

**NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU
UNIVERZITETA U BEOGRADU - FARMACEUTSKOG FAKULTETA
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Na sednici Nastavno-naučnog veća Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta, održanoj 23.10.2014. god., imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor, mentor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet
2. Prof. dr Mirjana Radenković, redovni profesor, Univerzitet u Nišu - Medicinski fakultet
3. Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije pod nazivom „**Farmakognozijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)**“, kandidata dipl. farm. Ivana N. Pavlovića, istraživača-saradnika na realizaciji projekata 173021 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja. Članovi Komisije su pregledali priloženu disertaciju i podnose Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta sledeći

IZVEŠTAJ

1. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Ivana N. Pavlovića pod nazivom „**Farmakognozijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)**“ sastoji se od sledećih poglavlja: Rezime na srpskom i engleskom jeziku, Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati i diskusija, Zaključci, Literatura i Prilozi.

Disertacija je napisana na 274 strane i sadrži 82 slike (5 u Uvodu, 2 u Materijalu i metodama, 43 u Rezultatima i diskusiji i 32 u Prilogu), 28 tabela (7 u Uvodu, 4 u Materijalu i metodama i 17 u Rezultatima i diskusiji) i 277 literaturnih navoda.

U **Uvodu** su date informacije o rodu *Ferula* L.: botanički opis vrsta ovog roda i rasprostranjenje vrsta navedenih u Flori Evrope. Srpska velestika, *F. heuffelii*, čije je ispitivanje bilo predmet ove doktorske disertacije je detaljno opisana i navedeno je njeno rasprostranjenje u Evropi. Nakon toga prezentovan je prikaz klasa sekundarnih metabolita izolovanih i/ili detektovanih u predstavnicima ovog roda. Pregled sekundarnih metabolita vrsta roda *Ferula* prikazan je na sledeći način: kumarini, hromoni, jedinjenja sa sumporom, fenilpropani, seskviterpeni i seskviterpenski estri i etarska ulja. U okviru svake klase dati su kratak pregled biosinteze i farmakološke aktivnosti i u odgovarajućim tabelama navedena su jedinjenja koja su do sada izolovana i/ili identifikovana u vrstama ovog roda. Kumarini, kao najrasprostranjeniji sekundarni metaboliti predstavnika roda *Ferula*, detaljno su obrađeni, pri čemu su prikazane i sve podgrupe kumarina prisutne u vrstama ovog roda: seskviterpenski

umbeliferil (7-hidroksikumarin) etri, seskviterpenski etri derivati izofraksidina, prenilovani 4-hidroksikumarini, seskviterpeni prenil-furokumarinskog tipa, i monoterpenski kumarini. Zatim je, kao posebno poglavlje u Uvodu, prikazana tradicionalna primena pojedinih vrsta roda *Ferula*. U završnom poglavlju, dat je pregled dosadašnjih farmakoloških ispitivanja predstavnika ovog roda.

Cilj doktorske disertacije je jasno definisan i predstavlja farmakognozijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*, koje će obuhvatiti njihovu hemijsku i farmakološku karakterizaciju. Hemijska analiza podzemnih organa ove vrste ima za cilj izolovanje i strukturnu karakterizaciju sekundarnih metabolita od značaja za medicinu i farmaciju. Dalji cilj je određivanje sadržaja najzastupljenijih sekundarnih metabolita u hloroformskom i metanolnom ekstraktu, kao i uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja podzemnih organa ove vrste prikupljenih na različitim lokalitetima u Republici Srbiji. Farmakološka karakterizacija obuhvata analizu antioksidantnog, spazmolitičkog, antiinflamatornog, gastroprotektivnog, antimikrobnog i citotoksičnog delovanja izolata podzemnih organa (etarskih ulja, ekstrakata i/ili izolovanih sekundarnih metabolita). Ova biljna vrsta do sada nije ispitivana u pogledu hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su podaci o uzorcima ispitivanog biljnog materijala (vreme i mesto sakupljanja podzemnih organa). Dat je pregled aparature i instrumentalnih metoda koje su korišćene u određivanju strukture izolovanih jedinjenja: HR-MS spektrometrija i jednodimenzionalna (^1H i ^{13}C) i dvodimenzionalna (gHMBC, COSY) NMR spektroskopija, kao i aparata korišćenih u ispitivanju farmakološke aktivnosti. Opisani su postupak izolovanja etarskih ulja u aparaturi po *Clevenger*-u i uslovi GC-FID i GC-MS analize izolovanih etarskih ulja. Prikazan je način izrade suvih hloroformskih i metanolnih ekstrakata, i dati su prinosi ekstrakcije. Opisani su postupci hromatografskih razdvajanja i izolovanja jedinjenja iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*, kombinovanjem hromatografije na koloni silikagela i semipreparativne HPLC hromatografije. Nakon toga, prikazani su uslovi HPLC analize hloroformskog i metanolnog ekstrakta, tj. kvalitativna i kvantitativna analiza najzastupljenijih sekundarnih metabolita. Nakon toga naveden je i postupak spektrofotometrijskog određivanja sadržaja ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu.

Antioksidantna aktivnost metanolnog i hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivana je *in vitro*, različitim testovima. Ukupna antioksidantna aktivnost ispitana je FRAP testom, dok je antiradikalska aktivnost ispitana na osnovu sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala i sposobnosti neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Antiradikalska aktivnost etarskih ulja ispitivana je takođe *in vitro* na osnovu sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. Spazmolitička aktivnost izolata (etarskog ulja, ekstrakata i izolovanih metabolita) ispitivana je, takođe *in vitro*, na izolovanom ileumu pacova primenom tri eksperimentalna modela: ispitivanjem uticaja izolata na spontane kontrakcije ileuma, kao i ispitivanjem uticaja na kontrakcije izazvane acetilholinom i kalijum-hloridom. Ispitivana je, takođe, i relaksantna aktivnost hloroformskog ekstrakta na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane kalijum-hloridom. Za procenu antiinflamatornog delovanja hloroformskog i metanolnog ekstrakta korišćen je *in vivo* model karageninom izazvanog edema šapica pacova. Antiinflamatorna aktivnost utvrđena je merenjem razlike u masi šapica tretiranih i netretiranih životinja, kao i analizom histoloških preparata šapica. Gastroprotektivni potencijal ekstrakata ispitivan je *in vivo* u eksperimentalnom modelu akutnog stres-ulkusa indukovano oralnom primenom apsolutnog etanola u pacova. Efekat ekstrakata procenjivan je makroskopskom analizom (uz pomoć lupe) sluzokože želudaca tretiranih i netretiranih životinja. Antimikrobna aktivnost izolata (etarskih ulja, ekstrakata i/ili izolovanih metabolita i hlorogenske kiseline), ispitana je *in vitro* bujon mikrodilucionim testom prema standardnim sojevima šest Gram (+)

bakterija (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *M. flavus*, *Bacillus subtilis* i *Enterococcus faecalis*), tri Gram (-) bakterije (*Escherichia coli*, dva soja *Klebsiella pneumoniae* i *Pseudomonas aeruginosa*) i tri soja kvasnice *Candida albicans* i upoređivana sa aktivnošću referentnih supstanci (ampicilin, amikacin, ciprofloksacin, streptomycin, nistatin i/ili amfotericin). Citotoksična aktivnost hloroformskog i metanolnog ekstrakta i jedinjenja izolovanih iz hloroformskog ekstrakta određivana je kolorimetrijski, *in vitro*, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliumbromid) testom prema tri ćelijske linije humanih karcinoma: imortalizovane linije dobijene od ćelija karcinoma grlića materice (HeLa), karcinoma dojke (MCF7) i mijeloidne leukemije (K562). Istim testom, u cilju procene selektivnosti citotoksičnog delovanja testiranih metabolita, ispitivan je i efekat prema ćelijskim linijama humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5).

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije prikazani su i diskutovani u poglavlju **Rezultati i diskusija** na 86 stranica teksta, kroz 17 tabela i 43 slike. Ovo poglavlje dopunjeno je Prilozima sa 32 slike. Kandidat je svoje rezultate detaljno uporedio sa odgovarajućim rezultatima drugih autora.

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

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (277) citiranih stilom američke asocijacije psihologa (APA).

2. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru doktorske disertacije izvršena je analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakoloških aktivnosti izolata podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii*: etarskih ulja, hloroformskog i metanolnog ekstrakta, i/ili izolovanih metabolita i hlorogenske kiseline.

Etarska ulja podzemnih organa *F. heuffelii* izolovana su iz uzoraka prikupljenih na tri različita lokaliteta u Republici Srbiji. Ulja su izolovana metodom destilacije vodenom parom i hemijski okarakterisana metodama GC-FID i GC-MS. Etarsko ulje izolovano iz podzemnih organa prikupljenih u Sićevačkoj klisuri (F1), bilo je bogato seskviterpenskimi ugljovodonicima i fenilpropanskim jedinjenjima, a glavni sastojak bio je elemicin (12,5%). Etarsko ulje izolovano iz podzemnih organa prikupljenih u Đerdapskoj klisuri (F2) karakterisao je visok sadržaj fenilpropanskih jedinjenja, od kojih su najzastupljeniji bili elemicin (35,4%) i miristicin (20,6%). Etarsko ulje izolovano iz podzemnih organa sakupljenih u klisuri Peka (F3) bilo je takođe bogato fenilpropanima, pri čemu su elemicin (16,8%) i miristicin (12,9%) bili najzastupljenije komponente. Na osnovu uporedne hemijske analize sastava ovih etarskih ulja konstatovano je da su razlike između njih pre svega kvantitativne prirode. U sva tri analizirana etarska ulja, elemicin je predstavljao najzastupljeniju komponentu.

Iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, kombinovanjem odgovarajućih hromatografskih tehnika za razdvajanje i izolovanje sekundarnih metabolita (hromatografija na koloni silikagela i semipreparativna HPLC) i instrumentalnih metoda za određivanje njihove strukture (jedno- i dvodimenzionalna NMR spektroskopija i HR-MS ESI⁺ spektrometrija), izolovano je i okarakterisano deset jedinjenja: dva fenilpropana [latifolon (**1**) i elemicin (**2**)], dva seskviterpena prenil-benzoil tipa (6*E*)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on (**3**) i džamiron (**4**)], dva seskviterpena prenil-

benzoilfuranonskog tipa ($3S^*,4R^*,5R^*$)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[($3E,7E$)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahidro-4,5-dimetilfuran-2-on (**5**) i fukanedon B (**8**), dva seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa ($2S^*,3R^*$)-2-[($3E$)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**) i bajgen C (**9**), jedan seskviterpen prenil-dihidrofurohromonskog tipa ($2S^*,3R^*$)-2-[($3E$)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon (**10**) i jedan seskviterpenski umbeliferil etar [samarkandin acetat (**7**)]. Metodom eksternog standarda, u frakciji hloroformskog ekstrakta rastvorljivoj u metanolu, određen je sadržaj četiri izolovana metabolita: latifolona (**1**), ($6E$)-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-ona (**3**), džamirona (**4**) i ($2S^*,3R^*$)-2-[($3E$)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (**6**). Kao standardne supstance korišćena su prethodno izolovana jedinjenja, a nakon toga je preračunat njihov sadržaj u sirovom hloroformskom ekstraktu.

HPLC analizom u metanolnom ekstraktu identifikovana su četiri jedinjenja: latifolon (**1**), ($2S^*,3R^*$)-2-[($3E$)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**), hlorogenska kiselina (**11**) i 3,5-dikafeoilhina kiselina (**12**). Zatim su metodom eksternog standarda u metanolnom ekstraktu kvantifikovana jedinjenja **1**, **6** i **11**. Sadržaj ukupnih polifenola, određen u reakciji sa *Folin-Ciocalteu* reagensom, iznosio je 0,112 mg ekvivalenata galne kiseline/mg suvog metanolnog ekstrakta.

Ukupni antioksidantni potencijal ekstrakata ispitivan je FRAP testom, dok je antiradikalna aktivnost ispitivana testovima neutralizacije $\cdot\text{OH}$ i DPPH radikala. Ukupna antioksidantna aktivnost metanolnog i hloroformskog ekstrakta iznosila je 0,98 i 0,13 $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg suvog ekstrakta, redom. Metanolni ekstrakt je, takođe, ostvario umeren antiradikalni efekat prema DPPH radikal (SC₅₀ vrednost iznosila je 62,5 $\mu\text{g/ml}$). Hloroformski ekstrakt je ostvario slabu anti-DPPH aktivnost (SC₅₀=145,5 $\mu\text{g/ml}$). Metanolni ekstrakt je u opsegu koncentracija od 5-20 $\mu\text{g/ml}$ ostvario koncentraciono-zavisani efekat neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala, ostvarivši u koncentraciji od 20 $\mu\text{g/ml}$ 49,54±3,16% inhibicije. U koncentracijama većim od 20 $\mu\text{g/ml}$, uočeno je da dolazi do smanjenja ove antiradikalne aktivnosti što je objašnjeno prisustvom supstanci sa pro-oksidantnom aktivnošću. Hloroformski ekstrakt u testiranom opsegu koncentracija (3,75-100,00 $\mu\text{g/ml}$) nije neutralisao $\cdot\text{OH}$ radikal. Sposobnost neutralizacije DPPH radikala ispitivana je i za etarska ulja i sva tri uzorka su pokazala zadovoljavajuću antiradikalnu aktivnost, pri čemu se SC₅₀ vrednost nalazila u opsegu koncentracija od 22,43-47,75 $\mu\text{l/ml}$.

Spazmolitička aktivnost izolata (etarskog ulja, ekstrakata, kao i metabolita **1**, **4**, **6** i **11**), ispitivana je *in vitro* na izolovanom ileumu pacova u tri eksperimentalna modela: prema spontanom kontrakcijama, i kontrakcijama izazvanim acetilholinom (ACh) i kalijum-hloridom (KCl). Etarsko ulje, izolovano iz podzemnih organa poreklom iz Đerdapske klisure, ostvarilo je značajno i koncentraciono-zavisno spazmolitičko delovanje u sva tri modela. Etarsko ulje je koncentraciono-zavisno relaksiralo spontanu kontraktilnost izolovanog ileuma i u koncentraciji od 375 $\mu\text{g/ml}$ ostvarilo 92,91±19,45% efekta koji je ostvario atropin (14,44 $\mu\text{g/ml}$). Ovo ulje je u opsegu koncentracija od 15–75 $\mu\text{g/ml}$ ostvarilo jak efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh. Naime, u koncentraciji od 75 $\mu\text{g/ml}$, efekat ulja je bio takav da gotovo da nije došlo do koncentracijski zavisnog spazmogenog efekta nakon dodavanja rastućih koncentracija ACh, a maksimalni efekat ACh je smanjen na 12,75±12,66%. Ulje je u koncentracijskom opsegu od 25–250 $\mu\text{g/ml}$ takođe koncentraciono-zavisno inhibiralo efekat 80 mM KCl, a u koncentraciji od 250 $\mu\text{g/ml}$ efekat KCl je bio gotovo u potpunosti poništen (10,01±23,35%). Hloroformski ekstrakt je prema spontanom kontrakcijama ostvario koncentraciono-zavisni spazmolitički efekat i u koncentraciji od 300 $\mu\text{g/ml}$ ostvario 109,19±28,26% efekta atropina. Spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh je, u poređenju sa etarskim uljem, bio nešto manjeg intenziteta. Ekstrakt je u koncentraciji od

100 µg/ml smanjio efekte ACh i na kraju doveo do smanjenja njegovog maksimalnog efekta na $48,53 \pm 16,68\%$. Spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl bio je sličan efektu koji je ostvarilo etarsko ulje. U koncentraciji od 300 µg/ml, ekstrakt je doveo do smanjenja efekta KCl na $13,19 \pm 26,79\%$. Ovaj ekstrakt je koncentraciono-zavisno relaksirao i kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane KCl (80 mM) i u koncentraciji od 1,3 mg/ml potpuno poništio efekat KCl. Metanolni ekstrakt je, generalno, ostvario jače spazmolitičko delovanje od hloroformskog ekstrakta. U koncentraciji od 100 µg/ml, ekstrakt je ostvario jači efekat ($124,57 \pm 21,39\%$) od efekta atropina (6,4 µM) sa kojim je upoređivan. Ovaj ekstrakt je takođe, koncentraciji od 120 µg/ml snažno, značajno i koncentraciono-zavisno inhibirao kontrakcije ileuma izazvane ACh i doveo do smanjenja maksimalnog efekta na $26,35 \pm 23,69\%$. Aktivnost ovog ekstrakta prema kontrakcijama izazvanim KCl testirana je u opsegu koncentracija od 10–60 µg/ml, i u koncentraciji od 60 µg/ml ekstrakt je doveo do smanjenja efekta KCl na $44,42 \pm 11,26\%$. Testirana jedinjenja **1** (1–6 µg/ml), **6** (1–10 µg/ml) i **11** (1–10 µg/ml) ostvarila su relaksantni efekat prema spontanim kontrakcijama ileuma. Jedinjenja **1** (28,8 µM) i **11** (28,2 µM) su u gotovo identičnim koncentracijama ostvarila uporediv spazmolitički efekat, koji je iznosio $93,20 \pm 26,57\%$ (za jedinjenje **1**) i $95,95 \pm 31,90\%$ (za jedinjenje **11**) efekta atropina (6,4 µM). Jedinjenje **6** je ostvarilo nešto slabiji efekat i u koncentraciji od 26,2 µM ostvarilo efekat od $46,13 \pm 21,50\%$ efekta atropina. Efekat jedinjenja **4** testiran je samo u koncentraciji od 22,5 µM i iznosio je $37,03 \pm 21,86\%$ efekta atropina. Testirana jedinjenja ostvarila su relaksantni efekat i prema kontrakcijama izazvanim ACh. Jedinjenje **1** testirano je u dvema koncentracijama (9,6 i 19,2 µM) i pokazalo spazmolitički efekat samo u nižoj koncentraciji, koji je ujedno bio izraženiji prema nižim koncentracijama ACh. Našto jači efekat ostvarilo je jedinjenje **4** koje je u koncentraciji od 22,5 µM dovelo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na $68,09 \pm 11,50\%$. Od svih testiranih metabolita, najjači efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh ostvarilo je jedinjenje **6**. Ovo jedinjenje (20,9 µM) ostvarilo je ujednačeno delovanje prema svim primenjenim koncentracijama ACh i dovelo do smanjenja maksimalnog efekta na $52,91 \pm 17,75\%$. Aktivnost jedinjenja **11** takođe je ispitivana u dve koncentracije: 22,5 i 45 µM. U nižoj primenjenoj koncentraciji ovo jedinjenje je ostvarilo relaksantni efekat prema nižim, ali ne i prema višim koncentracijama ACh, dok je u većoj koncentraciji efekat ostvaren prema svim koncentracijama ACh, a maksimalni efekat ACh je redukovan na $68,22 \pm 11,35\%$. Ipak, uzevši u obzir visoku koncentraciju ovog jedinjenja, može se zaključiti da jedinjenje **11** ostvaruje slab spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh. Atropin, koji je i u ovom modelu korišćen kao referentna supstanca, ostvario je višestruko jači efekat od svih testiranih metabolita i u koncentraciji od 0,14 µM doveo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na $17,38 \pm 1,62\%$. Od svih testiranih metabolita, samo su jedinjenja **1** i **6** ostvarila snažan, statistički značajan i međusobno uporediv relaksantni efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl. Jedinjenje **1** je u koncentraciji od 28,8 µM dovelo do smanjenja efekta KCl na $43,53 \pm 7,78\%$, dok je jedinjenje **6** u koncentraciji od 26,2 µM dovelo do smanjenja efekta na $45,11 \pm 14,10\%$. Jedinjenja **4** (16,88 µM) i **11** (28,2 µM) dovela su do smanjenja efekta KCl na $81,14 \pm 4,56$ i $61,73 \pm 26,78\%$, redom. Kao i u prethodnom eksperimentu, testirana jedinjenja ostvarila su višestruko slabije delovanje u poređenju sa referentnim lekom. U ovom eksperimentalnom modelu u ove svrhe korišćen je alverin koji je u koncentraciji od 8,4 µM poništio efekat KCl ($1,75 \pm 2,96\%$). Efekti testiranih izolata u svim eksperimentalnim modelima bili su reverzibilni i gubili su se nakon ispiranja preparata ileuma *Tyrod*-ovim rastvorom.

Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata ispitivana je *in vivo* u modelu karageninom izazvanog edema šapica pacova, kao i analizom histoloških preparata šapica pacova. Oba ekstrakta ostvarila su dozno-zavisno i statistički značajan antiedematozni efekat. Primenjen u dozi od 50 mg/kg *p.o.* metanolni ekstrakt je ostvario efekat ($77,28 \pm 23,72\%$) uporediv sa efektom indometacina (8 mg/kg *p.o.*), koji korišćen kao referentni lek ($76,00 \pm 19,32\%$), dok je

u dozi od 100 mg/kg ovaj ekstrakt ostvario efekat ($84,00 \pm 22,03\%$) jači od efekta indometacina. Hloroformski ekstrakt je ostvario nešto slabiji efekat u poređenju sa metanolnim. Primenjen u dozama od 50 i 100 mg/kg, ekstrakt je ostvario sličan efekat ($62,78 \pm 13,42\%$ i $64,71 \pm 17,98\%$, redom). Analizom histoloških preparata šapica pacova u kontrolnoj grupi uočeno je prisustvo izražene inflamacije koja se karakteriše prisustvom edema i ćelijskih infiltrata, dok navedene inflamatorne promene nisu detektovane u grupi koja je tretirana metanolnim ekstraktom u dozi 100 mg/kg, što je u skladu sa rezultatima dobijenim prilikom ispitivanja antiedematozne aktivnosti.

Gastroprotektivna aktivnost hloroformskog i metanolnog ekstrakta ispitivana je *in vivo* u modelu akutnog ulkusa pacova indukovanog oralnom primenom apsolutnog etanola (akutni stres-ulkus). Hloroformski ekstrakt ostvario je jak i statistički značajan efekat, pri čemu je već u dozi od 25 mg/kg *p.o.* ispoljio efekat uporediv sa efektom ranitidina (20 mg/kg *p.o.*), koji je korišćen kao referentni lek. Efekta metanolnog ekstrakta bio je nešto slabiji, tj. ovaj ekstrakt je tek u dozi od 100 mg/kg *p.o.* ostvario protektivni efekat uporediv sa efektom ranitidina.

Antimikrobna aktivnost izolata podzemnih organa *F. heuffelii* (etarskih ulja, ekstrakata i metabolita **1**, **3**, **4**, **6** i **11**), ispitivana je *in vitro*, bujon mikrodilucionim metodom, prema standardnim sojevima šest Gram (+) i tri Gram (-) bakterije, kao i tri soja kvasnice *Candida albicans*, a rezultati su izražavani kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Najsnažniju antimikrobnu aktivnost etarska ulja ostvarila su prema Gram (+) bakterijama *Staphylococcus epidermidis* (MIK=10,2-25,0 $\mu\text{g/ml}$), *Micrococcus flavus* (MIK=6,8-28,2 $\mu\text{g/ml}$) i *M. luteus* (MIK=10,2-13,7 $\mu\text{g/ml}$), dok je efekat prema Gram (-) bakterijama bio generalno slabiji. Sva tri etarska ulja ostvarila su naročito jako antifungalno delovanje inhibirajući rast tri soja kandidate u opsegu koncentracija od 6,2-13,7 $\mu\text{g/ml}$. Hloroformski i metanolni ekstrakt ostvarili su umereno antimikrobno delovanje, a najjači efekat oba ekstrakta ostvarila su prema bakterijama *S. aureus* (MIK=12,5 $\mu\text{g/ml}$) i *M. luteus* (MIK=50,0 $\mu\text{g/ml}$ i 12,5 $\mu\text{g/ml}$, redom). Od svih testiranih metabolita, samo su jedinjenja **3**, **4** i **6** ostvarila značajno antimikrobno delovanje. Jedinjenja **6** i **3** snažno su inhibirala rast bakterija *M. luteus* (MIK=2 $\mu\text{g/ml}$ i 4 $\mu\text{g/ml}$, redom), i *S. epidermidis* (MIK=4 $\mu\text{g/ml}$ i 8 $\mu\text{g/ml}$, redom). Jedinjenja **3** i **4** ostvarila su jak antimikrobni efekat i prema bakteriji *B. subtilis* (MIK=4 $\mu\text{g/ml}$ i 8 $\mu\text{g/ml}$, redom). Jedinjenja **1** i **11** nisu pokazala antimikrobno delovanje u testiranom opsegu koncentracija (2-64 $\mu\text{g/ml}$).

Izolati podzemnih organa *F. heuffelii* (ekstrakti i metaboliti **1**, **3**, **4**, **6**, **8** i **9**), testirani su u pogledu citotoksične aktivnosti prema tri ćelijske linije kancera: karcinoma grlića materice (HeLa), karcinoma dojke (MCF7) i mijeloidne leukemije (K562), dok je selektivnost citotoksične aktivnosti metabolita ispitana prema liniji humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5). Ovo ispitivanje sprovedeno je *in vitro* MTT testom. Ekstrakti su ispitivani u opsegu koncentracija od 12,5-200,0 $\mu\text{g/ml}$ i pokazali su snažno citotoksično delovanje. Hloroformski ekstrakt je ostvario višestruko snažnije delovanje od metanolnog, pri čemu su IC_{50} vrednosti prema svim ćelijskim linijama kancera bile niže od 11 $\mu\text{g/ml}$. Najjaču citotoksičnu aktivnost ovaj ekstrakt ostvario je prema MCF7 ćelijskoj liniji ($\text{IC}_{50}=6,09 \pm 0,52$ $\mu\text{g/ml}$). Metanolni ekstrakt je ostvario slabije delovanje prema svim ćelijskim linijama kancera, a najjače delovanje ispoljio je, takođe, prema liniji MCF7 ($\text{IC}_{50}=47,57 \pm 1,49$ $\mu\text{g/ml}$). Svi metaboliti ostvarili su uglavnom snažno delovanje prema testiranim ćelijskim linijama kancera. Najjači efekat ostvarili su prema liniji K562 i njihove IC_{50} vrednosti varirale su od $8,01 \pm 0,77$ μM (za jedinjenje **3**), do $10,56 \pm 1,19$ μM (za jedinjenje **9**). Cisplatin, koji je korišćen kao referentni lek, ostvario je nešto jaču aktivnost od testiranih metabolita ($\text{IC}_{50}=5,54 \pm 1,03$ μM). Prema HeLa ćelijskoj liniji svi metaboliti, osim jedinjenja **1** ($\text{IC}_{50}=86,81 \pm 1,21$ μM), ispoljili su snažnu citotoksičnu aktivnost, pri čemu je među njima najsnažniji efekat ostvarilo jedinjenje **6** ($\text{IC}_{50}=6,54 \pm 0,07$ μM), a najslabiji jedinjenje **9** ($\text{IC}_{50}=14,42 \pm 0,39$). Cisplatin je prema ovoj

liniji ostvario oko tri puta jače delovanje u odnosu na najaktivniji metabolit ($IC_{50}=2,1\pm 0,2 \mu M$). Testirana jedinjenja ostvarila su najslabiju aktivnost prema liniji MCF7. Naime, jedinjenja **1** i **3** u testiranom opsegu koncentracija nisu dovela do 50% inhibicije rasta ove linije ($IC_{50}>200 \mu M$). Među ostalim testiranim metabolitima, najjače delovanje ostvarilo je jedinjenje **6** ($IC_{50}=22,32\pm 1,32 \mu M$) i njegov efekat bio je uporediv sa efektom cisplatina ($IC_{50}=18,67\pm 0,75 \mu M$). Važno je, međutim, naglasiti da nijedan od metabolita nije, u testiranom opsegu koncentracija, doveo do 50% inhibicije rasta normalnih humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5). Iz ovoga je izveden zaključak da, za razliku od cisplatina ($IC_{50}=41,56\pm 1,72 \mu M$ za liniju MRC-5), testirani metaboliti ostvaruju citotoksičan efekat selektivno prema ćelijskim linijama kancera.

3. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rod *Ferula* L. pripada familiji Apiaceae, i obuhvata oko 170 vrsta čiji se centar diverziteta nalazi u zapadnoj i centralnoj Aziji (Downie i sar., 2000; Drude, 1898). U Flori Evrope (Tutin, 1968) opisano je 8 predstavnika ovog roda. Pojedine vrste ovog roda koriste se u tradicionalnoj medicini naroda azijskih zemalja, a među njima se svakako može izdvojiti *F. assa-foetida* L. Zasecanjem podzemnih organa ove (ali i još nekih drugih vrsta ovog roda), dobija se oleogumirezina koja se tradicionalno upotrebljava kao antibakterijski agens, spazmolitik, diuretik, antihelmitik, karminativ, antiepileptik i laksativ, a pripisuju joj se i afrodizijačna svojstva (Iranshahy i Iranshahi, 2011). Hemijski sastav i farmakološka aktivnost su do sada detaljno ispitani za veliki broj predstavnika ovog roda, naročito u poslednjih dvadesetak godina. Sekundarni metaboliti ovog roda se ispituju još od 60-ih godina XX veka. Najzastupljeniju grupu sekundarnih metabolita u vrstama roda *Ferula* predstavljaju seskviterpenski kumarini i oni za ovaj rod imaju i veliki hemotaksonomski značaj. Do danas je iz vrsta ovog roda izolovano i identifikovano više od 130 seskviterpenskih kumarina, uglavnom seskviterpenski umbeliferil etri, seskviterpenski etri derivati izofraksidina, prenilovani 4-hidroksikumarini i seskviterpeni prenil-furokumarinskog tipa. U vrstama ovog roda često su u značajnim količinama prisutni i monoterpenski kumarini, seskviterpenski hromoni, jedinjenja sa sumporom i daukanski estri (Gliszczyńska i Brodelius, 2012, Iranshahy i Iranshahi, 2011).

Iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa vrste *F. heuffelii* izolovano je 10 jedinjenja koja pripadaju različitim grupama sekundarnih metabolita. Od fenilpropanskih derivata iz ovog ekstrakta izolovani su latifolon, prethodno izolovan iz vrsta *F. sinaica* Boiss., *F. ugamica* Korovin ex Baranov (Al-Hazimi, 1986) i *F. communis* L. (De Pasqual i sar. 1986), i elemicin, prethodno identifikovan u etarskim uljima korena *F. communis* (De Pasqual i sar., 1986), *F. persica* Willd. (Javidnia i sar., 2005, Iranshahi i sar., 2006), *F. glauca* L. (Maggi i sar., 2009) i nadzemnih delova *F. foetida* Regel (Kanani i sar., 2011). Iz ovog ekstrakta izolovana su i dva seskviterpena prenil-benzoil tipa: (6*E*)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on, prethodno izolovan iz korena vrste *F. ferulioides* (Steud.) Korovin (Kojima i sar., 1998) i džamiron, prethodno izolovan iz korena vrsta *F. ferulioides* (Kojima i sar., 1998), *F. mongolica* V. M. Vinogr. & Kamelin i *F. dshaudshamyr* Korovin (Choudhary i sar., 2001). Dva seskviterpena prenil-benzoilfuranonskog tipa (3*S**,4*R**,5*R**)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetil-nona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-on i fukanedon B, prethodno izolovana iz korena vrsta *F. ferulioides* (Kojima i Isaka, 1999) i *F. fukanensis* K. M. Shen (Motai i Kitanaka, 2005),

redom, takođe su izolovana iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike. Najzastupljeniji sekundarni metabolit izolovan iz hloroformskog ekstrakta, (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin, koji pripada klasi seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa, prethodno je izolovan iz korena vrste *F. ferulioides* (Isaka i sar., 2001). Njegov stereoizomer bajgen C, takođe izolovan iz ispitivanog ekstrakta *F. heuffelii*, prethodno je izolovan iz korena vrste *F. mongolica* (Choudhary i sar., 2001). Iz ispitivanog ekstrakta izolovani su i jedan seskviterpen prenil-dihidrofurohromonskog tipa, (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon, prethodno izolovan iz korena vrste *F. ferulaeoides* (Nagatsu i sar., 2002), kao i samarkandinacetat, seskviterpenski umbeliferil etar, prethodno izolovan iz korena vrsta *F. persica*, *F. pseudooreoselinum* Lipsky, *F. teterrima* Kar. i Kir. i *F. lipskyi* Korovin (Saidkhodzhaev i sar., 1991; Sokolova i sar., 1978; Bagirov i sar., 1977; Kir'yalov i Bukreeva, 1972).

U metanolnom ekstraktu podzemnih organa *F. heuffelii* identifikovana su 4 jedinjenja, od kojih su latifolon i (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin prethodno izolovani iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa iste vrste. Identifikovane su i dve fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska i 3,5-dikafeoilhina kiselina. Pregledom literature utvrđeno je da je hlorogenska kiselina, koja je ubikvitarno rasprostranjena u biljnom svetu, u rodu *Ferula* do sada identifikovana samo u podzemnim organima *F. plurivittata* Korovin (Berdymuradov i sar., 1972), dok 3,5-dikafeoilhina kiselina do sada nije identifikovana u predstavnicima ovog roda.

U okviru ove doktorske disertacije ispitivan je i hemijski sastav etarskih ulja podzemnih organa *F. heuffelii* prikupljenih na tri lokaliteta u Republici Srbiji. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da u testiranim etarskim uljima dominiraju fenilpropanska jedinjenja. Glavni sastojak sva tri etarska ulja bio je elemicin (12,5-35,4%), dok je i miristicin bio zastupljen u značajnim količinama (4,5-20,6%). Fenilpropani su u visokom procentu bili zastupljeni i u etarskom ulju izolovanom iz korena *F. glauca* (16,4%), a glavni sastojci u ovom ulju, slično uljima testiranim u okviru ove disertacije, bili su elemicin (9,0%) i miristicin (7,4%) (Maggi i sar., 2009). Takođe, u etarskom ulju korena *F. oopoda* Boiss. i *F. persica* Willd. var. *persica* potvrđeno je značajno prisustvo miristicina (11,2 i 8,9%, redom) (Iranshahi i sar., 2006; Al-Ja'fari i sar., 2011). Seskviterpeni su takođe predstavljali grupu jedinjenja koja je u značajnom procentu bila prisutna u ispitivanim etarskim uljima. U ulju iz korena sakupljenog u Sićevačkoj klisuri oni su predstavljali dominantnu frakciju, u kojoj su najzastupljeniji bili β-kopaen (9,5%) i β-gurjunen (7,5%). Seskviterpenski ugljovodonici su predstavljali najzastupljeniju klasu i u etarskom ulju izolovanom iz korena *F. glauca* (56,1%), a najzastupljeniji u ovom ulju bili su (*E*)-β-farnezen (10,0%), *epi*-zonaren (7,1%) i γ-kadinen (6,8%) (Maggi i sar., 2009). U etarskim uljima nekih vrsta roda *Ferula*, pored seskviterpena, fenilpropana i/ili monoterpena, uočeno je i prisustvo jedinjenja sa sumporom koja su u nekima od njih bila prisutna u značajnim količinama, zbog čega se sva etarska ulja izolovana iz vrsta roda *Ferula* mogu podeliti u dve grupe: na ona u kojima ima i na ona u kojima nema jedinjenja sa sumporom. U uljima izolovanih iz korena *F. persica* i *F. latisecta* ova jedinjenja su predstavljala najzastupljeniju grupu metabolita (28,6 i 75,5%, redom). Takođe, sadržaj ovih jedinjenja bio je visok i u uljima dobijenim destilacijom oleogumirezina *F. fukanensis*, *F. sinkiangensis* i *F. assa-foetida*. Najčešći predstavnici jedinjenja sa sumporom u etarskim uljima vrsta ovog roda bili su *sec*-butil-(*Z*)-propenil disulfid i *sec*-butil-(*E*)-propenil disulfid (Sahebkar i Iranshahi, 2011). U testiranim etarskim uljima podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* nije uočeno prisustvo jedinjenja sa sumporom.

Antioksidantna aktivnost izolata vrsta roda *Ferula* do sada je malo ispitivana, a naročito su retki podaci o antioksidantnoj aktivnosti izolata njihovih podzemnih organa. Anti-DPPH

aktivnost metanolnog ekstrakta *F. heuffelii* ($SC_{50}=62,5 \mu\text{g/ml}$) bila je jača od anti-DPPH aktivnosti vodeno-etanolnog ekstrakta korena *F. gummosa* ($SC_{50}=579,6\pm 19,4 \mu\text{g/ml}$) (Ebrahimzadeh i sar., 2011). Takođe, aktivnost ispitivanog metanolnog ekstrakta bila je jača i od aktivnosti metanolnog ekstrakta herbe *F. assa-foetida* ($SC_{50}=380\pm 12 \mu\text{g/ml}$) (Dehpour i sar., 2009), vodeno-etanolnih ekstrakata stabla ($SC_{50}=775,9\pm 26,4 \mu\text{g/ml}$), lista ($SC_{50}=192,5\pm 8,6 \mu\text{g/ml}$) i cveta ($SC_{50}=471,6\pm 19,4 \mu\text{g/ml}$) vrste *F. foetida* (Nabavi i sar., 2010), kao i vodeno-metanolnog ekstrakta herbe *F. orientalis* ($SC_{50}=99,1\pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) (Kartal i sar., 2007). Anti-DPPH aktivnost hloroformskog ekstrakta može se okarakterisati kao slaba ($SC_{50}=145,5 \mu\text{g/ml}$), ali je u poređenju sa neaktivnim heksanskim ekstraktom herbe *F. orientalis*, kao i acetonskim ($SC_{50}=310\pm 0,5 \mu\text{g/ml}$) i deodorisanim acetonskim ekstraktom herbe iste vrste ($SC_{50}=118\pm 0,8 \mu\text{g/ml}$), ekstrakt *F. heuffelii* ipak ostvario jaču aktivnost. Testirana etarska ulja *F. heuffelii* ostvarila su jaču anti-DPPH aktivnost u poređenju sa etarskim uljem herbe *F. orientalis* ($SC_{50}=423,0\pm 0,8 \mu\text{g/ml}$). Pretragom literature nisu nađeni podaci o ispitivanju sposobnosti izolata vrsta roda *Ferula* da neutrališu $\cdot\text{OH}$ radikal.

U disertaciji je testirana i spazmolitička aktivnost izolata podzemnih organa *F. heuffelii*: etarskog ulja izolovanog iz podzemnih organa poreklom iz Đerdapske klisure, hloroformskog i metanolnog ekstrakta, kao i izabranih metabolita (latifolona, džamirona, (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina i hlorogenske kiseline). Spazmolitička aktivnost izolata testirana je *in vitro* u tri eksperimentalna modela: prema spontanom kontrakcijama, kao i prema kontrakcijama izazvanim acetilholinom (ACh) i kalijum-hloridom (KCl). Etarsko ulje ostvarilo je snažan, koncentraciono-zavisan i statistički značajan spazmolitički efekat u sva tri modela. Aktivnost testiranog ulja se makar delimično može objasniti prisustvom elemicina (35,4%) i miristicina (20,6%), jer su prethodna ispitivanja pokazala da ova dva fenilpropana ostvaruju antiholinergičko delovanje (McKenna i sar., 2004), a da se spazmolitičko delovanje ploda peršuna može takođe objasniti spazmolitičkim delovanjem miristicina (Czygan i Hiller, 2002). Efekat testiranog etarskog ulja *F. heuffelii* prema kontrakcijama izazvanim ACh bio je jači od efekta ulja oleogumirezine *F. gummosa*, koje je tek u koncentraciji od 360 $\mu\text{g/ml}$ dovelo do kompletne inhibicije efekata ACh. Takođe, za razliku od ulja *F. heuffelii*, etarsko ulje *F. gummosa* u opsegu koncentracija od 10–360 $\mu\text{g/ml}$ nije ostvarilo efekat prema spontanom kontrakcijama izolovanog ileuma. Nasuprot tome, etarsko ulje *F. gummosa* je ispoljilo nešto jači efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl (80 mM) i u koncentraciji od 180 $\mu\text{g/ml}$ gotovo poništilo efekat KCl (Sadrei i sar., 2001). Etarsko ulje oleogumirezine *F. assa-foetida* takođe je snažno inhibiralo kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane KCl (80 mM) ($IC_{50}=5,8\pm 1,1 \text{ nl/ml}$), dok je efekat ovog ulja prema kontrakcijama izazvanim ACh (320 nM) i 5-HT (1,28 μM) bio nešto slabiji ($IC_{50}=20,1\pm 2,8$ i $14,3\pm 0,9 \text{ nl/ml}$, redom). Bitno je naglasiti da su Sadrei i sar., za razliku od modela ispitivanja uticaja izolata *F. heuffelii* prema kontrakcijama izazvanim ACh korišćenim u okviru ove disertacije, koristili model gde su kontrakcije izazvane jednom koncentracijom ACh (slično modelu ispitivanja uticaja na kontrakcije izazvane KCl) (Sadrei i sar., 2003). Etarski (0,6–2,1 $\mu\text{g/ml}$) i benzinski (0,3–10 $\mu\text{g/ml}$) ekstrakt oleogumirezine podezemnih organa *F. gummosa* su, u poređenju sa hloroformskim ekstraktom *F. heuffelii*, u nižem opsegu koncentracija inhibirali kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM) i ACh. Metanolni ekstrakt oleogumirezine iste vrste je takođe jače relaksirao kontrakcije ileuma izazvane KCl i ACh u pređenju sa metanolnim ekstraktom podzemnih organa *F. heuffelii*. Relaksantni efekat vodeno-etanolnog ekstrakta oleogumirezine *F. gummosa* prema kontrakcijama izazvanim KCl i ACh bio je uporediv sa efektom testiranog metanolnog ekstrakta *F. heuffelii* (Sadrei i sar., 2001). Vodeni ekstrakt oleogumirezine *F. assa-foetida* ostvario je relaksantni efekat prema spontanom kontrakcijama, kao i prema kontrakcijama izazvanim ACh, histaminom i KCl. Ovi efekti su ostvareni u značajno višim testiranim koncentracijama (1–7 mg/ml) u poređenju sa izolatima

F. heuffelii, ali je važno napomenuti da su korišćeni drugačiji eksperimentalni modeli, kao i da je ispitivanje izvedeno na izolovanom ileumu zamoraca (Fatehi i sar., 2004).

Ekstrakti podzemnih organa *F. heuffelii* pokazali su snažno, dozno-zavisno i statistički značajno antiinflamatorno delovanje. Rezultati prethodnih ispitivanja pokazuju da hlorogenska kiselina, jedinjenje prisutno u ispitivanom metanolnom ekstraktu, ostvaruje antiinflamatornu aktivnost inhibicijom produkcije azot-monoksida (NO), ekspresije ciklooksigenaze 2 (COX-2) i inducibilne NO-sintaze (iNOS), da inhibira biosintezu proinflamatornih citokina (IL-1 β , TNF- α i IL-6) u monocitima tretiranim LPS, kao i da inhibira translokaciju transkripcionog faktora NF- κ B u jedro (Shi i sar., 2013; Hwang, Kim, Park, Lee i Kim, 2013). Druga fenolkarboksilna kiselina identifikovana u metanolnom ekstraktu, 3,5-dikafeoilhina kiselina, takođe deluje antiinflamatorno, i to tako što inhibira produkciju PGE₂. Izolati koji su sadržali smešu 3,5- and 3,4-dikafeoilhina kiselina dovodili su takođe do supresije COX-2/PGE₂ i iNOS/NO puteva (dos Santos i sar., 2010; Puangpraphant i sar., 2011). Seskviterpenski kumarini (fukanefuomarini E, F, G, H, I, J, K i L), strukturno slični jedinjenjima **6** i **9**, ostvarili su takođe antiinflamatornu aktivnost *in vitro* inhibirajući produkciju NO (Nazari i Iranshahi, 2011). Jedinjenje **10**, izolovano iz podzemnih organa *F. heuffelii*, inhibiralo je produkciju NO stimulisanu LPS/IFN- γ , ali ne i ekspresiju iNOS. Jedinjenja **3** i **4**, izolovana iz podzemnih organa *F. heuffelii*, inhibirala su produkciju NO, kao i ekspresiju iNOS u RAW264.7 ćelijskoj liniji, stimulisanu LPS/IFN- γ , dok jedinjenja **6** i **8**, u koncentracijama od 10 i 30 μ g/ml, redom, nisu inhibirala produkciju NO (Motai i Kitanaka, 2004, 2005 i 2006).

U disertaciji je ispitivana i gastroprotektivna aktivnost hloroformskog i metanolnog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*. Prethodno je pokazano da koloidni rastvor asafetide u dozi od 50 mg/kg *p.o.*, ostvaruje gastroprotektivni efekat u nekoliko različitih eksperimentalnih modela (Iranshahy i Iranshahi, 2011). Hloroformski, etilacetatni, *n*-butanolni ekstrakt oleogumirezine *F. sinkiangensis*, kao i ostatak nakon ekstrakcije ove oleogumirezine vodom, odnosno destilacije vodenom parom, ostvarili su gastroprotektivno delovanje u modelu indometacinom (3 mg/kg, *s.c.*) izazvanog ulcera u pacova. U dozi od 1,3515 g/kg hloroformski i etilacetatni ekstrakt ostvarili su efekat uporediv sa efektom referentnog leka famotidina (0,003 g/kg), dok je efekat butanolnog ekstrakta bio nešto slabiji (Teng i sar., 2013). Iako je ulkus izazvan drugim agensom i upređivan sa drugim kontrolnim lekom, može se zaključiti da su testirani ekstrakti *F. heuffelii* u nižim koncentracijama ostvarili gastroprotektivni efekat uporediv sa referentnim lekom.

Etarska ulja, ekstrakti i tri izolovana metabolita podzemnih organa *F. heuffelii* pokazala su antimikrobno delovanje *in vitro*. Prethodna ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskog ulja asafetide su pokazala da uzorci prikupljeni u junu i julu u Iranu pokazuju značajnu antimikrobnu aktivnost. Uzorak prikupljen u julu (MIK=15-65 μ g/ml) je jače inhibirao rast *E. coli* od ulja *F. heuffelii* F2 i F3, ali slabije od ulja F1. Inhibicija rasta *S. aureus* (MIK=65,0 \pm 9,3 μ g/ml) bila je jača od inhibicije koju su ostvarila sva tri etarska ulja *F. heuffelii*. Aktivnost prema soju *B. subtilis* bila je uporediva sa aktivnošću uzoraka F2 i F3, dok je antifungalna aktivnost prema kvasnici *C. albicans* (MIK=18 \pm 28 μ g/ml) bila slabija od aktivnosti sva tri etarska ulja *F. heuffelii*. Etarsko ulje asafetide inhibiralo je rast i *Salmonella typhi* (MIK=58 \pm 7,1 μ g/ml) i *Aspergillus niger* (MIK=22 \pm 3,9 μ g/ml), bakterija na čiji rast nije ispitivan uticaj etarskih ulja *F. heuffelii* (Kavoosi i Rowshan, 2013). Ispitivana etarska ulja F1, F2 i F3 pokazala su jaču aktivnost prema bakterijama *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli* i kvasnici *C. albicans* od etarskog ulja korena *F. glauca*, čije su se MIK vrednosti kretale od 78 μ g/ml (za *B. subtilis*) do 1250 μ g/ml (za *S. aureus* i *C. albicans*) (Maggi i sar., 2009). Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja oleogumirezine *F. gummosa* pokazalo je da ono snažno inhibira rast Gram (+) bakterija *S. aureus* i *Lysteria monocytogenes* (MIK=1,56

μl/ml) (Abedi i sar., 2008). Do sada je pokazano da brojni sekundarni metaboliti *F. heuffelii* pokazuju izrazito antimikrobno delovanje. Daukanski estar, 14-(*o*-hidroksicinamoiloksi)-dauka-4,8-dien, i seskviterpenski kumarin ferulenol, ostvarili su prema sojevima *S. aureus*, *B. subtilis*, *Streptococcus durans* i *E. faecalis* jaku inhibitornu aktivnost (MIK=6,83 μM i 1,72 μM). Antimikrobna aktivnost ovih jedinjenja prema *S. aureus*, *B. subtilis* i *E. faecalis* bila je jača od svih metabolita *F. heuffelii* testiranih u okviru ove disertacije (Al-Yahya i sar., 1998). Feruzinol i diastereoizomer samarkandina ostvarili su prema Gram (+) bakterijama (*B. cereus* i *S. aureus*) snažan inhibitorni efekat. Feruzinol je takođe ostvario snažan efekat i prema Gram (-) bakterijama (*Serratia* sp., *Pseudomonas* sp. i *E. coli*) (Gliszczynska i Brodelius, 2012). Galbanična kiselina potencira antimikrobnu aktivnost penicilina G i cefaleksina prema *S. aureus*, a istovremena primena ovog seskviterpenskog kumarina sa antibioticima dovodi do smanjenja njihovih MIK vrednosti prema meticilin-, tetraciklin- i ciprofloksacin-rezistentnom soju *S. aureus* (Nazari i Iranshahi, 2011).

Ekstrakti i izabrani sekundarni metaboliti podzemnih organa *F. heuffelii* testirani su i u pogledu citotoksične aktivnosti. Prethodna ispitivanja citotoksičnog potencijala različitih ekstrakata nadzemnih delova vrsta *F. persica* var. *persica* i *F. hezarlalehzarica* Ajani, pokazala su da samo heksanski i hloroformski ekstrakt ostvaruju citotoksičan efekat prema ćelijskim linijama kancera jetre (HepG2), dojke (MCF-7), kolona (HT29) i pluća (A549). Međutim, aktivnost ovih ekstrakata prema liniji MCF-7, koja je korišćena i u ispitivanjima u okviru ove disertacije, bila je slabija od metanolnog ekstrakta i višestruko slabija od hloroformskog ekstrakta *F. heuffelii* (Hajimehdipoor i sar., 2012). Seskviterpenski kumarin ferulenol ostvario je snažno citotoksično delovanje prema različitim ćelijskim linijama kancera (MCF-7, SKOV-3, HL-60). Prema liniji MCF7, ovaj kumarin je ostvario delovanje u nanomolarnim koncentracijama, pa se može zaključiti da je njegova aktivnost bila višestruko veća u poređenju sa metabolitima *F. heuffelii* testiranim u okviru ove disertacije (Bocca i sar., 2002). Veoma snažan citotoksični efekat (snažniji od testiranih metabolita *F. heuffelii*), prema ovoj ćelijskoj liniji ostvario je i biciklični seskviterpenski kumarin konferol (IC₅₀=3,4 μg/ml, odnosno 8,9 μM), koji je strukturno sličan samarkandinacetatu prisutnom u vrsti *F. heuffelii* (čija aktivnost nije testirana u okviru ove disertacije). Konferol je ostvario snažno citotoksično delovanje i prema dve linije hepatocelularnog karcinoma (HepG2 i Hep3B). Ispitivanje citotoksične aktivnosti različitih sekundarnih metabolita prisutnih u vrstama roda *Ferula* (umbeliprenina, 7-izopenteniloksikumarina, herniarina, stilozina, čimgina, galbanične kiseline, farneziferola A, diverzina, konferona, akantrifozida E i mogoltadona) na ćelijske linije karcinoma ovarijuma (CH1), pluća (A549) i melanoma (SK-MEL-28) koje su 2013. god. sprovedli Valiahdi i saradnici, pokazalo je da ova jedinjenja ostvaruju osrednji citotoksični efekat i autori smatraju da bi ih možda trebalo posmatrati pre svega kao hemopreventivne agenase, odnosno hemosenzitizere (Valiahdi i sar., 2013).

Literatura

- Abedi, D., Jalali, M., Asghari, G., & Sadeghi, N. (2008). Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gumosa* Boiss. essential oil using Alamar Blue™. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 41-45.
- Al-Hazimi, H. M. G. (1986). Terpenoids and a coumarin from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, 25(10), 2417-2419.
- Al-Ja'Fari, A., Vila, R., Freixa, B., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., & Cañigüeral, S. (2011). Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry*, 72(11-12), 1406-1413.
- Al-Yahya, M. A., Muhammad, I., Mirza, H. H., & El-Ferally, F. S. (1998). Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Research*, 12(5), 335-339.
- Bagirov, V. Y., Gasanova, R. Y., Burma, O. I., & Ban'kovskii, A. I. (1977). Coumarins of *Ferula szovitsiana* and *F. persica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 13(2), 240-241.
- Berdymuradov, A., Karryev, M. O., & Prokopenko, A. P. (1972). New glycoside, plurivittaside, extracted from *Ferula plurivittata*. *Izvestiya Akademii Nauk Turkmenkoi SSR, Seriya Biologicheskikh Nauk*, 4, 83-87.
- Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F., & Miglietta, A. (2002). Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta Medica*, 68(12), 1135-1137.
- Cannon, J. F. M. (1968). *Ferula* L. U: Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine D. H., Walters, S. M., & Webb D. A. (Urednici), *Flora Europea* 2 (pp. 358-359). Cambridge University Press, Cambridge.
- Choudhary, M. I., Baig, I., Nur-e-Alam, M., Shahzad-ul-Hussan, S., Öndognii, P., Bunderya, M., Oyun, Z., & Rahman, A. (2001). New α -glucosidase inhibitors from the mongolian medicinal plant *Ferula mongolica*. *Helvetica Chimica Acta*, 84(8), 2409-2416.
- Czygan F. C., & Hiller K. (2002). *Petroselinii radix*. In M. Wichtl (Ed.): *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage (4. Auflage)* (pp. 445-447). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- De Pasqual Teresa, J., Sanchez, M. R., Reviejo, C., Hernandez, J. M., & Grande, M. (1986). Chemical components from the roots of *Ferula communis* L. *Anales de Química, Serie C: Química Organica y Bioquímica* 82(2), 89-91.
- Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S., & Mohamad, N. S. (2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites*, 60(4), 405-412.
- dos Santos, M. D., Chen, G., Almeida, M. C., Soares, D. M., De Souza, G. E. P., Lopes, N. P., & Lantz, R. C. (2010). Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro inflammatory mediator production. *Natural Product Communications*, 5(5), 733-740.
- Downie, S. R., Watson, M. F., Spalik, K., & Katz-Downie, D. S. (2000). Molecular systematics of Old World 2. Apioideae (Apiaceae): relationships among some members of tribe Peucedaneae sensu lato, the placement of several island-endemic species, and resolution within the apioid superclade. *Canadian Journal of Botany* 78, 506-528.
- Drude, O. (1898). *Ferula* L. In A., Engler (Ed.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 3(8) (pp. 228-232). Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., & Dehpour, A. A. (2011). Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(6), 658-664.
- Fatehi, M., Farifteh, F., & Fatehi-Hassanabad, Z. (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(2-3), 321-324.
- Gliszczynska, A., & Brodelius, P. E. (2012). Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 77-96.
- Hajimehdipoor, H., Esmaeili, S., Ramezani, A., Anaraki, M. J., & Mosaddegh, M. (2012). The cytotoxic effects of *Ferula persica* var. *persica* and *Ferula hezarlalehzarica* against HepG2, A549, HT29, MCF7 and MDBK cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 113-117.
- Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. (2013). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, DOI 10.1007/s00011-013-0674-4.
- Iranshahi, M., Amin, G., Gholamreza, S., Mohammadhossein, S., Shafiee, A., & Hadjiakhoondi, A. (2006). Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. var. *persica*. *Flavour and Fragrance*, 21(2), 260-261.
- Iranshahi, M., & Iranshahi, M. (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin) - A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(1), 1-10.
- Isaka, K., Nagatsu, A., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., & Ogihara, Y. (2001). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(9), 1072-1076.

- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., & Edraki, N. (2005). Chemical composition of *Ferula persica* Wild. essential oil from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 605-606.
- Kanani, M. R., Rahiminejad, M. R., Sonboli, A., Mozaffarian, V., Osaloo, S. K., & Ebrahimi, S. N. (2011). Chemotaxonomic significance of the essential oils of 18 *Ferula* species (Apiaceae) from Iran. *Chemistry and Biodiversity*, 8(3), 503-517.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589.
- Kavoosi, G., & Rowshan, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, 138(4), 2180-2187.
- Kir'yalov, N. P., & Bukreeva, T. V. (1972). Coumarins from the roots of *Ferula pseudooreoselinum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(3), 395-396.
- Kojima, K., & Isaka, K. (1999). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(8), 1145-1147.
- Kojima, K., Isaka, K., Purev, O., Jargalsaikhan, G., Suran, D., Mizukami, H., & Ogihara, Y. (1998). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46(11), 1781-1784.
- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Tirillini, B., Sagratini, G., & Papa, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy). *Fitoterapia*, 80(1), 68-72.
- McKenna, A., Nordt, S. P., & Ryan, J. (2004). Acute nutmeg poisoning. *European Journal of Emergency Medicine: Official Journal of the European Society for Emergency Medicine*, 11(4), 240-241.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2004). Sesquiterpene coumarins from *Ferula fukanensis* and nitric oxide production inhibitory effects (2)1,2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(10), 1215-1218.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2005). Sesquiterpene chromones from *Ferula fukanensis* and their nitric oxide production inhibitory effects. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1732-1735.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2005). Sesquiterpene phenylpropanoids from *Ferula fukanensis* and their nitric oxide production inhibitory effects. *Journal of Natural Products*, 68(3), 365-368.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2006). Sesquiterpenoids from *Ferula fukanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 54-57.
- Nabavi, S. F., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., & Eslami, B. (2010). Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa* Boiss. *Grasas y Aceites*, 61(3), 244-250.
- Nagatsu, A., Isaka, K., Kojima, K., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., Irfan, B., Iqbal, C. M., & Ogihara, Y. (2002). New sesquiterpenes from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korovin. VI. isolation and identification of three new dihydrofuro[2,3-b]chromones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(5), 675-677.
- Nazari, Z. E., & Iranshahi, M. (2011). Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, 25(3), 315-323.
- Puangraphant, S., Berhow, M. A., Vermillion, K., Potts, G., & Gonzalez de Mejia, E. (2011). Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(10), 1509-1522.
- Sadraei, H., Asghari, G. R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., & Ebrahimi, M. (2001). Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine*, 8(5), 370-376.
- Sadraei, H., Ghannadi, A., & Malekshahi, K. (2003). Composition of the essential oil of asa-foetida and its spasmolytic action. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 11(3), 136-140.
- Sahebkar, A., & Iranshahi, M. (2011). Volatile constituents of the genus *Ferula* (Apiaceae): A review. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 14(5), 504-531.
- Saidkhodzhaev, A. I., Malikov, V. M., Pimenov, M. G., & Melibaev, S. (1991). Terpenoid coumarins of *Ferula lipskvi* and *F. vicaria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(2), 242-243.
- Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Zhao, J., Zhao, G., Dang, X., Lu, X., & Jia, M. (2013). Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology*, 303, 107-114.
- Sokolova, A. I., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1978). Terpenoid coumarins from *Ferula teterrima*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(1), 109-110.
- Teng, L., Ma, G. Z., Li, L., Ma, L. Y., & Xu, X. Q. (2013). Karatavicinol a, a new anti-ulcer sesquiterpene coumarin from *Ferula sinkiangensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(4), 606-609.
- Valiahdi, S. M., Iranshahi, M., & Sahebkar, A. (2013). Cytotoxic activities of phytochemicals from *Ferula* species. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1).

4. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

1. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Radenković, M., Milenković, M., Couladis, M., Branković, S., Pavlović-Drobac, M., Niketić, M. (2012). Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae) essential oil. *Food Chemistry*, 130(2), 310-315. IF 2012 3,334; IF 2013 3,259 (9/71) **M21**
2. **Pavlović, I.**, Krunić, A., Nikolić, D., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M., Petrović, S. (2014). Chloroform extract of underground parts of *Ferula heuffelii*: secondary metabolites and spasmolytic activity. *Chemistry and Biodiversity*, 11, 1417-1427. IF 2013 1,795 (63/148) **M22**

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodima (M34)

1. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M. Spasmolytic activity of methanol extract of underground parts of *Ferula heuffelii* (Apiaceae). International Conference on Natural Products Utilisation. Bansko, Bulgaria, November 3-6, 2013.
2. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Krunić, A., Nikolić, D., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M. Chemical composition and relaxant effect of chloroform extract of the underground parts of *Ferula heuffelii*. FIP Centennial Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Amsterdam, Netherlands, October 3-8, 2012.
3. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Milenković, M., Nikolić, D., Niketić, D. Antimicrobial, anti-inflammatory and anti-ulcer activities of *Ferula heuffelii* root extracts. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. Geneva, Switzerland, August 16-20, 2009. *Planta Med* 75 (p. 1039).

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu (M64)

1. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Milenković, M., Radenković, M., Branković, S., Couladis, M., Pavlović-Drobac, M. Hemijski sastav, antimikrobna, antiradikalska i spazmolitička aktivnost etarskih ulja *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija. 13-17.10.2010. *Arh farm*, 60(5), 995-998.
2. **Pavlović, I.**, Petrović, S., Juranić, Z., Stanojković, T., Kukić-Marković, J., Niketić, M. Ispitivanje citotoksične i antioksidantne aktivnosti ekstrakata *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija. 13-17.10.2010. *Arh farm* 60(5), 1014-1015.

5. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

U okviru doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Ivana N. Pavlovića sprovedena je analiza sekundarnih metabolita i farmakološke aktivnosti izolata podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel. Ova vrsta naseljava istočnu Srbiju, jugozapadnu Rumuniju i zapadnu Bugarsku i do sada nije proučavana u pogledu hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti, što je predstavljalo naučnu osnovu za njeno ispitivanje.

Hemijski sastav etarskih ulja izolovanih iz podzemnih organa *F. heuffelii* poreklom sa tri lokaliteta u Republici Srbiji (F1-Sićevačka klisura; F2-Đerdapska klisura i F3-klisura Peka), ispitivan je metodama GC-FID i GC-MS. Analizom sastava etarskog ulja F1 utvrđeno je da, generalno, najzastupljeniju grupu metabolita čine seskviterpeni, ali je glavni sastojak ipak bio elemicin, koji pripada grupi fenilpropanskih jedinjenja. Analizom sastava etarskog ulja F2 i F3 utvrđeno je da najzastupljeniju grupu metabolita čine fenilpropani, pri čemu je i u ovim uljima elemicin bio zastupljen u najvećoj količini, a pratio ga je još jedan fenilpropan – miristicin. Na osnovu hemijske analize sastava ovih etarskih ulja zaključeno je da su razlike između njih pre svega kvantitativne prirode.

U okviru ove doktorske disertacije prvi put je pristupljeno hemijskoj karakterizaciji podzemnih organa srpske velestike. Kombinovanjem odgovarajućih hromatografskih tehnika za razdvajanje i izolovanje sekundarnih metabolita i instrumentalnih metoda za određivanje njihove strukture, iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*, izolovano je i okarakterisano deset jedinjenja: dva fenilpropana [latifolon (**1**) i elemicin (**2**)], dva seskviterpena prenil-benzoil tipa (6*E*)-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on (**3**) i džamiron (**4**), dva seskviterpena prenil-benzoilfuranonskog tipa (3*S**,4*R**,5*R**)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetil-nona-3,7-dien-1-il]tetrahidro-4,5-dimetilfuran-2-on (**5**) i fukanedon B (**8**), dva seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**) i bajgen C (**9**), jedan seskviterpen prenil-dihidrofurohromonskog tipa (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon (**10**) i jedan seskviterpenski umbeliferil etar [samarkandin acetat (**7**)]. U frakciji hloroformskog ekstrakta rastvorljivoj u metanolu, metodom eksternog standarda gde su kao standardne supstance korišćena prethodno izolovana jedinjenja, određen je sadržaj četiri metabolita: latifolona (**1**), (6*E*)-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-ona (**3**), džamirona (**4**) i (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (**6**). U metanolnom ekstraktu HPLC metodom je utvrđeno prisustvo četiri jedinjenja: latifolona (**1**), (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (**6**), koji su prethodno izolovani iz hloroformskog ekstrakta, i dve fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska (**11**) i 3,5-dikafeoilhina kiselina (**12**). Zatim je u metanolnom ekstraktu, metodom eksternog standarda, određen sadržaj jedinjenja **1**, **6** i **11**. Po prvi put je spektrofotometrijski određen i sadržaj ukupnih polifenola u metanolnom ekstraktu podzemnih organa.

Veliki broj predstavnika roda *Ferula* koristi se u tradicionalnoj medicini (pre svega u Aziji), što je uslovalo brojna ispitivanja kojima je potvrđen njihov lekoviti potencijal. Međutim, kao što je već napomenuto, vrsta *F. heuffelii* do sada nije ispitivana u pogledu farmakološke aktivnosti. Tako je u okviru ove doktorske disertacije po prvi put ispitana farmakološka aktivnost podzemnih organa ove biljke.

Ispitivanjem antioksidantne aktivnosti utvrđeno je da metanolni ekstrakt poseduje veći antioksidantni potencijal u poređenju sa hloroformskim. Ovakvi rezultati su u skladu sa

razultatima ispitivanja hemijskog sastava ovih ekstrakata. Naime, metanolni ekstrakt sadrži veću količinu polifenolnih jedinjenja. U njemu su identifikovane hlorogenska i 3,5-dikafeoilhina kiselina, koje poseduju snažan antioksidantni potencijal. Među testiranim etarskim uljima najjaču aktivnost ostvarila su ona sa većim sadržajem fenilpropanskih jedinjenja.

Ispitivanjem spazmolitičke aktivnosti izolata podzemnih organa *F. heuffelii* (ekstrakata, etarskog ulja F2 i odabranih metabolita) *in vitro*, utvrđeno je da svi oni ostvaruju spazmolitičko delovanje. Metanolni ekstrakt i etarsko ulje su u svim eksperimentalnim modelima ispoljili snažno, koncentraciono-zavisno i statistički značajno delovanje. Hloroformski ekstrakt je takođe ostvario snažan, koncentraciono-zavisan spazmolitički efekat, pri čemu samo uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma izazvane ACh nije imao statističku značajnost. Dobijeni rezultati su ukazali na veliki spazmolitički potencijal podzemnih organa *F. heuffelii*, zbog čega se oni mogu posmatrati kao potencijalno nova biljna sirovina koja bi mogla naći primenu u terapiji grčeva u digestivnom traktu. U okviru ove disertacije po prvi put je ispitivan i spazmolitički potencijal latifolona (**1**), džamirona (**4**), (2*S**,3*R**)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (**6**) i hlorogenske kiseline (**11**), jedinjenja koja predstavljaju najzastupljenije metabolite u podzemnim organima *F. heuffelii*. Jedinjenja **1**, **6** i **11** inhibirala su koncentraciono-zavisno kontrakcije izolovanog ileuma u sva tri eksperimentalna modela, pri čemu jedino efekat jedinjenja **1** na spontanu kontraktilnost i efekat jedinjenja **11** na kontrakcije izazvane KCl nisu imali statističku značajnost. Jedinjenje **4** je ostvarilo slabije spazmolitičko delovanje. Efekat testiranih metabolita upoređen je sa efektima standardnih lekova: atropina i alverina. Testirana jedinjenja su ispoljila slabije spazmolitičko delovanje od standardnih lekova, a najbolji efekat ostvarila su jedinjenja **1** i **11** prema spontanim kontrakcijama ileuma. Ova dva jedinjenja su ostvarila isti efekat kao i atropin, ali u koncentracijama koje su bile oko 4 puta veće od koncentracije atropina.

Metanolni i hloroformski ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivani su po prvi put i u pogledu antiinflamatornog delovanja *in vivo*, nakon *p.o.* primene u modelu karageninom (*i.pl.*) izazvane inflamacije šapica pacova. Oba ekstrakta pokazala su dozno-zavisno i statistički značajno antiinflamatorno delovanje uporedivo sa efektom indometacina. Ovi rezultati su potvrđeni histološkom analizom preparata šapica netretiranih životinja, kao i životinja tretiranih najvećom dozom metanolnog ekstrakta.

Gastroprotektivni potencijal metanolnog i hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivan je po prvi put, *in vivo*, nakon *p.o.* primene u modelu akutnog ulkusa pacova izazvanog oralnom primenom apsolutnog etanola (akutni stres-ulkus). Oba ekstrakta ostvarila su dozno-zavisno i statistički značajno delovanje uporedivo sa delovanjem ranitidina koji je korišćen kao referentni lek, pri čemu je hloroformski ekstrakt u najvećoj testiranoj dozi ostvario jači efekat od ranitidina.

Dobijeni rezultati ispitivanja antiinflamatorne i gastroprotektivne aktivnosti ekstrakata podzemnih organa ukazuju da ovi ekstrakti, a samim tim i podzemni organi *F. heuffelii* predstavljaju nove prirodne sirovine koje mogu biti efikasne u smanjivanju edema nastalih u različitim zapaljenskim reakcijama (i uopšte u terapiji inflamacije), kao i u terapiji gastričnog ulkusa. Ovakva kombinacija efekata ekstrakata je poželjna, naročito ako se zna da određeni antiinflamatorni lekovi kao neželjena dejstva imaju gastrointestinalne neželjene događaje i da je čak primena nekih od najčešće korišćenih antiinflamatornih lekova kontraindikovana kod pacijenata sa gastričnim ulkusom.

Izolati podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivani su prvi put i u pogledu antimikrobne aktivnosti *in vitro*. Etarska ulja, kao i metanolni i hloroformski ekstrakt, ostvarili su

umeren antimikrobni efekat koji je bio izraženiji prema Gram (+) bakterijama. U okviru ove doktorske disertacije takođe je po prvi put ispitivan antimikrobni potencijal izabranih sekundarnih metabolita (jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6** i **11**) podzemnih organa *F. heuffelii*. Jedinjenja **3**, **4** i **6** ostvarila su antimikrobni efekat prema pojedinim Gram (+) bakterijama, pri čemu je najjači efekat ostvarilo jedinjenje **6** prema bakteriji *M. luteus*.

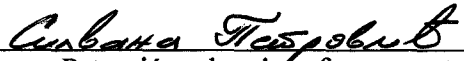
Citotoksično delovanje izolata podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivano je *in vitro* MTT testom prema tri tumorske ćelijske linije: HeLa, K562 i MCF7. Hloroformski ekstrakt je ispoljio višestruko jače citotoksično delovanje u odnosu na metanolni, a najbolju aktivnost oba ekstrakta pokazala su prema ćelijskoj liniji MCF7. U okviru ove disertacije po prvi put je ispitivan i citotoksični potencijal jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6**, **8** i **9**. Generalno, ova jedinjenja su ostvarila najjaču aktivnost prema liniji K562. Najveći citotoksični potencijal među testiranim jedinjenjima ispoljilo je jedinjenje **6**. Efekat ovog jedinjenja prema ćelijskim linijama K562 i MCF-7 bio je uporediv sa efektom cisplatina. Važno je naglasiti da nijedan od testiranih metabolita nije ostvario citotoksično delovanje prema liniji humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5), za razliku od cisplatina. Na osnovu rezultata ispitivanja citotoksične aktivnosti može se zaključiti da podzemni organi srpske velestike predstavljaju prirodnu sirovinu bogatu sekundarnim metabolitima sa potencijalno selektivnim citotoksičnim delovanjem.

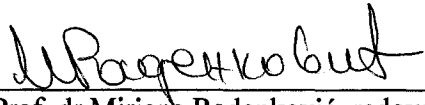
Doktorska disertacija pod nazivom „**Farmakognozijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)**“, kandidata dipl. farm. Ivana N. Pavlovića predstavlja naučno delo od izuzetnog značaja. Ona u velikoj meri doprinosi poznavanju sekundarnih metabolita podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*, a poseban značaj ogleda se u izolovanju retkih jedinjenja. Rezultati ispitivanja farmakološke aktivnosti izolata ukazuju na njihov lekoviti potencijal i time na značaj podzemnih organa ove biljke kao potencijalno nove prirodne lekovite sirovine.

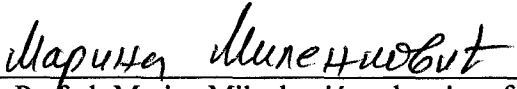
Iz rezultata koji predstavljaju deo ove doktorske disertacije publikovana su 2 rada u časopisima međunarodnog značaja: jedan rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21) i jedan rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22). Prikazana su tri saopštenja na međunarodnim skupovima štampana u izvodu (M34) i dva saopštenja na skupovima nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64).

Na osnovu svega izloženog, Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „Farmakognoksijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)“ i kandidatu dipl. farm. Ivanu N. Pavloviću odobri javnu odbranu po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisije:


Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor, mentor
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet


Prof. dr Mirjana Radenković, redovni profesor,
Univerzitet u Nišu - Medicinski fakultet


Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Beograd, 12.12.2014. god.