



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марина Т. Томовић

**Испитивање антимикубног, антиинфламаторног и
антихистаминског
дејства екстракта *Potentilla reptans L***

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014. година

Најискреније се захваљујем свом ментору *доц. др. Снежани Цупари*, која је предложила тему, а своје знање и искуство несебично пружала у току израде и писања овог рада.

Посебну захвалност упућујем *проф. др. Слободану Јанковићу* који је омогућио реализацију овог рада, а својим саветима и искуством ме усмеравао и подржавао током свих фаза његове израде.

Желим да се захвалим *доц. др. Биљани Љујић* и *асист др. Ани Радовановић* на учешћу у експерименталном раду, као и *асист. Снежани Бранковић* са Природно – математичког факултета у Крагујевцу на смерницама из области ботанике.

Овим путем се захваљујем свима који су на било који начин допринели изради ове докторске дисертације.

Немерљиву захвалност упућујем мојој сестри *дипл. пх. спец. Марији Поповић – Миленковић* која је својом несебичном подршком, саветима и разумевањем учинила мој пут лакшим и бржим.

Мом супругу и деци се захваљујем на љубави, стрпљењу, подршци и разумевању.

Ову дисертацију посвећујем својим родитељима Оцу Томиславу и мајци Гордани.

Садржај

| | |
|---|----|
| 1. Увод..... | 7 |
| 1.1. Фамилија <i>Rosaceae</i> | 9 |
| 1.2. Род <i>Potentilla</i> | 9 |
| 1.3. Ботаничке карактеристике рода <i>Potentilla L. (Rosaceae)</i> | 10 |
| 1.4. Ботаничке карактеристике врсте <i>P. reptans L.</i> | 11 |
| 1.5. Хемијски састав биљака из рода <i>Potentilla</i> | 12 |
| 1.5.1. Секундарни метаболити рода <i>Potentilla</i> | 12 |
| 1.5.1.1. Танини..... | 12 |
| 1.5.1.2. Флавоноиди | 13 |
| 1.5.1.3. Фенолне киселине | 13 |
| 1.5.1.4. Тритерпеноиди | 13 |
| 1.5.2. Значај и порекло секундарних биљних метаболита | 14 |
| 1.5.3. Хемијски састав корена и ризома рода <i>Potentilla</i> | 15 |
| 1.5.4. Хемијски састав хербе рода <i>Potentilla</i> | 16 |
| 1.5.5. Хемијски састав врсте <i>P. reptans L.</i> | 16 |
| 1.6. Употреба врсте рода <i>Potentilla</i> у традиционалној медицини..... | 17 |
| 1.7. Фармаколошко деловање рода <i>Potentilla</i> | 18 |
| 1.7.1. <i>In-vitro</i> фармаколошко деловање..... | 20 |
| 1.7.1.1. Анти-гуморска активност..... | 20 |
| 1.7.1.2. Антивирусна и антимикуробна активност..... | 20 |
| 1.7.1.3. Антиинфламаторна и хепатопротективна активност | 21 |
| 1.7.1.4. Антиоксидантна активност | 21 |
| 1.7.1.5. Антихипергликемијска активност..... | 22 |
| 1.7.2. <i>In-vivo</i> фармаколошко деловање..... | 22 |
| 1.7.2.1. Анти-улцерогена активност | 22 |
| 1.7.2.2. Анти-неопластична активност | 22 |
| 1.7.2.3. Антихипергликемијска активност | 22 |
| 1.7.2.4. Антиинфламаторна и хепатопротективна активност | 22 |
| 1.7.2.5. Антиоксидантна активност | 23 |
| 1.7.3. Клиничке студије | 23 |
| 1.7.3.1. Антидијароички ефекат..... | 23 |
| 1.7.3.2. Анти-улцерогена активност | 24 |
| 1.8. Фармаколошко деловање врсте <i>P. reptans</i> | 24 |

| | | |
|--------|---|----|
| 1.8.1. | Анти-улцерогена активност | 24 |
| 1.8.2. | Антиоксидантна активност | 24 |
| 2. | Циљеви и хипотезе..... | 26 |
| 2.1. | Циљеви..... | 26 |
| 2.2. | Хипотезе | 26 |
| 3. | Материјал и методе..... | 27 |
| 3.1. | Припрема узорака | 27 |
| 3.1.1. | Порекло биљног материјала..... | 27 |
| 3.1.2. | Припрема биљног материјала за екстракцију | 27 |
| 3.1.3. | Добијање екстраката..... | 27 |
| 3.2. | Хемијска анализа водених екстраката <i>P. reptans</i> | 28 |
| 3.2.1. | Одређивање укупних фенола..... | 28 |
| 3.2.2. | Одређивање саржаја укупних флавоноида | 30 |
| 3.2.3. | Одређивање садржаја проантоцијанидина | 33 |
| 3.2.4. | Квалитативно и квантитативно одређивање фенолних једињења | 35 |
| 3.2.5. | Одређивање антиоксидантне активности..... | 38 |
| 3.3. | Испитивање антиинфламаторне активности..... | 41 |
| 3.3.1. | Експерименталне животиње | 42 |
| 3.3.2. | Поступак | 42 |
| 3.4. | Испитивање цитотоксичне активности..... | 43 |
| 3.5. | Испитивање антихистаминске активности..... | 44 |
| 3.6. | Испитивање антимицробне активности..... | 46 |
| 3.7. | Статистичке методе | 47 |
| 3.7.1. | Антиинфламаторна активност | 47 |
| 3.7.2. | Цитотоксична активност | 47 |
| 3.7.3. | Антихистаминска активност..... | 48 |
| 3.7.4. | Статистичка анализа антимицробне активности | 48 |
| 4. | Резултати..... | 49 |
| 4.1. | Хемијски састав водених екстраката хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 49 |
| 4.2. | Антиоксидантна активност хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 52 |
| 4.3. | Антиинфламаторна активност хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 54 |
| 4.4. | Цитотоксична активност хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 54 |
| 4.5. | Антихистаминска активност хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 56 |
| 4.5.1. | Спонтана активност и ефекти хистамина | 56 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.5.2. | Ефекти екстракта хербе <i>P. reptans L</i> | 57 |
| 4.5.3. | Ефекти екстракта ризома <i>P. reptans L</i> | 57 |
| 4.6. | Антимикробна активност хербе и ризома <i>P. reptans</i> | 58 |
| 5. | Дискусија | 63 |
| 6. | Закључци..... | 76 |
| 7. | Литература..... | 78 |



Слика 1. *Potentilla reptans* L

1. Увод

Природни производи који потичу од биљака, животиња, микроорганизама, минерала заузимају значајно место у медицини. Записи старих Грка, Египћана, Кинеза, Индијанаца, као и Библијски текстови показују да су биљке од давнина коришћене у терапијске сврхе. Оне представљају важан извор добијања лековитих препарата још од времена када су први пут уочена и забележена њихова лековита својства све до данас (1). Лековите биљке су се користиле као дроге (осушени прописани делови биљака који садрже лековите супстанце) или као екстракти за добијање различитих лековитих препарата, тако да је терапија биљним екстрактима или једињењима изолованим из њих представљала у једном периоду историје дуго једини незаменљиви начин лечења.

У XIX веку, који је обележен индустријском револуцијом дошло је и до развоја фармацеутске, хемијске и козметичке индустрије. Медицински биоактивна једињења добијана из биљака коришћена су као модел за структурне измене као и за развој нових, функционалнијих једињења. Многе супстанце добијане изоловањем из биљака, су синтетисане хемијским путем као деривати или аналози, а синтетишу се и нови молекули који немају структуралну сличност са почетним једињењима из биљног света. Овакав вид добијања лековитих супстанци је дошао до изражаја средином XX века, када је осмишљавање нових синтетичких лекова било у циљу повећане безбедности и ефикасности терапије. Иако је у овом периоду настао огроман број синтетичких молекула, не сме се занемарити чињеница да тренутно око 250 000 биљних врста садрже много већу разноврсност биоактивних једињења и представљају супериорнији извор лековитих супстанци него постојећи ресурси фармацеутске и хемијске индустрије (2).

Крајем XX и почетком XXI века долази до пораста интересовања и експлоатације биљака у медицини, пре свега због мање токсичности биљних препарата. Данас фитотерапија заузима важно место у медицини а у модерној фармацеутској пракси заступљени су и природни и синтетски лекови. Око 50% лекова на светском тржишту су биљни препарати (3). Фитотерапија се користи или као самостална терапија код блажих форми обољења или као комплементарна терапија. Интересовање за примену природних препарата је у порасту и у козметици са циљем смањења употребе синтетичких сировина и повећања апликације препарата који садрже екстракте биљних

дрога. Употреба лековитих и зачинских биљака у прехранбеној индустрији или биљних сировина у хемијској индустрији је такође у порасту (1).

Филозофија савремене медицине заузима став да се сва обољења лече што једноставнијом терапијом. На основу овога у терапији се примењује кад год је то могуће једна врста лековитих супстанци ради постизања мање штетних ефеката. Овакав приступ имао је за последицу смањење ефикасности терапије код великог броја обољења услед повећања отпорности изазивача болести на саме лекове. Комплексне болести захтевају присуство више терапијски активних супстанци што је основа конвенционалне медицине. Данас је приступ лечењу заснован на примени комбинација биљних препарата и синтетских лекова који се прилагођавају пацијенту и стадијуму болести. На овај начин се омогућава постизање синергистичког ефекта различитих изолованих компоненти и комплексних биљних мешавина молекула (1).

Постојање великог броја биоактивних једињења у биљкама је узроковано потребом за формирање одбрамбеног система биљке од биљоједа, микробиолошких и вирусних инфекција, као и за опстанак биљке у неповољним климатским условима. Биљке синтетишу структурно и функционално различита једињења која делују на патогене врсте и на тај начин превенирају развој резистенције. Са друге стране, поједини изоловани активни састојци биљака испољавају токсично деловање док ти исти састојци у смеси са другим молекулама у екстракту показују оптимално дејство. На тај начин екстракти биљака као комплексне смеше различитих биоактивних једињења често имају мању токсичност а већу ефикасност од појединачних супстанци изолованих из биљних екстраката (4).

Деловање многих лековитих биљака често употребљаваних у традиционалној медицини је данас хемијски и фармаколошки потврђено, али је мало фармаколошких података о биљкама које се ређе користе. Од 250 000 познатих биљних врста у терапији се користи 119 једињења изолованих из 90 биљних врста. Чини се оправданим претпоставка да ће истраживања бити усмерена ка осталим врстама биљног света (3).

Ово истраживање је имало за циљ да утврди и комплентира оскудне литературне податке о фармаколошком деловању врсте *Potentilla reptans L.* Rosaceae која се у традиционалној медицини користи против различитих тегоба, сама или у комбинацији са другим биљкама, а у литератури је мало забележених истраживања.

1.1. Фамилија *Rosaceae*

Фамилија *Rosaceae* је распрострањена у различитим деловима света, садржи 115 родова и више од 3000 врста. Стабљике биљака ове фамилије се разликују и могу бити дрвенасте, грмолике или зељасте, једногодишње или вишегодишње.

Према традиционалној подели по типу плода, ова фамилија је подељена на четири подфамилије: *Rosoideae* (орашица), *Spiraeoideae* (мешак), *Amygdaloideae* (коштуница) и *Maloideae* (јабука). Опсежна филогенетска истраживања су указала на извесне недостатке овакве поделе на основу типа плода и предложила другу класификацију, по којој је ова фамилија подељена на три подфамилије - *Rosoideae*, *Dryodoideae*, *Spiraeoideae*, при чему су подфамилији *Spiraeoideae* придодате субфамилије *Amygdaloideae* и *Maloideae* (5). У табели бр. 1. је приказано филогенетско стабло рода *Potentilla* (6).

Табела 1. Филогенетско стабло рода *Potentilla*

| Таксономске категорије | Таксони |
|------------------------------|----------------------------|
| <i>Regnum</i> (царство) | <i>Plantae</i> |
| <i>Phylum</i> (одељак) | <i>Tracheophyta</i> |
| <i>Classis</i> (разред) | <i>Magnoliopsida</i> |
| <i>Subclassis</i> (подкласа) | <i>Rosidae</i> |
| <i>Ordo</i> (ред) | <i>Rosales</i> |
| <i>Familia</i> (фамилија) | <i>Rosaceae</i> |
| <i>Tribus</i> (племе) | <i>Potentilleae</i> |
| <i>Genus</i> (род) | <i>Potentilla</i> Linnaeus |

1.2. Род *Potentilla*

Род *Potentilla* припада фамилији *Rosaceae* и садржи преко двадесет врста. Врста *reptans* има неколико варијетета, *Mollis* (Borb.), *Typica* (Asch. et Graeb.) и *Microphylla* (Asch. et Graeb.). Назив рода потиче од латинске речи *potens* (моћан), која сугерише исцелитељску карактеристику рода (7). Стари Грци назвали су ову биљку *pentáphyllon* (πενταφυλλον), а до 17. века широко распрострањен назив је био и *quinquefolium*, оба назива значе „петолиста“. У Словенији постоји велики број имена за овај род и скоро сва су везана за његове лековите карактеристике (8). У 18. веку након што је шведски

ботаничар Linne израдио номенклатуру за родове и врсте, 1753. године *P. reptans* је добила ботанички назив - *Potentilla reptans* L.

Род *Potentilla* се спомиње још у 16. веку, у књизи „New Kreuterbuch“ аутора Fuch-a који описује лековита својства неколико биљака из овог рода, као и *P. reptans* и лековите особине њеног надземног и подземног дела. Надземни део *P. reptans* се користи за припрему хомеопатских препарата према прописима америчке хомеопатске фармакопеје, немачке хомеопатске фармакопеје и других (9).

У неким крајевима Србије ова биљка се назива челавица или трава од грознице, али најчешћи народни назив код нас је петопрсница, који потиче од карактеристичног распореда листова ове биљке (7). У Европи уобичајени називи за ову биљку су: европска цинквефолија, пузећа торментила, петопрста, петолиста трава. У Британији уобичајени назив је пузећа цинквефолија.

1.3. Ботаничке карактеристике рода *Potentilla* L. (*Rosaceae*)

Иако се традиционална подела биљака фамилије *Rosaceae* у мноме разликује од новије класификације настале услед опсежних филогенетских испитивања, и по једној и по другој подели род *Potentilla* L. припада подкласи *Rosoidae*, племену *Potentilleae* и обухвата преко 300 врста, углавном вишегодишњих, ређе двогодишњих или једногодишњих зељастих биљака (10).

Биљке овог рода имају стабљику углавном пузећу, али се могу наћи мали жбунови или полужбунови различите длакавости. Листови су прстасто или перасто подељени. Цветови су двополни, петочлани, сакупљени у терминалне цвасти, или ређе смештени бочно на стабљници у облику звезде. Најчешће су жуте боје, али могу бити и бели, ружичасти, црвени и тамно црвени. Плод је орашица. Расте у умереној, алпској и арктичкој зони северне хемисфере. Неке врсте овог рода успевају само на кречњачком подручју, док другима такво подручје не погодује. Овај род може да опстане у отежаним условима животне средине, па неке врсте насељавају пустиње и степе, а друге тешко приступачне планинске венце или поларне пустиње (7, 8). Неке врсте овог рода се могу наћи и на високим планинским врховима Јужне Америке. Постојбином рода *Potentilla* се сматрају предели северо-западне Кине и европског дела Медитерана (11). Данас је овај род по својој распрострањености и разноликости врста највише заступљен у северном делу европског и азијског континента, а многе врсте се гаје и као украсне биљке (10, 12). Род *Potentilla* је подељен на 302 врсте које су груписане у две

секције (*Trichocarpeae* и *Gymnocarpeae*) и велики број субсекција и група (13). У оквиру овог рода постоји велика морфолошка варијабилност врста, али и самог рода (појава хибридизације међу самим врстама, промена унутар самих врста, бесполне репродукције - аромиксис) (14). У табели бр. 2. је приказан таксономски положај врсте *Potentilla reptans* (14).

Табела 2. Таксономски положај врсте *Potentilla reptans*

| Таксономске категорије | Таксони |
|--------------------------------|----------------------|
| <i>Genus</i> (род) | <i>Potentilla</i> |
| <i>Section</i> (секција) | <i>Gymnocarpeae</i> |
| <i>Subsection</i> (субсекција) | <i>Gomphostylae</i> |
| <i>Group</i> (група) | <i>Tormentillae</i> |
| <i>Species</i> (врста) | <i>P. reptans L.</i> |

1.4. Ботаничке карактеристике врсте *P. reptans L.*

P. reptans је вишегодишња биљка са усправним ризомом. Ризом може бити различите дебљине, у зависности од станишта. У равничарским пределима ризом је танак и често се налази близу површине тла, док у планинским пределима ризом је дебео, разгранат и дубоко продире у земљу. Стабљика је зељаста, кончаста, пузећа и до 100 cm дугачка. Стабљика развија бочне изданке. Стабљика и изданци могу бити длакави или голи у зависности од поднебља (15). Планинске биљке су често прекривене густим длакама, док су у низијама стабљике углавном голе, црвенкасте боје и немају жлезде. Листови су прстасто распоређени, петочлани или седмочлани. Листови на врху стабљике могу бити трочлани или четворочлани и они се налазе на краћим дршкама. Листови су јајастог или дугуљасто-објајастог облика. Најчешће су назубљени или тестерасто назубљени. Цветови су жуте боје, петочлани, појединачно смештени у пазуху листова, са дугачким танким дршкама (15).

P. reptans расте поред путева, у јарцима, поред обала, по влажним и мочварним ливадама. Налази се и у шумама храста и граба, као и по низинским шумама. Распрострањена је у великом делу Европе и Азије, а пренесена је у Северну и Јужну Америку, Аустралију и Нови Зеланд. У нашој земљи се сматра доста распрострањеном и коровском биљком (15).

1.5. Хемијски састав биљака из рода *Potentilla*

За одређивање хемијског састава представника рода *Potentilla* коришћени су екстракти различитих врста. Још 60-их година прошлог века утврђено је да су танини доминантна једињења овог рода, а касније су истраживања усмерена на одређивање и других секундарних метаболита (16-18). Присутни су флавоноиди, тритерпеноиди и фенолне киселине (19-23).

1.5.1. Секундарни метаболити рода *Potentilla*

Најзаступљенија једињења овог рода су фенолна једињења (24). Она представљају хетерогену групу секундарних биљних метаболита широко распрострањену у биљном свету. По хемијској структури су ароматична једињења, са једним или више ароматичних прстенова, једном или више хидроксилних група. У фенолна једињења спадају фенолне киселине, флавоноиди, стилбени, кумарини и танини. Ова једињења се у биљкама налазе у слободном облику или у облику гликозида везани за различите шећерне остатке, или у облику комплекса са органским аминима, киселинама, липидима, угљеним хидратима и другим полифенолним једињењима. За биолошку активност гликозида је заслужан искључиво агликонски, фенолни део молекула. Нерастворни феноли су најчешће саставни део ћелијског зида, док се растворни феноли налазе унутар ћелијских структура. Ова једињења доприносе механичкој отпорности ћелијског зида, имају регулаторну улогу у расту и морфогенези биљке, као и у реакцији на стрес и патогене. Акумулација полифенолних једињења варира у зависности од физиолошког стања биљке. Ова група обухвата око 800 типова једињења. Они имају важну одбрамбену улогу, учествују као медијатори у реакцијама биљног метаболизма, а једна су од главних једињења која учествују у формирању боје, укуса и мириса. Најважнији представници ове групе за род *Potentilla* су: танини, флавоноиди и фенолне киселине (25).

1.5.1.1. Танини

По својој хемијској структури танини спадају у полифенолна једињења која су растворна у води, опорог укуса и нетоксична, а деле се на хидролизујуће и кондензоване танине.

Хидролизујући танини су полиестри галне киселине и молекула шећера. Дејством киселина и ензима ови танини се разлажу на полифенолне киселине и шећер.

Кондензовани танини настају кондензацијом неколико молекула флаван-3-ола (катехина и епикатехина) или ређе флаван-3,4-диола при чему настају проантоцијанидини (26).

Фамилија *Rosaceae* се карактерише присуством кондензованих танина (26). Уколико су танини присутни у количини већој од 10 % дрога се сматра танинском дрогом. Код великог броја биљака танини су пратеће компоненте. Биолошки ефекти танина су последица стварања нерастворљивих комплекса танина са беланчевинама, због чега поседују адстригентно, антимикумно, антиинфламаторно, антидијароично и антиоксидативно деловање. Користе се и као антидоти код тровања тешким металима или алкалоидима (26, 27).

1.5.1.2. Флавоноиди

Највећа група биљних фенола, обухвата флавоноле, флавоне, флаваноне, флаваноле, изофлаване и антоцианидине. Ова група једињења има широку примену у медицини. Флавоноиди позитивно утичу на смањење пермеабилности и повећање еластичности зида капилара (28). Испољавају диуретично деловање, и учествују у метаболизму арахидонске киселине узрокујући антиинфламаторну активност. Испољавају још и спазмолитичку, антимикумно, антиалергијску и хепатопротективну активност. Уочено је да флавоноиди инхибирају ензим фосфодиестеразу и на тај начин смањују агрегацију тромбоцита. Ова група једињења показује јаку антимикумно, цитостатску и антиоксидантну активност (28).

1.5.1.3. Фенолне киселине

Фенолне киселине могу бити деривати бензојеве и деривати циметне киселине. У деривате бензојеве киселине спадају: бензојева, п-хидроксибензојева, протокатехинска, ванилинска, сиригинска и гална киселина. У деривате циметне киселине се убрајају: циметна, п-кумаринска, кафена, ферулна и синапинска киселина. Углавном се користе као конзерванси, антиинфламаторни агенси и антиоксиданси. Када су у питању антиоксидантна својства ових киселина доказано је да антиоксидантна активност расте са повећањем броја хидроксилних група (29).

1.5.1.4. Тритерпеноиди

Изопренска јединица је основна структурна јединица терпена. Ова група секундарних метаболита улази у састав смола, могу бити слободни или се јављати као

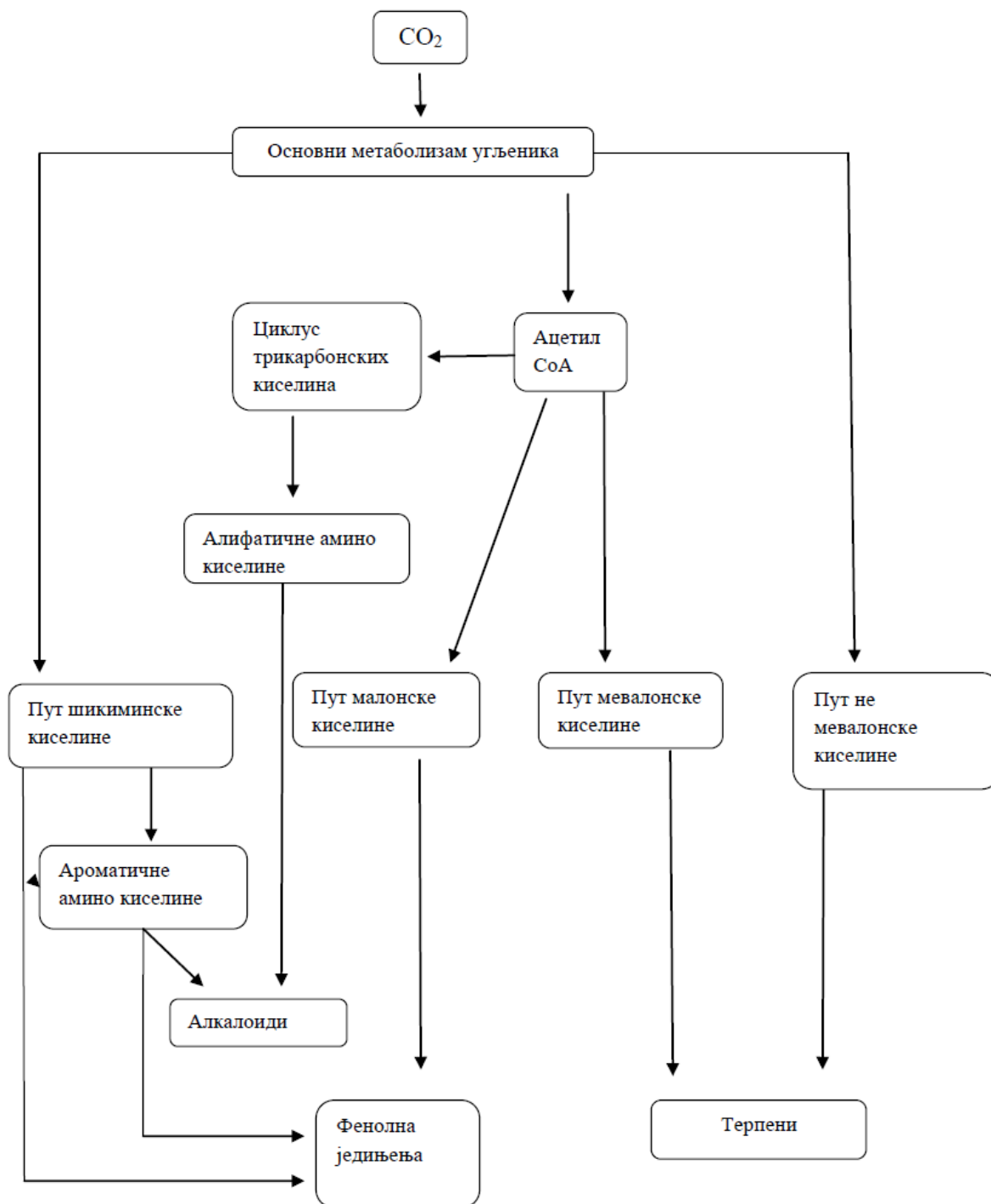
сапогенини сапонозида и агликони хетерозида. Испољавају антимикубно деловање (28).

1.5.2. Значај и порекло секундарних биљних метаболита

Хемијска једињења која се синтетишу у биљкама могу се поделити на две велике групе. Прву групу чине примарни метаболити, који омогућавају раст и развој биљке, односно имају градивну улогу. У примарне метаболите се убрајају: угљени хидрати, липиди, беланчевине, аминокиселине. Другу групу чине секундарни метаболити, једињења за која се сматра да помажу биљци да се прилагоди средини (земљиште, друге биљке, инсекти, суша, UV зрачење) и преживи у окружењу где се налази (присуство различитих патогена – бактерија, гљивица, или вируса). Једињења из ове групе настају као производи секундарног метаболизма биљака. Њихова количина у биљкама зависи од климатских фактора, времена бербе, сушења, чувања и врсте биљке. У овој групи се налази велики број једињења различитих хемијских структура али је уочена карактеристика да у оквиру једне биљне врсте, или рода, егзистирају у мањој или већој мери супстанце из исте хемијске групе (30).

Синтеза секундарних метаболита је сложена и до сада није у потпуности разјашњена. Сматра се да секундарни метаболити настају преко неколико биосинтетских путева. Једињења сродне хемијске структуре се синтетишу преко дефинисаног пута, до одређене фазе. На који начин ће се синтетисати неко једињење зависи од присуства или активности ензима што је генски детерминисано, од услова спољашње средине као и од врсте биљке. Сматра се да постоје четири главна пута за синтезу секундарних биљних метаболита и то:

- 1) Пут шикиминске киселине. На овај начин настају цикличне аминокиселине које представљају основни састојак и полазну сировину за синтезу алкалоида (алкалоиди поред тога што се синтетишу на овај начин могу бити синтетисани и преко алифатичних аминокиселина). Фенолна једињења се такође синтетишу овим путем.
- 2) Пут малонске киселине. Значајан за синтезу фенолних једињења.
- 3) Пут мевалонске киселине. Овим путем настају стероиди терпеноиди и терпени.
- 4) Пут не-мевалонске киселине. Значајан је за синтезу терпена, слика 2 (31).



Слика 2. Биосинтеза биљних секундарних метаболита.

1.5.3. Хемијски састав корена и ризома рода *Potentilla*

У корену и ризому идентификовано је преко 60 једињења, која спадају у следеће хемијских групе: танини, флавоноиди, тритерпени, органске и фенолкарбонске киселине.

Танини представљају добро испитану групу природних једињења. Уочен је висок садржај танина у ризому многих врста рода *Potentilla*. На пример, *Potentilla*

erecta, најраније анализирана и најбоље проучена биљка из овог рода, у ризому садржи 17-22 % танина, 15-22 % кондензованих и 3,5 % хидролизујућих (32, 9). Идентификовани су прекурзори кондензованих танина: (+)-катехин, (-)-епикатехин, (+)-галокатехин и (-)-епигалокатехин. Хидролизујући танини су у мањој мери заступљени од кондензованих и идентификовани су у две врсте *Potentilla* (*P. erecta* и *P. discolor*).

Овај род се карактерише и присуством тритерпеноида. Карактеристично једињење тритерпеноидне структуре је торментозид, изолован из ризома биљке *Potentilla erecta*, али је касније пронађен и у другим врстама *Potentilla* (*P. anserina* и *P. discolor*) (33, 34).

Идентификовано је присуство флавоноида у ризому *P. erecta* (35), међутим њихово присуство је карактеристично за надземне делове. Поред ових главних група једињења идентификоване су следећа једињења: органске и фенолкарбонске киселине, стероли, шећери, аминокиселине и масне киселине. Хемијски састав ризома *P. reptans* до сада није документован.

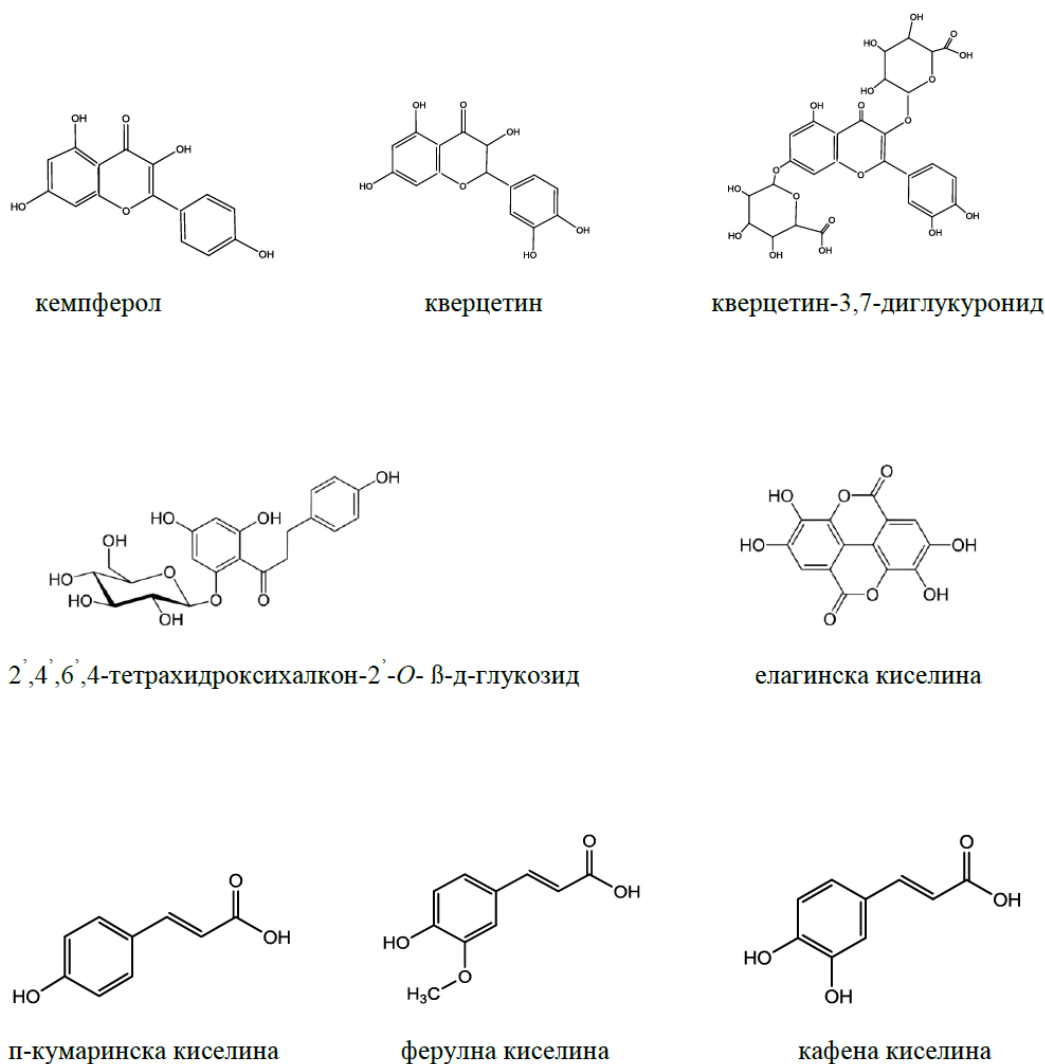
1.5.4. Хемијски састав хербе рода *Potentilla*

Херба рода *Potentilla* је проучавана код већег броја врста овог рода, него ризом. Идентификовано је 134 једињења. Доминантна једињења у надземном делу су флавоноиди. Идентификован је велики број различитих флавоноида. Карактеристично је присуство апигенина, кемпферола, лутеолина, кверцетина, мирцетина (24). У херби су присутни и танини, у мањем садржају него у ризому или корену. Присутни су мономери хидролизирајућих танина (потентилин, педункулагин, телимаграндин и касуариктин). Поред мономера идентификован је и димер агримонин у *P. kleiniana* као и деградациони производи хидролизујућих танина (елагична киселина и њени деривати) (36-38). Прекурзори кондензованих танина катехин, галокатехин и епигалокатехин су детектовани у *P. erecta* (39). Тритерпени идентификовани у херби су сличне или исте структуре као они присутни у ризому и корену. Поред ових главних група једињења уочено је и присуство кумаринских деривата (*P. erecta*, *P. anserina* и *P. argentea*) као и органских и фенол карбонских киселина, стерола, есенцијалних уља и пектина (комарумана из *P. palustris*) (40, 41).

1.5.5. Хемијски састав врсте *P. reptans* L.

Херба *P. reptans* је анализирана и идентификовано је осам једињења: четири флавоноида, елагинска киселина, и три карбонске киселине. Ризом ове биљке до сада

није испитиван (24). Једињења идентификована у херби *P. reptans* приказана су на слици 3.



Слика 3. Једињења идентификована у херби *P. reptans*. Флавоноиди (кемпферол, кверцетин, кверцетин-3,7-диглукуронид, 2',4',6',4'-тетрахидроксиалкон-2'-O-β-D-глюкозид), елагинска киселина, карбонске киселине (п-кумаринска киселина, кафена и ферулна киселина)

1.6. Употреба врсте рода *Potentilla* у традиционалној медицини

За медицинску употребу биљке овог рода се користе углавном целе тј. корен (ризом) и херба. Традиционално се примењују у облику инфуза, декокта, мацерата, а као растварачи коришћени су вода или етанол. Забележено је и директно посипање спрашене дроге на ране или оболела места (42). Код азијских народа различите биљке овог рода (*P. chinensis*, *P. multicaulis*, *P. atrosanguinea*, *P. kleiniana*, *P. peduncularis*, *P.*

freyniana, *P. discolor*, *P. multifida*) се користе у терапији дијареје, кашља, вирусних инфекција, паротитиса, лимфадентитиса, укочености удова, дисменореје итд (24, 43-45). У Америци и Канади најчешће употребљаване врсте су *P. arguta* и *P. simplex* у терапији вирусних и гљивичних инфекција (46). Врсте *P. erecta*, *P. fruticosa*, *P. anserine*, *P. speciosa*, *P. recta*, *P. fulgens* и друге које су заступљене на европском континенту, користе се у терапији бактеријских, вирусних и гљивичних инфекција, запаљенских процеса, против дизентерије, дијареје, упале грла, кожных инфекција, тумора и дијабетеса (47, 48). Најчешће се користе у облику декокта или инфуза.

Херба *P. reptans* се користи у терапији зубобоље, кожных инфекција, грчева у стомаку, запаљења грла и код појаве алергија (24). Ризом се користи у терапији дизентерије, реуматизма, гихта и шећерне болести, као и за регулацију метаболизма. Препоручује се и за лечење екцема, лишајева и других кожных обољења. У стоматологији се користи ризом *P. reptans* против упале десни, грла и ждрела. У народној медицини је коришћен против кожных осипа, екцема, нагњечења, за смањење крварења и брже зарастање, а забележено је посипање спрашеног корена директно на рану (42).

1.7. Фармаколошко деловање рода *Potentilla*

С обзиром да је велики број биљака овог рода коришћен у традиционалној медицини различитих народа, објављене студије су имале за циљ фармаколошку потврду употребе. Студије су биле *in vitro* и *in vivo*, а због малог броја клиничких студија за већину лабораторијских резултата потребна је и клиничка потврда. Фармаколошка активност биљака из рода *Potentilla* приказана је у табели бр. 3 (24).

Табела 3. Фармаколошка активност рода *Potentilla*

| Фармаколошка активност | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | Клиничке студије |
|------------------------|--|---|---|
| Улцер | | Пептички улцер (<i>P. reptans</i>) | |
| Дијареја | Антисекреторна активност (<i>P. erecta</i>) | | Антидијареична и антивирусна активност код дијареје изазване ротавирусом (<i>P. erecta</i>) |
| Инфламација | Јака инхибиција циклооксигеназе (<i>P. erecta</i>) | Антиинфламаторна активност на уху миша (<i>P. alba</i> , <i>P. erecta</i> и <i>P. malyana</i>), и Антиинфламаторна активност на шапици пацова (<i>P. palustris</i>) | |

| Фармаколошка активност | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | Клиничке студије |
|-------------------------|---|---|---|
| Улцерозни колитис | <i>P. erecta</i> | Индуковани колитис код мишева: (<i>P. palustris</i>) | <i>P. erecta</i> |
| Канцер | Инхибиција раста ћелија лимфома; (<i>P. chinensis</i> , <i>P. ulticaulis</i> , <i>P. argentea</i>) | Активност на неопластичне туморе код мишева (<i>P. fulgens</i>) | |
| Вирусне инфекције | Профилактика и терапија на <i>Coxsackie virus B</i> (<i>P. fruticosa</i>); респираторне вирусне инфекције (<i>P. arguta</i>); <i>Herpes virus</i> (<i>P. erecta</i> , <i>P. anserina</i>); <i>Hepatitis B</i> (<i>P. anserina</i>) | Профилактика и терапија на <i>Coxsackie</i> вирус Б код мишева (<i>P. fruticosa</i>); антивирусни ефекти на <i>Vaccine virus</i> код мишева (<i>P. erecta</i>); | Антивирусна активност на <i>rotavirus</i> код деце (<i>P. erecta</i>) |
| Бактеријске инфекције | Антибактеријска активност на <i>Streptococcus mutans</i> и <i>Streptococcus sobrinus</i> (<i>P. erecta</i>); умерена антибактеријска активност на <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ; не постоји или је веома слаба активност на <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; висока активност на <i>Campylobacter pylori</i> (већи број <i>Potentilla</i> врста) | | |
| Антиоксиданти | Антиоксидантна активност (<i>P. reptans</i> , као и већи број <i>Potentilla</i> врста) | Јака антиоксидантна активност на албино пацовима (<i>P. erecta</i>); код мишева (<i>P. reptans</i> , <i>P. anserina</i>). | |
| Гљивичне инфекције | Умерена активност на <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> и <i>Cryptococcus neoformans</i> (већи број <i>Potentilla</i> врста); јака антигљивична активност на <i>Candida glabrata</i> (<i>P. simplex</i>); слаба активност на дерматофите и плесни (<i>P. simplex</i>) | | |
| Ослабљен имунски систем | | Имуномодулаторне активности код мишева (<i>P. fruticosa</i> , <i>P. erecta</i>) | |

| Фармаколошка активност | <i>In vitro</i> | <i>In vivo</i> | Клиничке студије |
|---------------------------|---|--|------------------|
| Дијабетес мелитус | Терапија и превенција оштећења изазваних дијабетесом (<i>P. recta</i> , танини из <i>P. candicans</i> и <i>P. discolor</i>) | Смањење нивоа глукозе у крви код мишева (<i>P. Fulgens</i> , <i>P. erecta</i>) | |
| Спазми глатке мускулатуре | Спазмолитички ефекти на изолованом илеуму и материци пацова (<i>P. anserina</i>) | | |
| Деловање на јетру | | Хепатопротективни ефекат (<i>P. erecta</i> и <i>P. fruticosa</i>) | |

1.7.1. *In-vitro* фармаколошко деловање

1.7.1.1. Анти-туморска активност

Анти-туморска активност је доказана код великог броја биљака овог рода и сматра се да тритерпеноидна једињења доприносе томе. Цитотоксична активност је доказана код надземног дела *P. chinensis* и корена *P. multicaulis* на ћелијским линијама хуманог хепатома и хумане промијелоцитне леукемије (33, 49, 50). Етанолни екстракт *P. erecta* показује високу цитотоксичну активност у концентрацији од 10 и 50 µg/ml (51). Полифенолна једињења као што су кемпферол, тилирозид и друга изолована из *P. argentea* показују цитотоксични ефекат на ћелијским линијама хуманог карцинома дојке (52).

1.7.1.2. Антивирусна и антимикробна активност

Антивирусна активност је испитивана на великом броју биљака овог рода где је уочена активност на неке изазиваче вирусних инфекција. Екстракти појединих врста *Potentilla* (*P. erecta*, *P. anserine*) показују умерени антивирални ефекат против *Herpes virus-a* а *P. arguta* ублажава респираторне инфекције изазване респираторним синцицијалним вирусом (53). Антивирусно деловање је доведено у везу и са присуством танина (54). Водени екстракт ризома *P. erecta* је показао супресивни ефекат на ензим глукотрансферазу који је један од најважнијих фактора вирулентности стрептокока *Streptococcus mutans* и *Streptococcus sobrinus* (55).

Испитивана је активност танина присутних у биљкама рода *Potentilla* на грам-позитивне, грам-негативне бактерије и гљивице, при чему је уочена и антибактеријска и антифунгална активност (56). Надземни делови девет врста *Potentilla* (*P. argentea*, *P. fruticosa*, *P. recta*, *P. rupestris*, *P. erecta*, *P. anserina*, *P. nepalensis*, *P. thuringiaca*, *P.*

grandiflora) показали су умерени ефекат на грам-позитивне бактерије (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*), при минималној инхибиторној концентрацији од 12,5-100 mg/ml, док ови екстракти нису деловали на грам-негативне бактерије (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*). Минимална инхибиторна концентрација на *Helicobacter pylori* је висока (0,1–0,5 mg/ml). Умерени антифунгални ефекат је уочен против *Candida albicans* (57). Водени екстракт надземног дела *P. simplex* показао је слабу до умерену антифунгалну активност против *Candida* врста и *Cryptococcus neoformans*, а веома јако деловање против *Candida glabrata* (46, 58). Биљке из рода *Potentilla* имају слабо антифунгално деловање против дерматофита (*Trichophyton* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*), док биљке овог рода не делују против *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp (58, 59).

1.7.1.3. Антиинфламаторна и хепатопротективна активност

Биљке овог рода се користе за лечење дерматоза, микоза, вулвовагинитиса опекотина, промрзлина, гнојних и алергијских дерматитиса. Водени екстракт ризома *P. erecta* у *in vitro* условима инхибира циклооксигеназу (60). Етил-ацетатни екстракт надземног дела *P. anserinae* испољава значајну спазмолитичну активност на глатку мускулатуру црева и материце у *in vitro* условима, али не показује ефекат на глатке мишиће крвних судова и уринарног система. Екстракт *P. anserinae* стимулише секрецију жучи, а показује и хепатопротективно дејство (61).

1.7.1.4. Антиоксидантна активност

Антиоксидантни ефекти врста из овог рода су испитивани у *in vitro* условима. Сматра се да је овај ефекат повезан са присуством великог броја полифенолних једињења, која доводе до неутралисања слободних радикала. Екстракти ових биљака се користе у терапији или превенцији хроничних болести изазваних слободним радикалима (кардиоваскуларна обољења, тумор, поремећаји згрушавања крви итд.) Значајане антиоксидантне ефекте показао је метанолни екстракт корена *P. alba*, водено-етанолни екстракт надземног дела *P. atrosanguinea* и различити екстракти (метанолни, ацетонски, етилацетатни) цветова *P. fruticosa*. Антиоксидантни потенцијал ових врста је мерен различитим тестовима DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил), ABTS (2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина)), FRAP (*ferric reducing antioxidant potential*) (18, 62, 63).

1.7.1.5. Антихипергликемијска активност

Истраживања спроведена *in vitro* показала су да деривати елагичне киселине изоловани из *P. candicans*, као и метанолни екстракт надземног дела *P. recta* утичу ниво глукозе у крви (64, 65, 24).

1.7.2. *In-vivo* фармаколошко деловање

1.7.2.1. Анти-улцерогена активност

Представници овог рода су показали гастропротективни и антидијароични ефекат, који је проучаван на животињским моделима. Гастропротективно деловање се приписује присуству танина и пектина комарунама (66, 67). Комарунам изолован из надземних делова *P. palustris*, показао је протективне ефекте код колитиса на мишевима (67).

1.7.2.2. Анти-неопластична активност

Метанолни екстракт корена *P. fulgens* показује дозно завистан ефекат на Далтонов лимфом албино мишева (52, 68).

1.7.2.3. Антихипергликемијска активност

У *in vivo* експериментима показано је да метанолни екстракт корена *P. fulgens* у дози 150-450 mg/kg смањује гликемију у крви и код здравих и код дијабетичних мишева, при чему нису забележени никакви нежељени ефекти. Сличне ефекте је показао и екстракт ризома *P. erecta* што је доведено у везу са присуством торментозида (69, 70).

1.7.2.4. Антиинфламаторна и хепатопротективна активност

У *in vivo* условима доказано је локално антиинфламаторно деловање екстракта ризома и корена *P. alba* и *P. erecta* на уху мишева, где је инфламација изазвана ацетонским раствором кротонског уља. Сличан ефекат је испољио и екстракт корена и ризома *P. malyana* (71, 72). Водени екстракт цветова *P. fruticosa* показује хепатопротективни ефекат. У *in vivo* студији на пацовима екстракт је позитивно утицао на микрозомални систем јетре, као и ксенобиотски метаболизам и плазма липидну пероксидацију. Поред овога, дошло је и до нормализације активности аланин-аминотрансферазе и нивоа билирубина у плазми (73).

1.7.2.5. Антиоксидантна активност

Полифенолна једињења брзо и лако реагују са оксидансима спречавајући пероксидацију масних киселина и оксидацију LDL честица које би довеле до оштећења крвних судова и патологије. Анализом различитих екстраката *Potentilla* врста уочено је да оне врсте које у себи садрже кондензоване танине (посебно димере и тримере) показују бољу антиоксидативну активност (74). У *in vivo* условима испитивани су екстракти ризома *P. erecta* и *P. anserine* као и етанолни и водени екстракти надземног дела *P. reptans* и сви су показали значајну антиоксидантну активност. Етанолни екстракт ризома *P. erecta* у дози од 0,05 и 0,1 ml/100g телесне масе пацова узрокује смањење малонилалдехида и ендогених липида (75,76).

1.7.3. Клиничке студије

1.7.3.1. Антидијароички ефекат

Кондензовани танини или проантоцијанидини показују позитивне ефекте у третману дијареје. Сматра се да граде комплексе са мукозним протеинима и на тај начин стварају заштитни слој у цревима. Овај ефекат се може објаснити и стварањем комплекса између танина и неких секреторних једињења као што су токсин колере или инхибицијом интестиналне покретљивости (77-79). Спроведена је клиничка рандомизирана дупло слепа плацебо контролисана студија екстракта ризома *P. erecta* у терапији дијареје код деце изазване ротавирусом (80). Екстракт је стандардизован на 30-40% танина. Студија је пратила трајање дијареје, волумен столице и дехидратацију пацијената у испитиваној и контролној групи. Резултати спроведене студије су показали да је трајање дијареје у испитиваној групи било значајно краће него у контролној. Група која је третирана екстрактом (испитивана) примила је мању запремину електролита за надокнаду течности од контролне групе, а није било ни споредних нежељених ефеката као што је мучнина. Сматра се да висок садржај танина утиче на смањену дифузију воде кроз зидове црева и да се на тај начин смањује губитак електролита из организма. Аутори претпостављају да танини стварају комплексе са протеинима ротавируса, а антидијароичном ефекту су поред танина допринеле и друге компоненте из екстракта.

1.7.3.2. Анти-улцерогена активност

Клиничка студија која је истраживала ефикасност екстракта ризома *P. erecta* у третману активног улцерозног колитиса показала је да екстракт примењен у дози од 2400 mg/дан испољава оптимални ефекат (81).

1.8. Фармаколошко деловање врсте *P. reptans*

1.8.1. Анти-улцерогена активност

Надземни делови *P. reptans* користе се у народној медицини у третману горушице и абдоминалних болова. Студија која је фармаколошки и хистопатолошки потврдила висок гастропротективни ефекат орално примењеног воденог екстракта надземног дела *P. reptans* код улцера пацова, је ефекат објаснила присуством танина и флавоноида у надземном делу (82).

1.8.2. Антиоксидантна активност

Ефекти воденог и етанолног екстракта *P. reptans* су испитивани на мишевима а мерени су нивои укупног холестерола у серуму, триглицерида, HDL холесерола, LDL холестерола, глукозе. Етанолни екстракт је повећавао ниво серумског HDL холестерола а смањивао ниво азот оксида (NO), док етанолни и водени екстракти нису утицали на концентрацију холестерола у серуму (75, 76).

С обзиром да се *P. reptans* у народној медицини употребљава за различита обољења а мали број студија је потврдио те ефекте, циљ овог истраживања је био да евалуира оправданост улоге ове биљке у народној медицини и да комплементира податке о овој врсти са хемијског и фармаколошког аспекта.

У традиционалној медицини најчешће примењивани облици *P. reptans* су водени препарати хербе и (или) ризома, због тога су испитивани екстракти у овој студији били водени екстракти као најслични облици оним који се користе у народној медицини.



Слика 4. *Potentilla reptans L.* (херба и ризом)

2. Циљеви и хипотезе

2.1. Циљеви

Циљ овог истраживања је испитивање антиинфламаторног, цитотоксичног, антихистаминског и антимикуробног деловања водених екстраката хербе – *Pot.r-h* и ризома - *Pot.r-r*) *P. reptans L.*

Ради спровођења циљева ове студије урађено је следеће:

1. Сакупљена је биљна дрога хербе и ризома *P. reptans*.
2. Направљени су водени екстракти биљних дрога.
3. Извршена је анализа хемијског састава добијених екстраката.
4. Спроведено је *in vivo* испитивање антиинфламаторног деловања екстраката на експерименталном животињском моделу.
5. Одређено је цитотоксично деловање водених екстраката (*in vitro*).
6. Одређено антихистаминско деловање водених екстраката (*in vitro*).
7. Испитано је антимикуробно деловање водених екстраката (*in vitro*).

2.2. Хипотезе

- Фенолна једињења доминирају по садржају у обе врсте екстраката.
- Не постоји разлика у смањењу едема животиња третираних испитиваним екстрактима и контролних животиња.
- Не постоји разлика у испољавању цитотоксичног ефекта екстраката и стандардних супстанци.
- Испитивани екстракти не изазивају контрактилност изолованог јајовода.
- Нема значајних разлика у зонама инхибиције раста микроорганизама при коришћењу екстраката и стандардних антибиотика.

3. Материјал и методе

3.1. Припрема узорака

3.1.1. Порекло биљног материјала

Биљни материјал коришћен за анализу сакупљан је у периоду од маја до октобра 2010. године. Ботаничка идентификација извршена је према дихотомним кључевима „Флоре СР Србије“. Хербарски примерци депоновани су у хербаријуму Природно-математичког факултета у Крагујевцу и Ботаничкој башти „Јевремовац“ Природно-математичког факултета у Београду, под бројем ВЕОУ 16405. Сакупљање хербе је вршено у летњем периоду од маја до августа 2010. године, а ризома у априлу и октобру исте године. Биљни материјал је сакупљан са природних станишта на подручју Шумарица (Крагујевац), села Опланић (Кнић) и села Доброселица (Златибор).

3.1.2. Припрема биљног материјала за екстракцију

Сакупљени биљни материјал је након раздвајања биљних органа сушен две недеље, на промајном месту, у хладу. Овако осушен биљни материјал до израде екстракта чуван је у стакленим посудама на температури 6-8⁰С. Непосредно пре екстракције биљни материјал је уситњен млином (Ика[®] А11 В, Немачка).

3.1.3. Добијање екстраката

Екстракцијом хербе и ризома добијени су инфузи Ph Jug IV (83). За екстракцију је коришћено 20 g осушене и уситњене хербе (*Pot.r-h*), односно ризома (*Pot.r-r*) и 300 ml дестиловане воде. 20 g дроге је наквашено са 20 g дестиловане воде и остављено на собној температури пет минута, како би дрога набубрела ради лакше екстракције. Преостала количина воде је загрејана до кључања и преливена преко дроге. Екстракти су уз повремено мешање остављени да одстоје 30 минута а затим процеђени. Дрога је преко навлажене вате на левку испрана кључалом водом, којом су добијени екстракти допуњени до 300 ml. Екстракти су остављени да одстоје 30 мин. како би се исталожиле баласте материје, а потом још једном процеђени преко навлажене вате. За добијање сувих екстраката коришћен је ротациони вакум упаривач на 40⁰С, 90 грт и 250 mbar вакум. (RV05 basic ИКА, Немачка). Приноси екстракције добијених екстраката изражени су као проценат у односу на 100 g дроге, приказани у табели бр. 4.

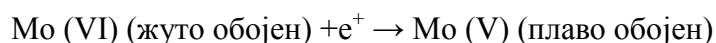
Табела 4. Принос добијених екстраката

| Ваучер | Таксон | Биљни делови | Принос (%) | Ознака узорка |
|------------|----------------------|--------------|------------|----------------|
| BEOU 16405 | <i>P. reptans L.</i> | Херба | 4.70 | <i>Pot.r-h</i> |
| | | Ризом | 3.07 | <i>Pot.r-r</i> |

3.2. Хемијска анализа водених екстраката *P. reptans*

3.2.1. Одређивање укупних фенола

Одређивање садржаја укупних фенола рађено је по стандардној методи модификованој за рад на микроплочама (84, 85). Метода се заснива на примени Folin-Ciocalteu реагенса (FC). Реагенс представља смешу фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. У присуству овог реагенса долази до оксидације фенолних једињења при чему се сам реагенс редукује до смеше волфрам-оксида и молибден-оксида. Реакција редукције (FC) реагенса је праћена променом боје из жуте у плаву услед настанка (фенол- $\text{MoW}_{11}\text{O}_{40}$)⁴⁻ јона.



Настала плава боја је стабилна и њен интензитет је сразмеран количини фенолних једињења. Интензитет боје је одређиван спектрофотометријски на таласној дужини 760 nm.

Раствори и реагенси коришћени у експерименту су:

1. FC реагенс (Fisher Scientific, UK): смеша фосфоволфрамове ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) и фосфомолибденске киселине ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$). 0,1M раствора FC реагенса припремљен је додавањем 1,25 ml 2M FC реагенса у одмерни суд од 25 ml и допуни дестилованом.
2. Раствор натријум карбоната (Analytika, Чешка Република), припремљен је растварањем 1,875 g анхидрованог Na_2CO_3 у 25 ml дестиловане воде при чему се раствор загрева док се целокупна количина соли не раствори. На овај начин се добија концентрација од 75 g/l Na_2CO_3 .

3. Стандардни раствор галне киселине је припремљен на следећи начин: 25 mg галне (Sigma Aldrich, Немачка) киселине се пренесе у нормални суд од 25 ml и допуни дестилованом водом. Добијена концентрација износи 1 mg/ml.
4. Сваки екстракт је припремљен у четири различите концентрације (0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml и 0,0625 mg/ml). Суви екстракти (5 mg) су квантитативно пренети у нормалне судове од 10 ml, растворени додавањем дестиловане воде. Овако је добијен раствор концентрације 0,5 mg/ml. 5 ml овог раствора је пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено. На исти начин су добијена и остала потребна разблажења.

Да би се експеримент спровео урађено је следеће:

Калибрациона крива. Од стандардног раствора галне киселине концентрације 1 mg/ml се одмери 1 ml пренесе у нормални суд од 10 ml и допуни дестилованом водом, при чему се добија раствор концентрације 0,1 mg/ml. коришћене су следеће запремине 1 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,5 ml; 0,4 ml; 0,3 ml; 0,2 ml, што одговара маси галне киселине у свакој од ових запремина: 0,1 mg; 0,08 mg; 0,06 mg; 0,05 mg; 0,04 mg; 0,03 mg; 0,02 mg. Свакој запремини се додаје FC реагенс (0,25 ml), натријум карбонат (1 ml) и дестилованом водом се допуне до 10 ml. Након тога мерена је апсорбанца ових стандардних раствора на 760 nm таласне дужине. На основу добијених вредности апсорбације стандардних раствора конструисана је калибрациона крива.

Радна проба. У резервоаре микроплоче одмерене су следеће запремине раствора: 30 μ l екстракта и 150 μ l FC реагенса. Након 6 минута инкубације додато је 120 μ l натријум карбоната, слика 5.

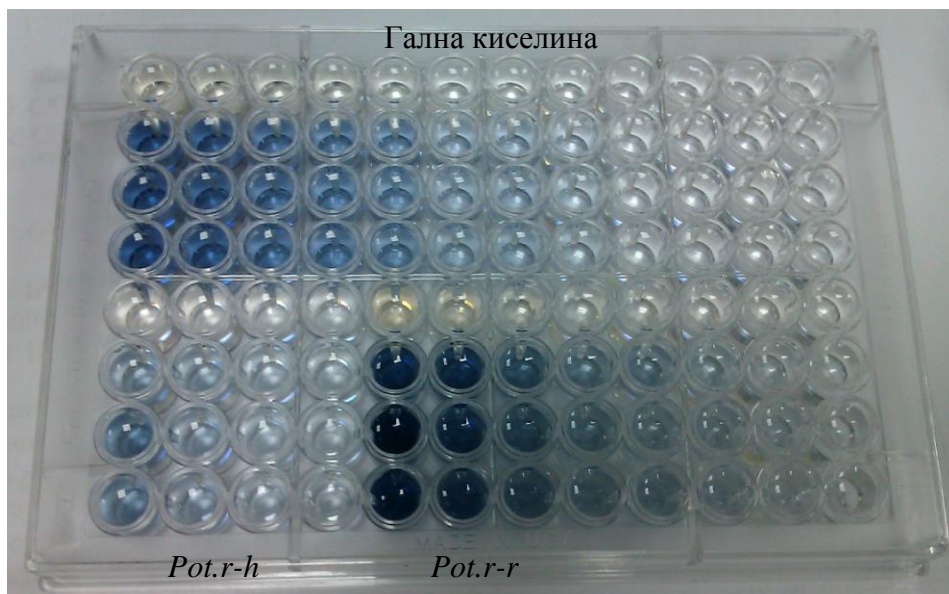
Корекција. У резервоаре микроплоче одмерене су следеће запремине раствора: 30 μ l екстракта и 150 μ l дестиловане воде. Након инкубације од 6 минута додато је 120 μ l натријум карбоната. Корекција је рађена за сваки екстракт ради елиминисања боје.

Слепа проба. У резервоаре микроплоче одмерене су следеће запремине раствора: 30 μ l дестиловане воде и 150 μ l FC реагенса. Након 6 минута инкубације додато је 120 μ l натријум карбоната.

На овај начин припремљене пробе су остављене 2 h, ради развијања боје, а затим измерене апсорбанце на спектрофотометру на таласној дужини 760 nm (Multiskan

Spectrum, Thermo Corporation). За сваку концентрацију одређивање се вршило у три понављања.

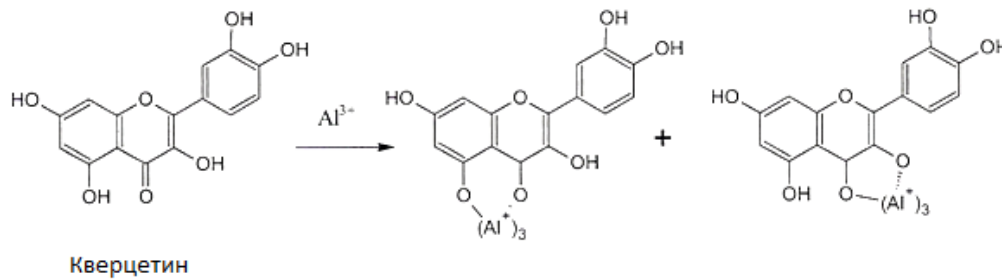
На основу измерених апсорбаци (средња вредност три мерења умањена за вредност апсорбанце корекције и слепе пробе), са калибрационе криве стандардног раствора галне киселине одређена је масена концентрација ($\mu\text{g/ml}$) полифенолних једињења коришћењем једначине праве $A = 0,065c_{\text{концентрација галне киселине}} (\mu\text{g/ml}) + 0,025$, $n = 7$, $R = 0,998$, а затим је садржај полифенолних једињења изражен као еквивалент галне киселине. Садржај укупних фенола је изражен као милиграм еквивалент галне киселине на 1g сувог екстракта.



Слика 5. Микроплоча након развијања боје у тесту одређивања укупних фенола (стандард галне киселине и екстракта *Pot.r-h* и *Pot.r-r*)

3.2.2. Одређивање саржаја укупних флавоноида

Одређивање садржаја укупних флавоноида рађено је по стандардној методи модификованој за рад на микроплочама (85, 86). Метода се заснива на особини флавоноида и флавоноидних гликозида да комплексирају јоне метала (Al^{3+}), при чему долази до померања апсорпционих трака у UV и VIS области ка вишим таласним дужинама, а боја раствора прелази из жуте у жутозелену, слика 6.



Слика 6. Настајање обојеног комплекса Al^{3+} јона и флавоноида

Концентрација укупних флавоноида је одређена коришћењем $AlCl_3$ као реагенса, а интензитет боје је одређиван спектрофотометријски на таласној дужини 415 nm.

Раствори и реагенси коришћени у експерименту су следећи:

1. $0,75 \text{ mol/dm}^3$ $AlCl_3$ (Centrohem, Србија): раствор $AlCl_3$ припремљен је растварањем $4,5 \text{ g } AlCl_3 \cdot 6H_2O$ у 25 ml дестиловане воде.
 2. 1 mol/dm^3 CH_3COONa (Centrohem, Србија): раствор CH_3COONa припремљен је растварањем $3,4020 \text{ g } CH_3COONa \cdot 3H_2O$ у 25 ml дестиловане воде.
 3. Стандардни раствор кверцетина припремљен је на следећи начин. $12,9 \text{ mg}$ кверцетин-хидрата (Sigma-Aldrich, Немачка) пренето је у нормални суд од 25 ml и растворено у метанолу (J.T.Baker, USA). Нормални суд је допуњен до црте метанолом. На овај начин је добијен раствор концентрације $0,516 \text{ mg/ml}$ кверцетин хидрата, односно $0,461 \text{ mg/ml}$ безводног кверцетина. Из овог раствора је припремљена серија разблажења помоћу кога је конструисана калибрациона крива.
 4. Сваки екстракт је припремљен у пет различитих концентрација (10 mg/ml , 5 mg/ml , $2,5 \text{ mg/ml}$, $1,25 \text{ mg/ml}$ и $0,625 \text{ mg/ml}$). Суви екстракти (100 mg) су квантитативно пренети у нормалне судове од 10 ml, растворени додавањем диметилсулфооксида (DMSO) и допуњени до црте. Овако је добијен раствор концентрације 10 mg/ml . Од овог раствора је узето 5 ml пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено водом. На исти начин су добијена и остала потребна разблажења.
 5. Диметилсулфоксид (DMSO) чистоте $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Немачка)
- Поступак спровођења експеримента је следећи:

Калибрациона крива. Од стандардног раствора кверцетин хидрата концентрације 0,516 mg/ml, односно 0,461 mg/ml безводног кверцетина, се узимају следеће запремине: 1,5 ml; 1,25 ml; 1,0 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,5 ml; 0,4 ml; 0,3 ml; 0,2 ml; 0,1 ml; 0,01 ml, што одговара следећим концентрацијама безводног кверцетина: 138,3 µg/ml; 115,3 µg/ml; 92,2 µg/ml; 73,8 µg/ml; 55,3 µg/ml; 46,1 µg/ml; 36,9 µg/ml; 27,7 µg/ml; 18,4 µg/ml; 9,2 µg/ml; 0,9 µg/ml. Свака запремина се пренесе у нормални суд од 5 ml и дода метанол. Растворима кверцетина у запремини од 1 ml одговарајућих концентрација се додају рствори DMSO-а, алуминијум хлорида и натријум ацетата, а дестилованом водом се допуне до 10 ml. Апсорбанца раствора је мерена на 415 nm таласне дужине. На основу добијених вредности апсорбанције конструисана је калибрациона крива апсорбанце од масене концентрације кверцетина који представља калибрациону криву, слика 7.

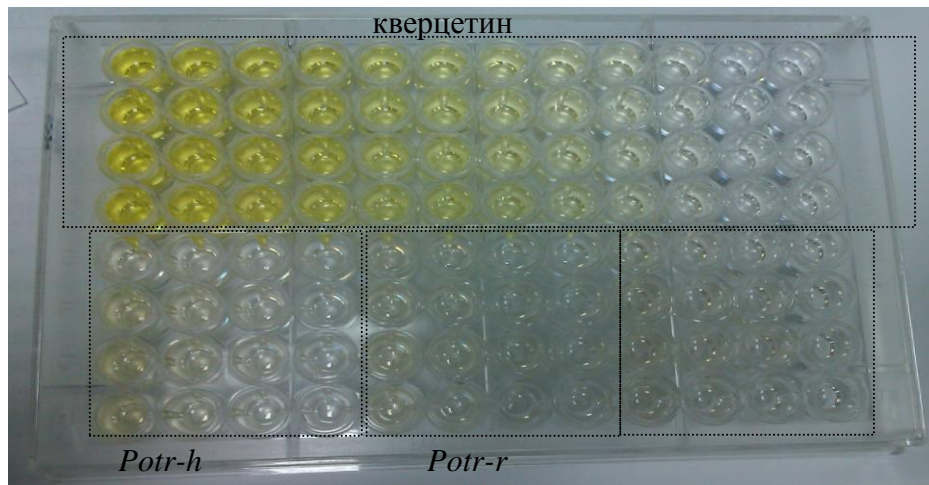
Радна проба. У резервоаре микроплоче одмерене су следеће запремине раствора: 30 µl екстракта одговарајуће концентрације, 90 µl метанола, 30 µl DMSO. Садржај је измешан и остављен 6 минута након чега је додат раствор 6 µl $AlCl_3 \cdot 6H_2O$, 6 µl CH_3COONa и 140 µl воде, слика 7.

Корекција. За корекцију су направљени раствори као и за радне растворе, с тим што је уместо 6 µl $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ додато 6 µl воде. Корекција је рађена за сваки екстракт ради елиминисања боје.

Слепа проба. За слепу пробу је урађен раствор додавањем 30 µl DMSO, 90 µl метанола, по 6 µl раствора $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ и CH_3COONa и 170 µl воде.

Апсорбанца припремљених проба мерена је спектрофотометром на таласној дужини 415 nm (Multiskan Spectrum Thermo Corporation). За сваку концентрацију одређивање је извршено у три понављања.

На основу измерених апсорбанци (средња вредност три мерења умањена за вредност апсорбанце корекције и слепе пробе), са калибрационе криве стандардног раствора кверцетина одређена је масена концентрација (µg/ml) укупних флавоноида коришћењем једначине праве $A = 0,045c_{\text{кверцетина}} (\mu\text{g/ml}) - 0,024$, $n = 11$, $R = 0,998$, а затим је садржај укупних флавоноида изражен као еквивалент кверцетина. Садржај укупних флавоноида је изражен као милиграм еквивалент кверцетина на 1g сувог екстракта.



Слика 7. Микроплоча након развијања боје у тесту одређивања укупних флавоноида (стандард кверцетина и екстракта *Potr-h* и *Potr-r*)

3.2.3. Одређивање садржаја проантоцијанидина

Одређивање садржаја кондензованих танина рађено је по стандардној методи (87). Метода се заснива на хидролизи проантоцијанидина до цијанидина у киселој средини, услед чега настаје црвено обојење чији се интензитет мери спектрофотометријски на таласној дужини 550 nm (Cecil CE 2021). Додатак јона Fe^{3+} побољшава поновљивост и осетљивост методе.

Раствори и реагенси коришћени у експерименту су следећи:

1. Ацетон (JT Baker, USA): 70% ацетон је припремљен додавањем 70 ml ацетона у одмерни суд од 100 ml и допуњен дестилованом водом.
2. Бутанол–HCl реагенс: припремљен је мешањем 95 ml н-бутанола (Poch, Пољска) са 5 ml HCl (Lach Ner, Чешка република) у одмерној тиквици од 100 ml.
3. Gvožđe(III)-амонијум-сulfат: припремљен је одмеравањем 4,15 ml HCl у одмерни суд од 25,0 ml и допуњен дестилованом водом ради добијања раствора концентрације 2 mol/dm³. У овако припремљен раствор HCl одмери се и раствори 0,25 g гвожђе(III)-амонијум-сулфата (Merck, Немачка). Реагенс је чуван у тамној боци.
4. Цијанидин хлорид чистоће $\geq 97\%$ (Carl Roth, Немачка): стандардни раствор цијанидин хлорида је припремљен растварањем 10 mg цијанидин хлорида у 1 ml 50% метанола (J.T.Baker, USA).

5. Сваки екстракт је припремљен у концентрацији од 10 mg/ml растварањем 100 mg сувог екстракта у 10 ml 70% ацетона. Екстракт *Pot.r-h* у концентрацији од 10 mg/ml је 20 пута разблажен 70% ацетоном при чему је добијена радна концентрација од 0,5 mg/ml. Од ове концентрације су добијене следеће радне концентрације: 0,25 mg/ml; 0,125 mg/ml и 0,0625 mg/ml. 10 mg/ml екстракта *Pot.r-r* је разблажено 200 пута при чему је добијена радна концентрација од 0,05 mg/ml. Од ове концентрације су добијене следеће радне концентрације: 0,025 mg/ml; 0,0125 mg/ml; и 0,00625 mg/ml.

Поступак извођења експеримента је следећи:

Калибрациона крива. Од стандардног раствора цијанидин хлорида концентрације 10 mg/ml одмери се 1 ml пренесе у нормални суд од 200 ml и допуни 70% ацетоном. Концентрација овако добијеног раствора је 50 µg/ml. Од овог раствора се одмери 5 ml пренесе у нормални суд од 10 ml и допуни 70% ацетоном. На исти начин је урађено и осталих пет разблажења. Добијени раствори имају следеће концентрације: 50,0 µg/ml; 25,0 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,25 µg/ml; 3,12 µg/ml; 1,56 µg/ml; 0,78 µg/ml. Од сваког раствора се узима 0,5 ml додаје 3,0 ml бутанол хлорида и 0,2 гвожђе амонијум сулфата. Након мешања раствора мери се апсорбанца на таласној дужини 550 nm. На основу добијених вредности апсорбанције конструисан је график зависности апсорбанце од масене концентрације цијанидина.

Радна проба. Одмерене су следеће запремине раствора: 0,5 ml екстракта, 3,0 ml бутанол хлорида и 0,2 ml гвожђе амонијум сулфата.

Корекција. Корекција се ради на исти начин као и радна проба са изузетком реагенса бутанол хлорида који изостаје и уместо њега се додаје 3,0 ml 70 % ацетона.

Слепа проба. Слепа проба се изводи на исти начин као и радна проба где у њен састав уместо екстракта улази 0,5 ml 70 % ацетона.

Све пробе су рађене у трипликатима, где су радне и слепе пробе инкубиране у воденом купатилу на 95°C 40 min, након чега су извађене и охлађене 5 минута у хладној води. Корекције су инкубиране 40 min. на собној температури. Апсорбанција свих узорака је читана на таласној дужини 550 nm.

На основу измерених апсорбанци са калибрационе криве цијанидина одређена је масена концентрација (µg/ml) кондензованих танина коришћењем једначине праве

$A = 0,1089c_{\text{цијанидин}} - 0,0021$; $n = 7$; $R = 0,999$ а затим је садржај танина изражен као еквивалент цијанидина. Кондензовани танини су представљени као милиграм еквивалент цијанидина на грам сувог екстракта.

3.2.4. Квалитативно и квантитативно одређивање фенолних једињења

Високо ефикасна течна хроматографија (HPLC- Agilent Technologies 1200 Series, USA) уз масеноспектрометријску детекцију (LC-MS-MS) са електроспреј јонским извором (ESI) (Agilent Technologies 6410A TripleQuad, USA) коришћена је за раздвајање и квантитативно одређивање фенолних једињења у екстрактима. Хроматографско раздвајање је спроведено на колони Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μm). Мобилну фазу чини систем растварача А = 0,05 % НСООН, Б = МеОН, чији је проток 1 ml/мин. Раздвајање компоненти је изведено у градијентном моду (0-6 мин 30 % Б, 6 мин 70 % Б, 9–12 мин 100 % Б, задњих 3 мин 30% Б). Инјектовано је 5 μl екстракта, односно раствора стандарда. Једињења су раздвојена на колони, термостатираној на 50 °С. Припремљени екстракти разблажени су мобилном фазом (0,05 % НСООН: МеОН, 1:1) до концентрације од 20 mg/ml и 2 mg/ml. Референтни стандарди, 45 супстанци (Fluka chemie AG, Швајцарска), примењено је у опсегу концентрација од 1,5 ng/ml до 25 $\mu\text{g/ml}$. Параметри јонског извора били су: негативни поларитет, притисак гаса 40 psi, проток гаса за сушење (N_2) 9 l/min и температура 350°C, напон на капилари 4 kV. Добијени резултати анализирани су употребом софтвера (MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis (B.03.01)).

Фенолна једињења у узорцима идентификована су поређењем ретенционих времена ових једињења са ретенционим временом стандарда за сваку компоненту. Коришћени стандарди су приказани у табели бр. 5. За квантификацију једињења у узорцима коришћене су калибрационе криве у уском опсегу концентрација, 5–6 тачака у околини циљне концентрације. За сваки стандард конструисана је калибрациона крива зависности површине пика од масене концентрације. Масене концентрације једињења у узорцима израчунате су из једначине линеарне зависности одговарајућег стандарда.

Табела 5. Стандарди коришћени у анализи

| Једињење | M _w | t _R [min] | V _f [V] | m/z prekurso ra | m/z produkta | V _{col} [V] |
|--|----------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-------------------------|
| хинска киселина | 192 | 0.52 | 150 | 191 | 85 | 20 |
| гална киселина | 170 | 0.58 | 90 | 169 | 125 | 10 |
| катехин | 290 | 0.74 | 150 | 289 | 245 | 10 |
| протокатехинска киселина | 154 | 0.79 | 105 | 153 | 109 | 9 |
| 5-О-кафеоилхинска киселина | 354 | 0.8 | 100 | 353 | 191 | 10 |
| епигалокатехин галат | 458 | 0.81 | 165 | 457 | 169 | 16 |
| епикатехин | 290 | 0.95 | 150 | 289 | 245 | 10 |
| гентизинска киселина | 154 | 1.03 | 100 | 153 | 109 | 9 |
| <i>p</i> -хидроксибензоева киселина | 138 | 1.08 | 80 | 137 | 93 | 10 |
| ескулетин | 178 | 1.13 | 105 | 177 | 133 | 15 |
| кафена киселина | 180 | 1.18 | 100 | 179 | 135 | 10 |
| ванилинска киселина | 168 | 1.24 | 100 | 167 | 108 | 15 |
| сирингинска киселина | 198 | 1.31 | 90 | 197 | 182 | 7 |
| <i>p</i> -кумаринска киселина | 164 | 1.69 | 90 | 163 | 119 | 9 |
| умбелиферон | 162 | 1.73 | 120 | 161 | 133 | 19 |
| скополетин | 192 | 1.77 | 80 | 191 | 176 | 8 |
| ферулна киселина | 194 | 1.9 | 90 | 193 | 134 | 11 |
| витескин | 432 | 1.9 | 200 | 431 | 311 | 22 |
| синапинска киселина | 224 | 1.92 | 100 | 223 | 193 | 17 |
| цинарозид | 448 | 2.13 | 230 | 447 | 285 | 30 |
| хиперозид | 464 | 2.16 | 200 | 463 | 300 | 30 |

| | | | | | | |
|--------------------------------------|-----|------|-----|-----|-----|----|
| <i>изокверцетин</i> | 464 | 2.25 | 210 | 463 | 300 | 30 |
| <i>рутин</i> | 610 | 2.33 | 135 | 609 | 300 | 42 |
| <i>апиин</i> | 564 | 2.6 | 250 | 563 | 269 | 36 |
| <i>о-кумаринска киселина</i> | 164 | 2.62 | 100 | 163 | 119 | 5 |
| <i>мирцетин</i> | 318 | 2.67 | 150 | 317 | 179 | 20 |
| <i>кверцетин</i> | 448 | 2.75 | 190 | 447 | 300 | 27 |
| <i>астрагалин</i> | 448 | 2.8 | 190 | 447 | 284 | 30 |
| <i>косметин</i> | 432 | 2.81 | 135 | 431 | 268 | 41 |
| <i>секоизоларицирезинол</i> | 362 | 2.9 | 130 | 361 | 165 | 26 |
| <i>3,4-диметоксициметна киселина</i> | 208 | 2.99 | 110 | 207 | 103 | 7 |
| <i>бајкалин</i> | 446 | 3.4 | 140 | 445 | 269 | 22 |
| <i>даидзеин</i> | 254 | 3.43 | 145 | 253 | 208 | 31 |
| <i>матаирезинол</i> | 358 | 3.66 | 130 | 357 | 122 | 24 |
| <i>кверцетин</i> | 302 | 3.74 | 130 | 301 | 151 | 15 |
| <i>нарингенин</i> | 272 | 3.87 | 130 | 271 | 151 | 16 |
| <i>циметна киселина</i> | 148 | 3.91 | 100 | 147 | 103 | 5 |
| <i>лутеолин</i> | 286 | 4.03 | 135 | 285 | 133 | 25 |
| <i>генистеин</i> | 270 | 4.12 | 145 | 269 | 133 | 32 |
| <i>кемферол</i> | 286 | 4.55 | 130 | 285 | 285 | 0 |
| <i>апигенин</i> | 270 | 4.71 | 130 | 269 | 117 | 25 |
| <i>изорамнетин</i> | 316 | 4.79 | 160 | 315 | 300 | 21 |
| <i>кризоериол</i> | 300 | 4.82 | 125 | 299 | 284 | 20 |
| <i>бајкалеин</i> | 270 | 5.15 | 165 | 269 | 269 | 0 |
| <i>аментофлавоин</i> | 538 | 5.78 | 220 | 537 | 375 | 35 |

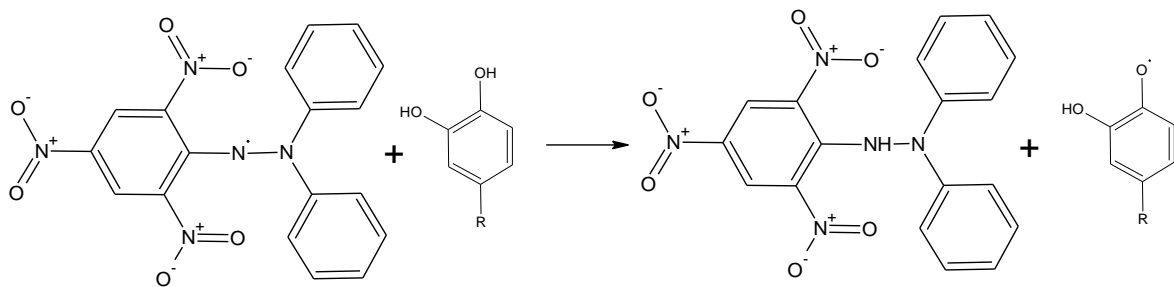
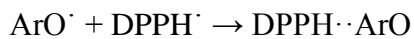
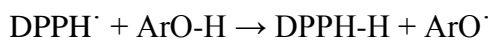
M_w – молекулска маса једињења; t_R – ретенционо време; V_f – напон фрагментора [V];

V_{col} – колизионни напон

3.2.5. Одређивање антиоксидантне активности

Капацитет за неутралисање слободних радикала испитиваних екстраката одређен је DPPH тестом који мери способност екстракта да неутралише DPPH[•] (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) радикале (88). DPPH[•] је стабилан слободни радикал љубичасто обојен. Метода се заснива на праћењу трансформације DPPH[•] радикала у редуковану, жуто обојену форму (DPPH-H) која настаје у присуству антиоксидантне компоненте. Појава жуте боје раствора објашњава се способношћу појединих компонената из екстракта да делују као доноси водоника или електрона при чему DPPH[•] радикал прелази у редуковани, неутрални DPPH-H облик. Неутрализација DPPH[•] радикала фенолним једињењима може се објаснити помоћу два механизма:

1. Фенолно једињење предаје H атом DPPH[•] радикалу, услед чега настаје редуковани, неутрални DPPH-H облик и арилокси радикал који је резонантно стабилизован што је приказано на слици 8.
2. Арилокси радикал може да реагује са још једним DPPH[•] радикалом при чему долази до кондензације и ствара се неутралан молекул. Реакција кондензације је приказана на следећи начин:



Слика 8. Механизам неутралисања DPPH[•] радикала помоћу фенолних једињења.

Интензитет жуте боје је одређен спектрофотометријски на таласној дужини 515 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific).

Раствори и реагенси коришћени у експерименту су следећи:

1. DPPH реагенси:

- Основни раствор DPPH, 3 mM ($c=1,18 \mu\text{mol/ml}$), припремљен је одмеравањем 11,8 mg DPPH реагенса (Fluka, Швајцарска) који је квантитативно пренет у нормални суд од 10 ml а затим је допуњен апсолутним етанолом (Зоркафарма, Србија). Овај реагенс је стабилан две недеље и чува се на тамном месту.
- Радни DPPH реагенс 67,2 μM ($c=26,4 \mu\text{g/ml}$), је припремљен на дан мерења разблаживањем основног раствора. 560 μl основног DPPH реагенса је пренето у нормални суд од 25 ml који је потом допуњен метанолом (J.T. Baker, USA).

2. Стандардни раствори коришћених једињења припремљени су у метанолу (J.T. Baker, USA) при чему су добијене следеће концентрације: 2010 $\mu\text{g/ml}$ бутилован хидроксид толуола чистоће 99% (Alfa Aesar, USA) (BHT), 500 $\mu\text{g/ml}$ бутилован хидрокси анизол (Merck, Немачка) (BHA), 461 $\mu\text{g/ml}$ кверцетин (Sigma Aldrich, Немачка), 470,3 $\mu\text{g/ml}$ рутина (Fluka, Швајцарска), 552 $\mu\text{g/ml}$ пропил-галат (Alfa Aesar, USA) (PG). Разблажења стандардних раствора за потребе DPPH теста, припремљена су у диметилсулфоксиду чистоће $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Немачка).

3. Испитивани екстракти су припремљени у седам различитих концентрација. Почетне концентрације екстракта *Pot.r-h* су следеће: 5,0 mg/ml; 2,5 mg/ml; 1,25 mg/ml; 0,625 mg/ml; 0,313 mg/ml; 0,156 mg/ml; 0,078 mg/ml). Суви екстракт (50 mg) је пребачен у нормални суд од 10 ml и додат раствор DMSO-а. Овако је добијен раствор концентрације 5 mg/ml. Од овог раствора је узето 5 ml пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено водом. На исти начин су добијена и остала потребна разблажења. Почетне концентрације екстракта *Pot.r-r* су: 0,345 mg/ml; 0,172 mg/ml; 0,086 mg/ml; 0,043 mg/ml; 0,022 mg/ml; 0,011 mg/ml; 0,005 mg/ml. Разблажења су добијена на исти начин као и код предходног екстракта.

4. Диметилсулфоксид (DMSO) чистоће $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Немачка).

Поступак извођења експеримента је следећи:

За одређивање антиоксидантне активности припремљене су по три пробе за сваку концентрацију и једна корекција ради елиминисања боје на следећи начин:

Радна проба. У резервоаре микроплоча за потребе радне пробе одмеравају се следеће запремине раствора: 100 μl радног раствора DPPH, 10 μl екстракта одговарајуће почетне концентрације, 190 μl метанола. На овај начин су све почетне концентрације оба екстракта разблажене тридесет пута па радне концентрације екстракта *Pot.r-h* су следеће: 166,7 $\mu\text{g/ml}$; 83,33 $\mu\text{g/ml}$; 41,67 $\mu\text{g/ml}$; 20,83 $\mu\text{g/ml}$; 10,42 $\mu\text{g/ml}$; 5,208 $\mu\text{g/ml}$;

2,604 µg/ml, а за екстракт *Pot.r-r* су: 11,49 µg/ml; 5,747 µg/ml; 2,874 µg/ml; 1,437 µg/ml; 0,718 µg/ml; 0,359 µg/ml; 0,18 µg/ml.

Корекција. У резервоаре микроплоча одмерава се 10 µl екстракта и 290 µl метанола. Апсорбанца овог раствора се мери ради кориговања боје екстракта.

Контрола. У резервоаре микроплоча се одмерава 100 µl радног раствора DPPH, додаје се 10 µl DMSO и 190 µl метанола.

Након мешања направљени раствори морају да одстоје 60 мин на собној температури. Апсорбанца добијених раствора се мери спектрофотометријски на 515 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific). Све пробе су рађене у три понављања.

За сваку концентрацију екстракта израчунат је капацитет неутралисања DPPH радикала (RSC% - Radical Scavenging Capacity) према формули:

$$RSC\% = 100 \cdot (1 - (\bar{A}_{\text{проба}} - A_{\text{корекција}}) / \bar{A}_{\text{контрола}})$$

где је:

RSC% - способност везивања радикала (процент неутралисаних DPPH радикала)

$\bar{A}_{\text{проба}}$ - средња вредност апсорбанце радних проба за дату концентрацију

$A_{\text{корекција}}$ - апсорбанца корекције за дату концентрацију

$\bar{A}_{\text{контрола}}$ - средња вредност апсорбанце контролних проба

За сваки испитани узорак графички је представљена зависност процента неутралисаних DPPH радикала од радне концентрације екстракта. Радна концентрација екстракта је концентрација екстракта у резервоару микроплоче, а однос почетне и радне концентрације је дат следећом формулом:

$$C_{\text{радна}} = 1000 \cdot C_{\text{почетна}} \cdot V_{\text{ек}} / V_{\text{ук}} = 33,33 \cdot C_{\text{почетна}}$$

$C_{\text{радна}}$ - концентрација екстракта у резервоару микроплоче (µg/ml)

$C_{\text{почетна}}$ - концентрација разблаженог екстракта која је одмерена у резервоару (mg/ml)

$V_{\text{ек}}$ - запремина екстракта у резервоару 10 µl

$V_{\text{ук}}$ - запремина реакционе смеше у резервоару, 300 µl

1000- фактор конверзије mg/ml у µg/ml.

Методом најмањих квадрата одреди се једначина праволинијске зависности RSC% од концентрације (µg/ml). Антиоксидантна активност је изражена преко IC₅₀ што представља концентрацију екстракта (µg/ml), односно стандарда потребну за

неутралисање 50% DPPH радикала у *in vitro* условима. Што је вредност IC₅₀ мања то је антиоксидантна активност екстракта већа.

Једначина праволинијске зависности се одређује за сваки узорак. Вредности IC₅₀ се могу добити из једначине праве или читавањем са графика.

Коришћени стандарди: ВНТ-а, ВНА, кверцетин, рутин и РГ су испитивани на исти начин као и узорци. Испитивања су рађена у седам различитих концентрација, а из добијених једначина праве су очитане одговарајуће IC₅₀ вредности.

3.3. Испитивање антиинфламаторне активности

Испитивање антиинфламаторне активности екстраката је изведено на животињском моделу (89, 90). Инфламација је изазвана наношењем средства за иритацију на ухо мишева. Наношењем ацетонског раствора фенола на површину уха долази до појаве локалне, акутне, запаљенске реакције (стварање едема) (91). Третираним животињама су апликовани екстракти, а контролним животињама дестилована вода односно дексаметазон, 15 минута пре апликације иритантног агенса. Свим тестираним групама поменуте супстанце су апликоване са спољашње и унутрашње стране десног уха. Један сат након индукције инфламације мишеви су жртвовани предозирањем у етарској анестезији и оба уха су уклоњена. Едем уха је мерен један сат након апликације иритантног агенса, а изражен је као разлика између тежине левог и десног уха. Експеримент је одобрен од стране етичког комитета Медицинског факултета у Крагујевцу број 016427/2.

Раствори и реагенси коришћени у експерименту су:

1. Дексаметазон (Дексазон[®] 4 mg/ml, Галеника, Србија). За потребе експеримента се користи 0,08 mg дексаметазона који се на ухо експерименталне животиње наноси у облику 20 µl раствора концентрације 4 mg/ml.
2. 10 % фенол у ацетону. Овај раствор је припремљен на следећи начин. 1 g фенола (Зоркафарма, Србија) је одмерено и пренето у нормални суд од 10 ml. Фенол је растворен додатком ацетона (JT Baker, USA) и допуњен.
3. Сваки екстракт је припремљен у три различите концентрације 500 mg/ml, 250 mg/ml, 125 mg/ml. Суви екстракт 500 mg је растворен у 1 ml дестиловане воде. Од овог раствора је узето 0,5 ml и разблажено водом до 1 ml, при чему је добијена концентрација од 250 mg/ml. На исти начин је направљено и треће разблажење.
4. Дестилована вода

3.3.1. Експерименталне животиње

У експерименту су коришћени мишеви BALB/c соја, оба пола, старости 5-6 недеља. Набављени из узгајалишта Војномедицинске академије у Београду, Србија. Животиње су боравиле у еколошки контролисаним и дефинисаним условима, на собној температури 22⁰С уз 12-часовни циклус светла и таме и константну влажност ваздуха. До експеримента су чувани у металним кавезима у групама од по три животиње, где су имали неограничен приступ брикетираној храни (Ветеринарски завод Земун) и води. Животиње су 15 часова пре експеримента лишене хране, а воду су добијале у неограниченим количинама. Експеримент је спровођен у складу са смерницама Националног института за здравље за третман лабораторијских животиња.

3.3.2. Поступак

Све животиње су подељене у осам група, у свакој је било по осам животиња. Шест група је третирано са различитим концентрацијама испитиваних екстраката *Pot.r-h* и *Pot.r-r*, у запремини од 20 μ l при чему су нанете следеће количине екстраката (2,5; 5,0 и 10,0 mg/уху). Једна контролна група је примала дестиловану воду, а друга дексаметазон у концентрацији од 0.08 mg/уху. 15 минута након апликације испитиваних супстанци на исти начин је нането и 20 μ l ацетонског раствора фенола као иритирајућег агенса.

Један сат након индукције инфламације животиње су жртвоване у етарској анестезији и оба уха су уклоњена, а маса уха је мерена на аналитичкој ваги. Разликом у маси између десног и левог уха третираних животиња, наспрам разлика у маси десног и левог уха контролне групе која је примала дестиловану воду мерен је постигнути антиинфламаторни ефекат.

Антиинфламаторни ефект је рачунат као проценат инхибиције едема у третираној групи у поређењу са контролном групом уз коришћење једначине:

$$\% \text{ проценат инхибиције едема} = 100 [(R_t - L_t)/(R_c - L_c)]$$

R_t = средња тежина десног уха третираних животиња

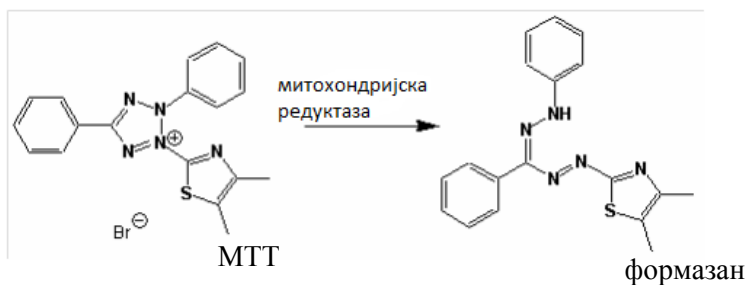
L_t = средња тежина левог уха третираних животиња

R_c = средња тежина десног уха контролних животиња

L_c = средња тежина левог уха контролних животиња

3.4. Испитивање цитотоксичне активности

Испитивање цитотоксичних ефеката екстракта *Pot.r-h* и *Pot.r-r* је изведено уз помоћ МТТ теста (92). Овај тест одређује вијабилност ћелија индиректним методом тако што прати редукцију МТТ [3-(4, 5-диметилтиазол-2-ил)-2, 5-дифенилтетразолијум бромид] (Sigma Aldrich, Немачка) у формазан. МТТ је једињење жуте боје, растворљиво у води, које лако пролази кроз ћелијске мембране. Услед присуства ензима митохондријалне редуктазе, МТТ се редукује до несолубилних кристала формазана љубичасте боје. С обзиром да је присуство ензима карактеристика само живих ћелија редукција МТТ-а је пропорционална броју ових ћелија (92). Редукција МТТ до формазана приказана је на слици 9.



Слика 9. Реакција редукције МТТ до љубичастог формазана

Ефикасност екстраката се одређује поређењем интензитета боје код ћелија изложених медијуму (негативна контрола) и интензитета ћелија изложених испитиваним екстрактима. Интензитет боје се одређује спектрофотометријски на таласној дужини 590 nm (Zenith 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Аустрија).

Због одсуства података о цитотоксичности за водени екстракт биљака из рода *Potentilla* обављен је пилот тест за одређивање ефективне концентрације која би довела до појаве цитотоксичности (52). Тестиране су концентрације 5-160 $\mu\text{g/ml}$, а позитиван резултат је примећен при концентрацији од 160 $\mu\text{g/ml}$. У експерименту су затим коришћене концентрације екстраката 100 – 800 $\mu\text{g/ml}$ за процену цитотоксичности (100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$, 400 $\mu\text{g/ml}$, 600 $\mu\text{g/ml}$, и 800 $\mu\text{g/ml}$) растварањем у RPMI-1640 медијуму (Gibco, Енглеска).

Експеримент је спроведен на 4Т1- ћелијској линији мишјег тумора дојки (ATCC-American Type Culture Collection). Ова ћелијска линија је одржавана у RPMI-1640 медијуму у инкубатору 24 часа (37° C, 5% CO₂). Ћелије су користиле 0,25 % trypsin (Hyclone) (93).

Ћелије су смештене у резервоаре микроплоче при густини од 4000 ћелија по резервоару, при чему је био присутан RPMI-1640 медијум на 37°C са 5 % CO₂. Овако припремљена ћелијска култура је остављена да преноћи и након целоноћног раста, ћелије су третиране различитим тест концентрацијама екстракта ризома и хербе *P. reptans L.* Иста ћелијска линија гајена под истим условима без присуства екстракта је послужила као негативна контрола. Након инкубације течност из сваког резервоара је уклоњена, а додато је 100 µl 15 % МТТ раствора. Овако припремљене ћелије су и инкубирани у влажној атмосфери на 5 % CO₂, 37°C, током 4 h. На крају инкубације МТТ је уклоњен и додато је 150 µl DMSO/по резервоару ради растварања кристала формазана. Ова смеша је инкубирана 30 мин. на собној температури уз непрекидно мешање. Оптичка густина је мерена на 590 nm (Zenith 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Аустрија) (92, 94). Сваки тест је рађен у трипликату. Цитотоксичност је представљена графички у функцији концентрације екстракта.

Цитотоксичност екстракта је израчуната на основу једначине:

$$\% \text{ Виабилност} = \bar{A} \text{ третираних ћелија} / \bar{A} \text{ негативне контроле} \times 100$$

$$\% \text{ Цитотоксичност} = 100 - \% \text{ Виабилности}$$

\bar{A} третираних ћелија - средња вредност апсорбанце третираних ћелија

\bar{A} негативне контроле - средња вредност апсорбанце негативне контроле

3.5. Испитивање антихистаминске активности

Антихистаминска активност је одређивана мерењем контракције истмичних сегената изолованог јајовода, а ефекти тестираних супстанци изражени су као површина испод криве степена контракција (AUC) (95).

Антихистаминска активност екстракта је испитивана на изолованим хуманим јајоводима, добијених током абдоминалне хистеректомије са аднексектомијом. У експерименту је коришћено једанаест јајовода, од једанаест различитих пацијената. Сви оперисани пацијенти су били у лутеалној фази менструалног циклуса, која је потврђена на основу дана циклуса и макроскопског посматрања. Просечна старост пацијената је била 40,2 ± 4,5 година. Експеримент је одобрен од стране етичког комитета Клиничког центра „Крагујевац“, а сви пацијенти су потписали пристанак.

Јајоводи су сакупљани у периоду 2010 - 2011 године у Гинеколошкој клиници Клиничког центра „Крагујевац“, током осам месеци, при чему су сакупљени неоштећени узорци исте величине. Ниједан пацијент није примао полне хормоне два месеца пре операције. Сви пацијенти су оперисани у општој анестезији, где су били претходно третирани са 0,5 mg атропина интрамускуларно, 1 h пре доласка у операциону салу. Анестетици коришћени током анестезије код свих пацијената су били N₂O, фентанил и дроперидол. Анестезија је индукована интравенском применом тиопентала, а релаксација мишића сукцинил-холином и панкуронијумом.

Иzolовани препарати: Око 15 минута после оперативног одстрањивања јајовода, изоловани препарати су смештени у резервоар са De Jalons-овим раствором (154 mM NaCl, 5.95 mM NaHCO₃, 5.63 mM KCl, 0.54 mM CaCl₂·2H₂O, 2.78 mM глукозе) уз довод гаса (95% O₂ и 5% CO₂, 5 ml/мин) и транспортовани у лабораторију.

Истмични сегмент јајовода је изолован при чему је сероза уклоњена. Само ови делови јајовода следећих димензија су коришћени у експерименту: 4 cm дужина, 1,3 mm дебљина зида и пречник лумена 1 mm. Препарати су смештени лонгитудинално у купатило, аналогно Магнус препаратима илеума пацова.

Један крај изолованог препарата је био спојен са дном купатила, а други са полугом изометријског трансдјусера и тензија изолованих препарата је константно праћена преко трансдјусера (Palmer Bio Science, Los Angeles, CA, USA) и бележена на компјутеру уз коришћење софтвера (Majk Electronic, Mladenovac, Србија). Препарати су били изложени статичком оптерећењу од 1 mN, уз могућност уравнотежења 1 h пре експеримента (95).

Реагенси коришћени у овом експерименту су:

1. хистамин дихидрохлорид (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), За потребе студије хистамин је растворен у дестилованој води.
2. екстракт *Pot.r-h* и *Pot.r-r*. Суви остатак је растворен у физиолошком раствору 0,9 % NaCl.

Агонисти и антагонисти. Контракција изолованих препарата мерена је као подручје испод криве (AUC). AUC за тоничне контракције је мерена од хоризонталне линије која је екстраполирана на базалну линију (регистровано пре додавања агониста у изоловано органско купатило) до линије настале након додавања агониста у

изоловано органско купатило (линија која повезује јачину фазних контракција). AUC за фазне контракције након сваке концентрације агониста је мерена као сума свих AUC пикова снимљених после дате концентрације, а до додавања нове концентрације агониста у купатило.

На почетку сваког експеримента, најмање један сат, бележена је спонтана активност у циљу евидентирања спонтаног смањења ритмичких контракција. Ако је код неког препарата уочен пад спонтаних контракција, то је узето у обзир приликом рачунања смањења ритмичких контракција добијених одговарајућом дозом агониста, да би се приказао чист ефекат агониста (96).

Агонисти су додавани у изоловано купатило органа кумулативно, без испирања органа пре додавања наредне дозе агониста. Размак између давања наредне дозе агонисте је био увек 5-6 минута. Након кумулативног додавања свих доза агонисте, купатило је испрано три пута, а изоловани препарат је остављан да одстоји наредних 30 минута. У одвојеним експериментима антагонисти су додавани у каду 20 минута пре агониста. Ефекат сваке испитиване супстанце је посматран на најмање четири изолована препарата од различитих појединаца.

Ефекат сваке концентрације хистамина на тонус и спонтане контракције је изражен као проценат од максималног добијеног ефекта и коришћен је за конструисање дозно – зависне криве (97, 98).

3.6. Испитивање антимикуробне активности

У циљу утврђивања могуће антимикуробне активности у *in vitro* условима тестирани су водени екстракти *Pot.r-h* и *Pot.r-r* на једну гљивицу и четири стандардна АТСС бактеријска соја коришћењем агар-дифузионе методе (99). Стандардни бактеријски сојеви коришћени у тесту су: *Klebsiella pneumoniae* АТСС 700603, *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 и *Escherichia coli* АТСС 25922, као и гљивица *Candida albicans* АТСС 10231.

Као стандарди су у тесту коришћени цефтриаксон (30 µg/диск) и нистатин (100 П/диск), а као негативна контрола дестилована вода.

Испитивани узорци у концентрацијама од 100 mg/ml, 10 mg/ml, 1 mg/ml, 100 µg/ml, и 10 µg/ml су припремљени на следећи начин: 100 mg сувог екстракта се раствори додавањем 1 ml дестиловане воде при чему се добија концентрација од 100

mg/ml. Разблаживањем ове концентрације десет пута дестиливаном водом добија се 10 mg/ml. На исти начин се добијају и друга разблажења. Накнадно су припремљене на исти начин следеће концентрације: 50 mg/ml, 75 mg/ml и 150 mg/ml.

За испитивање осетљивости бактерија коришћена је Милер-Хинтон агар подлога (HiMedia Laboratories, Индија, LOT 0000099844), а за гљивицу *Candida albicans* Sabouraud агар подлога (Институт за имунологију и вирусологију „Торлак“, Београд).

Концентрација бактеријских бујона је разблажена (10^2 организма/ml) и од сваког бујона је коришћена запремина 0,1 ml, која је нанесена на плоче агара помоћу стерилних шприцева и равномерно распрострајена по површини плоче. На плочи је било присутно око 10^4 бактерија. Потом је подлога са одговарајућим сојем разливана у стерилне Петријеве шоље промера 90 mm, тако да је дебљина агара након очвршћавања била око 4 mm. Резервоари пречника од 12 mm направљени су у агару и изведено је иницијално одређивање концентрације која инхибира раст бактерија пуњењем резервоара са 150 μ l биљних екстраката. Позитиван резултат је детектован при концентрацији од 10 mg/ml, односно 100 mg/ml, тако да су даља испитивања настављена при већим концентрацијама.

Овако припремљене агар плоче су инкубирани на 37°C , 24 h. Дијаметри зоне инхибиције биљних екстраката су мерене и упоређиване са вредностима стандардних супстанци. Зона инхибиције је одређена мерењем пречника у милиметрима (приказане вредности пречника зоне инхибиције су умањене за пречник резервоара 12 mm), а у случајевима када је пречник инхибиторне зоне био мањи или једнак 12 mm, испитивани узорак се сматрао неактивним (99).

3.7. Статистичке методе

3.7.1. Антиинфламаторна активност

Статистичка обрада резултата је извршена помоћу једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) и теста Dunnett T3 post hoc. Индикатором статистичке значајности разлике између експерименталних група се сматра $p < 0,05$. Сва статистичка израчунавања су рађена уз употребу SPSS софтвера верзија 18.

3.7.2. Цитотоксична активност

За статистичку анализу цитотоксичне активности је коришћен SPSS софтвер. Инхибиторне концентрације (IC_{50}) су за оба екстракта одређиване линеарном

регресионом анализом ($p < 0,05$). За статистичку анализу између тестираних концентрација оба екстракта коришћен је тест једнофакторске анализе варијансе (ANOVA) ($p < 0.01$).

3.7.3. Антихистаминска активност

Дозно зависна повезаност је одређивана линеарном регресијом рачунатом према методи најмањих квадрата. Вредности коришћене у линеарној регресији су 15% - 85% максималног одговора. Концентрација агонисте која изазива 50% свог максималног одговора (EC_{50}) и негов интервал поверења ($1,96 \times$ стандардна грешка) су одређивани графички (за сваку криву) линеарном интерполацијом.

Резултати су изражени као средња вредност \pm 95% интервал поверења. Статистичка разлика између (EC_{50}) контролне криве и (EC_{50}) у присуству екстракта су одређиване Студент Т-тестом. Вредност $p < 0,05$ је сматрана статистички значајном.

3.7.4. Статистичка анализа антимицробне активности

Вредности зона инхибиције за сваки диск су приказане дијаграмом расипања, а линеарне регресионе праве су рачунате методом најмањих квадрата.

4. Резултати

4.1. Хемијски састав водених екстраката хербе и ризома *P. reptans*

Хемијском анализом водених екстраката хербе и ризома *P. reptans* уочено је присуство неколико важних група једињења. У оба екстраката су идентификована фенолна једињења, флавоноиди и процијанидини што је приказано у табели бр. 6.

Табела 6. Квантитативна анализа водених екстраката *P. reptans* (*Pot.r-h* и *Pot.r-r*)

| Групе једињења | <i>Pot.r-h</i> | <i>Pot.r-r</i> |
|--|----------------|----------------|
| Укупни феноли (mg GA ^a /g) | 116.0 ±16 | 468.6 ±60 |
| Укупни флавоноиди (mg Q ^b /g) | 10.1 ±1 | 3.9±2 |
| Садржај процијанидина (mg C ^c /g) | 1.11±0.30 | 98.4±4.3 |

^aGA-гална киселина, ^bQ- кверцетин, ^cC- цијанидин-хлорид

Једињења која су најзаступљенија у херби су: хлорогенска киселина 758 mg/kg, хинска киселина 164 mg/kg, кафена киселина 78.7 mg/kg, рутин 49,1 mg/kg кверцитрин 47,5 mg/kg. Садржај катехина у ризому је износио 20103 mg/kg. Садржај деривата фенолних киселина и флавоноида је приказан у табелама бр. 7 и 8. Сlike 10 и 11 приказују хроматограме анализираних екстраката.

Табела 7. Деривати фенолних киселина у воденим екстрактима хербе и ризома *P. reptans*

| Једињење | <i>Pot.r-r</i> C(*) | <i>Pot.r-h</i> C(*) |
|-----------------------------|---------------------|---------------------|
| п-хидроксибензоева киселина | 4,52 | Nd |
| циметна киселина | Nd | Nd |
| протокатехинска киселина | 34,3 | 16,2 |
| 2,5-дихидроксибензоева | Nd | Nd |
| п-кумаринска киселина | 1,37 | 3,14 |
| о-кумаринска киселина | Nd | Nd |
| ванилинска киселина | 10,5 | 5,28 |
| гална киселина | 65,9 | 5,30 |
| кафена киселина | 0,67 | 78,7 |

| Једињење | <i>Pot.r-r</i> C(*) | <i>Pot.r-h</i> C(*) |
|-------------------------------------|---------------------|---------------------|
| хинска иселина | 87,2 | 164 |
| ферулна киселина | 6,60 | 12,8 |
| 3,4-диметоксициметна киселина | Nd | Nd |
| синапинска киселина | Nd | Nd |
| 5- <i>O</i> -кафеохолинска киселина | 1,75 | 758 |

* mg једињења по kg сувог екстракта

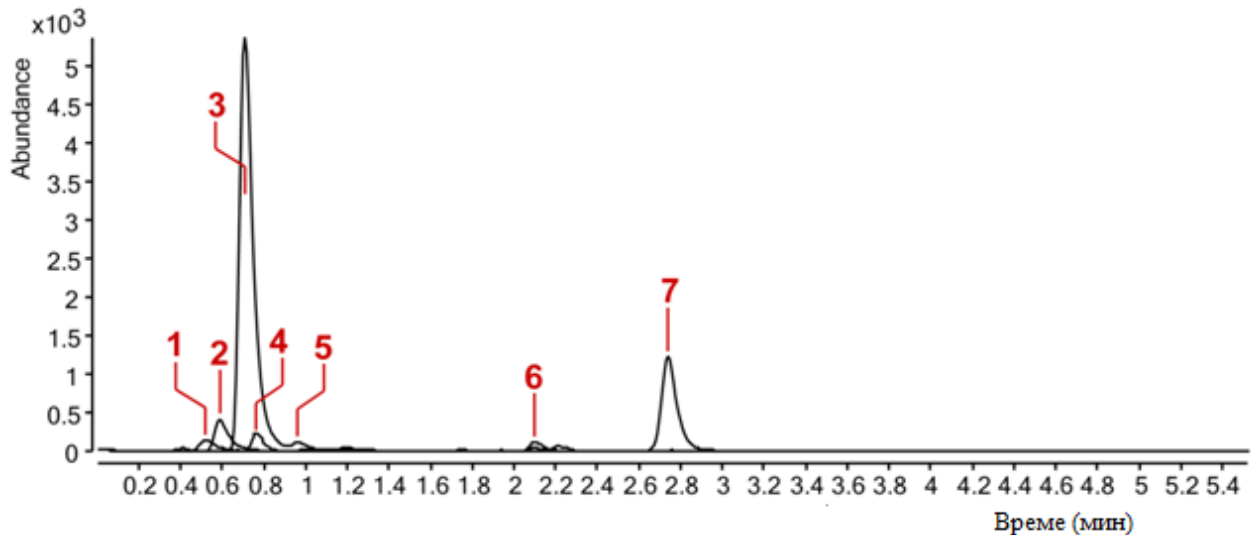
Nd – није детектовано

Табела 8. Флавоноиди и флавоноидни хетерозиди у воденим екстрактима хербе и ризома *P. reptans*

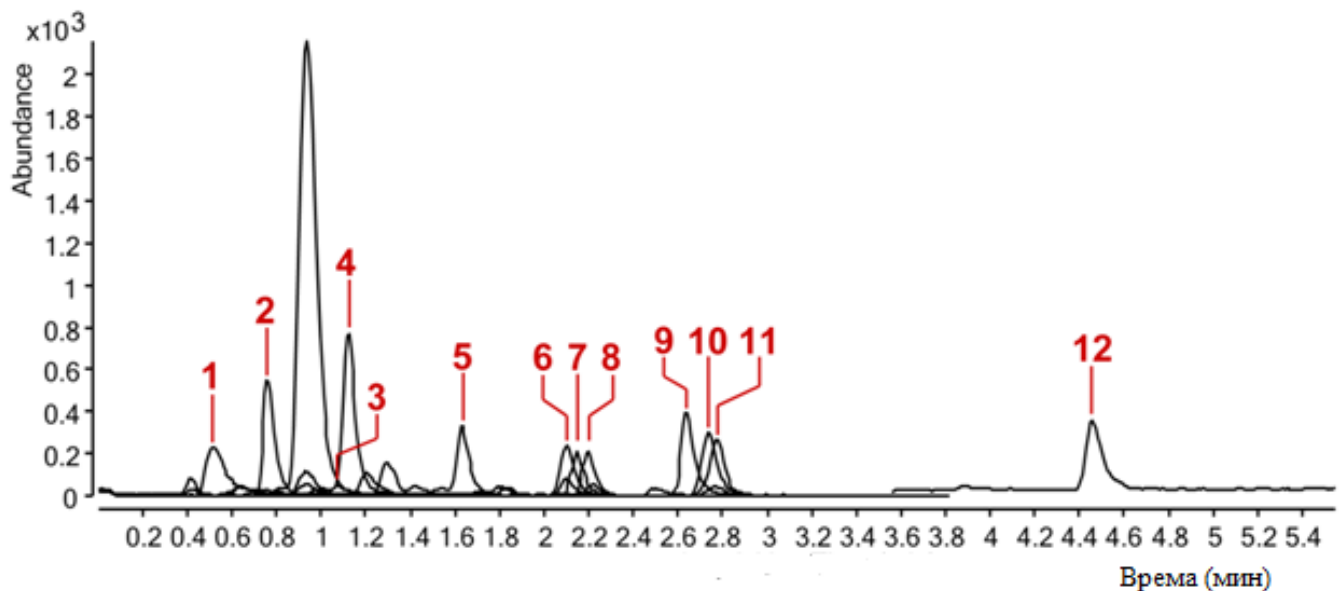
| Једињење | <i>Pot.r-r</i> C(*) | <i>Pot.r-h</i> C(*) |
|--------------|---------------------|---------------------|
| ескулетин | Nd | 9,05 |
| кемпферол | Nd | 3,72 |
| катехин | 20103 | Nd |
| епикатехин | 39,7 | Nd |
| кверцетин | Nd | 1,01 |
| изорамнетин | Nd | 0,53 |
| витескин | Nd | 0,100 |
| козметин | 0,975 | 21,6 |
| цинарозид | 6,50 | 13,5 |
| кверцитрин | 150 | 47,5 |
| астрагалин | 0,60 | 27,5 |
| хиперозид | Nd | Nd |
| изокверцетин | 1,75 | 38,3 |
| аментофлаван | 0,550 | 2,42 |
| апиин | Nd | 2,70 |
| рутин | 1,05 | 49,1 |

* mg једињења по kg сувог екстракта

Nd – није детектовано



Слика 10. HPLC хроматограм воденог екстракта *Pot.r-r*: 1- хинска киселина, 2 – гална киселина, 3 – катехин, 4 – протокатехуинска киселина, 5 – епикатехин, 6 – лутеолин-7-о-глукозид, 7- кверцетин.



Слика 11. HPLC хроматограм воденог екстракта *Pot.r-h*: 1- хинска киселина, 2- протокатехуинска киселина, 3- ескулетин, 4- кафена киселина, 5- п-кумаринска киселина, 6 - лутеолин-7-о-глукозид, 7- рутин, 8 - кверцетин-3-о-глукозид, 9 - апигенин-7-о-глукозид, 10 – кверцитрин, 11- кемферол-3-о-глукозид, 12- кемферол.

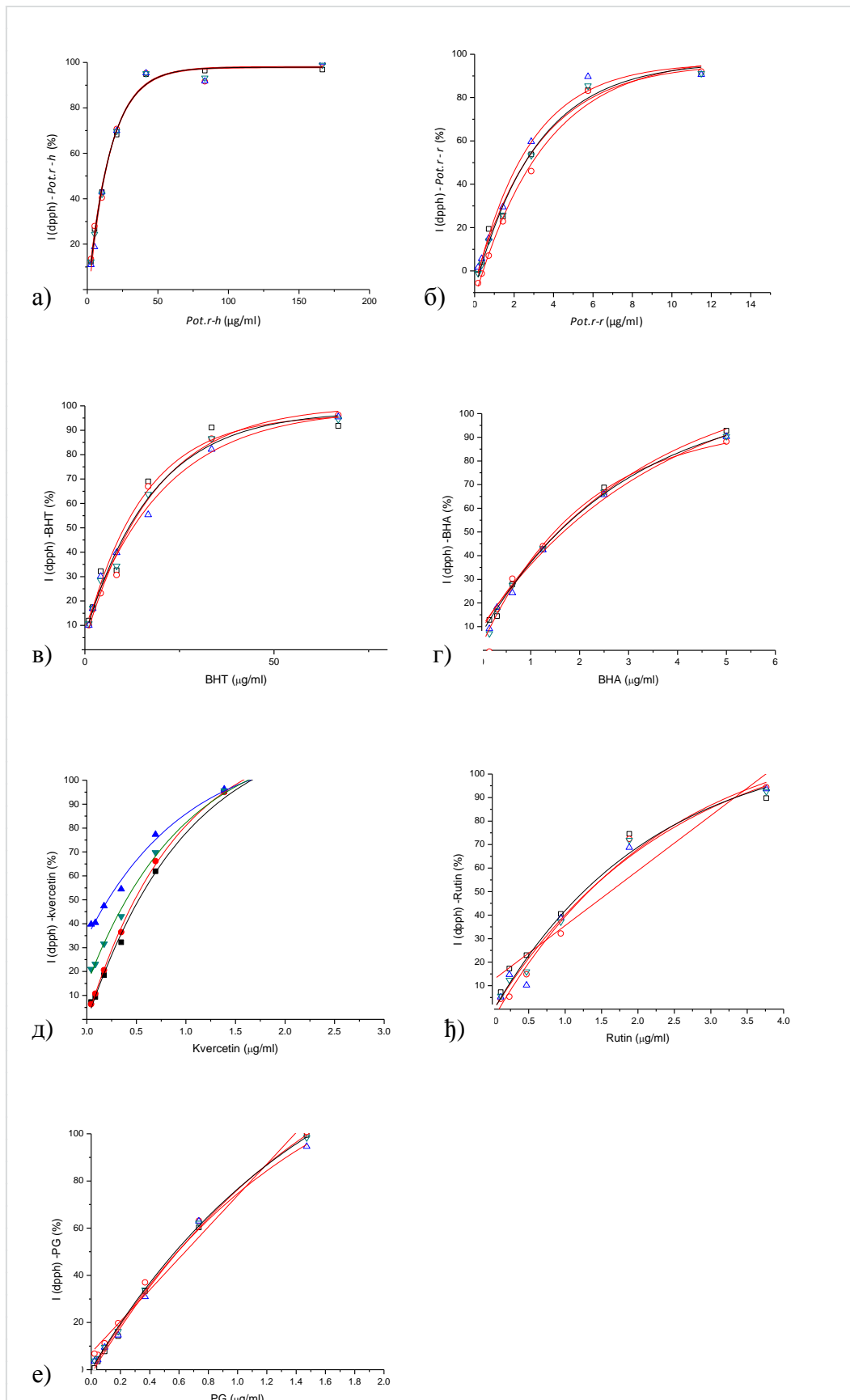
4.2. Антиоксидантна активност хербе и ризома *P. reptans*

Оба истраживана екстракта *P. reptans* су показала да поседују антиоксидантну активност DPPH - тестом. Ризом је показао већи антиоксидантни ефекат од хербе. За екстракт хербе *P. reptans* примењен у концентрацији од 166,7 – 2,6 $\mu\text{g/ml}$, DPPH активност је била у опсегу 98,9 до 12,3% (IC_{50} вредност је $12,11 \pm 0,216 \mu\text{g/ml}$). Применом екстракта ризома *P. reptans* у концентрацији од 11,49 – 0,180 $\mu\text{g/ml}$ DPPH активност је била од 91,2 – 1,1% (IC_{50} вредност $2,57 \pm 0,340 \mu\text{g/ml}$). Екстракт хербе *P. reptans* је показао најслабију активност у поређењу са стандардима, док је екстракт ризома показао већу активност од (ВНТ) и нешто слабију од (ВНА). Процент неутралисања DPPH радикала приказује се помоћу IC_{50} вредности, што представља концентрацију екстракта која је потребна да неутралише 50% DPPH радикала. Вредности IC_{50} за водене екстракте хербе и ризома *P. reptans* приказане су у табели бр. 9. Антиоксидантна активност екстраката и стандардних супстанци је на слици 12.

Табела 9. Антиоксидантна активност екстраката *P. reptans*

| | | IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------|----------------|---------------------------------------|
| Узорци | <i>Pot.r-h</i> | $12,11 \pm 0,216$ |
| | <i>Pot.r-r</i> | $2,57 \pm 0,340$ |
| Стандарди | ВНТ | $11,65 \pm 1,144$ |
| | ВНА | $1,57 \pm 0,093$ |
| | кверцетин | $0,41 \pm 0,169$ |
| | рутин | $1,42 \pm 0,173$ |
| | РГ | $0,61 \pm 0,030$ |

ВНТ – бурил хидрокси толуол, ВНА – бутил хидрокси анизол, РГ – пропилен галат.



Слика 12. Антиоксидантна активност екстраката и стандардних супстанци.
 а) *Pot.r-h*, б) *Pot.r-r*, в) ВНТ, г) ВНА, д) кверцетин, ж) рутин, е) пропилен гликолен

4.3. Антиинфламаторна активност хербе и ризома *P. reptans*

Водени екстракт ризома *P. reptans* показао је дозно зависну редукцију едема на експерименталном животињском моделу. Максимални ефекат постигнут је применом дозе 10 mg/уху. У овој дози екстракт је супримирао инфламаторни одговор у степену од 61,37%. Дексаметазон, који представља позитивну контролу је довео до инхибиције едема од 68,77%. Екстракт хербе *P. reptans* није довео до смањења едема.

Резултати антиинфламаторног деловања водених екстраката хербе и ризома *P. reptans* на моделу фенолом изазваног едема на уху мишева приказани су у табели бр. 10.

Табела 10. Антиинфламаторно деловање водених екстраката ризома и хербе *P. reptans* (*Pot.r-h*) и (*Pot.r-r*).

| Врста узорка | концентрација узорка (mg/уху) | Едем (mg) | Степен инхибиције (%) |
|----------------|----------------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>Pot.r-r</i> | 2,5 | 21,61±9,91 | 14,18 |
| <i>Pot.r-r</i> | 5 | 17,54±11,78 | 30,34 |
| <i>Pot.r-r</i> | 10 | 9,73±4,22 ^a | 61,37 |
| <i>Pot.r-h</i> | 2,5 | 19,89±9,46 | 21,00 |
| <i>Pot.r-h</i> | 5 | 26,36±7,74 | -4,71 |
| <i>Pot.r-h</i> | 10 | 18,47±17,75 | 26,62 |
| Дексаметазон | 0,08 | 7,86±4,74 ^a | 68,77 |
| Вода | 0 | 25,18±9,24 | 0 |

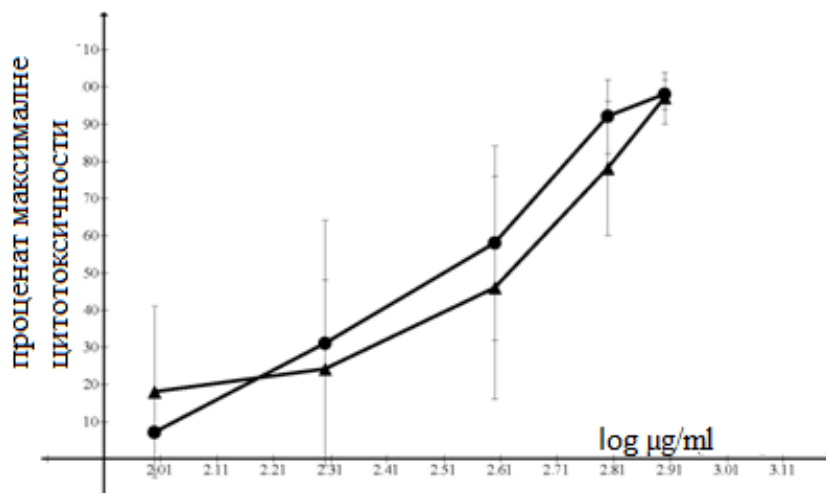
^a $P < 0,05$ поређење са контролном групом.

4.4. Цитотоксична активност хербе и ризома *P. reptans*

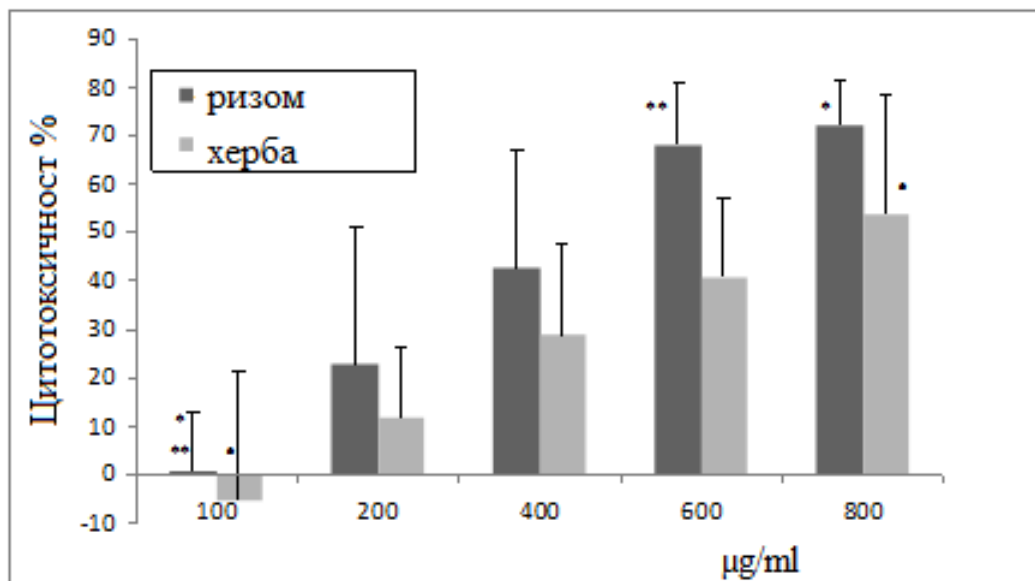
Водени екстракт ризома *P. reptans* је изазвао дозно – завистан цитотоксични ефекат, IC₅₀ је била 280,51 ± 1,16 µg/ml при (F = 27,16915; r = 0,87; p < 0,05). Водени екстракт хербе *P. reptans* је такође показао дозно – завистан цитотоксични ефекат са IC₅₀ 310,79 ± 1,22 µg/ml где је (F = 17,79516; r = 0,79; p < 0,05).

Цитотоксична активност екстраката ризома у концентрацији од 800 µg/ml је била већа од цитотоксичне активности екстраката концентрације 100 µg/ml и 600 µg/ml, док је цитотоксична активност екстракта хербе била већа за концентрацију од 800 µg/ml у

односу на концентрацију од 100 $\mu\text{g/ml}$. цитотоксични ефекти екстраката хербе и ризома *P. reptans* је приказана на сликама 13 и 14.



Слика 13. – Цитотоксични ефект екстраката *P. Reptans*:ризом (●); херба (▲).



Слика 14.- Цитотоксичност екстраката *P. reptans* (ризома и хербе) (%).

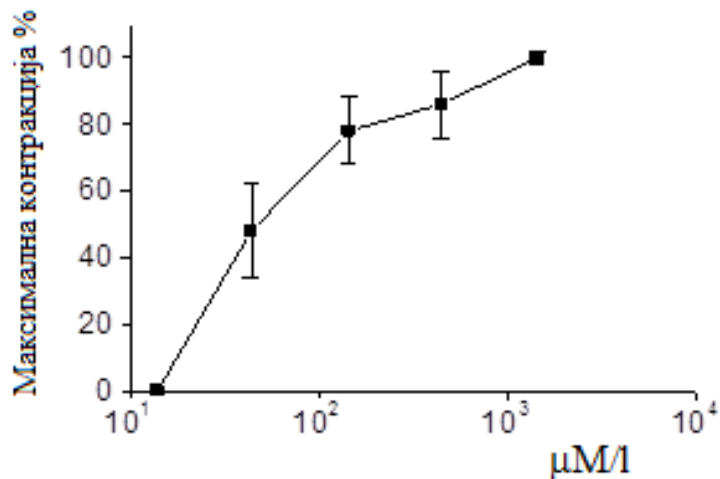
- * Значајност у поређењу екстракта ризома у концентрацијама од 100 $\mu\text{g/ml}$ до 800 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.000$)
- ** Значајност у поређењу екстракта ризома у концентрацијама од 100 $\mu\text{g/ml}$ до 600 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.000$)
- Значајност у поређењу екстракта надземног дела у концентрацијама од 100 $\mu\text{g/ml}$ до 800 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0.009$)

4.5. Антихистаминска активност хербе и ризома *P. reptans*

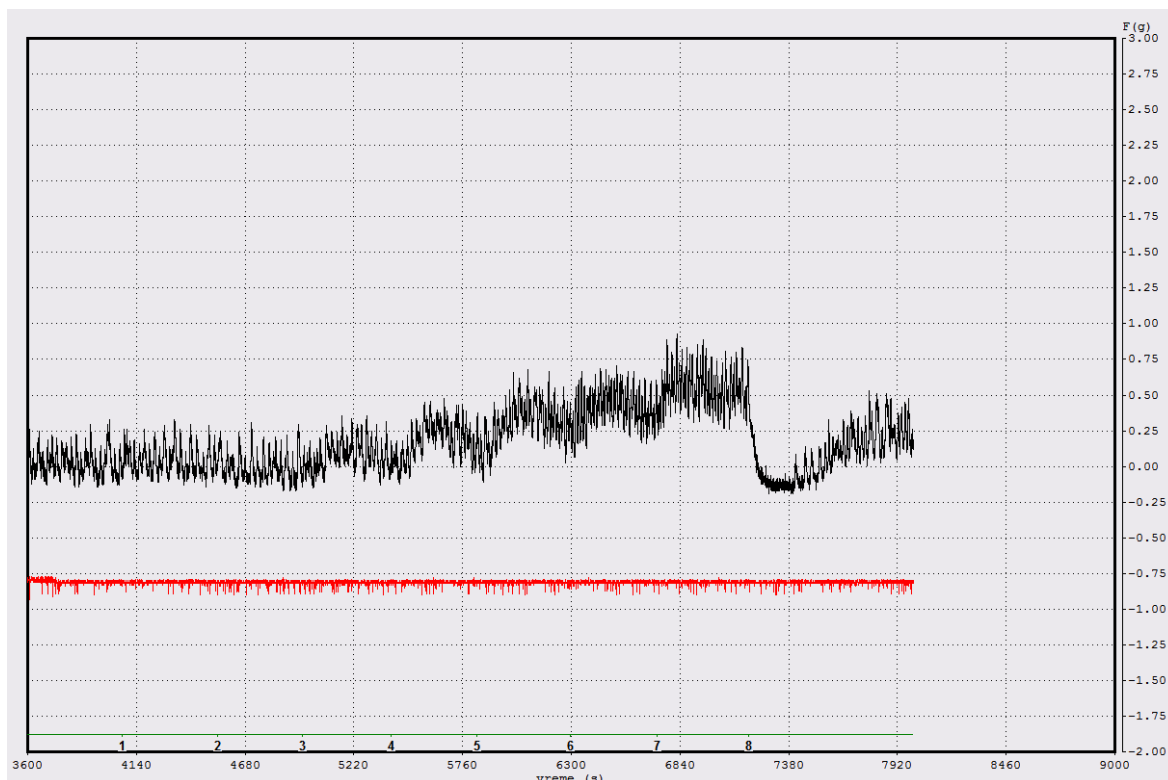
4.5.1. Спонтана активност и ефекти хистамина

Осам препарата (73%) је показало спонтану активност која се састоји од спорих ритмичких контракција са амплитудом од $0,7 \pm 0,4 \mu\text{N}$ и фреквенцијом од 3 до 6 циклуса у минути.

Хистамин ($1,0 \times 10^{-6} \text{ M} - 1,1 \times 10^{-4} \text{ M}$) је изазвао дозно – зависну контракцију изолованог истмичног сегмента ($\text{EC}_{50} = 4,20 \pm 1,80 \times 10^{-6} \text{ M}$; $r = 0,89$; $p < 0,001$), при чему није утицао на спонтану активност изолованих препарата ($F = 0,346$, $df_1 = 6$, $df_2 = 14$, $p > 0,05$), што је приказано на сликама 15 и 16.



Слика 15. Тоничне контракције истмичног сегмента хуманог јајовода продуковане хистамином



Слика 16. Ефекат хистамина на тонус изолованог сегмента хуманог јајовода и спонтана активност

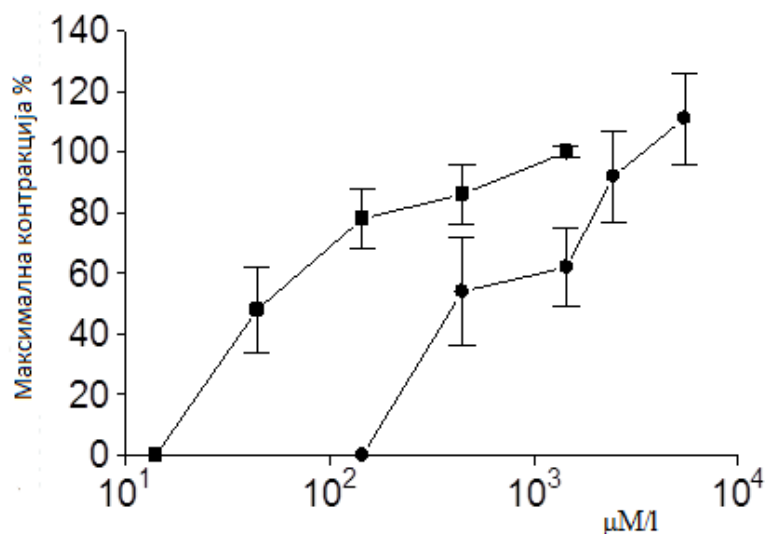
F = сила; Време (s) = секунд; Црна трака– снага лонгитудиналне контракције; Црвена трака – тајмер; Бројеви од 1 до 7 представљају додавање наредних доза хистамина. Број 8 указује на праће купатила.

4.5.2. Ефекти екстракта хербе *P. reptans L*

Екстракт хербе *P. reptans* у концентрацији од 13 $\mu\text{g/ml}$ показује антихистамински ефекат што је потврђено појавом померања хистаминске концентрација – ефекат криве у десно ($\text{EC}_{50} = 2.48 \pm 3.53 \times 10^{-5} \text{ M}$; $r = 2.370$, $df = 38$, $p < 0.05$; $F = 19.94$, $df_1 = 6$, $df_2 = 14$, $p < 0.01$), слика 17.

4.5.3. Ефекти екстракта ризома *P. reptans L*

Екстракт ризома *P. reptans L* примењен у концентрацији од 13 $\mu\text{g/ml}$ не показује антихистамински ефекат и не доводи до значајног померања хистаминске концентрација – ефекат криве у десно ($\text{EC}_{50} = 4,30 \pm 1,97 \times 10^{-6} \text{ M}$; $r = 0,049$, $df = 45$, $p > 0,05$).



Слика 17. Ефекат екстракта хербе на контракције јајовода продукване хистамином.

- а) Утицај екстракта хербе *P. reptans* L (13μg/ml) (●);
- б) Тоничне контракције истмичног сегмента хуманог јајовода продукване хистамином (■).

4.6. Антимикробна активност хербе и ризома *P. reptans*

Резултати агар дифузионог теста су показали да водени екстракти хербе и ризома *P. reptans* у концентрацијама од 10 – 150 mg/ml испољавају значајну антимикробну активност према *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, док ни једна од примењених концентрација ових екстраката није довела до значајне инхибиције раста бактерије *Klebsiella pneumoniae*. Антимикробно деловање је било најизраженије при највећим примењеним концентрацијама. Екстракт хербе је испољио 95,24% активности цефтриаксона (30 μg/диск) за *Escherichia coli*, односно 68,75% за *Staphylococcus aureus*. Екстракт ризома у концентрацији од 150 mg/ml испољава чак 133,3% активности стандарда према *Escherichia coli*, а 87,5% активности цефтриаксона (30 μg/диск) за *Staphylococcus aureus*. Сој *Candida albicans* је показала умерену осетљивост на ризом *P. reptans* где је највећа примењена концентрација испољила 50% активности референтне супстанце нистатина (25μg/диск). Резултати антимикробног деловања приказани су у табели бр. 11.

Табела 11. Антимикробна активност водених екстраката ризома и хербе *P. reptans*.

| Материјал | | Дијаметар зоне инхибиције (mm) | | | |
|---------------------------|-----------|--|------------------------------------|---|------------------------------------|
| | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 |
| <i>Potr-h</i> | 10 mg/ml | - | 15 | - | - |
| | 50 mg/ml | - | 16 | 16 | - |
| | 75 mg/ml | - | 17 | 18 | - |
| | 100 mg/ml | - | 18 | 20 | - |
| | 150 mg/ml | - | 20 | 22 | - |
| <i>Potr-r</i> | 10 mg/ml | - | 19 | 22 | - |
| | 50 mg/ml | - | 23 | 23 | - |
| | 75 mg/ml | - | 25 | 26 | - |
| | 100 mg/ml | - | 22 | 27 | 16 |
| | 150 mg/ml | - | 28 | 28 | 17 |
| Цефтриаксон 30 µg/диск | | | 21 | 32 | 0 |
| Нистатин 100 IU/диск | | 0 | 0 | 0 | 34 |

Утицај екстраката ризома и хербе *P. reptans L.* у концентрацијама од 10 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml на раст стандардних сојева бактерија и гљивице приказан је на сликама 18-20.



а).



б)

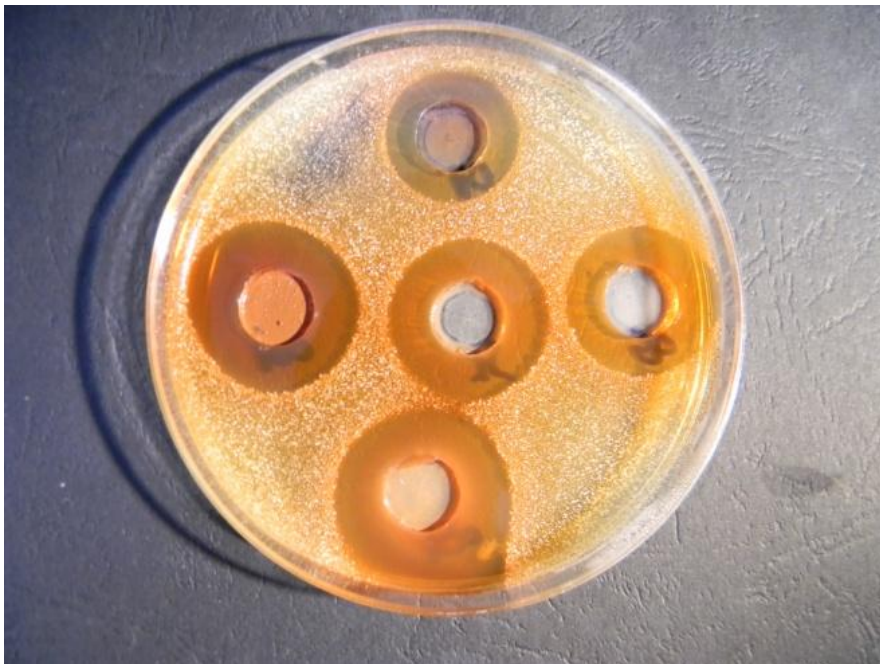
Слика 18. Антимикробно деловање *P. reptans* на *E. coli*

а) водени екстракт хербе

б) водени екстракт ризома



а)



б)

Слика 19. Антимикробно деловање *P. reptans* на *S. aureus*

а) водени екстракт хербе

б) водени екстракт ризома



а)



б)

Слика 20. Антимикробно деловање *P. reptans* на гљивицу- *C. albicans*

а) водени екстракт хербе

б) водени екстракт ризом

5. Дискусија

Род *Potentilla* има широку употребу у традиционалној медицини многих народа, што је довело до истраживања која су имала за циљ фитохемијску карактеризацију овог рода као и повезивање фармаколошких својстава рода са присутним секундарним метаболитима у биљкама. Доминантни секундарни метаболити овог рода су: флавоноиди, хидролизоване танини, кондензоване танини (проциајнидини), тритерпеноиди, као и органске и фенолкарбонске киселине (24). Поједини секундарни метаболити попут флавоноида су карактеристични за надземне делове биљака, док су танини доминантни у корену и у ризому ових биљака. Закључује се да се водени екстракти разликују не само у хемијском саставу, већ и у фармаколошким ефектима (24).

P. reptans припада роду *Potentilla* и широко је распрострањена на европском и азијском континенту. У народној медицини се користе ризом и херба биљке, у терапији запаљенских процеса, алергијских реакција, зарастања рана и др.

Могуће је одређивање хемијског састава и дефинисање фармаколошких особина екстракта добијених одговарајућим екстракционим методама из појединих делова или из целе биљке. Од избора растварача и метода екстракције зависи принос одговарајућих једињења а самим тим и фармаколошки ефекти екстракта који се испитује. Циљ овог истраживања је био да се испитају екстракти који су најсличнији по облику и саставу традиционалном начину употребе ове биљке.

феноли, флавоноиди и танини који су карактеристични за биљке овог рода се добро екстрахују поларним растварачима (вода, етил алкохол различитих односа воде и етанола). Недостатак воде као растварача је да поред фармаколошки активних компоненти раствара и баластне материје (31).

Ефикасност и брзина екстракције зависе и од температуре на којој се она изводи. Сходно томе да су активне компоненте код *Potentilla* врста термо стабилне, овде можемо изводити екстракцију и на повишеним температурама. Тако да је екстраховање вршено кључалом водом (24).

Квантитативном анализом екстракта утврђен је висок садржај фенолних једињења. А даљом HPLC анализом је утврђено да је најдоминантније једињење код ризома катехин, али поред њега су значајно заступљени и протокатехинска, гална, хинска киселина, епикатехин и кверцитрин а у херби хлорогенска, хинска, кафена киселина, рутин и кверцитрин.

Резултати ове студије су показали да је водени екстракт ризома *P. reptans* четири пута богатији у садржају укупних фенола од хербе. Садржај флавоноида је виши у екстракту хербе у односу на ризом, што је у складу са резултатима добијених и код осталих биљака овог рода (24). Процијанидини представљају главне компоненте укупних фенола у ризому *P. reptans* (Табела 6.). Упоредјујући садржај појединачних фенолних једињења хербе и ризома *P. reptans* уочено је да се већина фенолних једињења налази у већој количини у надземном делу него у ризому, са изузетком галне киселине, катехина, епикатехина, протокатехинске киселине и кверцитрина, чији садржај доминира у ризому.

Литературни подаци указују да су флавоноиди (апигенин, лутеолин и кемпферол) заступљени у ризому *Potentilla* врста, међутим они нису нађени у ризому *P. reptans*. Садржај процијанидина у ризому је (98,4 g/kg) што је више од њиховог садржаја у корену *P. alba* (80 g/kg), али и других биљака које су извор процијанидина. (100). Поређења ради, плод ароније, биљке која припада истој фамилији као и *P. reptans*, а која је позната као веома богат извор процијанидина, садржи (52 g/kg) (18, 101). Резултати укупних фенола, флавоноида и процијанидина добијени у овом истраживању су поређењем са резултатима једне компаративне студије, која је истраживала надземне делове десет различитих врста *Potentilla*, показали да херба *P. reptans* садржи 116.0 mg/g укупних фенола, што се поклапа са највишим вредностима ове студије *P. fruticosa-e* (116.3 mg/g). Надземни део *P. reptans* је богатији у укупним флавоноидима (10,1 mg/g) од *P. fruticosa-e*, биљке у којој су такође идентификовани флавоноиди у највећој количини од свих испитиваних биљака (7,0 mg/g). Поређењем са биљкама поменуте студије надземни део *P. reptans* има најмањи садржај процијанидина (1,1 mg/g) (102).

Резултати овог истраживања указују на присуство високе количине катехина у ризому (20,1 g/kg), што је у складу са подацима за неке врсте *Potentilla*. (24). Катехин спада у кондензоване танине и има антиинфламаторну, антимицробну, антитуморску активност и штити од оксидативног стреса (103). Студије које су квантификовале катехин у различитим биљкама дају различите резултате (104). Поједине биљке или њихови делови (воће) представљају оскудан извор катехина, док се друге биљке карактеришу богатим присуством овог једињења (105). Катехин се налази у великој количини у ризому, а на супрот томе, није пронађен у херби *P. reptans*. Ова неусаглашеност између садржаја надземног дела и ризома је уочена и код других

фенолних једињења: епикатехина, кемпферола, кафене киселине и п-кумаринске киселине. Кемпферол, кафена киселина и п-кумаринска киселина су доминантно присутне у херби, док је епикатехин нађен само у ризому.

Хидроксицинамске киселине и њени деривати су у значајној мери присутне у херби *Potentilla* (24). Из ове групе једињења у херби *P. reptans* су идентификоване: кафена, п-кумаринска, хинска и хлорогенска киселина. Хидроксицинамске киселине су донори водоника због присуства $\text{C}=\text{C}-\text{COOH}$ групе при чему се у многоме повећавају антиоксидантна својства ових једињења (106).

Слободни радикали су узроци патогенезе многих хроничних обољења (дијабетес, кардиоваскуларна обољења, различите врсте тумора, ХИВ инфекција, инфламаторна обољења и др.). Слободни кисеонични радикали могу бити молекули, атоми или јони, имају један или више неспарених електрона у својој структури, а настају као међупроизвод у кисеоничном метаболизму. Неспарени електрон код слободних радикала може да се нађе на С-атому (алкил радикали $\text{CH}_3\bullet$, $\text{CH}_3\text{CH}_2\bullet$), на О-атому ($\text{RO}\bullet$, $\text{HO}\bullet$, $\text{ROO}\bullet$, $\text{O}_2\bullet^-$), на N-атому ($\text{NO}\bullet$), на S-атому ($\text{RS}\bullet$). Неспарене електроне могу да имају и атоми водоника ($\text{H}\bullet$) халогена ($\text{Cl}\bullet$), алкални метали ($\text{Na}\bullet$). Ове структуре су нестабилне и реактивне и изазивају ланчане реакције у организму.

Реактивна кисеонична једињења (Reactive oxygen species - ROS) су структуре у које спадају кисеонични радикали као и нека нерадикалске врсте које су оксидативна средства или се лако преводе у радикале као на пример: HOCl , HOBr , O_3 , ONOO^- , H_2O_2 . Ове структуре имају важну улогу у ћелијској сигнализацији, а учествују и у одбрани организма од инфективних болести. Са друге стране, излагање организма негативним утицајима спољашње средине као што су различите врсте зрачења, дувански дим, токсичне хемијске супстанце итд, утичу на повећање садржаја ових једињења у организму. Њихово присуство у великим концентрацијама изазива оштећење ћелијских структура, такозвани оксидативни стрес. Формирани слободни кисеонични радикали као што су супероксид анјон радикал (O_2^-), пероксинитрит (ONOO^-), хидроксилни радикал (OH^-) и други се ослобађају из различитих ћелијских извора у васкуларно или паренхимско ткиво и доводе до различитих обољења (107, 108).

Под антиоксидантима се подразумевају све супстанце које смањују или спречавају оксидацију неког супстрата. Антиоксиданси могу да делују на један од следећих начина: делују као „хватачи“ слободних радикала, односно донори електрона или Н-атома пероксил или хидроксил радикалима, делују као акцептори електрона или

H-атома, разграђују хидропероксиде липида, комплексирају јоне метала (чиме је онемогућено стварање иницијатора оксидације, нпр. ОН радикала), инхибирају неке ензиме (109).

Природна једињења са антиоксидантним својствима играју важну улогу у реакцијама где се формирају реактивни облици кисеоника, при чему смањују штетан потенцијал ових реактивних структура. Полифенолна једињења се сматрају најзначајнијим фитокомпонентама која нису неопходна за опстанак биљке а поседују антиоксидантно деловање. У фенолна једињења која се карактеришу изразитим антиоксидантним својствима спадају: фенолне киселине, флавоноиди и танини. Они могу спречити или успорити развој хроничних болести попут кардиоваскуларних обољења, артериосклероза, реуматизама, разних форми канцера итд (109).

Флавоноиди се понашају као доноси водоника и на тај начин реагују са слободним радикалима, тако да представљају снажне антиоксидансе у поређењу са другим биљним фенолним дериватима. Кемпферол, кверцетин и рутин у биљним екстрактима показују снажан антиоксидантни ефекат (110). Фенолне киселине (кафена и п-кумаринска киселина) показују значајан антиоксидантни ефекат (111, 112).

У овом истраживању је коришћен индиректни метод одређивања антиоксидантне активности (DPPH тест) екстракта *P. reptans*. Индиректне методе се употребљавају за одређивање способности антиоксиданаса да неутралишу радикале који нису увек повезани са оксидативном разградњом (DPPH радикали). Овај тест је поуздан метод одређивања антиоксидантних способности фенолних једињења присутних у екстрактима. Оба екстракта су показала значајну антиоксидантну активност. Антиоксидантна активност ризома *P. reptans* била је пет пута већа од антиоксидантне активности хербе. Супстанце које су коришћене као стандарди су показале већу активност од хербе *P. reptans*, док је екстракт ризома имао већу активност од ВНТ, а нижу од кверцетина, ВНА, РГ и рутина.

Предходна истраживања биљног материјала показала су да постоји позитивна корелација између садржаја укупних фенола и антиоксидантне активности (113). Резултати овог истраживања су у складу са тим истраживањима јер постоје и друге *Potentilla* врсте, код којих су коришћени различити растварачи за добијање одговарајућих екстракта, а чији је антиоксидантни капацитет испитиван такође помоћу DPPH теста и потврђен (101, 62, 114, 115). Како литературни подаци указују на

то да је катехин снажан антиоксиданс, при чему високи садржај катехина га чини водећом компонентом ризома *P. reptans*, може се предпоставити да је ово једињење одговорно за испољавање антиоксидантне активности (103). Ова претпоставка се заснива на чињеници да су резултати вредности IC₅₀ екстракта ризома у доброј корелацији са резултатима добијеним у сличном експерименту где је испитиван водени екстракт ризома *Bergenia crassifolia*, а где је такође уочен позитиван однос садржаја катехина и добијених вредности IC₅₀ (113). Из свега овога може се предпоставити да висок садржај укупних фенола, посебно садржај катехина у ризому *P. reptans*, значајно доприноси антиоксидантном ефекту воденог екстракта ризома. Супстанце тестиране DPPH тестом које поседују IC₅₀ вредности ≤ 50 µg/ml сврставају се у активне антиоксидансе. Добијени резултати у овој студији сврставају и ризом и хербу у активне антиоксидансе (2,57 µg/ml ризом и 12,11 µg/ml херба) (116, 117).

Антиоксидантни ефекат биљних екстраката не остварује се услед присуства појединачних компоненти у екстракту већ је резултат синергистичког деловања већег броја једињења присутних у биљном материјалу. У надземном делу присутна је и кафена киселина у већем садржају него друга фенолна једињења. Кафена киселина је категорисана као активни антиоксидант па се може сматрати да и она доприноси антиоксидативном ефекту у односу на друга присутна једињења (111).

Процијанидини су истраживани као потенцијални антиоксиданси, због чега су у употреби у медицини и исхрани (118). Процијанидини су у већој количини заступљени у ризому него у херби *P. reptans*, па се може предпоставити да процијанидини доприносе показаном антиоксидантном ефекту ризома. Садржај укупних фенола је већи у ризому *P. reptans* него у херби што је у позитивној корелацији са антиоксидантном активношћу ових екстраката.

У студијама појединих врста рода *Potentilla* антиоксидантна својства (*P. alba* корен) су доведена у везу са садржајем фенолних једињења (катехин, епикатехин итд.) (102). Резултати ове студије комплементирају тренутна сазнања о овом роду (24).

Природни биљни деривати који поседују антиоксидантна својства се користе у терапији и исхрани ради превенције односно спречавања штетног деловања реактивних кисеоничних једињења која могу да покрену или убрзају деловање многих медијатора запаљенских процеса (119, 120). Антиоксиданси снижавају концентрацију

реактивних кисеоничних једињења и тако умањују продукцију про-инфламаторних медијатора као што су: IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , леукотријени и простагладини (121).

У овој студији су проучавани ефекти водених екстраката хербе и ризома *P. reptans* на инфламаторне процесе изазване фенолом (91). Контакт фенола и коже доводи до оштећења мембране кератиноцита и доводи до ослобађања цитокина који ослобађају остале медијаторе запаљења (91). На овај начин се постиже добар локални инфламаторни одговор, тако да се фенол може сматрати добрим реагенсом за изазивање локалне инфламације (122).

Секундарни метаболити попут фенолних једињења изолованих из биљака (флавоноиди и фенол карбонске киселине) показују антиинфламаторне карактеристике (123). Водени екстракт ризома *P. reptans* је показао антиинфламаторни ефекат, док екстракт надземног дела није показао никакву значајну антиинфламаторну активност. Инхибиција едема се постиже применом 10 mg/уху воденог екстракта ризома. При овој количини екстракта едем се редукује за 61,27 % што је у корелацији са резултатима других студија где применом водених екстраката различитих биљака такође долази до редукције едема (57,0 % применом 5 mg/уху (89), 36,3 % применом 200 mg/уху (117)). Водени екстракт ризома *P. reptans* у концентрацији од 10 mg/уху доводи до редукције едема за 89,24 % у односу на редукцију едема која је изазвана применом дексаметазона као стандардне супстанце (124).

Катехин и кверцитрин инхибирају ослобађање проинфламаторних цитокина (IL-1, TNF- α , и простагладина E₂), при чему су оба једињења заступљена у екстракту ризома *P. reptans* (123, 125). Резултати овог истраживања показују да је екстракт ризома *P. reptans* активан при локалној примени у третману акутног дерматитиса индукованог фенолом, у сличном обиму као и дексаметазон. На основу резултата добијених DPPH тестом и садржаја фенолних једињења у ризому *P. reptans*, посебно катехина који је присутан у највећој мери, може се предпоставити да су ова једињења у ризому одговорна за анти-инфламаторни ефекат који је постигнут применом воденог екстракта ризома *P. reptans*.

Водени екстракт хербе *P. reptans* иако сличног квалитативног састава (флавоноиди и фенол карбонске киселине) који спадају у групу једињења са антиинфламаторном активношћу није показао статистички значајне резултате при тестирањима концентрацијама. Разлог за добијање оваквог резултата је највероватније

присуство недовољних количина активних принципа у екстракту. Наиме кверцитрин који је дериват кверцетина и спада у јаке антиинфламаторне агенсе у ризому је заступљен у количини од 150 mg/kg, док је у херби заступљен свега 47,5 mg/kg (123). Рутин, као и кверцитрин, спада у гликозиде флавоноида кверцетина. Како је њихова хемијска структура веома слична, разлика је у једној хидроксилној групи, они показују и сличне фармаколошке ефекте (126). Иако је био очекиван његов утицај, у херби је изостао највероватније због ниских концентрација 49,1 mg/kg. Наиме концентрације рутина у биљном материјалу се крећу 4.879 mg/g до 171.82 mg/g (127). С обзиром да херба садржи активне принципе који би могли да доведу до испољавања антиинфламаторног ефекта будућа истраживања би могла да користе екстракте добијене или различитим методама или коришћењем поларних растварача попут алкохола или метанола где би се нашле веће количине флавоноидних једињења (31, 127).

Туморска обољења спадају у једна од најраспрострањенијих, а најтеже контролисаних болести савременог света. У традиционалној медицини многих народа постоје биљни препарати чији је циљ смањење или превенција туморских обољења. Биљке из рода *Potentilla* су коришћене код многих народа у ту сврху. Скорашње студије су потврдиле могућност смањења ризика од туморских обољења применом различитих облика биљних екстраката добијених из биљака рода *Potentilla* (128). *P. reptans* није истраживана до сада на цитотоксичне карактеристике. Потенцијална антитуморска активност *P.reptans* је праћена специфичним тестом на туморским ћелијским културама (129). Хемијска карактеризација ризома указује да је садржај катехина доминантан. Катехин је инхибитор СОХ 1 и сматра се да може вршити превенцију туморских процеса. Студије које су имале за циљ доказивање активности катехина су уочиле да је катехин, сам или у комбинацији са инхибиторима СОХ 2, ефикасан против неколико врста тумора као што су естроген зависни тумори, тумори бешике, простате, панкреаса. Катехин поседује још један користан механизам деловања, он повећава рану апоптозну активност, чиме остварује анти-пролиферативни ефекат (130).

Ова студија је показала да су од секундарних метаболита у херби *P. reptans* доминантни флавоноиди. Литературни подаци указују да флавоноиди испољавају јако антитуморско дејство, при чему могу да делују у различитим фазама настанка тумора. Механизам антитуморског деловања је комплексан и укључује антипролиферативну,

антиоксидантну активност, индукцију апоптозе, блокаду ћелијског циклуса, па чак и елиминацију резистенције на лекове, што оправдава коришћење флавоноида током терапије антитуморским лековима (131, 132). У зависности од карактеристика растварача (поларност) зависи која једињења и у којој мери ће бити екстрахована. Из овог разлога одабир растварача је веома битан фактор који у многоме утиче на резултате истраживања. Наиме, полифенолна једињења којима се приписују лековита својства и којих има доста у биљкама, ће се квантитативније екстраховати органским растварачима него водом (31). Вредности IC_{50} за цитотоксичност водених биљних екстраката и вредности IC_{50} за биљне екстракте добијене коришћењем органских растварача (етанола, метанола итд) могу се разликовати у великој мери. Етанолни екстракт *P. erecta* при концентрацији од 10 и 50 $\mu\text{g/ml}$ испољава снажан цитотоксични ефекат, док водени екстракти биљке *Geranium robertianum* испољавају цитостатске ефекте тек при концентрацијама већим од 500 $\mu\text{g/ml}$ (51,133). Иако су концентрације водених биљних екстраката које доводе до цитотоксичности обично веће од концентрација екстраката добијених уз помоћ других растварача овде је коришћена екстракција водом јер је то најчешћи начин справљања лековитих препарата у традиционалној медицини (134, 48).

Антитуморска активност већине врста из рода *Potentilla* је мало истраживана, изузетак је *P. erecta* где је етанолни екстракт ризома показао цитотоксичност (51). Мотивација за процену потенцијалне антитуморске активности *P. reptans* базирана је на њеном коришћењу у народној медицини у третману инфламације и инфекције, које су у вези са туморским обољењима (134, 48). У овој студији је спроведено истраживање водених екстраката хербе и ризома *P. reptans*, што је у складу са начинима припремања биљних препарата у традиционалној медицини (134). Оба екстракта, и ризом и херба *P. reptans* су показала цитотоксични ефекат на 4Т1 ћелијској линији канцера дојке код мишева. Код оба екстракта ефекат је детектован при концентрацијама од 100 $\mu\text{g/ml}$ и 200 $\mu\text{g/ml}$. Водени екстракт ризома има већу активност од екстракта хербе дела. IC_{50} за екстракт ризома је био $280,51 \pm 1,16 \mu\text{g/ml}$, а IC_{50} за екстракт хербе је $310,79 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$, сходно резултатима актуелних студија о цитотоксичности водени екстракти показују цитотоксични ефекат при вишим концентрацијама почевши од 250 $\mu\text{g/ml}$, при чему испољавају слабе цитотоксичне ефекте (51). С обзиром да је доминантно једињење у ризому катехин, може се претпоставити да је он и најодговорнији за испољавање овог цитотоксичног ефекта (130). Код хербе нема доминантне

присутности неког једињења, али се може уочити да су од свих секундарних метаболита у највећој мери присутни флавоноиди па се њима може и приписати активност овог екстракта (131, 132).

Резултати добијени овом студијом и подаци о антитуморском дејству *P. reptans* могу се сматрати прелиминарним и ови резултати отварају нова истраживачка питања везаних за ову биљку.

По својој структури хистамин је биогени амин који се синтетише у организму из аминокиселине хистидина и депонује у мастоцитима и у базофилним леукоцитима у крви. Под дејством антигена на IgE антитела која се налазе на мембранама ћелија у којима је депонован хистамин долази до његовог ослобађања. На овај начин хистамин се ослобађа у оквиру алергијске реакције типа 1. Други начин ослобађања хистамина тзв. не-егзоцитостатски механизам се одвија под дејством различитих агенаса (лекови, отрови или физички агенаси). Услед њиховог деловања долази до оштећења мембрана ћелија које садрже хистамин. Након ослобађања хистамина долази до вазодилатације артериола, капилара и венула. Хистамин повећава пропустљивост капилара услед чега долази до едема, црвенила коже, свраба, контракције глатке мускулатуре респираторних путева, гастроинтестиналног и генитоуринарног тракта. Сви набројани ефекти се остварују услед везивања хистамина за H_1 рецепторе. Поред активације H_1 рецептора, хистамин може да активира и H_2 рецепторе, при чему такође долази до вазодилатације, повећаног лучења хлороводоничне киселине, као и до смањења свог ослобађања из мастоцита и базофила (135).

У овој студији је испитивана антихистаминска активност воденог екстракта хербе и ризома *P. reptans*. Херба је при концентрацији од 13 $\mu\text{g/ml}$ показала значајно померање хистаминске криве, концентрација – ефекат у десно, што значи да веће концентрације хистамина ($EC_{50} = 2,48 \pm 3,53 \times 10^{-5} \text{M}$) доводе до истог интензитета контракције истмичног сегмента у присуству екстракта хербе него што је потребно самом хистамину ($EC_{50} = 4,20 \pm 1,80 \times 10^{-6} \text{M}$). Овај резултат је у корелацији са резултатима других студија где је показано значајно смањење контракције илеума замораца изазване хистамином приликом примене етанолних и водених екстраката биљке *Striga orobanchioides*. Применом ових екстраката у концентрационом опсегу од 2,5-25 $\mu\text{g/ml}$ долази до значајног смањења контракције илеума, а концентрација од 25 $\mu\text{g/ml}$ доводи до скоро потпуног прекида контракција код оба екстракта (136).

Флавоноиди показују велику фармаколошку и биохемијску активност, а уочено је да утичу и на функционисање имуног система (137). Студије које су испитивале антихистаминско и антиалергијско деловање екстраката су спровођене у *in vivo* условима са циљем да одреде која једињења у екстрактима су одговорна за овакво њихово деловање. Уочено је да су флавоноиди показали највећу антихистаминску активност. Флавоноиди (кверцетин, кверцетин-3-о-глукозид, рутин) изоловани из *Cressa cretica L.* стабилишу ћелијске мембране мастоцитних и базофилних ћелија и на тај начин смањују ослобађање хистамина (138). Поред овог могућег механизма деловања флавоноида, зна се да они могу да утичу и на функционисање ензима попут киназа, фосфолипаза, липооксигеназа (139). На пример флавоноиди лутеолин или кверцетин испољавају антиалергијско деловање инхибирањем активације ензима протеин киназе С, међутим њих нема, односно налазе се у траговима испитиваних екстраката (140).

Сви ови механизми деловања флавоноида доприносе ефекту које остварују у *in vivo* истраживањима. Међутим, мали је број студија које су испитивале директну антихистаминску активност биљака. Доказано је да свега неколико биљних врста и њихових екстраката испољава директну антихистаминску активност. Деривати кверцетина из силимарина, *Striga orobanchioides*, *Rhamnus nakaharai* али не и сам кверцетин инхибирају контракције изолованог трахеалног сегмента заморца индукованог хистамином (136, 141, 142). Поред флавоноида херба *P. reptans*, у значајној мери садржи и хлорогенску киселину за коју је такође утврђено да инхибира ослобађање хистамина из мастоцитних ћелија тако што стабилише мембране ових ћелија (143).

С обзиром да је ова студија показала позитивне резултате хербе *P. reptans* на изолованом истмичном сегменту хуманог јајовода, може се претпоставити да екстракт хербе испољава директну антихистаминску активност и да се понаша као компетитивни антагониста хистамина. Добијени резултати отварају нова питања, посебно о ефикасности овог екстракта у *in vivo* условима, прецизније идентификације хемијских једињења, боље повезивање њихове хемијске структуре која је одговорна за ово деловање са фармаколошким ефектима.

Литературни подаци указују на то да катехин и његови деривати имају антиалергијско деловање (144). Катехин из биљке *Albizia lebeck* испољава јак

инхибиторни ефекат ослобађања хистамина тако што доводи до стабилизације мастоцитних ћелија и смањењује експресију цитокина на мембранама сензибилизаних мастоцита (144, 147). Иако је екстракт ризома *P. reptans* богат катехином, он није показао значајно смањење контракција на изолованим препаратима. Овај резултат указује на чињеницу да катехин не испољава директну антихистаминску активност у *in vitro* условима.

Студије које су испитивале антимикуробну активност биљака из рода *Potentillae* показале су да врсте овог рода испољавају умерену или јаку антимикуробну активност. Тако је *P. recta* примењена у концентрацији од 10 mg/ml показала умерену активност на сојевима бактерија *S. aureus* и *E. coli*, са зонама инхибиције 15, односно 12 mm, као и на гљивицама *C. albicans*, и *C. krusei*, са зонама инхибиције 21, односно 17 mm док испитивања на *B. subtilis* нису довела до значајног повећања зоне инхибиције (146). Студија која је испитивала девет врста рода *Potentilla* (*P. argentea*, *P. fruticosa*, *P. recta*, *P. rupestris*, *P. erecta*, *P. anserina*, *P. nepalensis*, *P. thuringiaca*, *P. grandiflora*.) показала је да ове биљке испољавају умерену активност на грам-позитивне бактерије, као и умерени антигљивични ефекат на *Candida albicans*, док антибактеријске активности није било против грам-негативних бактерија. Најјаче антимикуробно дејство испитиване биљке су показала на *H. pylori* где се минимална инхибиторна концентрација кретала у опсегу од 0,1-0,5 mg/ml (57). Добијени резултати наше студије корелирају са литературним подацима о овом роду. Метанолни екстракт *P. recta* примењиван у концентрацији од 10 mg/ml довео је до појаве зоне инхибиције код *S. aureus* од 15 mm (146). Водени екстракт ризома *P. reptans* у овој студији је при концентрацији од 10 mg/ml такође довео до појаве зоне инхибиције код ове бактерије (22 mm), док екстракт надземног дела у овој концентрацији није показао значајно деловање на *S. aureus*, он тек при концентрацији од 50 mg/ml показује зону инхибиције од 16 mm. Зоне инхибиције након примене 10 mg/ml екстраката хербе и ризома *P. reptans* на *E. coli* су 15 mm односно 19 mm. Ове вредности су знатно веће од резултата добијених применом 10 mg/ml екстракта *P. recta* (12 mm) (146). Минимална инхибиторна концентрација (МИК) је одређивана на неколико врста *Potentilla* при чему су постигнути значајни резултати при концентрацијама од 50, односно 100 mg/ml код *E. coli*, док је код *S. aureus* МИК у нешто ширем опсегу. Најмања инхибиторна концентрација је 12,5 mg/ml за *P. nepalensis* и *P. anserine*. Друге врсте попут *P. argentea*, *P. fruticosa*, *P. recta* имају МИК од 25 mg/ml, док остале врсте МИК испољавају у опсегу од 50-100 mg/ml. Иако је

показано да биљке из рода *Potentilla* имају умерену антифугалну активност, на пример МИК за *Candida albicans* се креће у опсегу од 25-100 mg/ml код испитиваних врста *Potentilla* (147), док *P. recta* при концентрацији од 10 mg/ml доводи до појаве зоне инхибиције од 21 mm у овој студији ниједан екстракт при овој концентрацији није показао јасну зону инхибиције. Тек у концентрацијама већим од 100 mg/ml код екстракта ризома може се уочити зона инхибиције од 16 mm.

Истраживања су показала да су секундарни метаболити есенцијални за развој биљке. Истраживање које је вршено на три врсте пшенице је показало да се катехин и његови деривати синтетишу у већој количини код инфицираних биљака у односу на здраве, а такође и ниво катехина опада након завршетка инфекције, па се сматра да је синтеза катехина одбрамбени одговор на напад патогена (148). Једна студија је покушала да разјасни механизам деловања катехина на гљивицу *C. albicans* где је показано да катехин испољава фунгостатички ефекат. Доказано је да катехин делује на ћелијском нивоу тако што смањује пренос сигнала и на тај начин инхибира каскадни пут митоген активирајуће протеин киназе и смањује синтезу cAMP. Катехин посебно утиче на тзв. хифа форму *C. albicans* за коју се сматра да повећава патогеност ове гљивице, јер се прилагођава различитим условима средине. Катехин је доминантни метаболит ризома *P. reptans* и може се претпоставити да је главни носилац активности овог екстракта (149). Што се тиче антимикуробног деловања, доказано је да катехин поседује антимикуробну активност при чему механизам деловања још увек није разјашњен. Претпоставка је да хидроксилна група на катехинском молекулу услед дехидрогенације се преводи у карбоксилну групу која са своје стране може да оствари везу са фосфолипидима на ћелијској мембрани, а што доводи до оштећења мембране и физиолошких функција (150).

У херби *P. reptans* доминантни секундарни метаболити су фенолна једињења од којих су најзаступљенији флавоноиди и деривати хлорогенске киселине. Деривати хлорогенске киселине показују антимикуробну активност против грам-позитивних и грам-негативних бактерија (151). Међутим, екстракти биљака из којих су ова једињења изолована показала су бољу антимикуробну активност од самих једињења. Може се претпоставити да деривати хлорогенске киселине делују синергистички са другим фенолним једињењима из екстракта у испољавању антимикуробног деловања (151). Флавоноиди су ароматична фенолна једињења која се синтетишу у биљкама као одговор на микробиолошке инфекције. Претпоставља се да микробиолошка активност

флавоноида потиче од њихове способности да стварају иреверзибилан комплекс са аминокиселинама у протеинима ћелијског зида микроорганизама, што доводи до инактивације протеина и губитка њихове функције а самим тим и уништења микроорганизама. Сматра се да флавоноиди могу градити комплекс и са мембранским ензимима при чему долази до ензимске инактивације. Флавоноиди садрже карбоксилну и хидроксилне групе а сматра се да флавоноиди који у својим структурама имају више хидроксилних група испољавају и већу микробиолошку активност. С обзиром да је уочена и антимикуробна активност једноставних фенолних структура а може се уочити веза између степена хидроксилације и токсичности за микроорганизме. Микробиолошки ефекат водених екстраката *P. reptans* може бити резултат деловања већег броја секундарних метаболита различитих хемијских структура истовремено (152).

6. Закључци

1. Хемијском анализом воденог екстракта хербе *P. reptans* L. уочен је највећи садржај флавоноида, док су у екстракту ризома у највећој мери заступљени процијанидини и флавоноидни агликони. Ризом *P. reptans* L. се карактерише присуством велике количине катехина, а у херби су заступљени хинска, кафена као и деривати хлорогенске киселине.
2. Оба испитивана екстракта *Potentilla reptans* су показала значајан антиоксидантни ефекат. Ризом је показао јачи антиоксидантни ефекат од надземног дела. Екстракт хербе *P. reptans* је показао најслабији ефекат у односу на стандарде, док је екстракт ризома показао јачи ефекат од (ВНТ) а слабији ефекат од (ВНА).
3. Водени екстракт ризома *P. reptans* је довео до редукције едема на експерименталном моделу уха миша. Највиша примењена доза екстрата (10 mg/уху), је довела до инхибиције едема од 61,37 %, што представља 89,24 % деловања дексаметазона. Водени екстракт хербе *P. reptans* није довео до значајне редукције едема.
4. Оба екстракта хербе и ризома *P. reptans* испољавају цитотоксичну активност. Цитотоксична активност ризома у концентрацији од 800 µg/ml је била већа од цитотоксичне активности екстракта концентрација 100 µg/ml и 600 µg/ml. цитотоксична активност екстракта хербе била је већа при концентрацији од 800 µg/ml у односу на концентрацију од 100 µg/ml.
5. Водени екстракт хербе *P. reptans* примењен у концентрацији од 13 µg/ml показује антихистаминско деловање. За разлику од хербе екстракт ризома није показао значајну антихистаминску активност.
6. Водени екстракт хербе *P. reptans* у концентрацијама 10 – 150 mg/ml испољава антимикуробну активност према *Escherichia coli* а 50 – 150 mg/ml према *Staphylococcus aureus*, док ни једна од примењених концентрација није довела до инхибиције раста бактерије *Klebsiella pneumoniae*. Екстракт ризома *P. reptans* у концентрацији 10 – 150 mg/ml делује антимикуробно против *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*, а не показује ефекат на *Klebsiella pneumoniae*.
7. Антимикуробно деловање хербе забележено при највећим примењеним концентрацијама (150 mg/ml) је било 95,24 % активности цефтриаксона за

Escherichia-y coli, односно 68,75 % за *Staphylococcus aureus*. Екстракт ризома у концентрацији од 150 mg/ml испољава чак 133,3 % активности цефтриаксона према *Escherichia coli*, а 87,5 % активности цефтриаксона за *Staphylococcus aureus*. Екстракт ризома има антифунгално деловање (*Candida albicans*) при највишој примењеној концентрацији (150 mg/ml) која је испољила 50 % активности нистатина.

7. Литература

1. Dhami N. Trends in Pharmacognosy: A modern science of natural medicines. J Herbal Med. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2013.06.001>
2. Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S et al. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol.* 2002; 20: 522-31.
3. Lalli JYY. In vitro Pharmacological Properties and Composition of leaf Essential Oils and Extracts of Selected Indigenous Pelargonium (Geraniaceae) Species. PhD Thesis, University of the Witwatersrand, Johannesburg. 2005.
4. Tao X, Younger J, Fan FZ, Wang B, Lipsky PE. Benefit of an Extract of *Tripterygium Wilfordii* Hook F in Patients With Rheumatoid Arthritis A Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Arthritis & Rheumatism.* 2002; 46(7): 1735-43.
5. Potter D, Eriksson T, Evans RC, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Syst Evol.* 2007; 266(1–2): 5–43.
6. Systema Naturae. 2000; <http://sn2000.taxonomy.nl/>
7. Gajic M, Josifovic M. Flora Srbije. Beograd: SANU; 1972.
8. Hegi G. Illustrierte Flora von Mitteleuropa. 3th ed. Hamburg: Aufl. Verlag Paul Parey; 1980.
9. Hiller K. *Potentilla*. In: Hager`s Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. vol. 6, 5th ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer; 1994; 254-269.
10. Chaoluan L, Ikeda H, Ohba H. *Potentilla* Linnaeus. *Flora of China.* 2003; 9: 291–327.
11. Shah M, Sinwari ZK, Leghari MK. et al. A note on centres of diversity of the genus *Potentilla* (Rosaceae). *Bull. Nat. Sci. Mus. Tokyo B (Botany).* 1992; 18: 117–22.
12. Dobeš C, Paule J. A comprehensive chloroplast DNA-based phylogeny of the genus *Potentilla* (Rosaceae): Implications for its geographic origin, phylogeography and generic circumscription. *Mol Phylogenet Evol.* 2010; 56: 156–75.
13. Wolf T. Monographie der Gattung *Potentilla*. Stuttgart: Bibliotheca Botanica; 1908.
14. Goswami AD, Matfield B. Cytogenetic studies in the genus *Potentilla*. *New Phytol.* 1975; 75(1): 135-46.
15. Josifović M. Flora srbije. Beograd: SANU; 1973.
16. Feng W, Zheng X, Yoshida T, Okuda T. Five hydrolyzable tannins from *Potentilla discolor* Bunge. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 1996; 8: 26–30.
17. Gritsenko OM, Smik GK. Phytochemical study of *Potentilla alba*. *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev).* 1977; 1: 88–9.

18. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem.* 2007; 100: 579–83.
19. Kombal R, Glasl H. Flavan-3-ols and flavonoids from *Potentilla anserina*. *Planta Medica* 1995; 61: 484–5.
20. Xue PF, Luo G, Zeng WZ, Zhao YY, Liang H. Secondary metabolites from *Potentilla multifida* L. (Rosaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2005; 33: 725–8.
21. Jang DS, Yoo NH, Kim JM et al. An ellagic acid rhamnoside from the roots of *Potentilla discolor* with protein glycation and rat lens aldose reductase inhibitory activity. *Natural Product Sciences* 2007; 13: 160–3.
22. Grujic-Vasic J, Ramic S, Bosnic T, Rimpapa Z. Phytochemical investigation of the Tormentil—*Potentilla tormentilla*. *Folia Medica Facultatis Medicinae Universitatis Sarajeviensis* 1982; 17: 89–98.
23. Liu Y, Yannan SS, Zhu T. Antibacterial components in *Potentilla discolor*. *Zhongcaoyao* 1984; 15: 333.
24. Tomczyk M, Latté KP. *Potentilla*—A review of its phytochemical and pharmacological profile. *J Ethnopharmacol.* 2009; 122 (2-18): 184-204.
25. Cheynier V, Comte G, Davies KM, Lattanzio V, Martens S. Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem.* 2013; doi: 10.1016/j.plaphy.2013.05.009.
26. Kovačević N. *Osnovi farmakognozije*. 3th ed. Београд: Srpska školska knjiga Beograd; 2004.
27. Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. *Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet*. Blackwell Publishing; 2006.
28. Peng B, Qiao CF, Zhao J, Huang WH, Hu DJ, Liu HG, Li SP. Simultaneous Determination of Flavonoids, Isochlorogenic Acids and Triterpenoids in *Ilex hainanensis* Using High Performance Liquid Chromatography Coupled with Diode Array and Evaporative Light Scattering Detection. *Molecules* 2013; 18: 2934-41.
29. Mahmood T, Anwar F, Abbas M, Saari N. Effect of Maturity on Phenolics (Phenolic Acids and Flavonoids) Profile of Strawberry Cultivars and Mulberry Species from Pakistan. *Int. J. Mol. Sci.* 2012; 13: 4591-607.
30. Vasconsuelo A, Boland R. Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science.* 2007; 172: 861–75.

31. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *J Food Eng.* 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
32. Schleep S, Friedrich H, Kolodziej H. The first natural procyanidin with a 3,4-*cis*-configuration. *J Chem Soc Chem Commun.* 1986; 392–6.
33. Li Q, Hui J, Shang D, Wu L, Ma X. Investigation of the chemical constituents of the roots of *Potentilla anserina* L. in Tibet. *Chin. Pharm. J.* 2003; 55: 179–84.
34. Li YY, Xiao CM, Yao M, Zeng XY, Xiao XH, Zhu CQ. Study on chemical constituents of triterpenoids from *Potentilla discolor*. *Zhong Yao Cai.* 2013; 36(7):1099-101.
35. Selenina LV, Zozulya RN, Yakovleva TN. Polyphenols of *Potentilla erecta* and their biological activity. *Rastitel'nye Resursy.* 1973; 9: 409–14.
36. Okuda T, Yoshida T, Hatano T et al. Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the Rosaceae. *Phytochemistry* 1992; 31: 3091–6.
37. Okuda T, Yoshida T, Kuwahara M, Memon MU, Shingu T. Agrimoniin and potentillin, an ellagitannin dimer and monomer having an α -glucose core. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications.* 1982; 153–64.
38. Okuda T, Yoshida T, Kuwahara M, Memon MU, Shingu T. Tannins of rosaceous medicinal plants. I. Structures of potentillin, agrimonic acids A and B, and arimoniin, a dimeric ellagitannin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin.* 1984; 32: 2165–73.
39. Goncharov NF, Stupakova EP, Komissarenko NF. Polyphenol composition Of the the epigeal part of *Potentilla erecta*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.* 1989; 25: 431–2.
40. Goncharov NF, Stupalova EP, Komissarenko NF, Gella EV. Coumarins of the epigeal part of *Potentilla erecta*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii.* 1987; 23: 299–300.
41. Popov SV, Popova GY, Ovodova RG, Ovodov YS. Antiinflammatory activity of the pectic polysaccharide from *Comarum palustre*. *Fitoterapia* 2005; 76: 281–7.
42. Vilfort R. *Lekovito bilje I njegova upotreba.* Beograd: Sezam book; 2009.
43. Long ChL, Li R. Ethnobotanical studies on medicinal plants used by the Red-headed Yao People in Jinping, Yunnan Province, China. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 90: 389–95.
44. Manandhar NP. A survey of medicinal plants of Jajarkot district, Nepal. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 48: 1–6.

45. Xue PF, Yin T, Liang H, Zhao YY. Study on chemical constituents of *Potentilla discolor*. Chinese Pharmaceutical Journal. 2005; 40: 1052–4.
46. Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extract; preliminary screening studies. Journal of Ethnopharmacology 2008; 115: 140–6.
47. Ivancheva S, Stantcheva B. Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria. Journal of Ethnopharmacology 2000; 69: 165–72.
48. De Natale A, Pollio A. Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). J Ethnopharmacol. 2007; 109: 295–303.
49. Li PL, Lin CJ, Zhang ZX, Jia ZJ. Three new triterpenoids from *Potentilla multicaulis*. Chemistry and Biodiversity 2007; 4: 17–24.
50. Wang QH, Li ZY, Shen Y, Lin HW, Shu W, Zhou JB. Studies on triterpenoids from *Potentilla chinensis*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2006; 31(17):1434-6.
51. Spiridonov NA, Konovalov DA, Arkhipov VV. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plant compounds. Phytother Res. 2005; 19: 428–32.
52. Syiem D, Syngai C, Kharbuli B, Kayang H, Khongwir BS. Anti-tumor activity of crude root extract of *Potentilla fulgens*. Indian Drugs. 2003; 40: 124–5.
53. McCutcheon AR, Roberts TE, Gibbons E et al. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. J Ethnopharmacol. 1995; 49: 101–10.
54. Tackechi M, Tanaka Y, Takehara M, Nonaka GI, Nishioka I. Structure and antiherpetic activity amongs the tannins. Phytochemistry. 1985; 24: 2245–50.
55. Pleszczyńska M, Wiater A, Szczodrak J, Bachanek T. Searching for natural substances inhibiting glucosyltransferases from mutans streptococci. Nowa Stomatologia. 2003; 8: 163–7.
56. Kołodziej H, Kayser O, Latte KP, Ferreira D. Evaluation of the antimicrobial potency of tannins and related compounds using the microdilution broth method. Planta Med. 1999; 65: 444–6.
57. Tomczyk M, Leszczyńska K, Tomczykowa M, Jakoniuk P. Screening of antimicrobial activity of aqueous extracts of the selected *Potentilla* L. species. Planta Med. 2007; 73: 854–5.
58. Hamza OJM, Carolien JP, Beukel B, et al. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. Journal of Ethnopharmacology, 2006;108(1):124-32.

-
59. Latte KP, Kołodziej H. Antifungal effects of hydrolysable tannins and related compounds on dermatophytes, mould fungi and yeasts. *Zeitschrift fur Naturforschung* 2000; 55: 467–72.
 60. Tunon H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol.* 1995; 48: 61–76.
 61. Youngken JHW, Neva AC, Dauben JHJ, Chang YW, Wenkert E. The muscle relaxant effects produced by *Potentilla anserina* extracts. I. Fractionation studies. *J Am Pharm Assoc.* 1949; 38 (8): 448–51.
 62. Kalia K, Sharma K, Singh HP, Singh B. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *J Agric Food Chem.* 2008; 56 (21): 10129–34.
 63. Miliauskas G, VanBeek TA, Venskutonis PR, Linssen JPH, deWaard P, Sudholter JRE. Antioxidant activity of *Potentilla fruticosa*. *J Sci Food Agric.* 2004; 84: 1997–2009.
 64. Terashima S, Shimizu M, Nakayama H, et al. Studies on aldose reductase inhibitors from natural products. Part III. Studies on aldose reductase inhibitors from medicinal plant of “Sinfito,” *Potentilla candicans*, and further synthesis of their related compounds. *Chem Pharm Bull.* 1990; 38: 2733–6.
 65. Enomoto S, Okada Y, Guvenc A, Erdurak CS, Coskun M, Okuyama T. Inhibitory effects of traditional Turkish folk medicine on aldose reductase (AR) and hematological activity, and on AR inhibitory activity of quercetin-3-Omethyl ether isolated from *Cistus laurifolius* L. *Biol Pharm Bull.* 2004; 27: 1140–3.
 66. Borrelli F, Izzo AA. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother Res.* 2000; 14: 581–91.
 67. Popov SV, Ovodova RG, Markov PA, Nikitina IR, Ovodov YS. Protective effect of comaruman, a pectin of cinquefoil *Comarum palustre* L., on acetic acidinduced colitis in mice. *Dig Dis Sci.* 2006; 51: 1532–7.
 68. Laloo D, Prasad SK, Krishnamurthy S, Hemalatha S. Gastroprotective activity of ethanolic root extract of *Potentilla fulgens* Wall. ex Hook. *Journal of Ethnopharmacology* 2013;146: 505–14.
-

-
69. Syiem D, Syngai C, Khup PZ, Khongwir BS, Kharbuli B, Kayang H. Hypoglycemic effects of *Potentilla fulgens* L. in normal and alloxan-induced diabetic mice. *J Ethnopharmacol.* 2002; 83: 55–61.
 70. Stachurski L, Strzelecka H. Quantitative determination of tormentoside and two of its isomers in *Potentilla erecta* L. rhizomes. *Herba Pol.* 1994; 40: 99–105.
 71. Pilipovic S, Bosnic T, Redzic S, Mijanovic M. Topical anti-inflammatory effect of acetone rhizome/root extract of *Potentilla mal'jana* Borbas. *Planta Med.* 2007; 73: 829–30.
 72. Pilipovic S, Grujic-Vasic J, Ibrulj A, Redzic S, Bosnic T. Antiinflammatory effect of rhizome and root of *Potentilla erecta* (L.) Raeuschel and *Potentilla alba* L. (Rosaceae). Abstract P164, p. 192, 53. Joint meeting of the Society of Medicinal Plant Research, Florence. 2005.
 73. Kolpakov MA, Grek OR, Bashkirova YV, Lyubarskii MS, Ravilova YR. Hepatoprotective properties of aqueous extract from *Pentaphylloides fruticosa* during chronic toxic hepatitis. *Bull Exp Biol Med.* 2001; 131: 470–2.
 74. Vennat B, Bos MA, Pourrat A, Bastide P. Procyanidins from Tormentil: Fractionation and study of the anti-radical activity towards superoxide anion. *Biol Pharm Bull.* 1994; 17: 1613–5.
 75. Teftyuyeva N. Effects of *Potentilla tormentilla* spirituous tincture on lipoperoxidation of rats blood. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skodowska. Sectio DDD, Pharmacia* 2004; 17: 189–91.
 76. Avci G, Kupeli E, Eryavuz A, Yesilada E, Kucukkurt I. Antihypercholesterolaemic and antioxidant activity assessment of some plants used as remedy in Turkish folk medicine. *J Ethnopharmacol.* 2006; 107: 418–23.
 77. Hor M, Rimpler H, Heinrich M. Inhibition of intestinal chloride secretion by proanthocyanidins from *Guazuma ulmifolia*. *Planta Med.* 1995; 61: 208–12.
 78. Verhaeren EHC, Lemli J. The effect of gallotannins and (+)-catechin on the stimulated fluid secretion on the colon, following a rhein perfusion in guinea pigs. *Planta Med.* 1986; 52: 269–72.
 79. Galvez J, Zarzuelo A, Crespo ME et al. Antidiarrhoeic activity of *Sclerocarya birrea* bark extract and its active tannin constituent in rat. *Phytother Res.* 1991; 5: 276–8.
 80. Subbotina MD, Timchenko VN, Vorobyov MM, Konunova YS, Aleksandrovih YS, Shushunov S. Effect of oral administration of tormentil root extract (*Potentilla*
-

- tormentilla*) on rotavirus diarrhea in children: a randomized, double blind, controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2003; 22: 706–11.
81. Huber R, Ditfurth AV, Amann F et al. Tormentil for active ulcerative colitis: an open-label, doseescalating study. *J Clin Gastroenterol.* 2007; 41: 834–8.
82. Gurbuz I, Ozkan AM, Yesilada E, Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2005; 101: 313–8.
83. Farmakopeja SFRJ IV. Beograd: savezni zavod za zdravstvenu zastitu; 1984.
84. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152–78.
85. Beara NI, Lesjak MM, Jovin ĐE, et al. Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 9268–73.
86. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 2002; 10: 178–82.
87. Porter LJ, Hristich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; 25(1): 223-30.
88. Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochem. Anal.* 2000; 11: 330–8.
89. Okoli CO, Akah PA, Onuoha NJ, Okoye TC, Nwoye AC, Nworu CS. *Acanthus montanus*: An experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. *BMC Complement Altern Med.* 2008; 8: 27.
90. Leite GO, Leite L, Sampaio RS, et al. (–)- α -Bisabolol attenuates visceral nociception and inflammation in mice. *Fitoterapia.* 2011; 82: 208–11.
91. Wilmer JL, Burlison FG, Kayama F, Kauno J, Luster MI. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 1994; 102: 915–22.
92. Mosmann TR. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods.* 1983; 65: 55-63.
93. Le HK, Graham L, Cha E, Morales JK, Manjili MH, Bear HD. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary

- carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* 2009; 9: 900–9.
94. Hussain RF, Nouri AME, Oliver RTD. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay Original Research Article. *J. Immunol. Methods.* 1993; 160 (1): 89-96.
95. Jankovic SM, Jankovic SV, Lukic G, Radonjic V, Cupara S, Stefanovic S. Contractile effects of endothelins on isolated ampullar segment of human oviduct in luteal phase of menstrual cycle. *Pharmacol Res.* 2009; 59: 69-73.
96. Bowman WC, Rand MJ. Principles of Drug Action. In: Textbook of Pharmacology. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1980; 1-46.
97. Kenakin TP. The classification of drugs and drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev.* 1984; 36: 165-222.
98. Jankovic SM, Milovanovic DR, Jankovic SV. Schild's equation and the best estimate of pA_2 value and dissociation constant of an antagonist. *Croatian Med J.* 1999; 40: 67-70.
99. Cheruiyot KR, Olila D, Kateregga J. In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. *African Health Sciences* 2009; 9: S42-6.
100. Xue P, Zhao Y, Wang B, Liang H. Simultaneous determination of seven flavonoids in *Potentilla multifida* by HPLC. *J Chromatogr Sci.* 2007; 45(4): 216-9.
101. Shahat AA, Marzouk MS. Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. *Med. Plant Research in Africa.* 2013; 479-555.
102. Tomczyk M, Pleszczyńska M, Wiater A. Variation in Total Polyphenolics Contents of Aerial Parts of *Potentilla* Species and Their Anticariogenic Activity. *Molecules* 2010; 15: 4639-51.
103. Katalinic V, Milos M, Modun D, Music I, Boban M. Antioxidant effectiveness of selected wines in comparison with (+)-catechin. *Food Chem.* 2004; 86: 593–600.
104. Suzuki T, Someya S, Hu F, Tanokura M. Comparative study of catechin compositions in five Japanese persimmons (*Diospyros kaki*). *Food Chem.* 2005; 93: 149–52.
105. Tsanova-Savova S, Ribarova F, Gerova M. (+)-Catechin and (-)-epicatechin in Bulgarian fruits. *J Food Compost Anal.* 2005; 18: 691-8.

106. Cuvelier ME, Hubert R, Berset C. Comparison of the Antioxidative Activity of Some Acid-phenols: Structure-Activity Relationship. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1992; 56 (2): 324-5.
107. Rice-Evans CA, Miller NJ, Pagagna G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20(7): 933-56.
108. Aslan M, Cort A, Yucel I. Oxidative and nitrative stress markers in glaucoma. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 367–76.
109. Halliwell B. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutr Re.* 1999; 57(4): 104-13.
110. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 2002; 96: 67–202.
111. Gülçin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006; 217 (2-3): 213-20.
112. Sun C, Fu J, Chen J, Jiang L, Pan Y. On-line HPLC method for screening of antioxidants against superoxide anion radical from complex mixtures. *J Sep Sci.* 2010; 33(8): 1018-23.
113. Ivanov S, Nomura K, Malfanov IL, Sklyar IV, Ptitsyn LR. Isolation of a novel catechin from *Bergenia* rhizomes that has pronounced lipase-inhibiting and antioxidative properties. *Fitoterapia* 2011; 82: 212–8.
114. Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004; 85: 231–7.
115. Hatano T, Edamatsu R, Hiramatsu M, et al. Effects of the interaction of tannins with co-existing substances. VI.: Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical, and on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem Pharm Bull.* 1989; 37: 2016–21.
116. Cheel J, Theoduloz C, RodriÄguez J, Schmeda-Hirschmann GJ. Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 2511-7.
117. Tadic VM, Dobric S, Markovic GM et al. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(17): 7700–9.

118. Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds-nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 2000; 80: 1094–117.
119. Alder V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z. Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 1999; 18: 6104–11.
120. Keane MP, Strieter RM. The importance of balance pro- inflammatory and anti-inflammatory mechanisms in diffuse lung disease. *Respir. Res.* 2002; 3: 5.
121. Luger TA, Schwarz T. Evidence for an epidermal cytokine network. *J. Invest. Dermatol.* 1990; 95: S100–4.
122. Murray AR, Kisin E, Castranova V, Kommineni C, Gunther MR, Shvedova AA. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20:1769–77.
123. Rogerio AP, Kanashiro A, Fontanari C et al. Antiinflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation Res.* 2007; 56: 402–8.
124. Utsunomiya I, Nagai S, Oh-ishi S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. *Eur J Pharmacol.* 1994; 252: 213-8.
125. Tang LQ, Wei W, Wang XY. Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats. *Adv Ther.* 2007; 24(3): 679-90.
126. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 2001; 56: 683–7.
127. Zeng H, Wang Y, Kong J, Nie C, Yuan Y. Ionic liquid-based microwave-assisted extraction of rutin from Chinese medicinal plants. *Talanta* 83 (2010) 582–590
128. Unnati S, Ripal S, Sanjeev A, Niyati A. Novel anticancer agents from plant sources. *Chin J Nat Med.* 2013; 11(1): 0016–23.
129. Siriwatanametanon N, Fiebich BL, Efferth T, Prieto JM, Heinrich M. Traditionally used Thai medicinal plants: In vitro anti-inflammatory, anticancer and antioxidant activities: *J. Ethnopharmacol.* 2010; 130: 196 – 207.
130. McMillan BBS, Riggs DRBA, Jackson BJBA, Cunningham C, McFadden DWMD. Dietary Influence on Pancreatic Cancer Growth by Catechin and Inositol Hexaphosphate. *J Surg Res.* 2007; 141: 115–9.

-
131. Scheck AC, Perry K, Hank NC, Clark WD.
Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. *BMC Complement Altern Med.* 2006; 6: 27.
132. Kanadaswami C, Lee LT, Lee PPH, et al. The Antitumor Activities of Flavonoids. *In vivo* 2005; 19: 895-910.
133. Neagu E, Paun G, Constantin D, Radu G.L. *Arabian Journal of Chemistry*
Cytostatic activity of *Geranium robertianum* L. extracts processed by membrane procedures. *Arabian Journal of Chemistry* (2013),
<http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.09.028>
134. Tucakov J. *Lecenje biljem.* Beograd: Rad; 2006.
135. Јанковић СМ, Простран М, Тодоровић З. *Фармакологија и токсикологија.* Крагујевц, Београд: медицински факултет у Крагујевцу; 2007.
136. Harish MS, Nagur M, Badami S. Antihistaminic and mast cell stabilizing activity of *Striga orobanchioides* *J Ethnopharmacol.* 2001; 76: 197–200.
137. Middleton EJ, Kandaswami C.
Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol.* 1992; 43(6):1167-79.
138. Sunita P, Jha S, Pattanayak SP. Bronchodilatory and mast cell stabilising activity of *Cressa cretica* L. Evaluation through *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 180-6.
139. Manthey JA. Biological properties of flavonoids pertaining to inflammation. *Microcirculation* 2000; 7: 29–34.
140. Kimata M, Shichijo M, Miura T, Serizawa I, Inagaki N, Nagai H. Effects of luteolin, quercetin and baicalein on immunoglobulin E-mediated mediator release from human cultured mast cells. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30: 501–8.
141. Breschi MC, Martinotti E, Apostoliti F, Nieri P. Protective effect of silymarin in antigen challenge- and histamine-induced bronchoconstriction in *in vivo* guinea pigs. *Eur J Pharmacol.* 2002; 437: 91–5.
142. Ko WC, Wang HL, Lei CB, Shih CH, Chung MI, Lin CN. Mechanisms of relaxant action of 3-O-methylquercetin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med.* 2002; 68: 30–5.
143. Qin HD, Shi YQ, Liu ZH, et al. Effect of Chlorogenic acid on mast cell-dependent anaphylactic reaction. *Int Immunopharmacol.* 2010; 10: 1135–41.
-

144. Venkatesh P, Mukherjee PK, Kumar NS, et al. Anti-allergic activity of standardized extract of *Albizia lebeck* with reference to catechin as a phytomarker. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2010; 32(2): 272-6.
145. Maeda-Yamamoto M, Ema K, Monobe M, Tokuda Y, Tachibana H. Epicatechin-3-O-(3''-O-methyl)-gallate content in various tea cultivars (*Camellia sinensis* L.) and its in vitro inhibitory effect on histamine release. *J Agric Food Chem*. 2012; 60(9): 2165-70.
146. Tosun A, Bahadir Ö, Altanlar N. Antimicrobial activity of some plants used in folk medicine in Turkey. *Turk J Pharm Sci*. 2006; 3(3): 167-76.
147. Tomczyk M, Leszczyńska K, Jakoniuk P. Antimicrobial activity of *Potentilla* species. *Fitoterapia* 2008; 79: 592-4.
148. Ghassempour A, Mollayi S, Farzaneh M, Sharifi-Tehrani A, Aboul-Enein HY. Variation of Catechin, epicatechin and their enantiomers concentrations before and after wheat cultivar-*Puccinia triticina* infection. *Food Chem*. 2011; 125: 1287-90.
149. Saito H, Tamura M, Imai K, Ishigami T, Ochiai K. Catechin inhibits *Candida albicans* dimorphism by disrupting Cek1 phosphorylation and cAMP synthesis. *Microb Pathog*. 2013; 56: 16-20.
150. Chunmeia D, Jiabob W, Weijuna K, Chengc P, Xiaoheb X. Investigation of antimicrobial activity of catechin on *Escherichia coli* growth by microcalorimetry. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2010; 30: 284-8.
151. Xia D, Wu X, Shi J, Yang Q, Zhang Y. Phenolic compounds from the edible seeds extract of Chinese Mei (*Prunus mume* Sieb. et Zucc) and their antimicrobial activity. *Food Sci and Technol- LEB* 2011; 44: 347-9.
152. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12: 564-82.

ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Редни број: РБ

Идентификациони број: ИБР

Тип документације: ТД

Монографска публикација

Тип записа: ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада: ВР

Докторска дисертација

Аутор: АУ

Марина Т. Томовић

Ментор: МН

доц. др Снежана Цупара

Наслов рада: НР

Испитивање антимикробног,
антиинфламаторног и
антихистаминског дејства екстракта
Potentilla reptans L.

Језик публикације: ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода: ЈИ

Српски / Енглески

Земља публикавања: ЗП

Србија

Уже географско подручје: УГП

Србија

Година: ГО

2014.

Издавач: ИЗ

Ауторски репринт

| | |
|---------------------------------------|---|
| Место и адреса: МС | Светозара Марковића 69, 34 000 Крагујевац |
| Физичи опис рада: ФО | Дисертација има 89 страна, 7 поглавља, 20 слика, 11 табела и 152 референце |
| Научна област: НО | Медицина |
| Научна дисциплина: ДИ | Клиничка и експериментална фармакологија |
| Предметна одредница / кључне речи: ПО | <i>Potentilla reptans L.</i> , анти-инфламаторно, антихистаминско, антимикробно деловање екстраката, фитохемијска анализа |
| УДК | |
| Чува се: ЧУ | У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу, Светозара Марковића 69, 34 000 Крагујевац |
| Важна напомена: ВН | |
| Извод: ИД | |

Potentilla reptans L. је коровска биљка доста распрострањена у Европи и Азији. Користи се у традиционалној медицини, у терапији различитих обољења сама или у комбинацији са другим биљкама. Циљ овог истраживања је одређивање хемијског профила ове биљке као и утврђивање биолошке активности и фармаколошких ефеката водених екстраката ризома и хербе *P. reptans*. До сада нису забележени подаци о хемијском саставу ризома *P. reptans*, док је у херби идентификовано осам једињења. Фармаколошка испитивања су се односила на одређивање антиоксидантног и антиулцерогеног ефекта.

За предвиђене анализе припремљени су водени екстракти хербе и ризома *P. reptans*. Применом референтне методологије одређен је садржај укупних фенола, флавоноида и процијанидина, као и идентификација фенолних једињења из помоћ 45 стандардних супстанци. У *in vitro* условима применом DPPH теста одређена је антиоксидантна

активност екстраката. Испитивање фармаколошких ефеката спроведено је применом одговарајућих методологија при чему је одређивана антиинфламаторна, антихистаминска, антимикуробна и цитотоксична активност водених екстраката хербе и ризома *P. reptans*.

Резултати истраживања су показали доминантно присуство флавоноида у херби *P. reptans*, док у ризому доминира катехин. Испитивани екстракти показују антиоксидантни ефекат, где је уочено да нешто јачи антиоксидантни ефекат испољава ризом у односу на хербу. Антиинфламаторна активност је посматрана код оба екстракта применом неколико растућих концентрација. Позитиван резултат је уочен применом највеће концентрације воденог екстракта ризома *P. reptans*. Оба екстракта показују цитотоксичну активност, при чему је већа активност уочена код воденог екстракта ризома. Антихистаминска активност је уочена код воденог екстракта хербе *P. reptans* док ризом није показао ову врсту активности. Испитивањем ефикасности екстраката на грам позитивне, грам негативне бактерије и гљивицу *Candida albicans* уочена је ефикасност обе врсте екстраката. Антимикуробно деловање је било најизраженије при највећим примењеним концентрацијама, изузетак је бактерија *Klebsiella pneumoniae* где ни једна од примењених концентрација није довела до значајног ефекта.

Датум прихватања теме од стране ННВ: ДП

Датум одбране: ДО

Чланови комисије: КО

Доц. др Наташа Ђорђевић- председнк
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Проф. др Викторија Драгојевић Симић - члан

Медицински факултет ВМА Универзитета одбране у Београду

Проф. др Слободан Јанковић-члан
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

| | |
|-----------------------------|--|
| Accession number: ANO | |
| Identification number: INO | |
| Documentation type: DT | Monographic publication |
| Type of record: TR | Textual material, printed |
| Contents code: CC | Ph.D. Thesis |
| Author: AU | Marina T. Tomovic |
| Menthor: MN | doc. dr Snezana Cupara |
| Title: TI | Examination of the Antimicrobial, Antiinflammatory and Antihistaminic effects of the extracts <i>Potentilla reptans</i> L. |
| Language of text: LT | Serbian |
| Language of abstract: | Serbian / English |
| Country of publication: CP | Serbia |
| Locality of publication: LP | Serbia |
| Publication year: PY | 2014. |
| Publisher: PU | Reprint by author |
| Publication place: PP | Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac |
| Physical description: PD | Thesis contains 89 pages, 7 chapters, 20 images, 11 tables and 152 literature references |

| | |
|---------------------------|--|
| Scientific field: SF | Medicine |
| Scientific discipline: SD | Clinical and experimental pharmacology |
| Subject/key words: SKW | <i>Potentilla reptans</i> L., antiinflammatory, antimicrobial, antihistaminic, chemical analysis |
| UDC | |
| Holding data: | Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia |
| Note: N | |
| Abstract: AB | |

Potentilla reptans L. is a weedy plant widespread throughout Europe and Asia. It has been used in traditional medicine to treat various diseases, alone or in combination with other plants. The aim of this research is to determine the chemical profile of this plant as well as to assess the biological activity and pharmacological effects of an aqueous extract of *P. reptans* rhizome and aerial parts. Until now, no data has been found for chemical composition of *P. reptans* rhizome, while eight compounds have been identified in the aerial part. Pharmacological researches were intended to determine an anti-oxidant and anti-ulcer effect.

The aqueous extracts of both rhizome and aerial parts of *P. reptans* were provided for proposed analysis. Using reference methodology, it was determined the total content of phenols, flavonoids and procyanidins, and phenolic compounds were identified using 45 standard substances. *In vitro*, anti-oxidant activity was determined by using DPPH test. The research of pharmacological effects was carried out using appropriate methodologies where anti-inflammatory, anti-histamic, antimicrobial and cytotoxic activity of aqueous extracts of *P. reptans* rhizome and aerial parts was determined.

Research results showed dominant presence of flavonoids in *P. reptans* aerial parts, while catechin is dominant in rhizome. Examined extracts showed anti-oxidant effect, and it is detected that the rhizome showed a stronger anti-oxidant effect than the areal parts. Anti-inflammatory activity was observed in both extracts using several growing concentrations. Positive result occurred when the highest concentration of the aqueous extract of *P. reptans* rhizome was used. Both extracts showed cytotoxic activity, but stronger activity was detected

in the aqueous extract of rhizome. Anti-histamic activity was detected in the aqueous extract of *P. reptans* areal parts while the rhizome did not show this kind of activity. An examination of the extract effectiveness against gram-positive and gram-negative bacteria and fungus *Candida albicans* showed the effectiveness of both extracts. Antimicrobial activity was the most significant at the highest concentrations, the exception is *Klebsiella pneumonia* bacteria, where the used concentrations did not show any significant effect.

Accepted by the Scientific Board on: ASB

Defended on: DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty): DB

Doc. dr Natasa Djordjevic - Chairmen
Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

Prof. dr Viktorija dragojevic Simic - member

Medical faculty of Military Academy,
Belgrade

Prof. dr Slobodan Jankovic - member
Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

8.3. Биографски подаци аутора

Дипл. фарм. **Марина Т. Томовић** рођена је 14.11.1975. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и Гимназију, природно-математички смер. Фармацеутски факултет, смер дипломирани фармацеут Универзитета у Београду уписала је 1994/95. године а 20. 06. 2001. године дипломирала. Дипломски испит је положила са оценом 10 пред члановима Завода за медицинску биохемију. Удата, мајка два детета.

Од августа 2001 до октобра 2008. год. запослена у Апотеци Крагујевац на месту дипломираног фармацеута. Од 2005. год. обавља функцију начелника апотеке „Палилула“ а од 2006. год. и функцију руководиоца централне набавке Апотеке Крагујевац.

Од септембра 2001. год. до децембра 2002. год. обавља послове професора козметологије у Медицинској школи у Крагујевцу.

Од октобра 2008. год. запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, у звању сарадника у настави за ужу научну област Фармацеутска технологија. Од октобра 2009. год. прелази у звање асистента за ужу научну област Фармацеутска технологија. Учествовала је у два истраживачка пројекта: на „Јуниор“ пројекту Факултета медицинских наука у Крагујевцу и на међународном пројекту: „SEEERANET PLUS 088 -Indigenous Traditional Plants for Preparing Added Value New Products with Different Appllication“. До сада је објавила више научних радова од којих су пет у часописима на СЦИ листи. Ко-аутор је приручника за предмет „Практични аспекти издавања лекова и ручна производња лековитих препарата“. Током 2013. год. је учествовала два пута на курсу континуиране медицинске едукације под називом „Безбедно управљање хемикалијама и биоцидним производима“ као предавач.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу одсек молекулска медицина (клиничка и експериментална фармкологија) уписала је 2008/2009 године. Усмени докторски испит положила је у јуну 2010 године са оценом 10. Докторску дисертацију на тему „Испитивање антимикубног, антиинфламаторног и антихистаминског дејства екстракта *Potentillae reptans L.*“ Пријавила је 20.12.2010. године. Стручно веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу дало је сагласност на тему докторске дисертације на седници одржаној 24.01.2011. године. Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације у саставу: доц. др Наташа Ђорђевић (председник), проф. др Викторија Драгојевић Симић (члан), проф. др

Слободан Јанковић (члан) именована је на седници Наставно – научног већа Факултета медицинских наука 30.10.2013. године.

8.4. Списак објављених радова

Радови у часописима националног и међународног значаја

1. Popovic-Milenkovic TM, **Tomovic TM**, Brankovic RS, Ljubic TB, Jankovic MS. Antioxidant and anxiolytic activities of *Crataegus nigra* Wald. et Kit berries. Acta Pol Pharm. 2014; 71(2): pp. xxx.
2. Kostic M, Jovanovic S, **Tomovic M**, Popovic Milenkovic M, Jankovic S. Cost – effectiveness analysis of tracicizumab in combination with methotrexate for rheumatoid arthritis: a Markov model based on data from a Balkan country in socio – economic transition. Vojnosanit Pregl. 2014; 71(2): pp. xxx.
3. Radovanovic MA, Cupara MS, Popovic LjS, **Tomovic TM**, Slavkovska NV, Jankovic MS. Cytotoxic effect of *Potentilla reptans* L. rhizome and aerial part extracts. Acta Pol Pharm. 2013; 70(5): 851-4.
4. Dostić PM, **Tomović TM**, Popović-Milenković TM, Stefanović MS, Janković MS. Risk factors for intraoperative arrhythmias in general surgery patients operated under general anesthesia. Med Glas. 2012; 9(2): 204-10.
5. Radovanovic A, Cupara S, **Tomovic M**, Tamas V, Ivopol G, Simion D, Gaidau C, Jankovic S. Comparative analysis of the chemical composition of *heliantus tuberosus* L. growing in Serbia and Romania. Ser J Exp Clin Res. 2013; 14(1): 9-12.
6. **Popovic TM**. Pharmacological and phytochemical properties of some species of the genus *Potentilla*. Racionalna terapija 2009; I(2): 1-5.
7. **Tomovic MT**, Cupara SM, Popovic-Milenkovic MT, Ljubic BT, Kostic MJ, Jankovic SM. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Potentilla reptans* L. Acta Pol Pharm. 2015; (1) pp. xxx

Радови саопштени на скупу националног и међународног значаја у форми апстракта

1. **Popović M.** Farmakološke osobine nekih vrsta roda Rotentilla. Други национални конгрес рационалне терапије у медицини. Рационална терапија. Књига сажетака 2009; 1(2): 66.
2. Popović – Milenković M, **Tomović M.** Prirodni preparati i moguće interakcije sa lekovima. Трећи национални конгрес рационалне терапије у медицини. Рационална терапија. Књига сажетака 2011; 3(1): 62.

8.5 ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

| |
|--|
| <i>I. Аутор</i> |
| Име и презиме: Марина Томовић |
| Датум и место рођења: 14.11.1975, Крагујевац |
| Садашње запослење: Асистент на Одсеку за фармацију, Факултета медицинских наука у Крагујевцу |
| <i>II. Докторска дисертација</i> |
| Наслов: Испитивање антимикуробног, антиинфламаторног и антихистаминског дејства екстракта <i>Potentillae reptans L.</i> |
| Број страница: 89 (без Прилога) |
| Број слика: 20 |
| Број библиографских података: 152 |
| Установа и место где је рад израђен: факултет Медицинских Наука у Крагујевцу, Природно математички факултет - Нови Сад. |
| Научна област (УДК): Медицина (Клиничка и експериментална фармакологија) |
| Ментор: Доц. др. Снежана Цупара |
| <i>III. Оцена и одбрана</i> |
| Датум пријаве теме: 20.12.2010 |
| Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 24.01.2011 |
| Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Викторија Драгојевић-Симић Доц. др Наташа Ђорђевић |
| Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Викторија Драгојевић-Симић Доц. др Наташа Ђорђевић |
| Комисија за оцену докторске дисертације: Доц. др Наташа Ђорђевић Проф. др Викторија Драгојевић Симић Проф. др Слободан Јанковић |
| Комисија за одбрану докторске дисертације: Доц. др Наташа Ђорђевић Проф. др Викторија Драгојевић Симић Проф. др Слободан Јанковић |
| Датум одбране дисертације: |

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марино Томовић
број уписа 2008/03

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНОГ, АНТИИНФЛАМАТОРНОГ И
АНТИУСТАЛМИНСКОГ ДЕЈСТВА ЕКСТРАКТА *Potentilla rectoris* L.

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

У Крагујевцу, 21.06.2014.

Потпис аутора

Марино Томовић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марино Томовић
 Број уписа 2008/03
 Студијски програм Докторске академске студије - Клиничка и експериментална медицина
 Наслов рада Испитивање Антибактеријског, Антиинфламаторног и Антихистаминског Дјететског Екстрактa
 Ментор доц др. Снежана Џупара Potentillo reptans L.

Потписани Марино Томовић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Крагујевцу.

Потпис аутора

у Крагујевцу, 21.06.2014.

Марино Томовић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТУВАЊЕ АНТИЦЕРОБНОГ, АНТИИНФЛАМАТОРНОГ И АНТИОСТАНИНСКОГ ДЕЈСТВА ЕКСТРАКТА *Potentilla reclinans* L.
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

у Крагујевцу, 21. 01. 2014.

Морица Поповић