlying anti-inflammatory and anti-allergic activities of phytochemicals: an update. *Molecules.* 2013; 18(1): 322-53.
95. Arulsevan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 5276130.
96. Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002; 105(9): 1135-43.
97. Romano B, Iqbal AJ, Maione F. Natural anti-inflammatory products/compounds: Hopes and reality. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 374239.
98. Yuan G, Wahlqvist ML, He G, Yang M, Li D. Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2006; 15(2): 143-52.
99. Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules.* 2016; 21(10): 1321.
100. Arya V, Arya ML. A Review on anti-inflammatory plant barks. *Int J Pharm Tech Res.* 2011; 3: 899-908.
101. Kim YS, Young MR, Bobe G, Colburn NH, Milner JA. Bioactive food components, inflammatory targets, and cancer prevention. *Cancer Prev Res.* 2009; 2(3): 200-8.
102. Calixto JB, Otuki MF, Santos AR. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). *Planta Med.* 2003; 69(11): 973-83.
103. Mantzarlis K, Tsolaki V, Zakynthinos E. Role of oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis and potential therapies. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 5985209.
104. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
105. Đukić MM. Oksidativni stres - kliničko-dijagnostički značaj. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
106. Đukić MM. Oksidativni stres. Slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Beograd: Mono i Manjana; 2008.
107. Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 6501046.
108. Cepinskas G, Wilson JX. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 42(3): 175-84.

109. Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, Moran GJ, Abraham E, Trzeciak S et al. Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med.* 2006; 48(1): 28-54.
110. Macdonald J, Galley HF, Webster NR. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *Br J Anaesth.* 2003; 90(2): 221-32.
111. Prauchner CA. Oxidative stress in sepsis: pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns.* 2017; 43(3): 471-85.
112. Liew KY, Hafiz MF, Chong YJ, Harith HH, Israf DA, Tham CL. A review of malaysian herbal plants and their active constituents with potential therapeutic applications in sepsis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020; 2020(3): 1-20
113. Clevenger JF. Apparatus for the determination of volatile oil. *J Am Pharm Assoc.* 1928; 17(4): 346-9.
114. Milosavljević S. *Strukturne instrumentalne metode.* Beograd: Hemijski fakultet; 1994.
115. Van Den Dool H, Kratz PD. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. *J Chromatogr A.* 1963; 11: 463-471.
116. National Institute of Standards and Technology. NIST Chemistry WebBook - Nist Standard Reference database. Dostupno na: <https://webbook.nist.gov/chemistry>.
117. Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy.* Carol Stream: Allured Publishing Corporation; 2007.
118. Rajurkar NS, Hande SM. Estimation of phytochemical content and antioxidant activity of some selected traditional Indian medicinal plants. *Indian J Pharm Sci.* 2011; 73(2): 146-51.
119. Dimitrijevic M, Jovanovic VS, Cvetkovic J, Mihajilov-Krstev, Stojanovic G, Mitic V. Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Anal Methods.* 2015; 7: 4181.
120. Baba, SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J Taibah Univ Sci.* 2015; 9: 449-454.
121. Seeram NP, Aviram M, Zhang Y, Henning SM, Feng L, Dreher M, Heber D. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(4): 1415-22.
122. Stojanović D, Ašanin R, Maličević Ž, Vidić M. Model of sepsis (Caecal Ligation and Puncture) in rats caused by mixed and pure bacterial cultures and changes in white blood cell counts. *Acta vet.* 2004; 54: 281.
123. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82(1): 70-7.
124. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-8.
125. Viinikka L. Nitric oxide as a challenge for the clinical chemistry laboratory. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996; 56(7): 577-81.
126. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: *Research (Greenwald RA ed.). Handbook of methods for oxygen radical.* Boca Raton. CRC Press Inc; 1985. pp. 123- 32.
127. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiiah U et al. Antioxidants and human diseases. *Clin Chim Acta.* 2014; 436: 332-47.
128. Sun M, Zigman S. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. *Anal Biochem.* 1978; 90(1): 81-9.

129. Fiebich BL, Grozdeva M, Hess S, Hüll M, Danesch U, Bodensieck A, Bauer R. Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE2 release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells. *Planta Med.* 2005; 71(1): 12-9.
130. Dadkhah A, Fatemi F. Heart and kidney oxidative stress status in septic rats treated with caraway extracts. *Pharm Biol.* 2011; 49(7): 679-86.
131. Akbari S, Soodi M, Hajimehdipour H, Ataei N. Protective effects of Sanguisorba minor and Ferulago angulata total extracts against beta-amyloid induced cytotoxicity and oxidative stress in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Herbmед Pharmacology.* 2019; 8(3): 248-55.
132. Petropoulos SA, Fernandes Â, Vasileios A, Ntatsi G, Barros L, Ferreira IC. Chemical composition and antioxidant activity of Cichorium spinosum L. leaves in relation to developmental stage. *Food Chem.* 2018; 239: 946-52.
133. Elgersma A, Søgaard K. Effects of species diversity on seasonal variation in herbage yield and nutritive value of seven binary grass-legume mixtures and pure grass under cutting. *Eur J Agron.* 2016; 78: 73-83.
134. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci.* 2004; 74(17): 2157-84.
135. Kim S, Oh S, Noh HB, Ji S, Lee SH, Koo JM et al. In vitro antioxidant and anti-propionibacterium acnes activities of cold water, hot water, and methanol extracts, and their respective ethyl acetate fractions, from Sanguisorba officinalis L. Roots. *Molecules.* 2018; 23(11): 3001.
136. Shan B, Cai YZ, Brooks JD, Corke H. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *Int J Food Microbiol.* 2007; 117(1): 112-9.
137. Ceccanti C, Landi M, Incrocci L, Pardossi A, Venturi F, Taglieri I et al. Comparison of three domestications and wild-harvested plants for nutraceutical properties and sensory profiles in five wild edible herbs: Is domestication possible?. *Foods.* 2020; 9(8): 1065.
138. Ullah S, Hussain SA, Shaukat F, Hameed A, Yang W, Song Y. Antioxidant potential and the characterization of arachis hypogaea roots. *Biomed Res Int.* 2019; 2019(2): 1-9
139. Blondeau D, St-Pierre A, Bourdeau N, Bley J, Lajeunesse A, Desgagné-Penix I. Antimicrobial activity and chemical composition of white birch (Betula papyrifera Marshall) bark extracts. *Microbiologyopen.* 2020; 9(1): e00944.
140. Liew SS, Ho WY, Yeap SK, Sharifudin SA. Phytochemical composition and in vitro antioxidant activities of Citrus sinensis peel extracts. *PeerJ.* 2018; 6: e5331.
141. Sepahpour S, Selamat J, Abdul Manap MY, Khatib A, Abdull Razis AF. Comparative analysis of chemical composition, antioxidant activity and quantitative characterization of some phenolic compounds in selected herbs and spices in different solvent extraction systems. *Molecules.* 2018; 23(2): 402.
142. Li CW, Chu YC, Huang CY, Fu SL, Chen JJ. Evaluation of antioxidant and anti- α -glucosidase activities of various solvent extracts and major bioactive components from the seeds of Myristica fragrans. *Molecules.* 2020; 25(21): 5198.
143. Shahidi F, Yeo J. Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *Int J Mol Sci.* 2018; 19(6): 1573.
144. Chen F, Long X, Liu Z, Shao H, Liu L. Analysis of phenolic acids of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) responding to salt-stress by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *ScientificWorldJournal.* 2014; 2014: 568043.

145. Bagdas D, Gul Z, Meade JA, Cam B, Cinkilic N, Gurun MS. Pharmacologic overview of chlorogenic acid and its metabolites in chronic pain and inflammation. *Curr Neuropharmacol*. 2020; 18(3): 216-28.
146. Silva H, Lopes NM. Cardiovascular effects of caffeic acid and its derivatives: a comprehensive review. *Front Physiol*. 2020; 11: 595516.
147. Kumar S, Pandey AK. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *ScientificWorldJournal*. 2013; 2013: 162750.
148. Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 26(5): 343-56.
149. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The pharmacological potential of rutin. *Saudi Pharm J*. 2017; 25(2): 149-64.
150. Šeregelj V, Četković G, Čanadanović-Brunet J, Šaponjac VT, Vulić J, Stajčić S. Encapsulation and degradation kinetics of bioactive compounds from sweet potato peel during storage. *Food Technol Biotechnol*. 2020; 58(3): 314.
151. Singh M, Jha A, Kumar A, Hettiarachchy N, Rai AK, Sharma D. Influence of the solvents on the extraction of major phenolic compounds (punicalagin, ellagic acid and gallic acid) and their antioxidant activities in pomegranate aril. *J Food Sci Technol*. 2014; 51(9): 2070-7.
152. Gil MI, Tomás-Barberán FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem*. 2000; 48(10): 4581-9.
153. Hagerman AE, Riedl KM, Jones GA, Sovik KN, Ritchard NT, Hartzfeld PW, Riechel TL. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J Agric Food Chem*. 1998; 46(5): 1887-92.
154. Jurenka J. Therapeutic applications of pomegranate (*Punica granatum L.*): a review. *Altern Med Rev*. 2008; 13(2): 128-44.
155. Granato D, Shahidi F, Wrolstad R, Kilmartin P, Melton LD, Hidalgo FJ et al. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods?. *Food Chem*. 2018; 264: 471-5.
156. Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*. 2010; 15(10): 7313-52.
157. Al-Jaber HI, Shakya AK, Elagbar ZA. HPLC profiling of selected phenolic acids and flavonoids in *Salvia eigii*, *Salvia hierosolymitana* and *Salvia viridis* growing wild in Jordan and their in vitro antioxidant activity. *PeerJ*. 2020; 8: e9769.
158. Sayah K, El Omari N, Kharbach M, Bouyahya A, Kamal R, Marmouzi I et al. Comparative Study of Leaf and Rootstock Aqueous Extracts of *Foeniculum vulgare* on Chemical Profile and In Vitro Antioxidant and Antihyperglycemic Activities. *Adv Pharmacol Pharm Sci*. 2020; 2020: 8852570.
159. Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T et al. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *Int J Pharm*. 2011; 403(1-2): 136-8.
160. Ghasemzadeh A, Jaafar HZ, Rahmat A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale Roscoe*). *Molecules*. 2010; 15(6): 4324-33.
161. Rajauria G, Abu-Ghannam N. Isolation and partial characterization of bioactive fucoxanthin from *Himantalia elongata* brown seaweed: A TLC-based approach. *Int J Anal Chem*. 2013; 2013: 802573.
162. Li S, Li SK, Gan RY, Song FL, Kuang L, Li HB. Antioxidant capacities and total phenolic contents of infusions from 223 medicinal plants. *Ind Crops Prod*. 2013; 51: 289-98.

163. Li Y, Li Y, Fang Z, Huang D, Yang Y, Zhao D, Hang M, Wang J. The effect of *Malus doumeri* leaf flavonoids on oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) in human embryonic kidney 293 T cells. *BMC Complement Med Ther.* 2020; 20(1): 1-2.
164. Hritcu L, Ionita R, Postu PA, Gupta GK, Turkez H, Lima TC et al. Antidepressant flavonoids and their relationship with oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 5762172.
165. Zongo F, Ribuot C, Boumendjel A, Guissou I. Botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Waltheria indica* L.(syn. *Waltheria americana*): a review. *J Ethnopharmacol.* 2013; 148(1): 14-26.
166. Munguia L, Rubio-Gayosso I, Ramirez-Sanchez I, Ortiz A, Hidalgo I, Gonzalez C et al. High flavonoid cocoa supplement ameliorates plasma oxidative stress and inflammation levels while improving mobility and quality of life in older subjects: a double-blind randomized clinical trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2019; 74(10): 1620-7.
167. Mattera R, Benvenuto M, Giganti MG, Tresoldi I, Pluchinotta FR, Bergante S et al. Effects of polyphenols on oxidative stress-mediated injury in cardiomyocytes. *Nutrients.* 2017; 9(5): 523.
168. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MC, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: what polyphenols can do for us?. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 7432797.
169. Cheng YC, Sheen JM, Hu WL, Hung YC. Polyphenols and oxidative stress in atherosclerosis-related ischemic heart disease and stroke. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 8526438.
170. Li G, Ding K, Qiao Y, Zhang L, Zheng L, Pan T, Zhang L. Flavonoids Regulate Inflammation and Oxidative Stress in Cancer. *Molecules.* 2020; 25(23): 5628.
171. Costa Marques TH, Santos De Melo CH, Fonseca De Carvalho RB, Costa LM, De Souza AA, David JM et al. Phytochemical profile and qualification of biological activity of an isolated fraction of *Bellis perennis*. *Biol Res.* 2013; 46(3): 231-8.
172. Cano A, Arnao MB, Williamson G, Garcia-Conesa MT. Superoxide scavenging by polyphenols: effect of conjugation and dimerization. *Redox Rep.* 2002; 7(6): 379-83.
173. Xianchu L, Lan Z, Ming L, Yanzhi M. Protective effects of rutin on lipopolysaccharide-induced heart injury in mice. *J Toxicol Sci.* 2018; 43(5): 329-37.
174. Enogieru AB, Haylett W, Hiss DC, Bardien S, Ekpo OE. Rutin as a potent antioxidant: Implications for neurodegenerative disorders. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 2018: 6241017
175. Nassiri-Asl M, Farivar TN, Abbasi E, Sadeghnia HR, Sheikhi M, Lotfizadeh M, Bazahang P. Effects of rutin on oxidative stress in mice with kainic acid-induced seizure. *J Integr Med.* 2013; 11(5): 337-42.
176. Navegantes-Lima KC, Monteiro VV, de França Gaspar SL, de Brito Oliveira AL, De Oliveira JP, Reis JF et al. *Agaricus brasiliensis* mushroom protects against sepsis by alleviating oxidative and inflammatory response. *Front Immunol.* 2020; 11: 1238.
177. Nagar H, Piao S, Kim CS. Role of mitochondrial oxidative stress in sepsis. *Acute Crit Care.* 2018; 33(2): 65–72.
178. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med.* 1996; 24(7): 1179-83.
179. Matsumoto S, Koga H, Kusaka J, Hagiwara S. Effects of the Antioxidant-Enriched Concentrated Liquid Diet ANOM on Oxidative Stress and Multiple Organ Injury in Patients with Septic Shock: A Pilot Study. *J Anesth Clin Res.* 2011; 2: 155.

180. Silva JB, De Almeida KN, Barbosa BB. Medicinal plants and polymicrobial sepsis: A review. *J Med Plants Stud.* 2017; 5: 42–46.
181. Muttigi MS, Kedage V, Suvarna R, Rao SS, Joshi C, Shetty MS, Prakash M. Serum GST activity and total thiols status in patients with liver disease secondary to various disorders. *Open J Hematol.* 2009; 1: 5–8.
182. Ruiz S, Vardon-Bounes F, Merlet-Dupuy V, Conil JM, Buléon M, Fourcade O et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Med Exp.* 2016; 4(1): 1-3.
183. Dickinson DA, Forman HJ. Cellular Glutathione and Thiols Metabolism. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 1019-1026.
184. Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N. Total Thiols: Biomedical Importance And Their Alteration In Various Disorders. *Online J Health Allied Scs.* 2009; 8(2): 2.
185. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 2014: 360438.
186. Toufekoula C, Papadakis V, Tsaganos T, Routsis C, Orfanos SE, Kotanidou A et al. Compartmentalization of lipid peroxidation in sepsis by multidrug-resistant gram-negative bacteria: experimental and clinical evidence. *Crit Care.* 2013; 17(1): R6.
187. Demirbilek S, Ersoy MO, Demirbilek S, Karaman A, Akin M, Bayraktar M, Bayraktar N. Effects of polyenylphosphatidylcholine on cytokines, nitrite/nitrate levels, antioxidant activity and lipid peroxidation in rats with sepsis. *Intensive Care Med.* 2004; 30 (10): 1974-8.
188. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018; 217(6): 1915-1928.
189. Keřa M, Miklasińska-Majdanik M, Wojtyczka RD, Idzik D, Korzeniowski K, Smoleń-Dzirba J, Wąsik TJ. Antimicrobial potential of caffeic acid against *Staphylococcus aureus* clinical strains. *Biomed Res Int.* 2018; 2018(2): 1-9.
190. Adamczak A, Ożarowski M, Karpiński TM. Antibacterial activity of some flavonoids and organic acids widely distributed in plants. *J Clin Med.* 2020; 9(1): 109.
191. Bouarab Chibane L, Degraeve P, Ferhout H, Bouajila J, Oulahal N. Plant antimicrobial polyphenols as potential natural food preservatives. *J Sci Food Agric.* 2019; 99(4): 1457-74.
192. Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard-Akkari L, Oulahal N et al. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure–activity relationship) models. *Front Microbiol.* 2019; 10: 829.
193. Mehmood A, Murtaza G. Phenolic contents, antimicrobial and antioxidant activity of *Olea ferruginea* Royle (Oleaceae). *BMC Complement Altern Med.* 2018; 18(1): 1-6.
194. Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Curr Med Chem.* 2015; 22(1): 132-49.
195. Farhadi F, Khameneh B, Iranshahi M, Iranshahi M. Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytother Res.* 2019; 33(1): 13-40.
196. Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p-coumaric acid and rutin, using food systems. *J Sci Food Agric.* 2013; 93(13): 3205-8.
197. Luís Â, Silva F, Sousa S, Duarte AP, Domingues F. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling.* 2014; 30(1): 69-79.

198. Fialova S, Rendekova K, Mucaji P, Slobodnikova L. Plant natural agents: Polyphenols, alkaloids and essential oils as perspective solution of microbial resistance. *Curr Org Chem*. 2017; 21(18): 1875-84.
199. Khameneh B, Iranshahy M, Soheili V, Bazzaz BSF. Review on plant antimicrobials: A mechanistic viewpoint. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019; 8: 118.
200. Wu Y, Liang S, Zhang M, Wang Z, Wang Z, Ren X. The effect of chlorogenic acid on bacillus subtilis based on metabolomics. *Molecules*. 2020; 25(18): 4038.
201. Lou Z, Wang H, Zhu S, Ma C, Wang Z. Antibacterial activity and mechanism of action of chlorogenic acid. *J Food Sci*. 2011; 76(6): M398-403.
202. Kordbacheh H, Eftekhari F, Ebrahimi SN. Anti-quorum sensing activity of Pistacia atlantica against Pseudomonas aeruginosa PAO1 and identification of its bioactive compounds. *Microb Pathog*. 2017; 110: 390-8.
203. Freitas PR, de Araújo ACJ, Dos Santos Barbosa CR, Muniz DF, Rocha JE, de Araújo Neto JB et al. Characterization and antibacterial activity of the essential oil obtained from the leaves of Baccharis coridifolia DC against multiresistant strains. *Microb Pathog*. 2020; 145: 104223.
204. Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential use of phenolic acids as anti-Candida agents: A review. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1420.
205. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (Cynara scolymus L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem*. 2004; 52(24): 7272-8.
206. Engiso H, Worku T, Nureye D, Salahaddin M, Woldelessie W, Hambisa S, Sharief N. Antibacterial activity of Ritchiea albersii Gilg and Cynoglossum amplifolium leaves extracts against selected bacteria. *Saudi J Med Med Sci*. 2020; 8(3): 201.
207. Downey MO, Hanlin RL. Comparison of ethanol and acetone mixtures for extraction of condensed tannin from grape skin. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 2010; 31(2): 154-9.
208. Inouye S, Yamaguchi H, Takizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother*. 2001; 7(4): 251-4.
209. Taguri T, Tanaka T, Kouno I. Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull*. 2006; 29(11): 2226-35.
210. Martins N, Barros L, Henriques M, Silva S, Ferreira IC. In vivo anti-candida activity of phenolic extracts and compounds: Future perspectives focusing on effective clinical interventions. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 247382.
211. Ivanov M, Kannan A, Stojković DS, Glamočlija J, Calhella RC, Ferreira IC et al. Flavones, flavonols, and glycosylated derivatives—impact on candida albicans growth and virulence, expression of cdr1 and erg11, cytotoxicity. *Pharmaceuticals*. 2021; 14(1): 27.
212. Jeppesen AS, Soelberg J, Jäger AK. Antibacterial and COX-1 inhibitory effect of medicinal plants from the Pamir Mountains, Afghanistan. *Plants*. 2012; 1(2) :74-81.
213. Seo CS, Jeong SJ, Yoo SR, Lee NR, Shin HK. Quantitative analysis and in vitro anti-inflammatory effects of gallic acid, ellagic acid, and quercetin from radix sanguisorbae. *Pharmacogn Mag*. 2016; 12(46): 104.
214. Yahfoufi N, Alsadi N, Jambi M, Matar C. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 2018; 10(11): 1618.
215. Gerin F, Sener U, Erman H, Yilmaz A, Aydin B, Armutcu F, Gurel A. The effects of quercetin on acute lung injury and biomarkers of inflammation and oxidative stress in the rat model of sepsis. *Inflammation*. 2016; 39(2): 700-5.

216. Colunga Biancatelli RM, Berrill M, Catravas JD, Marik PE. Quercetin and vitamin C: an experimental, synergistic therapy for the prevention and treatment of SARS-CoV-2 related disease (COVID-19). *Front Immunol.* 2020; 11: 1451.
217. Mondal A, Maity TK, Bishayee A. Analgesic and anti-inflammatory activities of quercetin-3-methoxy-4'-glucosyl-7-glucoside isolated from Indian medicinal plant *Melothria heterophylla*. *Medicines.* 2019; 6(2): 59.
218. Abd Nikfarjam B, Adineh M, Hajiali F, Nassiri-Asl M. Treatment with rutin-a therapeutic strategy for neutrophil-mediated inflammatory and autoimmune diseases:- anti-inflammatory effects of rutin on neutrophils. *J Pharmacopuncture.* 2017; 20(1): 52.
219. Nardi GM, Januario AG, Freire CG, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MR et al. Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. *Pharmacognosy Res.* 2016; 8(Suppl 1): S42-9.
220. Gautam R, Singh M, Gautam S, Rawat JK, Saraf SA, Kaithwas G. Rutin attenuates intestinal toxicity induced by Methotrexate linked with anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *BMC Complement Altern Med.* 2016; 16(1): 1-6.

Биографија аутора

Магистар фармације Тијана Р. Кокерић (рођена Ћировић) рођена је 15.06.1990. у Крагујевцу. Током основног и средњег образовања била је носилац Вукове дипломе, а добитник је и награде за најбољег ђака генерације Прве крагујевачке гимназије.

Уписала је Интегрисане академске студије фармације 2009. г. на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Дипломирала је у септембру 2014. г., просечна оцена 9,73, као најбољи студент у генерацији. За постигнуте успехе награђивана је следећим стипендијама и наградама:

- стипендија Министарства просвете, науке и технолошког развоја;
- стипендија “Доситеја” Фонда за младе таленте Републике Србије;
- стипендија Фондације Хемофарм;
- награда из Фонда “Академик Драгослав Срејовић” Града Крагујевца.

Учествовала је два пута на Конгресу студената биомедицинских наука Србије са интернационалним учешћем (2011, 2014. г.). Била је члан групе студената у програму размене (Смоленск, Русија, 2012. г.). Била је учесник интернационалног еколошког пројекта "*Bike your environment*" (Охрид, Македонија, 2013. г.).

У радном је односу у компанији Хемофарм АД од 2015. г. у сектору Медицински маркетинг.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу уписала је школске 2016/2017. г. Усмени докторски испит положила је 30.10.2018. (оцена 9). Докторску дисертацију на тему „Хемијска карактеризација, антиоксидациона и антимикуробна активност екстракта и етарског уља корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* L.“ пријавила је 09.10.2019. Позитиван извештај комисије о оцени научне заснованости теме докторске дисертације усвојен је на Наставно – научном већу Факултета медицинских наука у Крагујевцу 29.01.2020. Веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу дало је сагласност за израду докторске дисертације 19.02.2020.

Списак објављених радова аутора Тијане Кокерић

1. Barjaktarevic A, **Cirovic T**, Arsenijevic N, Volarevic V, Markovic B, Mitic V, Jovanovic SV, Cupara S. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of *Salvia verticillata* L. extracts. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021; 83(6): 1280-1287.
2. **Cirovic T**, Barjaktarevic A, Ninkovic M, Bauer R, Nikles S, Brankovic S, Markovic M, Jovanovic SV, Ilic M, Milovanovic O, Kojcic K, Cupara S. Biological activities of *Sanguisorba minor* L. extracts - in vitro and in vivo evaluations. *Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research*. 2020; 77: 745-758.
3. **Cirovic T**, Barjaktarevic A, Cupara S, Mitic V, Nikolic J, Jovanovic SV. Antioxidant and antimicrobial activity of *Sanguisorba minor* L. extracts. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*; 2022; 23(1): 51-57.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ђијана Кокерит, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Хемијска карактеризација, антиоксидациона и антимикробна активност екстракта и етарског уља корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* L.

која је одбрањена на Филозофском факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

у Крагујевцу, 15.03.2022. године,

Ђијана Кокерит
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Тијана Кокерити,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

"Хемијска карактеризација, антиоксидациона и антимикробна активност екстракта и етарског уља корена и хербе биљне врсте *Sanguisorba minor* L." "

која је обрађена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Крагујевцу, 15.03.2022. године,

Милана Кокерита
потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: [http://creativecommons.org/rs/](http://creativecommons.org.rs/)