

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Ivan N. Pavlović

**Farmakognoksijsko ispitivanje  
podzemnih organa srpske velestike,  
*Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel  
(Apiaceae)**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Ivan N. Pavlović

**Pharmacognostic investigation of  
underground parts of *Ferula heuffelii*  
Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2015.

Doktorska disertacija urađena je na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta.

Deo eksperimenata urađen je na Katedri za mikrobiologiju i imunologiju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, Katedri za fiziologiju Univerziteta u Nišu – Medicinskog fakulteta, Katedri za medicinsku hemiju i farmakognoziju Univerziteta u Ilinoisu – Farmaceutskog fakulteta (University of Illinois College of Pharmacy, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacognosy, Chicago, USA) i na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.

Mentor

---

Prof. dr Silvana Petrović  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

1. \_\_\_\_\_

Prof. dr Mirjana Radenković  
Univerzitet u Nišu – Medicinski fakultet

2. \_\_\_\_\_

Prof. dr Marina Milenković  
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane \_\_\_\_\_

*Baka Smilji i baka Nadi*

Najiskreniju zahvalnost na svojoj pomoći, savetima, strpljenju, izuzetno stručnom vođenju moje doktorske disertacije, kao i na motivaciji da što više naučim i uradim na svojim doktorskim studijama dugujem svome mentoru, prof. dr Silvani Petrović.

Prof. dr Nadi Kovačević želim da se iskreno zahvalim na ukazanoj šansi da radim na projektu čiji je ona rukovodilac i da se i na taj način uključim u naučnoistraživački rad u okviru svoje doktorske disertacije.

Prof. dr Marini Milenković zahvaljujem na svesrdnoj pomoći i korisnim savetima prilikom ispitivanja antimikrobne, antiinflamatorne i gastroprotektivne aktivnosti. Uz to, najtoplije joj se zahvaljujem i na podršci koju mi je pružala za sve vreme mojih doktorskih studija.

Prof. dr Mirjani Radenković i prof. dr Suzani Branković zahvaljujem na pruženoj prilici da na njihovom institutu uradim ispitivanja spazmolitičke aktivnosti, na pomoći i stručnim savetima u toku izvođenja eksperimenata, kao i na ukazanom gostoprimstvu.

Dr sc. Dejanu Nikoliću dugujem veliku zahvalnost na snimanju i pomoći prilikom tumačenja masenih spektara izolovanih jedinjenja, ali, i pre svega, prijateljskoj podršci svih ovih godina.

Dr sc. Alekseju Kruniću dugujem takođe veliku zahvalnost na snimanju NMR spektara, a naročito na pomoći prilikom njihovog tumačenja.

Dr sc. Marjanu Niketiću zahvaljujem na pomoći u prikupljanju i identifikaciji biljnog materijala koji je ispitivan u okviru ove disertacije.

Dr sc. Tatjani Stanojković iskreno se zahvaljujem na pomoći prilikom ispitivanja citotoksične aktivnosti.

Želim da izrazim veliku zahvalnost i doc. dr Milici Drobac na svojoj pomoći koju mi je pružila, a naročito na početku doktorskih studija, pre svega pri ispitivanju hemijskog sastava etarskih ulja, kao i pri postavljanju semipreparativne HPLC metode.

Svom prijatelju Bojanu Jovanoviću, inženjeru računarstva, dugujem takođe veliku zahvalnost na tehničkoj pomoći prilikom pisanja radova koji su proistekli iz ove disertacije.

Svim kolegama sa Katedre za farmakognoziiju dugujem zahvalnost na prijateljstvu i pomoći koju su mi pružali svih ovih godina. Posebno želim da se zahvalim Jeleni i Višnji, koje su kao moje koleginice tačno znale kada mi je pomoć najpotrebnija.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici. Svi oni su tokom ovih godina pokazali puno razumevanje za rad na mojoj doktorskoj disertaciji i pružali mi bezrezervnu podršku, ljubav i pomoć. Da nije njih ova disertacija ne bi imala za mene ovoliki značaj.

## Farmakognoksijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)

### Rezime

Predmet doktorske disertacije je analiza hemijskog sastava i ispitivanje farmakološke aktivnosti izolata (etarskih ulja, hloroformskog i metanolnog ekstrakta i metabolita) podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). Srpska velestika je endemična vrsta koja naseljava klisure i stenovite terene istočne Srbije, jugozapadne Rumunije i zapadne Bugarske. Ova vrsta do sada nije ispitivana u pogledu hemijskog sastava i farmakološke aktivnosti.

Etarska ulja podzemnih organa *F. heuffelii* izolovana su iz uzoraka prikupljenih na tri lokaliteta u Republici Srbiji: Sićevačkoj klisuri, Đerdapskoj klisuri i klisuri reke Pek. Etarska ulja su izolovana destilacijom vodenom parom i hemijski okarakterisana metodama GC-FID i GC-MS. Etarsko ulje izolovano iz podzemnih organa poreklom iz Sićevačke klisure (F1) bilo je bogato seskviterpenima (48,7%) i fenilpropanima (17,0%), a glavni sastojak bio je elemicin (12,5%). Etarska ulja izolovana iz podzemnih organa prikupljenih u Đerdapskoj klisuri (F2) i klisuri reke Pek (F3), karakterisao je visok sadržaj fenilpropanskih jedinjenja (56,0 i 29,7%, redom), pri čemu su elemicin (35,4 i 16,8%, redom) i miristicin (20,6 i 12,9%, redom), bili najzastupljenije komponente. Razlike između ispitivanih etarskih ulja bile su pre svega kvantitativne prirode.

Kombinacijom odgovarajućih hromatografskih tehnika za razdvajanje i izolovanje sekundarnih metabolita (hromatografija na koloni silikagela i semipreparativna HPLC) i strukturnih instrumentalnih metoda (jedno- i dvodimenzionalna NMR spektroskopija i HR-MS ESI<sup>+</sup> spektrometrija), iz hloroformskog ekstrakta (HE) podzemnih organa srpske velestike izolovano je i identifikovano deset jedinjenja: dva fenilpropana [latifolon (**1**) i elemicin (**2**)], dva seskviterpena prenil-benzoil tipa [(6*E*)-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on (**3**) i džamiron (**4**)], dva seskviterpena prenil-benzoilfuranonskog tipa [(3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahidro-4,5-dimetilfuran-2-on (**5**) i fukanedon B (**8**)], dva seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa [(2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**) i bajgen C (**9**)], jedan seskviterpen prenil-dihidrofurohromonskog tipa [(2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon (**10**)] i jedan seskviterpenski umbeliferil etar [samarkandinacetat (**7**)]. U frakciji HE koja je rastvorena u metanolu, HPLC metodom, određen je sadržaj jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6**. Njihov sadržaj računat na sirovi HE iznosio je 6,84% jedinjenja **1**, 4,16% jedinjenja **3**, 1,74% jedinjenja **4** i 10,92% jedinjenja **6**.

U metanolnom ekstraktu (ME), HPLC metodom, identifikovana su četiri metabolita: jedinjenja **1** i **6**, kao i dve fenolkarboksilne kiseline: hlorogenska (**11**) i 3,5-dikafeoilhina kiselina (**12**). HPLC metodom u ME kvantifikovana su jedinjenja **1**, **6** i **11** i njihov sadržaj iznosio je 1,32, 1,39, i 3,46%, redom. Sadržaj ukupnih fenola u ME određen je spektrofotometrijski korišćenjem *Folin-Ciocalteu* reagensa i iznosio je 0,112 mg ekvivalenta galne kiseline/mg suvog ekstrakta.

Antioksidantna aktivnost ekstrakata podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivana je *in vitro*. Ukupna antioksidantna aktivnost, određena FRAP testom, iznosila je 0,98 μmol Fe<sup>2+</sup>/mg suvog ME, odnosno 0,13 μmol Fe<sup>2+</sup>/mg suvog HE. Anti-DPPH aktivnost ME bila je umerena (SC<sub>50</sub>=62,5 μg/ml), a HE slaba (SC<sub>50</sub>=145,5 μg/ml). ME je u opsegu

koncentracija od 5-20  $\mu\text{g/ml}$  ostvario koncentraciono-zavisnu neutralizaciju  $\cdot\text{OH}$  radikala, ostvarivši u koncentraciji od 20  $\mu\text{g/ml}$   $49,54 \pm 3,16\%$  inhibicije. U koncentracijama iznad 20  $\mu\text{g/ml}$  aktivnost je opadala, što je objašnjeno prisustvom supstanci sa prooksidantnom aktivnošću. HE u testiranom opsegu koncentracija (3,12-100,00  $\mu\text{g/ml}$ ) nije doveo do neutralizacije  $\cdot\text{OH}$  radikala. Sva tri etarska ulja pokazala su zadovoljavajuću anti-DPPH aktivnost ( $\text{SC}_{50} = 22,43-47,75 \mu\text{l/ml}$ ).

Spazmolitička aktivnost izolata (etarskog ulja F2, ekstrakata, kao i jedinjenja **1**, **4**, **6** i **11**), ispitivana je *in vitro* na izolovanom ileumu pacova u tri eksperimentalna modela: prema spontanim kontrakcijama i kontrakcijama izazvanim acetilholinom (ACh) i kalijum-hloridom (KCl). Etarsko ulje F2 ispoljilo je snažno, koncentraciono-zavisno i statistički značajno spazmolitičko delovanje. U koncentraciji od 375  $\mu\text{g/ml}$  ostvarilo je prema spontanim kontrakcijama relaksantni efekat uporediv sa efektom atropina (14,44  $\mu\text{g/ml}$ ). Ovo ulje je u opsegu koncentracija od 15-75  $\mu\text{g/ml}$  ostvarilo jak spazmolitički efekat i prema kontrakcijama izazvanim ACh. Nakon inkubacije preparata sa 75  $\mu\text{g/ml}$  F2, u potpunosti je izostao koncentraciono-zavisna spazmogena efekat ACh, a maksimalni efekat ACh smanjen je na  $12,75 \pm 12,66\%$ . Ulje je u koncentracijskom opsegu od 25–250  $\mu\text{g/ml}$  takođe koncentraciono-zavisno inhibiralo tonične kontrakcije ileuma izazvane KCl (80 mM) i u koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$  gotovo u potpunosti poništilo efekat KCl. HE je prema spontanim kontrakcijama ostvario koncentraciono-zavisna spazmolitički efekat i u koncentraciji od 0,3 mg/ml ostvario  $109,19 \pm 28,26\%$  efekta atropina (6,4  $\mu\text{M}$ ). Ovaj ekstrakt je ostvario relaksantni efekat i prema kontrakcijama izazvanim ACh i u koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$  doveo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na  $48,53 \pm 16,68\%$ . Efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl po intenzitetu je bio sličan efektu koji je ostvarilo etarsko ulje. U koncentraciji od 0,3 mg/ml, ekstrakt je smanjio kontraktilni efekat KCl na  $13,19 \pm 26,79\%$ . ME je ispoljio koncentraciono-zavisna i statistički značajan efekat u sva tri eksperimentalna modela. U koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$ , ME je prema spontanim kontrakcijama ostvario jači efekat ( $124,57 \pm 21,39\%$ ) od efekta atropina (6,4  $\mu\text{M}$ ). U koncentraciji od 120  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakt je snažno inhibirao kontrakcije ileuma izazvane ACh i doveo do smanjenja maksimalnog kontraktilnog efekta ACh na  $26,35 \pm 23,69\%$ . Aktivnost ME prema kontrakcijama izazvanim KCl testirana je u opsegu koncentracija od 10-60  $\mu\text{g/ml}$ , i u koncentraciji od 60  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakt je doveo do smanjenja efekta KCl na  $44,42 \pm 11,26\%$ . Jedinjenja **1**, **6** i **11** ostvarila su koncentraciono-zavisna relaksantni efekat prema spontanim kontrakcijama ileuma. Jedinjenja **1** (28,8  $\mu\text{M}$ ) i **11** (28,2  $\mu\text{M}$ ) su u gotovo identičnim koncentracijama ispoljila snažan i statistički značajan relaksantni efekat koji je iznosio  $93,20 \pm 26,57\%$  (za jedinjenje **1**) i  $95,95 \pm 31,90\%$  (za jedinjenje **11**) efekta atropina (6,4  $\mu\text{M}$ ). Jedinjenje **6** je delovalo slabije i u koncentraciji od 26,2  $\mu\text{M}$  ostvarilo efekat od  $46,13 \pm 21,50\%$  efekta atropina. Efekat jedinjenja **4** testiran je samo u koncentraciji 22,5  $\mu\text{M}$  i iznosio je  $37,03 \pm 21,86\%$  efekta atropina. Sva četiri testirana metabolita ostvarila su spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh. Aktivnost jedinjenja **1** ispitivana je u koncentracijama 9,6  $\mu\text{M}$  i 19,2  $\mu\text{M}$ . Jedinjenje **1** ostvarilo je spazmolitički efekat u manjoj, ali ne i u većoj primenjenoj koncentraciji. Efekat ovog jedinjenja bio je jači prema nižim koncentracijama ACh, pri čemu je ono ipak dovelo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na  $89,34 \pm 19,92\%$ . Nešto jači efekat ostvarilo je jedinjenje **4**, koje je u koncentraciji od 22,5  $\mu\text{M}$  dovelo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na  $68,09 \pm 11,50\%$ . Najjači spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh ostvarilo je jedinjenje **6**. Ovo jedinjenje (20,9  $\mu\text{M}$ ) uticalo je na sve primenjene koncentracije ACh dovodeći do smanjenja maksimalnog efekta na

52,91±17,75%. Aktivnost jedinjenja **11** takođe je ispitivana u dve koncentracije: 22,5 µM i 45,0 µM. Iako je u koncentraciji od 45 µM jedinjenje **11** redukovalo maksimalni kontraktilni efekat ACh na 68,22±11,35%, testirana koncentracija ovog jedinjenja bila je visoka, pa se može zaključiti da ono ostvaruje slab spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh. U ovom eksperimentalnom modelu kao referentni lek korišćen je atropin. Primenjen u koncentraciji od 0,14 µM, atropin je ostvario višestruko jači efekat od svih testiranih metabolita i doveo do smanjenja maksimalnog efekta ACh na 17,38±1,62%. Od testiranih metabolita, samo su jedinjenja **1** i **6** ostvarila snažan i statistički značajan spazmolitički efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl. Primenjeni u koncentracijama od 28,8 µM (**1**) i 26,2 µM (**6**), ova dva metabolita dovela su do smanjenja efekta KCl na 43,53±7,78%, odnosno 45,11±14,10%, redom. Jedinjenja **4** (16,88 µM) i **11** (16,9 µM) ostvarila su slabiju aktivnost i dovela do smanjenja efekta KCl na 81,14±4,56% i 70,57±18,90%, redom. Kao referentni lek, u ovom eksperimentalnom modelu korišćen je alverin, koji je u koncentraciji od 8,4 µM potpuno poništio efekat KCl (1,75±2,96%). Efekti testiranih izolata u svim eksperimentalnim modelima bili su reverzibilni nakon ispiranja preparata ileuma *Tyrod*-ovim rastvorom. HE je inhibirao i kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane KCl (80 mM). U koncentraciji od 1,3 mg/ml on je potpuno poništio kontraktilni efekat KCl.

HE i ME podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivani su u pogledu antiinflamatornog delovanja. Antiedematozni efekat ispitivan je nakon njihove *p.o.* primene, u modelu karageninom (*i.pl.*) izazvane inflamacije šapice pacova, a dobijeni efekti upoređivani su sa efektom indometacina (8 mg/kg *p.o.*). Primenjen u dozi od 100 mg/kg, ME je ostvario jači antiedematozni efekat (84,00±22,03%) od indometacina (76,00±19,32%). HE je takođe ostvario statistički značajan antiedematozni efekat koji je ipak bio slabiji od efekta ME i indometacina. Primenjen u dozama od 50 i 100 mg/kg *p.o.*; HE je ostvario uporediv antiedematozni efekat (62,78±13,42% i 64,71±17,98%, redom). Analizom histoloških preparata šapica pacova u kontrolnoj grupi uočena je izražena inflamacija, koju je karakterisalo prisustvo edema i ćelijskih infiltrata, dok navedene inflamatorne promene nisu detektovane u grupi koja je tretirana ME u dozi 100 mg/kg. Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu antiinflamatornu aktivnost ekstrakata.

Gastroprotektivno delovanje HE i ME (primenjenih *p.o.*) ispitivano je *in vivo* u modelu akutnog ulkusa indukovanog oralnom primenom apsolutnog etanola na pacovima (akutni stres-ulkus). Primenjen u dozi do 25 mg/kg HE je ostvario snažan i statistički značajan protektivni efekat uporediv sa efektom ranitidina (20 mg/kg *p.o.*), a u dozi od 100 mg/kg efekat ovog ekstrakta bio je čak jači od efekta referentnog leka. ME je takođe ostvario dozno-zavisan i statistički značajan gastroprotektivni efekat. Ovaj efekat je međutim bio slabiji u poređenju sa efektom HE; ME je tek u dozi od 100 mg/kg ostvario efekat uporediv sa efektom ranitidina.

Antimikrobna aktivnost izolata podzemnih organa *F. heuffelii* (HE i ME, etarskih ulja, kao i jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6** i **11**), ispitivana je *in vitro*, bujon mikrodilucionim metodom prema šest standardnih sojeva Gram (+) i tri soja Gram (-) bakterija, kao i tri soja kandidate, a dobijeni rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK). Najsnažniju antimikrobnu aktivnost etarska ulja su ostvarila prema Gram (+) bakterijama *Staphylococcus epidermidis* (MIK=10,2-25,0 µg/ml), *Micrococcus luteus* (MIK=10,2-13,7 µg/ml) i *M. flavus* (MIK=6,8-28,2 µg/ml), dok je efekat prema Gram (-) bakterijama bio slabiji. Sva tri etarska ulja su, takođe, snažno inhibirala rast kandidate, a MIK vrednosti su se kretale u opsegu koncentracija od 6,2-13,7 µg/ml. HE i ME ostvarili su umereno antimikrobno delovanje,



a najjači efekat oba ekstrakta ostvarila su prema Gram (+) bakterijama: *S. aureus* (MIK=12,5 µg/ml) i *M. luteus* (MIK=50,0 µg/ml i 12,5 µg/ml, redom). Jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6** i **11** testirana su u opsegu koncentracija 2-64 µg/ml. Jedinjenja **1** i **11** nisu inhibirala rast nijednog mikroorganizma u testiranom opsegu koncentracija. Jedinjenje **3** je snažno inhibiralo rast Gram (+) bakterija: *M. luteus* i *Bacillus subtilis* (MIK=4 µg/ml; 11,2 µM) i *S. epidermidis* (MIK=8 µg/ml; 22,5 µM). Jedinjenje **6** je takođe snažno inhibiralo rast bakterija *M. luteus* (MIK=2 µg/ml; 5,2 µM) i *S. epidermidis* (MIK=4 µg/ml; 10,5 µM), dok je jedinjenje **4** najjače delovanje ostvarilo prema bakteriji *B. subtilis* (MIK=8 µg/ml; 22,5 µM). Analizom dobijenih rezultata zaključeno je da bi jedinjenja **3**, **4** i **6** mogla u značajnoj meri doprinosti antimikrobnom efektu HE prema bakterijama *M. luteus*, *B. subtilis* i *S. epidermidis*.

Citotoksična aktivnost izolata podzemnih organa *F. heuffelii* (HE i ME, i jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6**, **8** i **9**), ispitivana je MTT testom prema tri ćelijske linije kancera: karcinoma grlića materice (HeLa), karcinoma dojke (MCF7) i mijeloidne leukemije (K562), dok je na liniji humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5) ispitivana selektivnost citotoksičnog delovanja metabolita. Ekstrakti su u testiranom opsegu koncentracija pokazali snažno citotoksično delovanje, a HE je ostvario višestruko snažnije delovanje od ME. IC<sub>50</sub> vrednosti HE prema svim ćelijskim linijama kancera bile su niže od 11 µg/ml, a najjači efekat ekstrakti su ostvarili prema liniji MCF7 (IC<sub>50</sub>=6,09±0,52 µg/ml za HE i 47,57±1,49 µg/ml za ME). Svi testirani metaboliti, izuzev jedinjenja **1**, ostvarili su uglavnom snažno delovanje prema svim tumorskim ćelijskim linijama, a njihova aktivnost upoređena je sa aktivnošću cisplatina. Najjači efekat metaboliti su ostvarili prema liniji K562 i njihove IC<sub>50</sub> vrednosti kretale su se od 8,01±0,77 µM (za jedinjenje **3**), do 10,56±1,19 µM (za jedinjenje **9**), dok je cisplatin ostvario nešto jaču aktivnost (IC<sub>50</sub>=5,54±1,03 µM). Prema HeLa ćelijskoj liniji svi metaboliti, osim jedinjenja **1**, ostvarili su snažnu citotoksičnu aktivnost, pri čemu je najjači efekat ostvarilo jedinjenje **6** (IC<sub>50</sub>=6,54±0,07 µM), a najslabiji jedinjenje **9** (IC<sub>50</sub>=14,42±0,39). Cisplatin (IC<sub>50</sub>=2,1±0,2 µM) je prema ovoj liniji ostvario oko tri puta jače delovanje u odnosu na najaktivniji metabolit. Testirana jedinjenja ispoljila su najslabiju aktivnost prema liniji MCF7, a jedino je jedinjenje **6** (IC<sub>50</sub>=22,32±1,32 µM) ostvarilo efekat uporediv sa efektom cisplatina (IC<sub>50</sub>=18,67±0,75 µM). Važno je, međutim, naglasiti da, za razliku od cisplatina, nijedan od metabolita nije, u testiranom opsegu koncentracija, doveo do 50% inhibicije rasta normalnih humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5). Zaključeno je da testirani metaboliti podzemnih organa *F. heuffelii* ostvaruju selektivno citotoksično delovanje.

Ispitivanjem podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* dobijene su informacije o vrsti i količini pojedinih sekundarnih metabolita i farmakološkoj aktivnosti izolata (etarskih ulja, ekstrakata i metabolita). Rezultati ispitivanja farmakološke aktivnosti izolata ukazuju na njihov značajan lekoviti potencijal, a samim tim i na značaj ove vrste kao potencijalno nove biljne lekovite sirovine.

**Ključne reči:** *Ferula heuffelii*, ekstrakti podzemnih organa, seskviterpeni, seskviterpenski kumarini, fenilpropani, farmakološka aktivnost.

**Naučna oblast:** Farmacija.

**Uža naučna oblast:** Farmakognozija.

**UDK broj:** 794.1:[543.544:616-092.9(043.3)  
794.1:616-092.7

## Pharmacognostic investigation of underground parts of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae)

### Abstract

The scope of this doctoral dissertation represents chemical analysis of underground parts of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae), and investigation of pharmacological activity of its isolates (chloroform and methanol extracts, essential oils and metabolites). *Ferula heuffelii* („srpska velestika“) is an endemic and rare perennial species which grows predominantly in gorges and stony places in Eastern Serbia, and locally in Southwestern Romania and Western Bulgaria. This plant has not been previously investigated for chemical composition and pharmacological activity.

The essential oils of underground parts of *F. heuffelii* were isolated from the samples collected from three localities in Serbia: the Sićevo Gorge; the Djerdap Gorge and the gorge of the river Pek. The oils were isolated by hydrodistillation in a Clevenger-type apparatus and analyzed by GC-FID and GC-MS methods. The oil from underground parts obtained from the Sićevo gorge (F1) was rich in sesquiterpene hydrocarbons (48.7%) and phenylpropanoids (17%), and elemicin was the major constituent (12.5%). The oils isolated from underground parts collected in the Djerdap gorge (F2) and in the gorge of the river Pek (F3), were characterized by high content of phenylpropanoids (56.0 and 29.7%, respectively), with elemicin (35.4 and 16.8%, respectively) and myristicin (20.6 and 12.9%, respectively) being the main compounds. The differences in chemical composition between the essential oils were mainly quantitative.

From the chloroform extract (CE) of *F. heuffelii* underground parts 10 compounds were isolated and identified by combining suitable chromatographic techniques for separation and isolation of secondary metabolites (column chromatography and semipreparative HPLC), as well as techniques for structural elucidation (one- and two dimensional NMR spectroscopy and HR-MS ESI<sup>+</sup> spectrometry). From CE following compounds were isolated: two phenylpropanoids [latifolone (**1**) and elemicin (**2**)], two sesquiterpenes of prenyl-benzoyl-type [(6*E*)-1-(2,4-dihydroxyphenyl)-3,7,11-trimethyl-3-vinyldodeca-6,10-dien-1-one (**3**) and dshamirone (**4**)], two sesquiterpenes of prenyl-benzoylfuranone type [(3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihydroxybenzoyl)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimethylnona-3,7-dien-1-yl]tetrahydro-4,5-dimethylfuran-2-one (**5**) and fukanedone B (**8**)], two sesquiterpenes of prenyl-furocoumarin-type [(2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimethylnona-3,7-dien-1-yl]-2,3-dihydro-7-hydroxy-2,3-dimethylfuro[3,2-*c*]coumarin (**6**) and baigene C (**9**)], one sesquiterpene of prenyl-dihydrofurochromone-type [(2*S*\*,3*R*\*)-2-(3*E*)-4,8-dimethylnona-3,7-dien-1-yl]-2,3-dihydro-7-hydroxy-2,3-dimethylfuro[2,3-*b*]chromone (**10**)] and one sesquiterpene umbelliferyl ether [samarkandin acetate (**7**)]. The content of compounds **1** (6.84%), **3** (4.16%), **4** (1.74%), and **6** (10.92%) in CE was performed using HPLC method with isolated compounds used as standards.

HPLC analysis of methanol extract (ME) led to identification of four metabolites: compounds **1** and **6**, as well as chlorogenic acid (**11**) and 3,5-dicaffeoylquinic acid (**12**). The amount of compounds **1** (1.32%), **6** (1.39%) and **11** (3.46%) was determined using HPLC method. Total phenolics content in ME, determined using *Folin-Ciocalteu* reagent, was 0.112 mg of gallic acid equivalent/mg of dry extract.

Antioxidant activity of extracts was investigated *in vitro*. Total antioxidant activity, investigated using FRAP assay of the ME was 0.98  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$  dry weight, and of the CE 0.13  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$  dry weight. Investigation of  $\cdot\text{OH}$  radical scavenging potential showed that ME in 5-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentration range concentration-dependently inhibited creation of this radical and that the highest activity was achieved with 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (49.54 $\pm$ 3.16% of inhibition). Higher concentrations of the extract (40, 80 and 160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) exhibited weaker activity and this decrease in inhibition could be partly explained with pro-oxidative effect of some components of the extract. CE exhibited no effect in tested concentration range (3.12-100.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). ME exhibited moderate anti-DPPH activity ( $\text{SC}_{50}$ =62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), while the activity of CE was weak ( $\text{SC}_{50}$ =145.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Essential oils demonstrated good anti-DPPH activity ( $\text{SC}_{50}$ =22.43-47.75  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ).

Spasmolytic activity of *F. heuffelii* isolates (essential oil F2, extracts and metabolites **1**, **4**, **6** and **11**), was investigated *in vitro* on isolated rat ileum using three experimental models: spontaneous contractions and contractions induced with acetylcholine (ACh) and potassium chloride (KCl). Oil F2 exhibited strong, significant and concentration-dependent antispasmodic activity. The oil relaxed spontaneous contractions of the isolated ileum and the effect obtained in concentration of 375  $\mu\text{g}/\text{ml}$  was comparable to effect of atropine (14.44  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In the concentration range from 15-75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , this oil exhibited strong relaxant effect against contractions induced with ACh. After incubation with 75.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of the oil, even the highest concentrations of ACh did not induce contractions of the ileum and the effect of the highest concentration of ACh was reduced to 12.75 $\pm$ 12.66%. The oil (25.00-250.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) concentration-dependently relaxed the contractions induced with 80 mM KCl, and in concentration of 250.00  $\mu\text{g}/\text{ml}$  almost completely abolished the response to KCl (10.01 $\pm$ 23.35%). CE showed relaxant effect against spontaneous contractions and in concentration of 0.3 mg/ml it achieved 109.19 $\pm$ 28.26% of atropine effect (6.4  $\mu\text{M}$ ). CE relaxed the contractions induced with ACh as well. 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of extract influenced all concentrations of ACh except for the highest one, while in concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  it reduced also the maximal effect of ACh to 48.53 $\pm$ 16.68%. The effect against contractions induced with KCl was quantitatively similar to one of essential oil. Applied in concentration of 0.3 mg/ml, extract reduced contractile effect of KCl to 13.19 $\pm$ 26.79%. ME exhibited strong, significant and concentration-dependent antispasmodic activity. In concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ME exhibited stronger spasmolytic effect than atropine (6.4  $\mu\text{M}$ ) on spontaneous contraction. Applied in the concentration of 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , extract inhibited contractions elicited with ACh and led to reduction of the maximal effect of ACh to 26.35 $\pm$ 23.69%. Activity of ME (10-60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) was tested against KCl induced contractions as well. In highest concentration used, extract led to reduction of the effect of KCl to 44.42 $\pm$ 11.26%. Compounds **1** (1-6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), **6** (1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and **11** (1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) exhibited relaxant effect against spontaneous contractions of isolated ileum. Compounds **1** (6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 28.8  $\mu\text{M}$ ) and **11** (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 28.2  $\mu\text{M}$ ) in almost identical molar concentrations demonstrated equal spasmolytic effect: 93.20 $\pm$ 26.57 and 95.95 $\pm$ 31.90% of atropine effect (6.4  $\mu\text{M}$ ), respectively. Compound **6** exhibited slightly weaker relaxation and in concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (26.2  $\mu\text{M}$ ) achieved 46.13 $\pm$ 21.50% of atropine effect. The activity of compound **4** was tested only in concentration of 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (22.5  $\mu\text{M}$ ), and it achieved 37.03 $\pm$ 21.86% of atropine effect. All tested metabolites affected contractions induced with ACh. Activity of compound **1** was assessed in concentrations of 9.6 and 19.2  $\mu\text{M}$ . Incubation with 9.6  $\mu\text{M}$  of compound **1** led to reduction of maximal effect of ACh to

89.34±19.92%. Compound **4** exhibited slightly better relaxant effect and in concentration of 22.5 µM lowered maximal ACh effect to 68.09±11.50%. The strongest spasmolytic effect amongst tested compounds was achieved with compound **6**. Tested in concentration of 20.9 µM it inhibited all applied concentrations of ACh with the reduction of the highest effect of ACh to 52.91±17.75%. The activity of compound **11** was investigated in two concentrations: 22.5 and 45.0 µM. Compound **11** (45 µM) reduced the maximal effect of ACh to 68.22±11.35%, but the applied concentration was considered high and it was concluded that this compound exhibits weak antispasmodic activity against contractions induced with ACh. In this experimental model, similarly to investigation of activity on spontaneous contractions, atropine was used as a reference drug. Applied in concentration of 0.14 µM, it exhibited several times stronger effect compared to all tested compounds and led to reduction of maximal ACh effect to 17.38±1.62%. Among tested metabolites, only compounds **1** and **6** exhibited strong and significant spasmolytic effect against contractions induced with KCl. Applied in concentrations of 28.8 µM (compound **1**) and 26.2 µM (compound **6**), these metabolites inhibited the effect of KCl to 43.53±7.78%, and 45.11±14.10%, respectively. Compounds **4** (16.88 µM) and **11** (16.9 µM) demonstrated weak relaxant activity in this model and led to reduction of KCl effect to 81.14±4.56% and 70.57±18.90%, respectively. In this series of experiments, alverine was used as a reference drug. It showed stronger activity compared to tested compounds and in concentration of 8.4 µM completely abolished the effect of KCl (1.75±2.96%). Spasmolytic effects of all tested isolates were reversible after washing with *Tyrod* solution. CE inhibited contractions of isolated rat trachea induced with KCl (80 mM) as well. In concentration of 1.3 mg/ml it abolished completely the contractile effect of KCl.

Extracts of *F. heuffelii* underground parts were investigated for *in vivo* anti-inflammatory activity. For screening the anti-oedematous activity, carrageenan-induced rat paw oedema test was used and the results were compared to the effect of indomethacin (8 mg/kg *p.o.*). Administered in dose of 100 mg/kg *p.o.* ME exhibited stronger activity (84.00±22.03%) than indomethacin (76.00±19.32%). CE demonstrated strong and significant anti-oedematous activity as well. Its effect was, however, weaker in comparison to ME, and administered in dose of 50 and 100 mg/kg *p.o.* it achieved similar effect (62.78±13.42% and 64.71±17.98%, respectively). Histological analysis revealed severe inflammatory lesions in the paws of control rats, while in the group treated with 100 mg/kg ME (which had induced 84.00±22.03% of reduction of oedema), inflammatory infiltrates were not detected. This results corroborated that tested extracts exhibit significant anti-inflammatory activity.

In order to evaluate *in vivo* gastroprotective activity of the extracts, an acute ethanol-induced gastric ulceration experimental model was used on rats. Oral administration of both extracts significantly reduced the incidence and severity of ulceration in ethanol-induced ulcer model and the effect was dose dependant. CE exhibited strong and significant protective activity and administered in dose of 25 and 50 mg/kg *p.o.* it achieved the effect comparable to effect of ranitidine (20 mg/kg *p.o.*). The effect of highest tested dose was even stronger than the reference drug. The effect of ME was weaker compared to effect of CE. Only the maximal tested dose (100 mg/kg) of ME exhibited significant protective effect, comparable with ranitidine.

Antimicrobial activity of isolates (essential oils, extracts, and compounds **1**, **3**, **4**, **6** and **11**), was investigated *in vitro* using the broth microdilution method. Antimicrobial activity was investigated using six laboratory ATCC strains of Gram (+) bacteria, three

Gram (–) bacteria and three strains of a yeast *Candida albicans*. Obtained results were presented as minimal inhibitory concentrations (MICs). The essential oils exhibited significant inhibitory effect against Gram (+) bacteria *Staphylococcus epidermidis* (MIC=10.2-25.0 µg/ml), *Micrococcus flavus* (MIC=6.8-28.2 µg/ml) and *M. luteus* (MIC=10.2-13.7 µg/ml), while the effect against Gram (–) bacteria was weaker. The best inhibitory effect oils exhibited against *C. albicans* (MIC=6.2-13.7 µg/ml). Extracts exhibited moderate antimicrobial activity, and strongest inhibition was achieved against Gram (+) bacteria *S. aureus* (MIC=12.5 µg/ml) and *M. luteus* (MIC=50.0 and 12.5 µg/ml, respectively). Compounds **1** and **11** did not inhibit growth of any microorganism in tested concentration range (2-64 µg/ml). Compound **3** strongly inhibited growth of Gram (+) bacteria: *M. luteus* (MIC=4 µg/ml; 11.2 µM), *Bacillus subtilis* (MIC=4 µg/ml; 11.2 µM) and *S. epidermidis* (MIC=8 µg/ml; 22.5 µM). Compound **6** exhibited strong inhibition of growth of Gram (+) bacteria: *M. luteus* (MIC=2 µg/ml; 5,2 µM) and *S. epidermidis* (MIC=4 µg/ml; 10,5 µM), while compound **4** exhibited the strongest activity against *B. subtilis* (MIC= 8 µg/ml; 22.5 µM). From the presented results it can be postulated that antimicrobial activity of CE towards Gram (+) bacteria: *M. luteus*, *B. subtilis* and *S. epidermidis* can be, at least partly, explained by synergistic activity of compounds **3**, **4** and **6**.

*In vitro* investigation of cytotoxic activity of *F. heuffelii* isolates (extracts and metabolites **1**, **3**, **4**, **6**, **8** and **9**) was undertaken using MTT assay and the results were expressed as IC<sub>50</sub> values. The cytotoxic effect was assessed on the following cancer cell lines: Human cervical adenocarcinoma (HeLa), breast cancer (MCF7), immortalised myelogenous leukemia (K562). For assessment of the selectivity of the cytotoxic effect of metabolites human fetal lung fibroblasts (MRC-5) were used. Extracts were tested in concentration range from 0-200.0 µg/ml and both showed strong cytotoxic activity. CE exhibited stronger activity compared to ME and it can be seen that IC<sub>50</sub> values for all cancer cell lines were lower than 11 µg/ml. Extracts exhibited the strongest activity against MCF7 cell line (IC<sub>50</sub>=6.09±0.52 µg/ml for CE and 47.57±1.49 µg/ml for ME). Results indicated that high cytotoxic activity was demonstrated for all tested compounds against K562 (IC<sub>50</sub>=8.01-10.56 µM), and, except for compound **1**, against HeLa (IC<sub>50</sub>=6.54-14.42 µM) cell line. This activity was only a few times lower than the one of cisplatin. Considering activity against MCF7 cell line, only compound **6** exhibited activity (IC<sub>50</sub>=22.32±1.32 µM) comparable to activity of cisplatin (IC<sub>50</sub>=18.67±0.75 µM). It is important to mention that in the non-cancerous lung fibroblasts (MRC-5), all tested compounds were significantly less cytotoxic than cisplatin. It was concluded that metabolites of the underground parts of *F. heuffelii* exhibit selective cytotoxic activity.

Investigation of underground parts of *F. heuffelii* gave information considering type and amount of secondary metabolites. Demonstrated pharmacological activity of isolates (essential oils, extracts and metabolites) indicated significant medical potential, and therefore the importance of this species as potentially new natural raw material.

**Keywords:** *Ferula heuffelii*, secondary plant metabolites, sesquiterpenes, sesquiterpene coumarins, phenylpropanoids, pharmacological activity.

**Academic expertise:** Pharmacy.

**Major in:** Pharmacognosy.

**UDC number:** 794.1:[543.544:616-092.9(043.3)  
794.1:616-092.7

## SADRŽAJ

UVOD.....	1
1. Rod <i>Ferula</i> L. ....	2
1.1. <i>Ferula heuffelii</i> Griseb. ex Heuffel.....	4
2. Sekundarni metaboliti vrsta roda <i>Ferula</i> .....	6
2.1. Kumarini.....	6
2.1.1. Seskviterpenski umbeliferil (7-hidroksikumarin) etri.....	10
2.1.2. Seskviterpenski etri derivati izofraksidina.....	12
2.1.3. Prenilovani 4-hidroksikumarini.....	13
2.1.4. Seskviterpeni prenil-furokumarinskog tipa.....	13
2.1.5. Monoterpenski kumarini.....	14
2.2. Hromoni.....	15
2.3. Jedinjenja sa sumporom.....	16
2.4. Fenilpropani.....	17
2.5. Seskviterpeni i seskviterpenski estri.....	17
2.6. Etarska ulja.....	18
3. Tradicionalna upotreba vrsta roda <i>Ferula</i> .....	74
4. Farmakološka aktivnost vrsta roda <i>Ferula</i> .....	76
CILJ.....	84
MATERIJAL I METODE.....	86
1. Biljni materijal.....	87
2. Aparatura.....	87
3. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja.....	89
3.1. Izolovanje etarskih ulja.....	89
3.2. GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja.....	90

4. Izrada ekstrakata .....	91
5. Izolovanje sekundarnih metabolita iz hloroformskog ekstrakta.....	91
5.1. Razdvajanje hloroformskog ekstrakta hromatografijom na stubu silikagela.....	91
5.2. Analitička i semipreparativna HPLC analiza hloroformskog ekstrakta .....	94
6. Analitička HPLC analiza metanolnog ekstrakta.....	96
7. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu.....	96
8. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja .....	97
8.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala (FRAP test) ekstrakata .....	98
8.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije $\cdot$ OH radikala ekstrakata .....	99
8.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala ekstrakata i etarskih ulja .....	101
9. Eksperimentalne životinje korišćene za ispitivanje spazmolitičke, antiinflamatorne i gastroprotektivne aktivnosti izolata.....	102
10. Ispitivanje spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja, ekstrakata i metabolita.....	102
10.1. Izolovanje i postavljanje preparata .....	104
10.1.1. Izolovanje i postavljanje ileuma pacova .....	104
10.1.2. Izolovanje i postavljanje traheje pacova .....	105
10.2. Uticaj izolata na spontane kontrakcije izolovanog ileuma .....	105
10.3. Uticaj izolata na kontrakcije izolovanog ileuma izazvane acetilholinom (ACh) ..	106
10.4. Uticaj izolata na kontrakcije izolovanog ileuma i traheje izazvane kalijum-hloridom (KCl) .....	106
11. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata.....	107
11.1. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti ekstrakata .....	107
11.2. Histološka analiza poprečnih preseka šapica pacova.....	108
12. Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti ekstrakata .....	110
12.1. Eksperimentalni protokol ispitivanja gastroprotektivnog delovanja ekstrakata ....	111
13. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, ekstrakata i metabolita .....	113
13.1. Standardni sojevi mikroorganizama .....	113

13.2. Kultivacija mikroorganizama .....	115
13.3. Standardni antibiotici .....	116
13.4. Bujon mikrodiluzioni test .....	116
14. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata i metabolita .....	117
14.1. Čelijske linije .....	117
14.2. Hranljiva podloga .....	117
14.3. Tretman čelijskih linija .....	118
14.4. Određivanje čelijskog preživljavanja – MTT test.....	119
REZULTATI I DISKUSIJA.....	122
1. Hemijski sastav etarskih ulja .....	123
2. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta .....	131
2.1. Jedinjenje 1 (latifolon) .....	131
2.2. Jedinjenje 2 (elemicin) .....	133
2.3. Jedinjenje 3 (( <i>6E</i> )-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on).....	134
2.4. Jedinjenje 4 (džamiron).....	136
2.5. Jedinjenje 5 (( <i>3S</i> *, <i>4R</i> *, <i>5R</i> *)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[( <i>3E</i> , <i>7E</i> )-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahidro-4,5-dimetilfuran-2-on).....	139
2.6. Jedinjenje 6 (( <i>2S</i> *, <i>3R</i> *)-2-[( <i>3E</i> )-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2- <i>c</i> ]kumarin) .....	141
2.7. Jedinjenje 7 (samarkandinacetat).....	145
2.8. Jedinjenje 8 (fukanedon B) .....	147
2.9. Jedinjenje 9 (bajgen C) .....	150
2.10. Jedinjenje 10 (( <i>2S</i> *, <i>3R</i> *)-2-[( <i>3E</i> )-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3- <i>b</i> ]hromon) .....	152
3. HPLC analiza hloroformskog ekstrakta – identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita .....	154



4. HPLC analiza metanolnog ekstrakta – identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita .....	156
5. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu .....	162
6. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja .....	162
6.1. Antioksidantna aktivnost metanolnog ekstrakta .....	162
6.2. Antioksidantna aktivnost hloroformskog ekstrakta .....	165
6.3. Antioksidantna aktivnost etarskih ulja.....	166
7. Spazmolitička aktivnost etarskog ulja, ekstrakata i metabolita.....	167
7.1. Spazmolitička aktivnost etarskog ulja .....	168
7.2. Spazmolitička aktivnost hloroformskog ekstrakta.....	172
7.3. Spazmolitička aktivnost metanolnog ekstrakta.....	174
7.4. Spazmolitička aktivnost metabolita .....	177
8. Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata.....	186
9. Gastroprotektivna aktivnost ekstrakata .....	190
10. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja, ekstrakata i metabolita .....	193
10.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja.....	193
10.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i metabolita .....	194
11. Citotoksična aktivnost ekstrakata i metabolita .....	199
11.1. Citotoksična aktivnost ekstrakata .....	199
11.2. Citotoksična aktivnost metabolita.....	200
ZAKLJUČCI .....	208
LITERATURA .....	213
PRILOZI.....	242

# **UVOD**

## 1. Rod *Ferula* L.

Rod *Ferula* L. pripada porodici Apiaceae (Umbelliferae). Ova porodica obuhvata oko 300 rodova sa oko 3000 vrsta koje su rasprostranjene po celoj Zemlji, i to pretežno na severnoj hemisferi. Brojni predstavnici ovog roda su od antičkih vremena bili poznati kao izvor oleogumirezina, koje su primenjivane u tradicionalnoj medicini različitih naroda: asafetida\* (npr. iz *F. assa-foetida* L., *F. alliacea* Boiss., *F. foetida* Regel i *F. narthex* Boiss.), sagapenum (iz *F. persica* Willd. i *F. szowitsiana* DC), galbanum (iz *F. gummosa* Boiss.), sumbul (iz *F. moschata* (Reinsch) Koso-Pol.) i afrički amonijak (iz *F. tingitana* L. i *F. communis* L.) (Kurzyńska-Młynik i sar., 2008).

Predstavnici ove porodice najčešće su zeljaste jednogodišnje, dvogodišnje ili višegodišnje biljke, a vrlo retko mogu biti i polužbunovi. Stabljike, zahvaljujući razvijenom kolenhimu, dostižu visinu do 3 m, uz prečnik od oko 5 cm. Listovi su obično krupni, naizmenično raspoređeni i najčešće su, na različite načine, jednom ili više puta perasto deljeni. Lisna drška ili liska pri osnovi prelaze u lisni rukavac koji obuhvata stabljiku. Cvetovi su najčešće dvopolni, sitni i aktinomorfni, dok se ponekad po obodu štitora mogu naći i cvetovi zigomorfne simetrije. Cvetovi su grupisani najčešće u složene štitorve kod kojih se bočne grane završavaju prostim štitorvima. Cvetovi ređe mogu biti sakupljeni i u proste cvasti i tada ove cvasti imaju oblik glavice. Ispod glavnog štitora cvasti manji ili veći broj priperaka obrazuje involukrum. Cvetovi se sastoje od pet čašičnih listića, pet kruničnih listića, pet prašnika i dva oplodna listića. Čašica uglavnom ima oblik petozubog obruba na gornjem delu plodnika, ali je najčešće slabo razvijena i neprimetna. Krunični listići su beli, žuti ili crveni, najčešće usečeni ili dvorežnjeviti, retko celog oboda. Često se može uočiti da su vrhovi kruničnih listića povijeni ka unutrašnjosti. Kod zigomorfnih cvetova, krunični listići su nejednaki, pri čemu su veći cvetovi lokalizovani prema spoljašnjoj strani cvasti. Prašnici su slobodni, a tučak je sa dvostrukim (ređe jednostrukim), potcvetnim plodnikom, pri čemu se u svakom okcu nalazi po jedan semeni zametak. Na plodniku se često mogu uočiti nektarije koje imaju oblik mesnatog jastučića (lat. *discus*), odnosno istaknutog proširenja –

---

\* U literaturi poznata i kao azafetida ili azant (Kovačević, 2004).

stilopodijuma (lat. *stylopodium*). Iz nektarija se izdižu dva stubića čiji su žigovi uglavnom lepljivi. Plod je šizokarpijum. Kada sazri, šizokarpijum se raspada na dva jednosemena merikarpijuma koji su neko vreme vezani za karpofor. Plodovi su na unutrašnjoj strani pljosnati, a na spoljašnjoj ispupčeni. Na svakom plodu može se uočiti pet glavnih, uzdužnih rebara (tri leđna i dva bočna – lat. *juga primaria*) u kojima se najčešće nalaze provodni snopići. Između primarnih rebara često se nalaze i sekundarna rebra (lat. *juga secundaria*). U perikarpu, uglavnom između glavnih rebara u brazdama (lat. *vittae intrajugalis*), nalaze se kanali sa etarskim uljem, ali se oni takođe mogu naći i na ventralnoj strani (lat. *vittae commissuralis*). Seme je različitog oblika i građe i često prirasta za zid plodnika.

Rod *Ferula* čine višegodišnje biljke sa razvijenim i zadebljalim rizomom i korenom. Listovi predstavnika ovog roda su višestruko perasto deljeni. Cvetovi lokalizovani u vršnim štitovima su hermafroditni, dok se u bočnim cvastima nalaze muški cvetovi. Čašični zupci su jedva приметni, dok su krunični listići žuti ili žućkastozeleni. Plod je spljošten i po obodu je zadebljao. U brazdama se nalazi po jedan kanal sa etarskim uljem. Rod je dobio naziv od latinske reči *ferula*, što u prevodu znači prut (šiba), jer se suva stabljika vrste *F. narthex* još u antičko doba koristila za šibanje dece, pre svega zato što jako prašti, a slabo udara (Nikolić, 1973). Stabljike ovog roda, ukrašene šiškarkom bora na vrhu, i prekrivene puzavicama, predstavljale su tirsus (gr. *thyrsus*), štap za hodanje, najčešće povezivan sa Dionisom i njegovim sledbenicima satirima i menadama (Kurzyna-Młynik i sar., 2008).

Centar diverziteta ovog roda nalazi se u centralnoj i zapadnoj Aziji (Drude, 1898), pri čemu se u centralnoj Aziji nalazi oko 130 vrsta, od kojih je oko 100 endemskih. U Flori SSSR opisano je 96 vrsta roda *Ferula*, od kojih je 66 endemskih. U Flori Irana opisane su 53 vrste, od kojih su 33 endemske, dok je u Flori Turske i Istočnih Egejskih ostrva opisano 18 vrsta, od kojih je 9 endemskih (Sağiroğlu i Duman, 2007).

U Flori Evrope (Cannon, 1968) navodi se 8 predstavnika ovog roda.

- *Ferula communis* L. – džinovski komorač (eng. *Giant fennel*) je vrsta koja naseljava Mediteran. Obuhvata 2 podvrste:
  - *F. communis* subsp. *communis*
  - *F. communis* subsp. *glauca* (L.) Rouy & Camus.

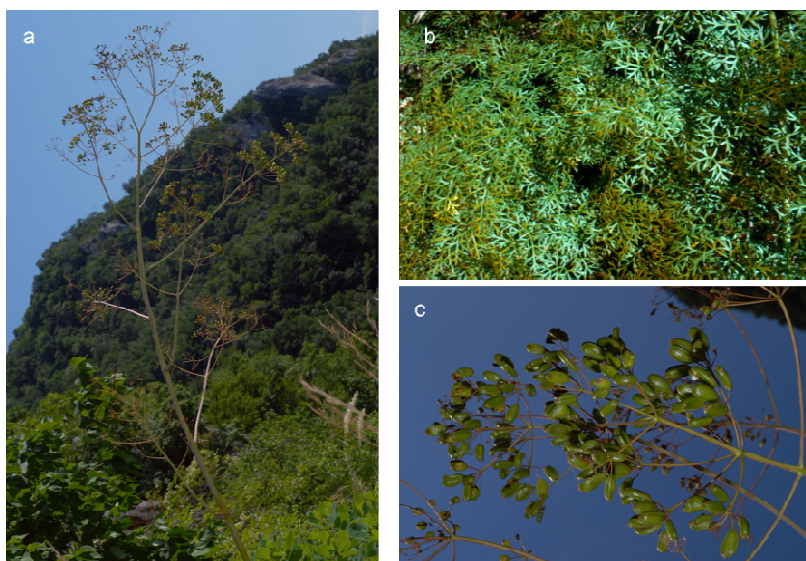
- *Ferula tingitana* L. – naseljava južnu i jugoistočnu Španiju, Portugal i severnu Afriku. Veoma je slična vrsti *F. communis*, osim što su lisni režnjevi delimično srasli.
- *Ferula sadlerana* Ledeb. – naseljava suve, stenovite predele severne i centralne Mađarske, Slovačke, zapadne i centralne Rumunije.
- *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel – naseljava suve, krečnjačke terene, stene i kamenjare severoistočne Srbije, jugozapadne Rumunije i zapadne Bugarske.
- *Ferula nuda* Sprengel – naseljava uglavnom jugoistočnu Rusiju.
- *Ferula orientalis* L. – raste na suvim travnjacima južne Ukrajine i jugoistočne Bugarske na nadmorskim visinama od 1600-2900 m.
- *Ferula tatarica* Fischer ex Sprengel – naseljava stepske terene u istočnoj Ukrajini i jugoistočnoj Rusiji.
- *Ferula caspica* Bieb. – raste na zaslanjenim terenima bogatim mineralima u južnoj i istočnoj Ukrajini i jugoistočnoj Rusiji.

Za floru Srbije konstatovana je samo *F. heuffelii* – srpska velestika (Nikolić, 1973).

### 1.1. *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel

Srpska velestika je višegodišnja biljka sa repasto zadebljalim rizomom i korenom i snažnom stabljikom koja može dostići visinu i do 1,5 m. Stabljika je okrugla, glatka, sitno izbrazdana i u gornjem delu razgranata. Grane su često pršljenasto raspoređene i završavaju se štitovima. Listovi su 3-4 puta perasto deljeni, sivi i goli. Samo mladi listovi mogu biti maljavi. Prizemni i donji listovi se nalaze na dugačkim drškama; krupni su (dužine 50-70 cm) i uglavnom su jajastog ili trouglastog oblika; režnjevi i isečci prvog reda su trouglasto jajastog oblika i nalaze se na dugačkim drškama; režnjevi poslednjeg reda su linearno lancetasti, goli i sa jednim nervom; uglavnom su tupi, dok vršni režnjevi mogu biti i zašiljeni. Gornji listovi su redukovani u rukavac. Cvetovi su sakupljeni u mnogobrojne štitove sastavljene od 4-7 zrakova dužine 2,5-4 cm. Čašični listići su slabo приметni, dok su krunični listići žuti. Plod je dugačak

9-11 mm i jako je spljošten. Stubići su glavičasti, povijeni i dugi do 2 mm, dok je stilopodijum koničan. Plodići imaju naboranu površinu, a na poprečnom preseku se mogu uočiti trouglasta rebra na leđnoj i krilata rebra na bočnoj strani. Perikarp je tanak. U brazdama se nalazi po jedan kanal sa etarskim uljem, a na ventralnoj strani se nalaze po četiri kanala. Naseljava kamenjare, stenovite terene, klisure i krečnjačke litice istočne Srbije, jugozapadne Rumunije i zapadne Bugarske.



**Slika 1.** *Ferula heuffelii* Griseb ex. Heuffel. a – habitus; b – listovi; c – plodovi.



**Slika 2.** *Ferula heuffelii* Griseb ex. Heuffel. Podzemni organi.

## 2. Sekundarni metaboliti vrsta roda *Ferula*

Rod *Ferula* je u pogledu hemijskog sastava jako zanimljiv i njegove vrste su intenzivno proučavane u poslednjih tridesetak godina. Najzastupljeniju grupu sekundarnih metabolita čine kumarini i to najčešće seskviterpenski kumarini. Iz predstavnika ovog roda izolovani su još i seskviterpeni, seskviterpenski laktoni, daukanski estri, i jedinjenja sa sumporom (Nazari i Iranshahi, 2011).

### 2.1. Kumarini

Kumarini su derivati benzo- $\alpha$ -pirona, odnosno laktone *o*-hidroksi-*cis*-cimetne kiseline. Naziv kumarini potiče od naziva za južnoameričko drvo *Dipteryx odorata* Willd. - "coumarou" (syn. *Coumarouna odorata* Aubl.). Iz semena ove vrste 1822. god. je po prvi put izolovan kumarin koji je kasnije nađen u još oko 150 vrsta iz 30 različitih familija. Do danas je izolovano i opisano oko 1000 različitih kumarina, pri čemu su oni najjednostavnije strukture široko rasprostranjeni u biljnom carstvu, dok se oni čije su strukture kompleksnije najčešće javljaju u vrstama familija Fabaceae, Asteraceae, i naročito Apiaceae i Rutaceae (Evans, 2009; Hänsel i sar., 1999).

Prema strukturi kumarini se dele na jednostavne i heterociklične. Jednostavni kumarini su supstituisani OH ili OCH<sub>3</sub> grupama, najčešće u položaju C-7, ali često i u položajima C-6 i C-8. Heterociklični kumarini nastaju ciklizacijom 7-hidroksikumarina koji su prenilovani u položaju C-6 (linearni tip) ili u položaju C-8 (angularni tip), a dele se na furokumarine (furanokumarine) i piranokumarine. Kumarini se u drogama mogu naći slobodni ili glikozilovani, a šećer se vezuje preko hidroksilne grupe na položaju C-6, C-7 ili C-8. Pod kumarinskim heterozidima podrazumevaju se i heterozidi čiji su aglikoni derivati *o*-hidroksi-*trans*-cimetne (kumarne) kiseline, odnosno derivati *o*-hidroksi-*cis*-cimetne (kumarinske) kiseline (Petrović i sar., 2009).

Iz vrsta roda *Ferula* do sada je izolovan veliki broj kumarina od kojih većina pripada klasi seskviterpenskih kumarina. Seskviterpenski kumarini predstavljaju veoma zanimljivu grupu prirodnih proizvoda kod kojih je C15 terpenski lanac vezan etarskom vezom za OH grupu na položaju C-7 kumarinskog jezgra ili C-C vezom za ugljenik na

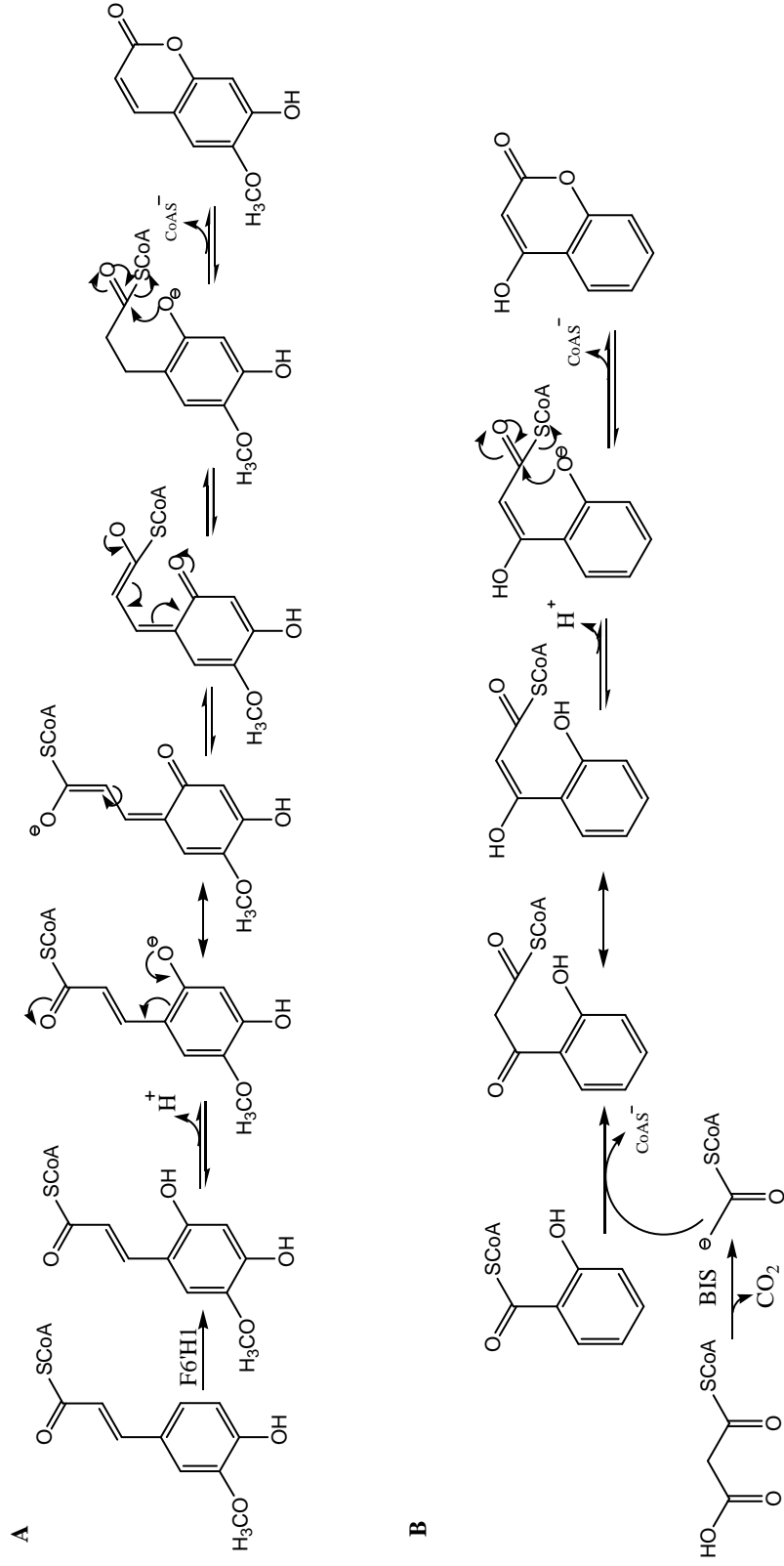
položaju C-3 4-hidroksi kumarina. Seskviterpeni prenil-furokumarinskog tipa predstavljaju posebnu grupu seskviterpenskih kumarina. Seskviterpenski kumarini su kao sekundarni metaboliti prisutni u nekim biljkama iz familija Apiaceae, Asteraceae i Rutaceae, a najzastupljeniji su u vrstama rodova *Ferula*, *Heptaptera* Margot. & Reut., *Heracleum* L., *Peucedanum* L., *Angelica* L. (Apiaceae), *Artemisia* L. (Asteraceae) i *Haplophyllum* Juss. (Rutaceae).

U poslednjih 20 godina je iz vrsta roda *Ferula* izolovano oko 130 različitih seskviterpenskih kumarina i smatra se da oni imaju i veliki hemotaksonomski značaj za ovaj rod. Odličan primer predstavljaju dva hemotipa vrste *F. communis* koji naseljavaju Sardiniju. Jedan hemotip sadrži toksične, prohemoragijske 4-hidroksikumarine i izaziva ferulozu, veoma često trovanje stoke koja tokom ispaše unese ovu biljku. Drugi hemotip sadrži seskviterpenske kumarinske etre, nije otrovan i ima terapijsku primenu. U ovom trenutku, poznavanje biosintetskog puta za sintezu seskviterpenskih kumarina je ograničeno. Smatra se da nastaju iz dva prekursora: farnezil-difosfata (FDP) i kumarina. Biosinteza FDP mevalonatnim putem je dobro proučena. Izopentenil-difosfat i dimetilalil-difosfat su intermedijeri koji takođe nastaju u plastidima mevalonatnim putem. Između ova dva biosintetska puta postoji komunikacija i samim tim C<sub>5</sub> jedinica seskviterpenoida može poteći iz mevalonatnog puta. Danas se pretpostavlja da biosinteza kumarina iz fenilpropanskih jedinjenja uključuje i CYP450 zavisne enzime. Ova pretpostavka se odnosi pre svega na para- i meta-hidroksilaciju cinamoil grupe u *p*-kumarnu kiselinu i kafeoilšikimat, redom, dok orto-hidroksilacija hidroksicimetnih kiselina predstavlja najznačajniji korak u biosintezi kumarina. Ovaj vid hidroksilacije zahteva prisustvo CoA-estara kao supstrata, a katalizovan je Fe(II)- i 2-oksoglutarat-zavisnom dioksigenazom (F6'HI). Na taj način npr. dolazi do konverzije feruloil-CoA u skopoletin u vrsti *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., a slična orto-hidroksilacija kumaroil- i sinapoil-CoA ortologim enzimima bi mogla biti uključena u biosintezu umbeliferona i izofraksidina, redom.

Do sada je predloženo nekoliko biosintetskih puteva za sintezu 4-hidroksikumarina, a prema dva najbolje proučena, ovi metaboliti nastaju aktivnošću fungalne CYP450 monooksigenaze i bisfenil sintetaze. Danas su dobro proučeni i biosintetski putevi kojima dolazi do prenilovanja kumarinskog jezgra. 7-*o*-prenilovanje umbeliferona C<sub>5</sub> jedinicom (dimetilalil-difosfatom) prilikom formiranja fitoaleksina u



kulturama ćelija vrste *Ammi majus* L. katalizovano je dimetilalil-difosfat umbeliferon dimetilalil-transferazom. Ovaj enzim je lokalizovan u membrani endoplazmatskog retikuluma. Može se pretpostaviti da su slične membranske farnezil-transferaze uključene u sintezu *o*-farnezilovanih kumarina. Ciklične seskviterpenske strukture mogu nastati nezavisno, tj. pre vezivanja za kumarinsko jezgro ili mogu nastati iz linearnih seskviterpena. Smatra se da je farnohrol prekursor seskviterpenskih kumarinskih etara nastalih iz izofraksidina. U svetlu ove informacije, Gliszczynska i Brodelius su pretpostavili da su svi farnezilovani kumarini (umbeliprenin, skopofarnol, farnohrol i ferulenol), zapravo prekursori drugih seskviterpenskih kumarina koji u osnovi imaju umbeliferon, skopoletin, izofraksidin ili 4-hidroksikumarin.



**Slika 3.** Biosinteza kumarina: **A** – skopoletina; **B** – 4-hidroksikumarina; F6<sup>+</sup>HI: Fe(II)- i 2-oksoglutarat-zavisna dioksigenaza; BIS: bisfenil sintetaza (Gliszczyńska i Brodelius, 2012)

Seskviterpeni uobičajeno nastaju iz farnezil-pirofosfata (FPP) pod dejstvom seskviterpen sintetaza (ciklaza). Osnovni mehanizam njihovog nastanka obuhvata jonizaciju i elektrofilni napad alilnog katjona na jednu od preostalih *p*-veza supstrata. Nakon toga dolazi do transformacije katjona (elektrofilnom ciklizacijom, transferom vodonika i *Wagner-Meerwein*-ovim premeštanjem) i neutralisanja pozitivnog naelektrisanja deprotonovanjem ili uz pomoć egzogenog nukleofila kao što je npr. voda. Gliszczynska i Brodelius takođe pretpostavljaju da bi do ciklizacije farnezil ostatka seskviterpenskih kumarina moglo doći i aktivnošću enzima sličnih skvalen epoksidazi (Gliszczynska i Brodelius, 2012).

### **2.1.1. Seskviterpenski umbeliferil (7-hidroksikumarin) etri**

Veliki broj metabolita koji pripadaju ovoj grupi je do danas izolovan iz vrsta roda *Ferula*, a za neke od njih je pokazano da ispoljavaju značajna farmakološka delovanja. Najvažniji predstavnik ove grupe je umbeliprenin, 7-[[*(2E,6E)*-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-il]oksi] 2*H*-1-benzopiran-2-on (Tabela 1). Ovo jedinjenje je prisutno, osim u vrstama roda *Ferula*, takođe i u vrstama rodova *Heptaptera*, *Heracleum*, *Peucedanum* i *Angelica* iz familije *Apiaceae*, kao i u vrstama roda *Haplophyllum* iz familije *Rutaceae*. Umbeliprenin deluje antimikrobno, inhibirajući rast patogenih bakterija, kao i produkciju crvenog pigmenta *Serratia marcescens*. Ovaj 7-preniloksikumarin takođe inhibira rast promastigota *Leishmania major* u niskim mikromolarnim koncentracijama. Umbeliprenin inhibira matriksne metaloproteinaze, enzime ključne za proces metastaze tumora, a pokazao je i snažno citotoksično delovanje prema nekoliko humanih tumorskih ćelijskih linija (Wehi 164, M4Beu, A549, PC3, PA1, MCF7 i DLD), pri čemu je najosetljivija na delovanje ovog kumarina bila metastatska linija humanog malignog melanoma (M4Beu). S obzirom da su ove ćelije bile osetljivije od zdravih fibroblasta i da je umbeliprenin bio dva puta aktivniji od cisplatina, može se zaključiti da je efekat bio snažan i selektivan. Ispitivanja su takođe pokazala da umbeliprenin snažno inhibira 5-lipooksigenazu, skvalen-hopen ciklazu, a nešto slabije i acetilholinesterazu. Derivat umbeliprenina, 8'-acetoksi-5'-hidroksi umbeliprenin, izolovan iz *F. assa-foetida* pokazao je snažno antivirusno delovanje

prema soju H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>, a potvrđeno je i da deluje antiinflamatorno inhibirajući transkripcioni faktor NF-κB.

Karatavicinol, 7-[[*(2E,6E)*-10,11-dihidroksi-3,7,11-trimetil-2,6-dodekadien-1-il]oksi]kumarin (Tabela 1) ostvario je inhibitorno delovanje prema bakteriji *Alicyclobacillus acidocaldarius* (Gliszczyńska i Brodelius, 2012).

Ispitivanja seskviterpenskikh kumarina pokazala su da ova grupa jedinjenja može uticati na rezistenciju tumorskih ćelija na hemoterapeutike (eng. *multi-drug resistance-MDR*). Među izolovanim sekundarnim metabolitima iz nadzemih delova *F. vesceritensis* Coss et Dur ex Batt dva seskviterpenska kumarina, farneziferol A i fezelol (Tabela 1) poseduju hemoterapijski potencijal i da bi se mogli koristiti za tretiranje multirezistencije tumorskih ćelija (Oughlissi-Dehak i sar., 2008). Pored uticaja na multirezistenciju tumorskih ćelija, fezelol je takođe snažno inhibirao proliferaciju ćelija leukemije. Farneziferol B i C (Tabela 1) su pokazali dozno-zavisani antivirusni efekat inhibirajući citopatogeni efekat humanog rinovirusa, pa se smatra da bi mogli naći primenu u terapiji virusnih infekcija gornjih disajnih puteva (Gliszczyńska i Brodelius, 2012).

Rezultati novih ispitivanja ukazuju i na veliki antitumorski potencijal farneziferola C. Ovaj kumarin inhibira vaskularni endotelijalni faktor rasta i dovodi do nishodne regulacije ekspresije matriksne metaloproteinaze 2. Antitumorska aktivnost ovog jedinjenja potvrđena je i *in vivo* studijom u kojoj je pokazano da 1 mg/kg dovodi do 60% inhibicije rasta *Lewis*-ovog kancera pluća na miševima. Farneziderol D (Tabela 1) je u modifikovanom *Ames*-ovom testu ostvario antimutagenu aktivnost na soju *Salmonella typhimurium* TA 100.

Galbanična kiselina, 2,3-dimetil-6-(1-metiletiliden)-2-[[*(2-okso-2H-1-benzopiran-7-il)*oksi]metil]-*(1S,2S,3S)*-cikloheksanpropanska kiselina (Tabela 1), je u dva nezavisna istraživanja pokazala jak potencijal kao modulator rezistencije bakterija. Naime, sama kiselina u koncentracijama do 120 µg/ml nije ostvarila efekat prema bakteriji *Staphylococcus aureus*, ali je kombinacija ovog kumarina (100 µg/ml) i penicilina G, odnosno cefaleksina dovela do značajnog smanjenja vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIK) za ove antibiotike, kao i u kombinaciji sa ciprofloksacinom, meticilinom i tetraciklinom prema kliničkim izolatima iste bakterijske vrste. Novija istraživanja su pokazala da je galbanična kiselina takođe i

snažan inhibitor farnezil-transferaze (Gliszczyńska i Brodelius, 2012). Galbanična kiselina i metilgalbanat pokazuju i snažno antivirusno delovanje prema H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> soju virusa influence. Može se pretpostaviti da metilovanje karboksilne grupe pojačava antivirusno delovanje ove grupe kumarina s obzirom da je metilgalbanat delovao jače od galbanične kiseline. Značajno je da je aktivnost oba jedinjenja bila snažnija od adamantina, standardnog antivirusnog leka (Lee i sar., 2009).

Ispitivanje iz 2010. god. pokazalo je da koladin, 7-[[*(1R,4aS,6R,8aR)*]-6-(acetiloksi)-dekahidro-5,5,8a-trimetil-2-metilen-1-naftalenil]metoksi]kumarin (Tabela 1), i koladonin (njegov deacetil derivat) ostvaruju blago citotoksično delovanje prema ćelijskim linijama humanog kolorektalnog kancera. Koladin je ostvario i dva puta jaču acetilholinesteraznu aktivnost u poređenju sa koladoninom i smatra se da je slobodna OH grupa koladonina uticala na interakciju sa enzimima i smanjila njegovu efikasnost (Gliszczyńska i Brodelius, 2012).

Iz vrste *F. pseudalliacea* Rech.f. je 2012. god. izolovan prvi diseskviterpenski kumarin – sanadajin, uz jedan nov (fekrinolacetat) i nekoliko poznatih seskviterpenskih kumarina (Tabela 1) (Dastan i sar., 2012).

### **2.1.2. Seskviterpenski etri derivati izofraksidina**

Ovaj tip seskviterpenskih kumarina zastupljen je u vrstama rodova *Artemisia* L., *Achillea* L. i *Ferula*. Farnohrol, 6,8-dimetoksi-7-[[*(2E,6E)*]-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrienil]oksi]kumarin (Tabela 1), nije prisutan u vrstama roda *Ferula*, ali se smatra prekursorom ostalih seskviterpenskih kumarina iz ove klase. Dva jedinjenja ovog tipa: drimatrol B i epoksifarnohrol (Tabela 1) izolovana su iz korena *F. jaeskeana* C. B. Clarke.

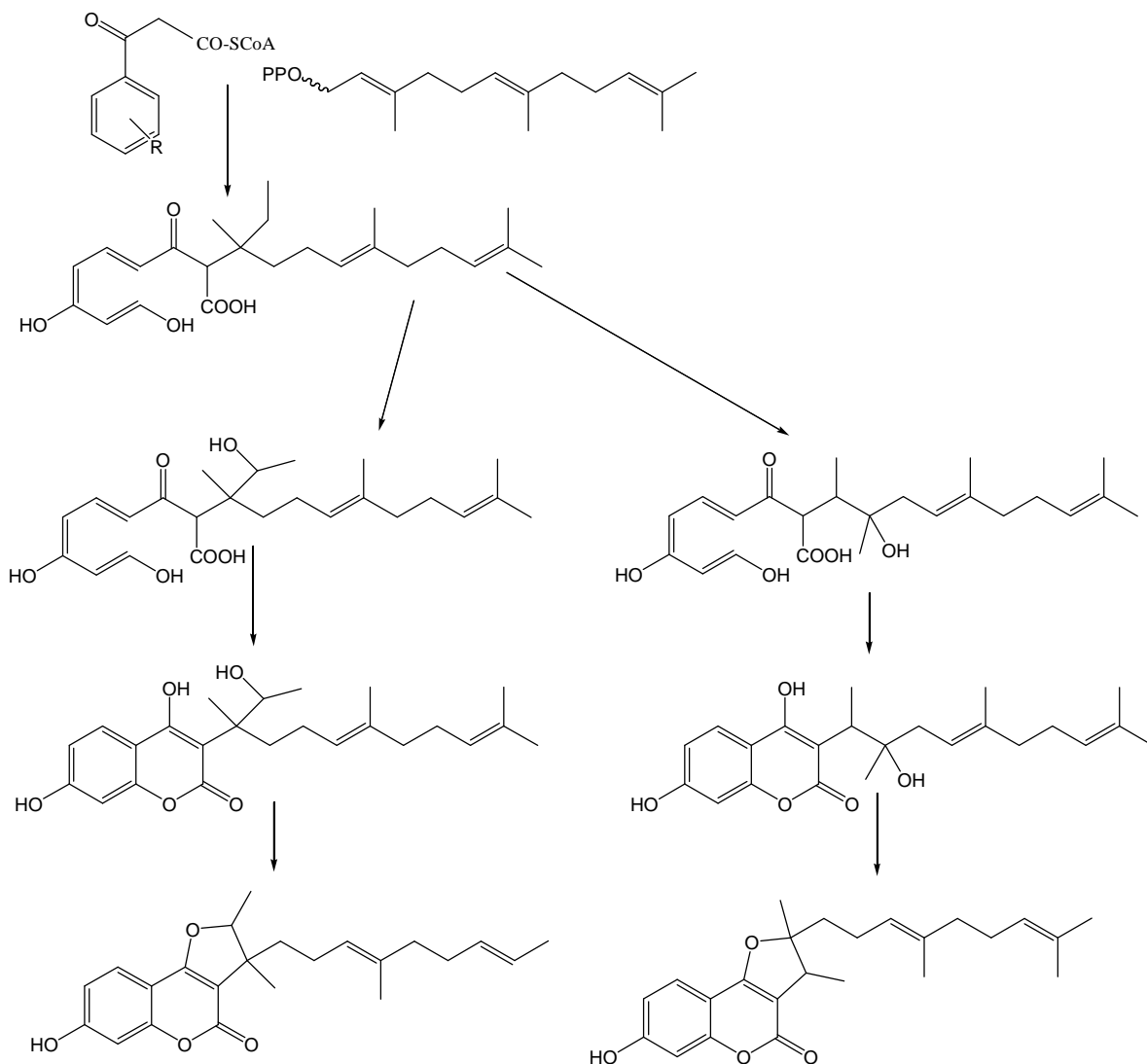
### 2.1.3. Prenilovani 4-hidroksikumarini

Ferulenol, 4-hidroksi-3-[(2*E*,6*E*)-3,7,11-trimetil-2,6,10-dodekatrien-1-il]kumarin (Tabela 1), je glavni sastojak toksičnog hemotipa vrste *F. communis* i univerzalni prekursor ostalih farnezil 4-hidroksikumarina. Istraživanja su pokazala da ova grupa seskviterpenskih kumarina ostvaruje antimikrobnu i citotoksičnu aktivnost, ali i da je najverovatnije odgovorna za trovanja životinja koje unose ovu vrstu tokom ispaše (Gliszczyńska i Brodelius, 2012).

### 2.1.4. Seskviterpeni prenil-furokumarinskog tipa

Ovi furokumarinski derivati formalno nastaju iz 4-hidroksikumarina,  $\alpha$ -farnezilovanjem 3-fenil-3-ketopropionil CoA (Slika 4). U svetlu novijih informacija o biosintezi, verovatnije je da do prenilovanja dolazi u fazi postojanja 4-hidroksikumarina i da nastali konjugat hidroksilovanjem i ciklizacijom formira dihidrofuranski prsten. Predstavnici ove grupe kumarina su do sada izolovani iz svega nekoliko vrsta roda *Ferula*. Najveći broj predstavnika je do sada izolovan iz vrste *F. feruloides* (Steud.) Korovin, od toga trinaest derivata seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa kod kojih je bočni lanac vezan za C<sub>2</sub> ili C<sub>3</sub> atom furokumarinskog dela molekula (Tabela 1).

Ispitivanja farmakološke aktivnosti pokazala su da neki predstavnici ove grupe kumarina pokazuju antiinflamatorno delovanje inhibirajući proizvodnju azot-monoksida (NO) u kulturi mišijih leukemijskih ćelija (monocitno-makrofagna linija-RAW 264.7). Takođe, za neke predstavnike ove grupe seskviterpenskih kumarina pokazano je da snažno inhibiraju  $\alpha$ -glukozidazu (Gliszczyńska i Brodelius, 2012).



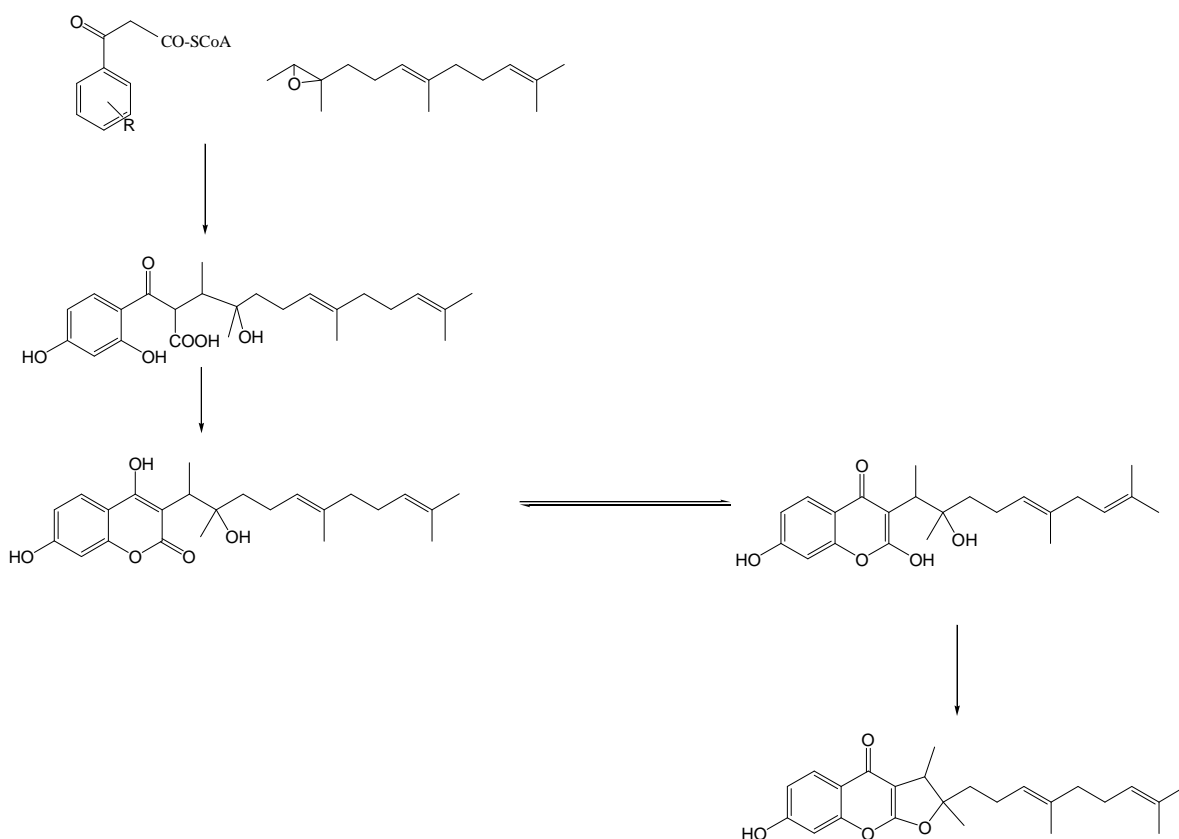
**Slika 4.** Potencijalni put biosinteze seskviterpena prenil-furokumarinskog tipa (Isaka i sar., 2001)

### 2.1.5. Monoterpenški kumarini

Iz vrste *F. ferulago* L. izolovano je 5 monoterpenških kumarina (Tabela 1), od kojih su ferulagol A i B predstavljali nova jedinjenja (El Razek i sar., 2001).

## 2.2. Hromoni

Hromoni predstavljaju derivate benzo- $\gamma$ -pirona. Iz vrsta roda *Ferula* izolovano je i nekoliko predstavnika ove grupe sekundarnih metabolita. Hromoni se danas u organskoj hemiji koriste pre svega u sintezi različitih heterocikličnih jedinjenja. Ispoljavaju i brojna farmakološka delovanja. Pokazano je da mogu ostvariti antimikrobno, antivirusno, anti-tumorsko, antiinflamatorno i antioksidantno delovanje (Sharma i sar., 2011). Predstavnici ove grupe jedinjenja su do sada izolovani iz svega nekoliko vrsta roda *Ferula* i većinom se hemijski mogu okarakterisati kao seskviterpenoidi prenil-furohromonskog tipa. Nagatsu i sar. (2002), kao i Meng i sar. (2013) predložili su biosintetski put kojim bi mogla da nastane većina jedinjenja ove klase izolovanih iz vrsta roda *Ferula* (Slika 5).



**Slika 5.** Mogući put biosinteze seskviterpena prenil-furohromonskog tipa (Meng i sar., 2013)



Dosadašnja ispitivanja farmakološke aktivnosti seskviterpenskih hromona prisutnih u vrstama roda *Ferula* pokazala su da oni inhibiraju proizvodnju NO i nishodno regulišu ekspresiju iNOS u kulturi ćelija miša sličnih makrofagama (RAW 264.7) (Motai i Kitanaka, 2005a). Ispitivanje citotoksične aktivnosti 2,3-dihidro-7-hidroksi-2*S*\*,3*R*\*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil]-furo[3,2-*b*]hromona (Tabela 2), seskviterpenskog hromona izolovanog iz korena *F. ferulaeoides*, prema ćelijskim linijama kancera dojke (MCF-7), hepatocelularnog karcinoma (HepG2) i humanog glioma (C6) pokazalo je da ovo jedinjenje ostvaruje slabu citotoksičnu aktivnost prema malignim ćelijama HepG2 i C6 (Meng i sar., 2013). Neki od hromonskih derivata izolovanih iz vrsta roda *Ferula* dati su u Tabeli 2.

### 2.3. Jedinjenja sa sumporom

Ova jedinjenja igraju značajnu ulogu u formiranju mirisa i ukusa nekih predstavnika roda *Ferula*, kao i njihovih izolata. Smatra se da su za oštar i neprijatan miris najverovatnije odgovorni disulfidi za koje je potvrđeno da, slično izotiocijanatima i elektrofilnim sumpornim jedinjenjima iz belog i crnog luka, snažno aktiviraju TRPA1 jonski kanal (Shokoohinia i sar., 2013). U Tabeli 3 prikazana su neka jedinjenja iz ove klase, do sada izolovana iz vrsta roda *Ferula*. Veliki broj jedinjenja iz ove grupe je isparljiv i može se naći u etarskim uljima predstavnika ovog roda. Ispitivanja su pokazala da etarsko ulje *F. latisecta* Rech.f. & Aellen, bogato polisulfidima (75,2%), ostvaruje snažno antifungalno delovanje prema humanim patogenim dermatofitima (*Trichophyton rubrum* i *T. verrucosum*). Pokazano je i da su perzikasulfid A i B (Tabela 3) aktivni metaboliti odgovorni za antifungalno delovanje (Iranshahi i sar., 2008a; Mirjani i sar., 2005). Perzikasulfid B je identifikovan kao jedan od dva aktivna metabolita odgovorna za inhibitorno delovanje hloroformskog ekstrakta korena *F. persica* var. *persica* prema matriksnim metaloproteinazama (MMP). Ovaj polisulfid je ostvario snažno i dozno-zavisno citotoksično delovanje prema ćelijskoj liniji fibrosarkoma (WEHI 164), kao i inhibitorno delovanje prema matriksnim metaloproteinazama u testu invazivnosti (Shahverdi i sar., 2006).

## 2.4. Fenilpropani

Centralna gradivna jedinica fenilpropana C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> nastaje iz prefenske kiseline koja u toku konverzije u aromatične aminokiseline gubi C<sub>1</sub> gradivni element u obliku molekula CO<sub>2</sub>. Iz nastalih aromatičnih aminokiselina nastaje dalje cimetna kiselina, najjednostavniji predstavnik ove grupe metabolita (Hänsel i sar., 1999). Iz vrsta roda *Ferula* do danas je izolovan i identifikovan veći broj fenilpropanskih jedinjenja (Tabela 4). Seskviterpenski fenilpropanoidi izolovani iz metanolnog ekstrakta korena *F. fukanensis* K. M. Shen inhibirali su produkciju NO i nishodno regulisali ekspresiju inducibilne NO sintetaze (iNOS) u ćelijskoj liniji ćelija miša sličnih makrofagima (RAW 264.7) (Motai i Kitanaka, 2005b).

## 2.5. Seskviterpeni i seskviterpenski estri

Iz vrsta roda *Ferula* izolovan je veliki broj seskviterpena, kao i seskviterpenskih estara uglavnom daukanskog tipa, mada su iz predstavnika ovog roda izolovani i seskviterpeni humulenskog, himahalanskog i gvajanskog tipa (Lhuillier i sar., 2005).

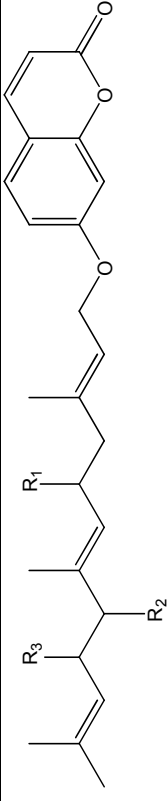
Za daukanske estre prisutne u vrstama roda *Ferula* pokazano je da mogu ostvariti različite farmakološke aktivnosti. Daukanski estri izolovani iz *F. hermonis* Boiss. su u dva različita ispitivanja pokazali antimikrobno i antiradikalno delovanje (Ibraheim i sar., 2012; Al-Ja'fari i sar., 2013), dok su neki predstavnici izolovani iz *F. communis* subsp. *communis*, *F. glauca* subsp. *glauca* L. i *F. arrigonii* Bocchieri pokazali snažno proapoptotsko i antiproliferativno delovanje prema nekoliko tumorskih ćelijskih linija (Dall'Acqua i sar., 2011; Poli i sar., 2005). Ferutin (Tabela 5), metabolit izolovan iz brojnih predstavnika ovog roda, inhibira rast *Mycobacterium tuberculosis* snažnije od streptomicina i rifampicina i potencira delovanje izonijazida i etionamida (Abourashed i sar., 2011). Ovaj daukan deluje i antiinflamatorno, a isto delovanje potvrđeno je i za teferin (Geroushi i sar., 2011). Daukanski estri (naročito siolanizat) pokazuju još i antiholinesteraznu (Dall'Acqua i sar., 2010), fitoestrogenu (Appendino i sar., 2002) i repelentnu aktivnost (Ghisalberti i sar., 1994). U Tabeli 5 prikazani su najčešće zastupljeni daukanski estri u vrstama roda *Ferula*.

## 2.6. Etarska ulja

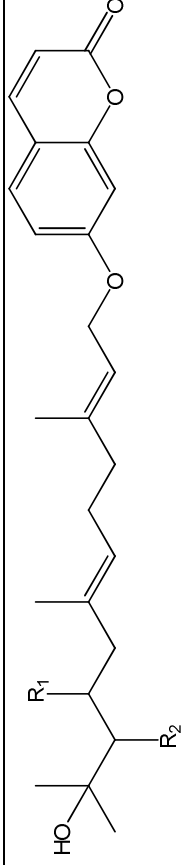
Do danas je više od 20 vrsta roda *Ferula* ispitivano u pogledu sastava etarskog ulja. Sva etarska ulja izolovana iz vrsta ovog roda mogu se podeliti u dve grupe: na ulja koja u svom sastavu imaju jedinjenja sa sumporom i na ulja u kojima ova jedinjenja nisu prisutna. Kao što je prethodno rečeno, zbog prisustva isparljivih sumpornih jedinjenja neki predstavnici ovog roda imaju jak i karakterističan, a nekada i veoma neprijatan miris. Jedinjenja sa sumporom su do sada identifikovana u etarskim uljima vrsta *F. assa-foetida*, *F. fukanensis*, *F. latisecta*, *F. persica* i *F. sinkiangensis* K. M. Shen.

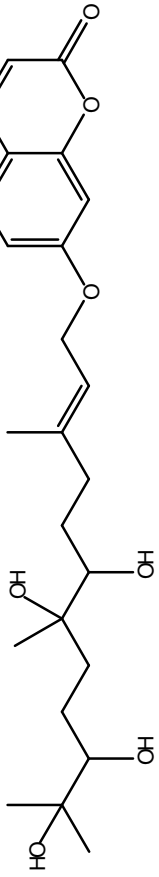
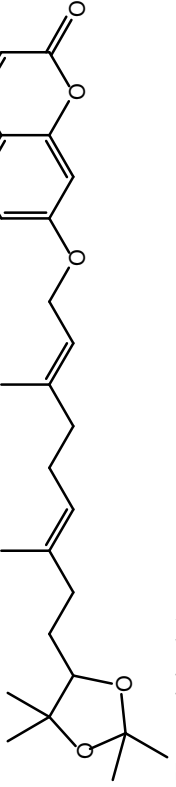
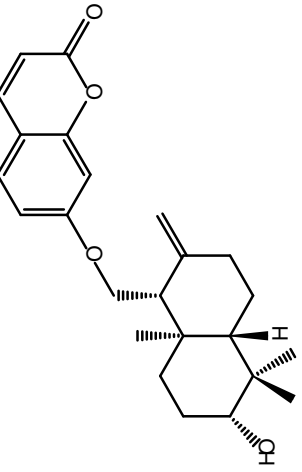
Terpeni su svakako najveća klasa metabolita prisutnih u etarskim uljima vrsta ovog roda, a od glavnih sastojaka najčešće su prisutni:  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinen, mircen i limonen (od monoterpena); linalol,  $\alpha$ -terpineol i nerilacetat (od oksidovanih monoterpena);  $\beta$ -kariofilen, germakren B, germakren D i  $\delta$ -kadinen (od seskviterpena); kariofilen-oksidi,  $\alpha$ -kadinol, gvajol i spatulenol (od oksidovanih seskviterpena) i (Z)- i (E)-2-butyl-1-propenil-disulfid (od jedinjenja sa sumporom). U Tabeli 6 prikazane su neke najzastupljenije komponente etarskih ulja izolovanih iz podzemnih organa vrsta roda *Ferula* (Sahebkar & Iranshahi, 2011).

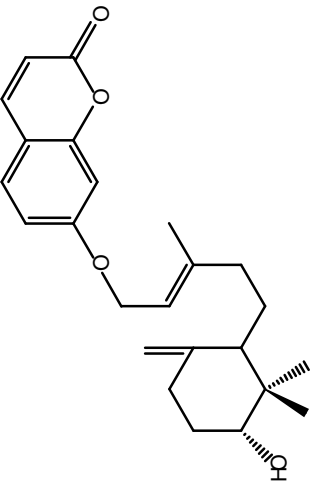
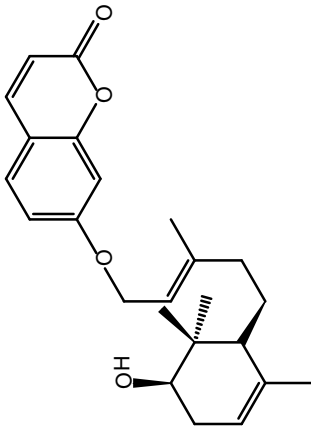
**Tabela 1.** Seskviterpenski kumarini izolovani iz vrsta roda *Ferula*

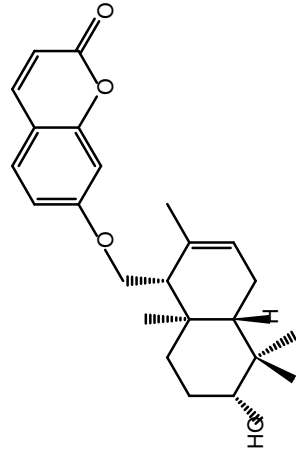
Jedinjenje	Biljna vrsta	Referenca
	$R_1=H; R_2=H; R_3=H$	<p><i>F. persica</i> Bunge  <i>F. szowisiana</i> DC  <i>F. assa-foetida</i>  <i>F. coccinea</i> Regel &amp; Schmalh.  <i>F. linkii</i> Webb.  <i>F. atchisonii</i> Koso-Pol.  <i>F. conocaula</i> Korov.  <i>F. fukanensis</i> K.M.Shen  <i>F. flabelliloba</i> Rech. f. &amp; Aell.  <i>F. tunetana</i> Pom.  <i>F. arrigonii</i> Bocchieri  <i>F. sinkiangensis</i> K. M. Shen  <i>F. iliensis</i> Krasn. ex Korov.  <i>F. foetidissima</i> Regel &amp; Schmalh.  <i>F. loscosii</i> (Lange) Willk</p>
		<p>Iranshahi i sar., 2004a            Barhomeuf i sar., 2008            Nassar i sar., 1995            Kir'yalov, 1961            González i sar., 1993            Veselovskaya i sar., 1982            Kuliev i sar., 1982            Xu i sar., 2009            Iranshahi i sar., 2010a            Jabrane i sar., 2010            Appendino i sar., 1997            Teng i sar., 2013            Bizhanova i sar., 1978            Kir'yanova i Sklyar, 1980            Pinar i Rodriguez, 1977</p>

5'-Hidroksiumbeliprenin:	$R_1=OH; R_2=H; R_3=H$	<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
8'-Hidroksiumbeliprenin:	$R_1=H; R_2=OH; R_3=H$	<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
9'-Hidroksiumbeliprenin:	$R_1=H; R_2=H; R_3=OH$	<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
Azakumarin:	$R_1=OH; R_2=OH; R_3=H$	<i>F. assa-foetida</i>	Kajimoto i sar., 1989
5'-Acetoksi-8'-hidroksiumbeliprenin:	$R_1=OAc; R_2=OH; R_3=H$	<i>F. foetida</i> Regel	Abd El-Razek i sar., 2007
8'-Acetoksi-5'-hidroksiumbeliprenin:	$R_1=OH; R_2=OAc; R_3=H$	<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
10'R-Karatavicinol:	$R_1=H; R_2=OH$	<i>F. foetida</i>	Abd El-Razek i sar., 2007
		<i>F. arrigonii</i>	Appendino i sar., 1997
		<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
		<i>F. sinaica</i>	Ahmed, 1999
		<i>F. aitchinsonii</i>	Veselovskaya i sar., 1982
10'-Acetoksi-11'-hidroksiumbeliprenin:	$R_1=H; R_2=OAc$	<i>F. karatavica</i> Regel & Schmalh.	Nabiev i sar., 1983
		<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009



	<i>F. sinaica</i>	Ahmed, 1999
<p>6',7'-Dihidroksikaratavicinol</p> 	<i>F. sinkiangensis</i>	Teng i sar., 2013
<p>Karatavicinol A</p> 	<i>F. vesceritensis</i> Coss et Dur ex Batt	Oughlissi-Dehak i sar., 2008
	<i>F. persica</i>	Hanafi-Bojd i sar., 2011
	<i>F. gummosa</i>	Adhami i sar., 2013
	<i>F. szowitziana</i>	Kohn i sar., 2011
	<i>F. assa-foetida</i>	Ghosh i sar., 2009
	<i>F. kokanica</i>	Babekov i sar., 2000
	<i>F. lipskyi</i> Korovin	Saidkhodzhaev i sar., 1991b
Farneziferol A	<i>Ferula linczewskii</i> Korovin	Savina i sar., 1978
	<i>F. caspica</i> M. Bieb.	Zhukov i sar., 1965

	<i>F. sinkiangensis</i>	Teng i sar., 2013
	<i>F. pseudalliacea</i> Rech.f.	Dastan i sar., 2012
	<i>F. assa-foetida</i>	Nassar, 1994
	<i>F. gummosa</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1991a
	<i>F. kopetdaghensis</i> Aut. Korovin	Nabiev i sar., 1982a
	<i>F. flabelliloba</i> Rech.f. & Aellen	Iranshahi i sar., 2010a
	<i>F. szowitsiana</i>	Iranshahi i sar., 2007
	<i>F. persica</i>	Iranshahi i sar., 2004b
Farneziferol B	<i>F. sinkiangensis</i>	Teng i sar., 2013
	<i>F. assa-foetida</i>	Cha i sar., 2011
	<i>F. szowitsiana</i>	Iranshahi i sar., 2007
	<i>F. kopetdaghensis</i>	Nabiev i sar., 1982a
	<i>F. caspica</i>	Zhukov i Prokopenko, 1967
Farneziferol C	<i>F. kopetdaghensis</i>	Nabiev i sar., 1982a
	<i>F. gummosa</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1991a
		
Farneziferol D (kopetdagin)		

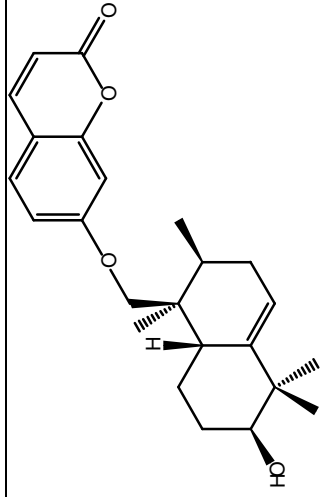


Fezelol (mošatol)

<i>F. badrakema</i> Kos.-Pol.	Mollazadeh i sar., 2011
<i>F. gummosa</i>	Iransahi i sar., 2010b
<i>F. flabelliloba</i>	Iransahi i sar., 2010a
<i>F. vesceritensis</i>	Oughlissi-Dehak i sar., 2008
<i>F. sumbul</i> Hook.f.	Zhou i sar., 2000
<i>F. pallida</i> Korovin	Su i sar., 2000
<i>F. litvinowiana</i> Aut. Koso-Pol.	Babekov i sar., 1999
<i>F. communis</i> L.	Al-Yahya i sar., 1998
<i>F. kelifii</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1993
<i>F. samarcandica</i>	Nasirov i sar., 1985
<i>F. tingitana</i>	Miski i sar., 1985
<i>F. conocaula</i>	Kuliev i sar., 1982
<i>F. foetidissima</i>	Kir'yanova i Sklyar, 1980
<i>F. iltensis</i>	Veselovskaya i sar., 1979
<i>F. diversivittata</i>	Nabiev i sar., 1978
<i>F. korshinskyi</i>	Kadyrov i Nikonov, 1974
<i>F. pseudooreoselinum</i> Lipsky	Kir'yalov i Bukreeva, 1973
<i>F. moschata</i>	Sklyar i sar., 1973
<i>F. tunetana</i>	Jabrane i sar., 2010
<i>F. vesceritensis</i>	Ahmed i sar., 2007

13-Hidroksifezelol





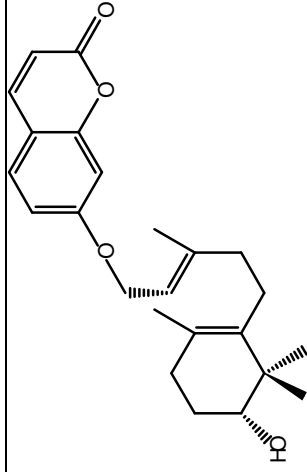
*F. assa-foetida*

Rollinger i sar., 2008

*F. microloba* Boiss.

Nabiev i Malikov, 1983a

Mikrolobiden



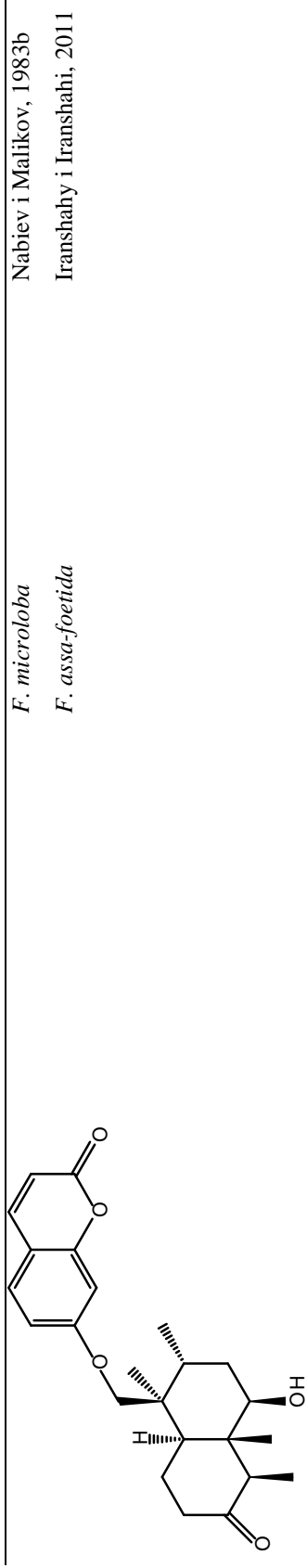
*F. flabelliloba*

Iranshahi i sar., 2010a

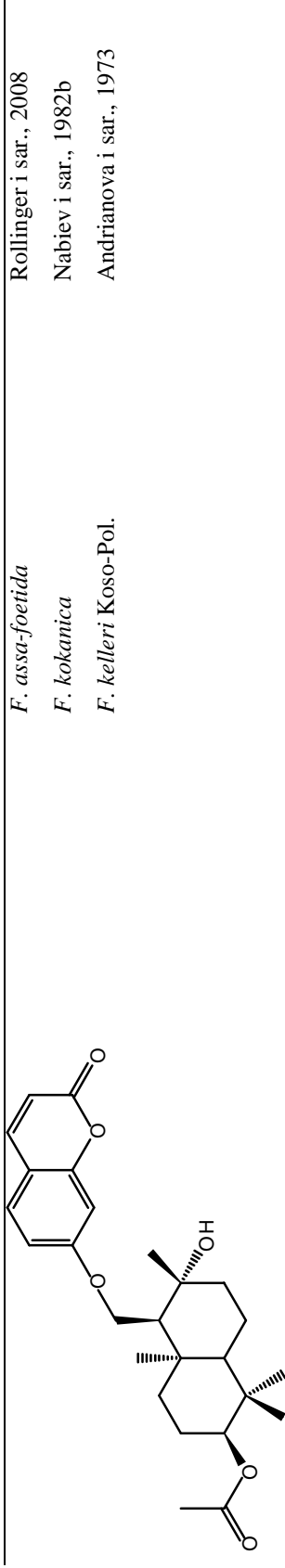
*F. assa-foetida*

Iranshahi i Iranshahi, 2011

Lehmferin



Mikrolobin



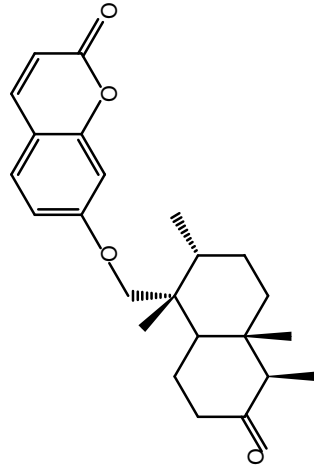
Kelerin



Deacetylkelerin

*F. szowitziana*

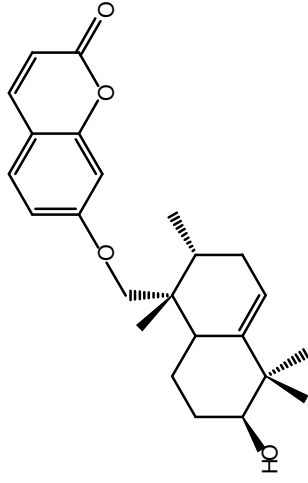
Iranshahi i sar., 2007



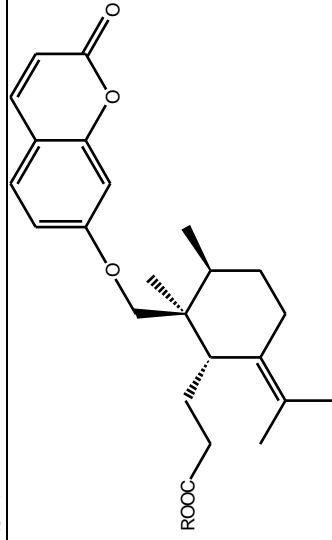
Soviciakumarin A

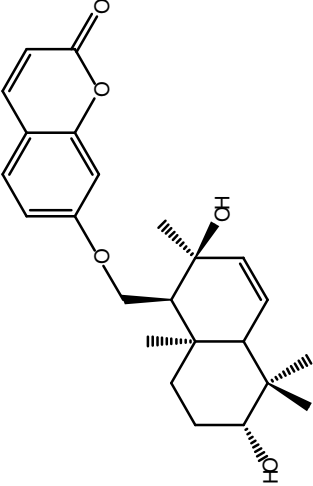
*F. szowitziana*

Iranshahi i sar., 2007



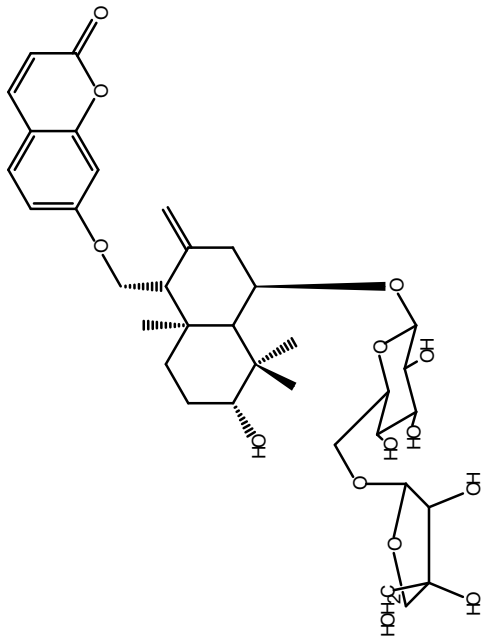
Soviciakumarin B



Galbanična kiselina (asakumarin B):	R=H		
	<i>F. sinkiangensis</i>		Teng i sar., 2013
	<i>F. szowitsiana</i>		Hanafi-Bojd i sar., 2011
	<i>F. assa-foetida</i>		Zhang i sar., 2012
	<i>F. kokanica</i>		Babekov i sar., 2000
	<i>F. gummosa</i>		Saidkhodzhaev i sar., 1991a
	<i>F. kopetdaghensis</i>		Syrov i sar., 1990
	<i>F. microloba</i>		Nabiev i Malikov, 1983b
	<i>F. violacea</i>	Korovin	Kir'yanova i sar., 1979
	<i>F. eugenii</i>	Kamelin	Kir'yanova i sar., 1979
Metilgalbanat	<i>F. pseudalliacea</i>		Dastan i sar., 2012
	<i>F. szowitsiana</i>		Kohno i sar., 2011
	<i>F. assa-foetida</i>		Lee i sar., 2009
	<i>F. microloba</i>		Nabiev i Malikov, 1983b
Etilgalbanat	<i>F. pseudalliacea</i>		Dastan i sar., 2012
	<i>F. gummosa</i>		Iranshahi i sar., 2010b
			
Gumozin			

*F. gummosa*

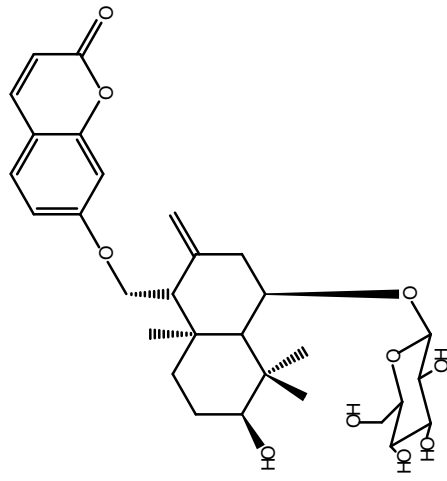
Iranshahi i sar., 2010b



Gumozid A

*F. gummosa*

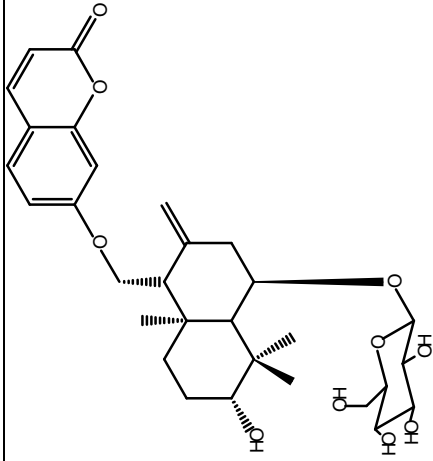
Iranshahi i sar., 2010b



Gumozid B

*F. gummosa*  
*F. conocaula*

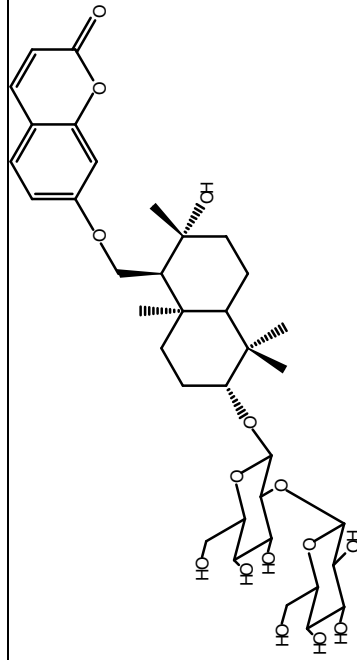
Iranshahi i sar., 2010b  
Kuliev i sar., 1979



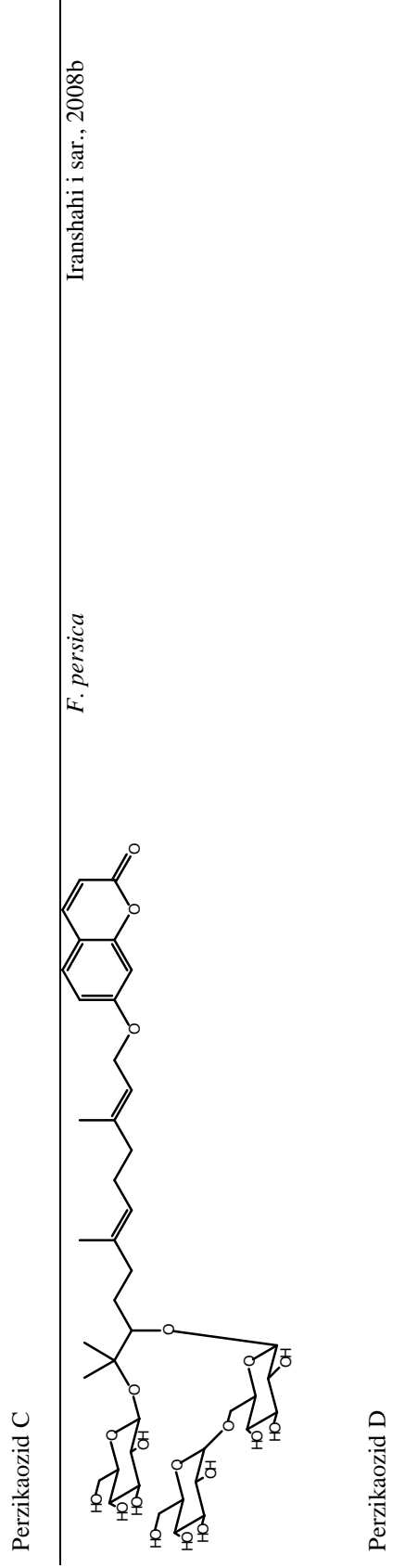
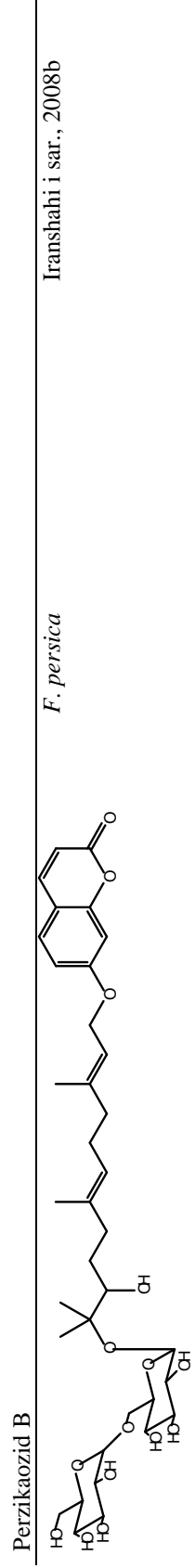
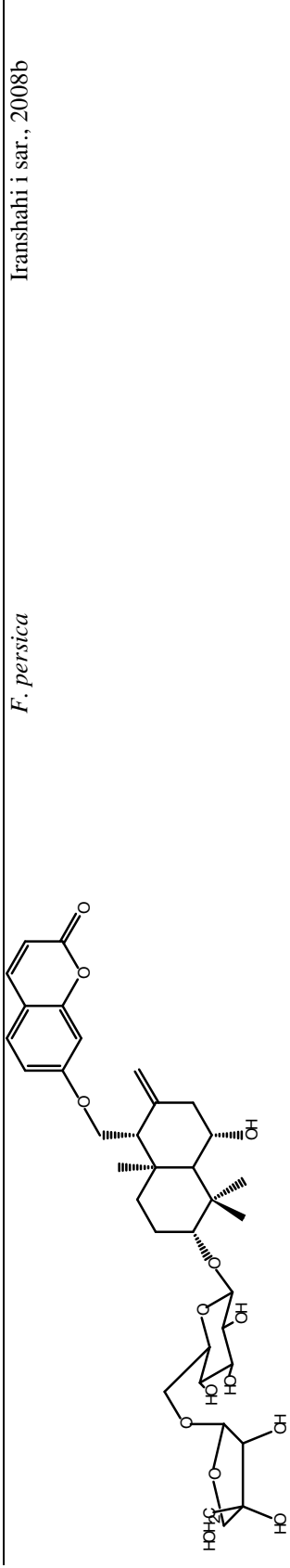
Kaufferozid

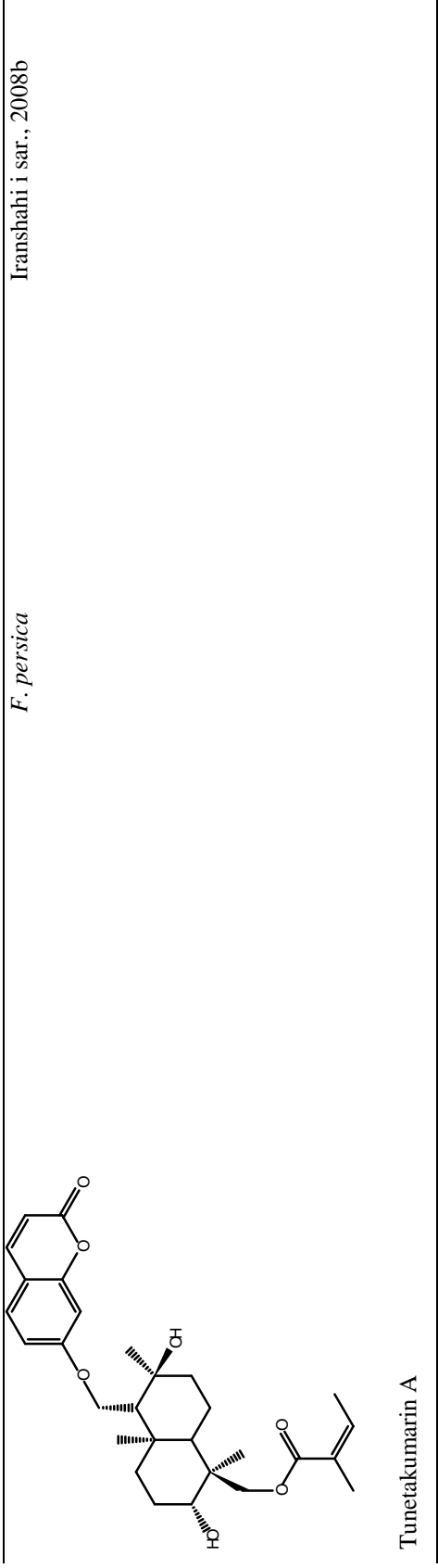
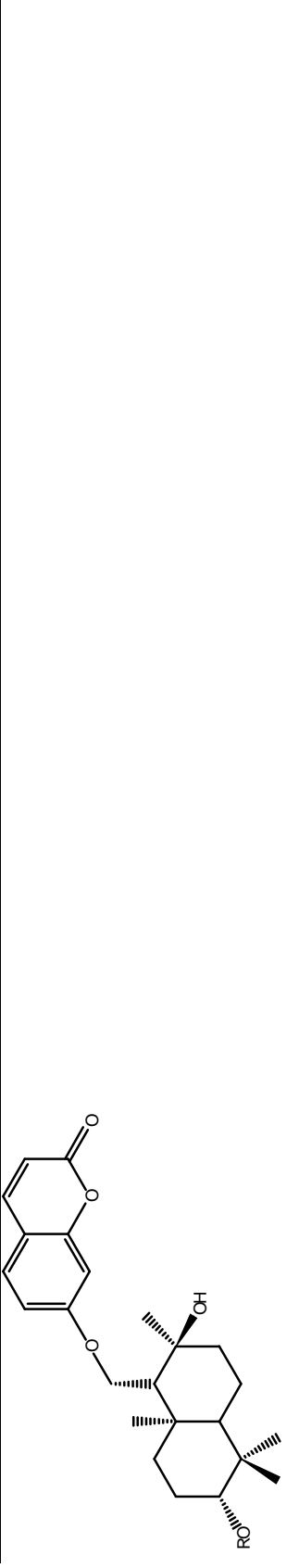
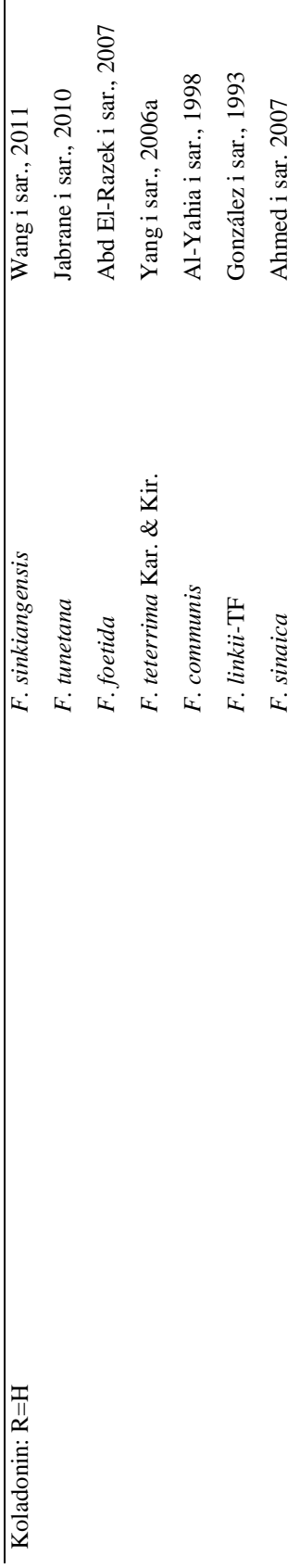
*F. persica*

Iranshahi i sar., 2008b



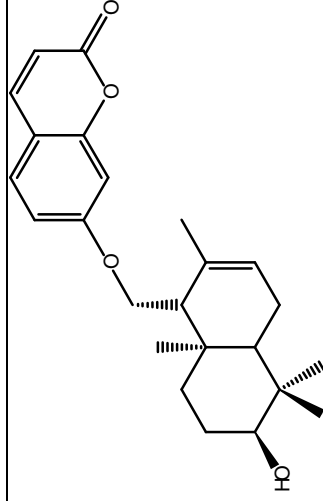
Perzikaozid A



 <p>The structure shows a complex polycyclic core with a hydroxyl group (OH) and a methyl group (H<sub>3</sub>C). It is substituted with a 6-methoxy-2-naphthyl group and a 3-methylbut-2-en-1-yloxy group.</p>	<p><i>F. persica</i></p> <p>Iranshahi i sar., 2008b</p>
 <p>The structure shows a polycyclic core with a hydroxyl group (OH) and a substituent R. It is substituted with a 6-methoxy-2-naphthyl group.</p>	<p>Tunetakumarin A</p>
<p>Koladomin: R=H</p>  <p>The structure shows a polycyclic core with a hydroxyl group (OH) and a substituent R. It is substituted with a 6-methoxy-2-naphthyl group.</p>	<p><i>F. sinkiangensis</i> Wang i sar., 2011</p> <p><i>F. tunetana</i> Jabrane i sar., 2010</p> <p><i>F. foetida</i> Abd El-Razek i sar., 2007</p> <p><i>F. teterrima</i> Kar. &amp; Kir. Yang i sar., 2006a</p> <p><i>F. communis</i> Al-Yahia i sar., 1998</p> <p><i>F. linkii</i>-TF González i sar., 1993</p> <p><i>F. sinaica</i> Ahmed i sar. 2007</p>



Koladin: R=Ac



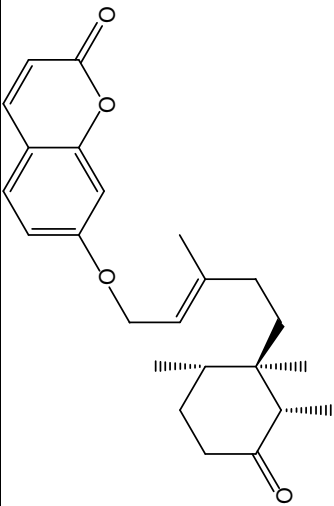
Konferol

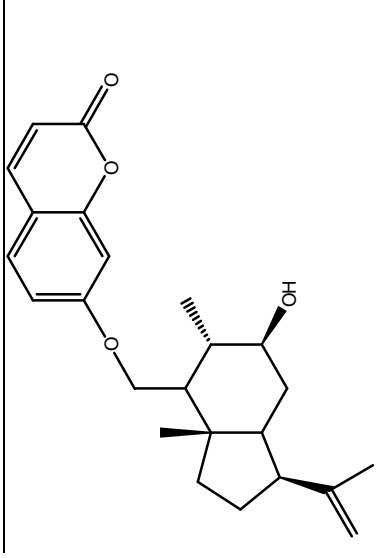
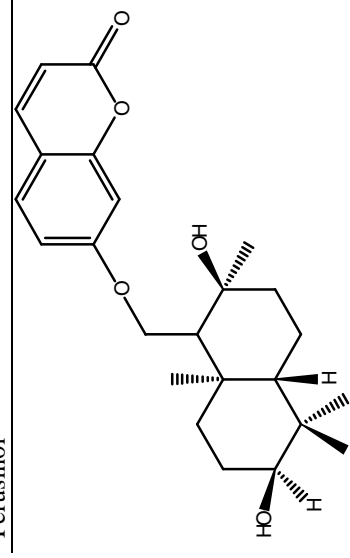
<i>F. tunetana</i> Pomm.	Jabrane i sar., 2010
<i>F. communis</i>	De Pasqual i sar., 1986
<i>F. loscosii</i>	Pinar i sar., 1977
<i>F. sinaica</i>	Ahmed i sar., 2007
<i>F. arrigonii</i>	Appendino i sar., 1997
<i>F. badrakema</i>	Fazly Bazzaz i sar., 2010
<i>F. gummosa</i>	Iranshahi i sar., 2010b
<i>F. assa-foetida</i>	Lee i sar., 2009
<i>F. sumbul</i>	Zhou i sar., 2000
<i>F. pallida</i>	Su i sar., 2000
<i>F. litvinowiana</i>	Babekov i sar., 1999
<i>F. kelfii</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1993
<i>F. lipskyi</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1991a
<i>F. inciso-serrata</i> Pimenov & J.V.Baranova	Kir'yanova i sar., 1982
<i>F. iltensis</i>	Veselovskaya i sar., 1979
<i>F. persica</i>	Bagirov i sar., 1977
<i>F. foetidissima</i>	Vandyshev i sar., 1975
<i>F. tuberifera</i> Korovin	Borisov i sar., 1974
<i>F. korshinskyi</i>	Kadyrov i Nikonov, 1974
<i>F. conocaula</i>	Vandyshev i sar., 1972a
<i>F. moschata</i>	Vandyshev i sar., 1972a
<i>F. badrakema</i>	Iranshahi i sar., 2009
<i>F. inciso-serrata</i>	Kir'yanova i sar., 1982
<i>F. tuberifera</i>	Borisov i sar., 1974

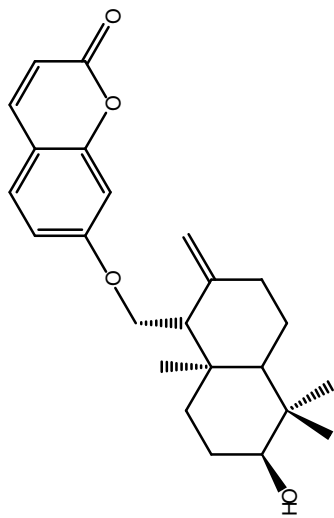
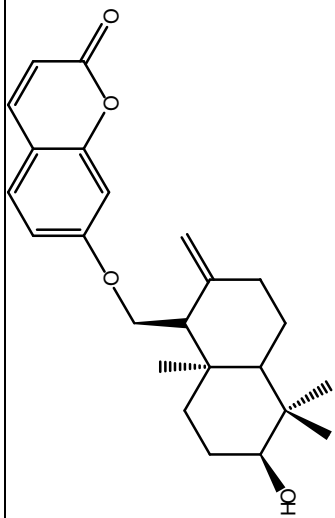
	<i>F. flabelliloba</i> <i>F. badrakema</i> <i>F. schtschurowskiana</i> Regel & Schmalh. <i>F. sumbul</i> <i>F. litvinowiana</i> <i>F. inciso-serrata</i> <i>F. iliensis</i> <i>F. teterrima</i> <i>F. persica</i> <i>F. foetidissima</i> <i>F. korshinskyi</i> <i>F. conocaula</i> <i>F. teterrima</i>	Iranshahi i sar., 2010a Iranshahi i sar., 2009 Barthomeuf i sar., 2006 Zhou i sar., 2000 Babekov i sar., 1999 Kir'yanova i sar., 1982 Veselovskaya i sar., 1979 Sokolova i sar., 1978 Bagirov i sar., 1977 Vandyshv i sar., 1975 Kadyrov i Nikonov, 1974 Vandyshv i sar., 1972b Yang i sar., 2006b
		

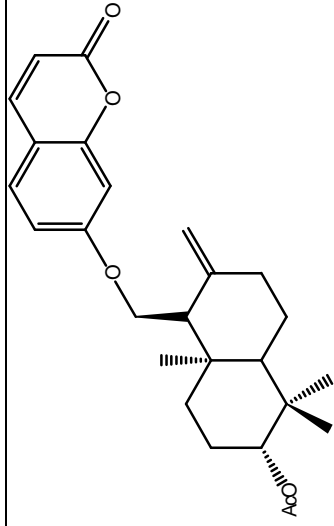
Konferon

Izofeterin

 <p>Lehmanolol</p>	<p><i>F. sinkiangensis</i></p> <p>Yang i sar., 2006b</p>
<p>Lehmanolon</p>	<p><i>F. sinkiangensis</i></p> <p><i>F. lehmannii</i></p> <p><i>F. fukanensis</i></p> <p>Yang i sar., 2006b</p> <p>Li i sar., 2010</p> <p>Xu i sar., 2009</p>
 <p>Sinkianon</p>	<p><i>F. sinkiangensis</i></p> <p><i>F. lehmannii</i></p> <p>Yang i sar., 2006b</p> <p>Li i sar., 2010</p>

<i>F. sinaica</i>		Gohar i sar., 2007
		
Ferusinol		
<hr/>		
<i>F. assa-foetida</i>		Abd El-Razek i sar., 2001
<i>F. litvinowiana</i>		Babekov i sar., 1999
<i>F. sinaica</i>		Ahmed, 1999
<i>F. keliffii</i>		Saidkhodzhaev i sar., 1993
<i>F. communis</i> subsp. <i>communis</i>		Miski i Jakupovic, 1990a
<i>F. kirialovii</i> Pimenov		Bukreeva, 1987
<i>F. samarcandica</i>		Nasirov i sar., 1985
<i>F. schtschurovskiana</i>		Kadyrov i sar., 1980
<i>F. iliensis</i>		Veselovskaya i sar., 1979
<i>F. persica</i>		Bagirov i sar., 1977
<i>F. nevsikii</i> Korovin		Bagirov i Kir'yalov, 1974
<hr/>		
<i>F. lypskii</i>		Saidkhodzhaev i sar., 1991b
<i>F. teterrima</i>		Sokolova i sar., 1978
<i>F. persica</i>		Bagirov i sar., 1977
<i>F. pseudooreoselinum</i>		Kir'yalov i Bukreeva, 1972
<hr/>		
		
Samarandin		
<hr/>		
Samarandinacetat		
<hr/>		

	<i>F. teterrima</i>	Yang i sar., 2006a
	<i>F. assa-foetida</i>	Abd El-Razek i sar., 2001
	<i>F. badrakema</i>	Bukreeva i Pimenov, 1991
	<i>F. samarcandica</i>	Nasirov i sar., 1985
	<i>F. lehmanni</i>	Sagidinova i sar., 1983
	<i>F. linczewskii</i>	Savina i sar., 1978
	<i>F. tuberifera</i>	Borisov i sar., 1974
<b>Badrakemin</b>		
<b>Badrakeminacetat</b>	<i>F. teterrima</i>	Yang i sar., 2006a
	<i>F. badrakema</i>	Bukreeva i Pimenov, 1991
	<i>F. kokanica</i>	Sklyar i sar., 1982
	<i>F. linczewskii</i>	Savina i sar., 1978
	<i>F. tuberifera</i>	Borisov i sar., 1974
	<i>F. persica</i>	Iranshahi i sar., 2004b
	<i>F. assa-foetida</i>	Abd El-Razek i sar., 2001
	<i>F. kelifii</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1993
	<i>F. lipskyi</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1991a
	<i>F. vicaria</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1991a
	<i>F. kokanica</i>	Sklyar i sar., 1982
	<i>F. schtschurowskiana</i>	Kadyrov i sar., 1980
	<i>F. liczevskii</i>	Savina i sar., 1980
	<i>F. gummosa</i>	Kir'yalov i Movchan, 1966
	<i>F. pseudooreoselinum</i>	Kir'yalov i Movchan, 1966
	<i>F. samarcandica</i>	Kir'yalov i Movchan, 1966
		
<b>Gumozin</b>		



*F. assa-foetida*

Abd El-Razek i sar., 2001

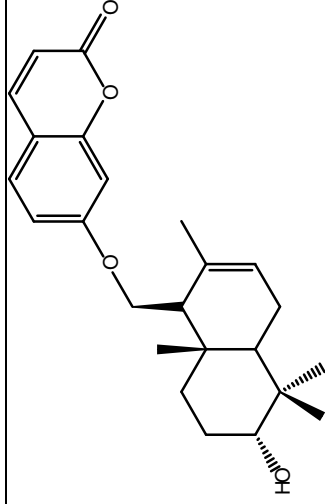
*F. kokanica*

Babekov i sar., 2000

*F. polyantha* Korovin

Khasanov i sar., 1974

Poliantin



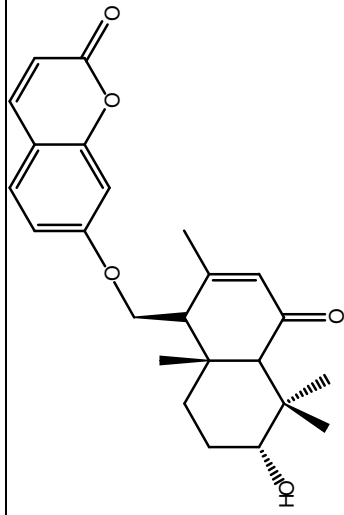
*F. badrakema*

Iranshahi i sar., 2009

*F. mogoltavica* Lipsky ex Korovin

Khasanov i sar., 1976

Mogoltacin



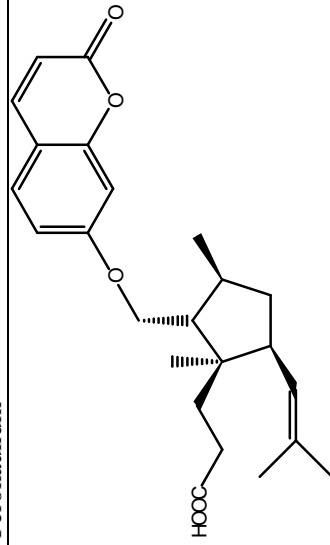
*F. gummosa*

Iranshahi i sar., 2010b

*F. badrakema*

Iranshahi i sar., 2009

Ferokaulidin



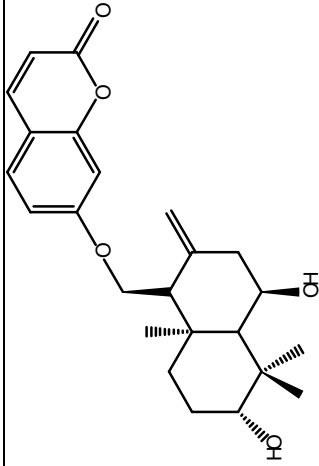
*F. sinatica*

Gohar i sar., 2007

Ferulsinatna kiselina

*F. assa-foetida*

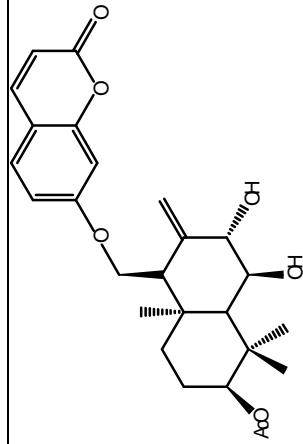
Abd El-Razek i sar., 2001



Azafetidol A

*F. assa-foetida*

Abd El-Razek i sar., 2001

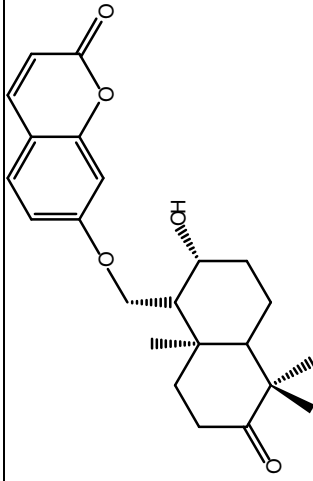


Azafetidol B



*F. assa-foetida*

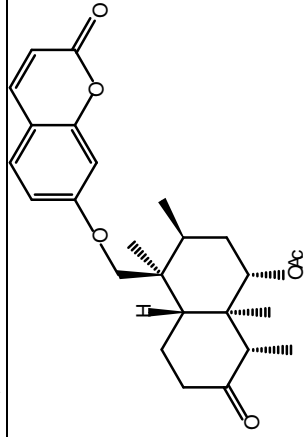
Abd El-Razek i sar., 2001



Neveskon

*F. pseudalliacea*

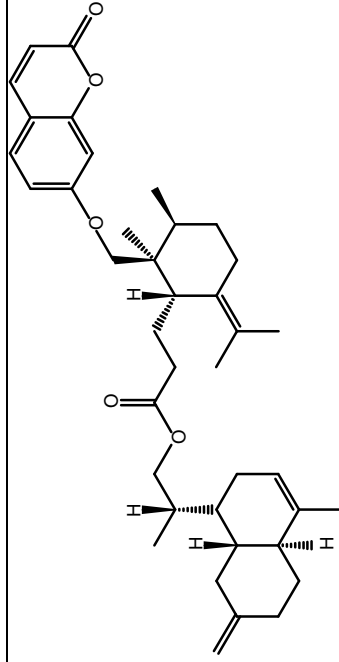
Dastan i sar., 2012



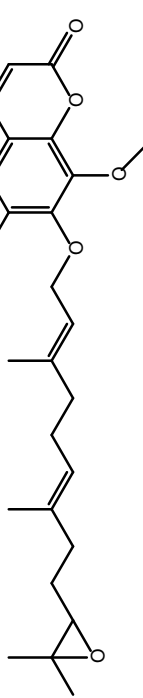
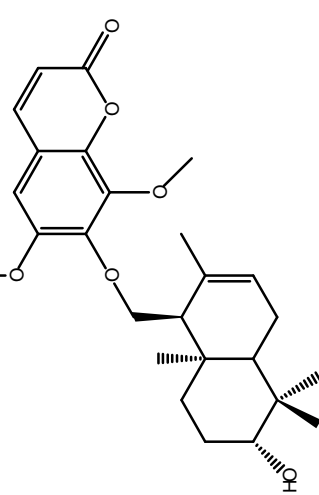
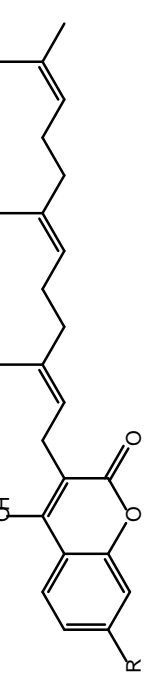
Fekrinolacetat

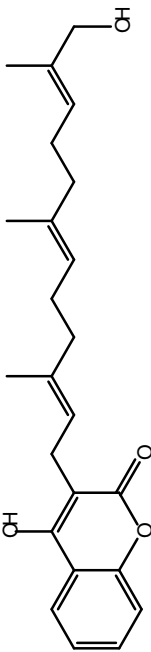
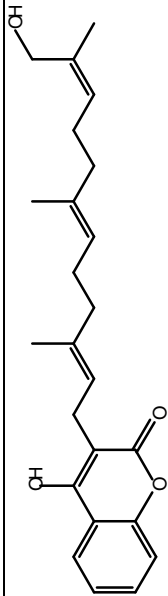
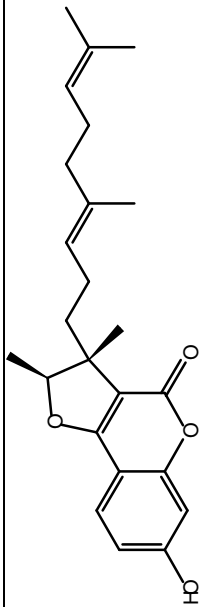
*F. pseudalliacea*

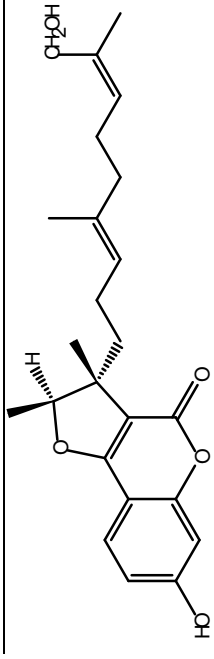
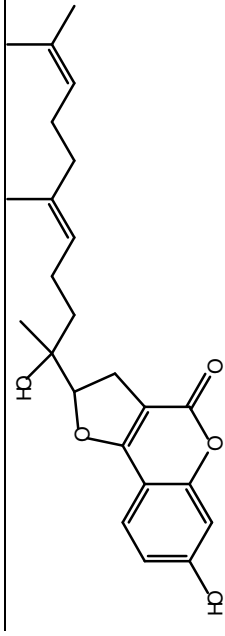
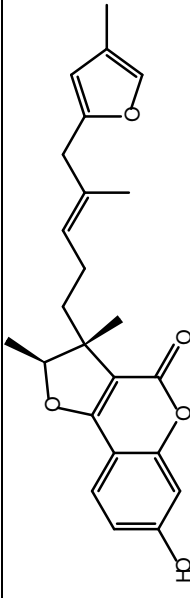
Dastan i sar., 2012

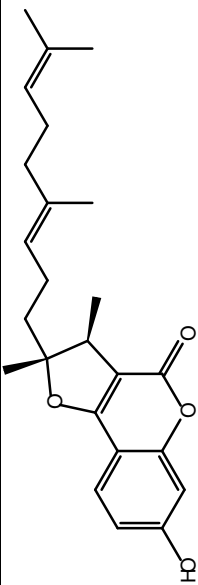
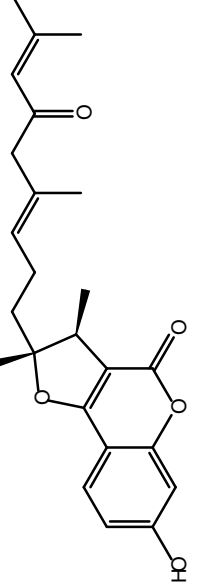


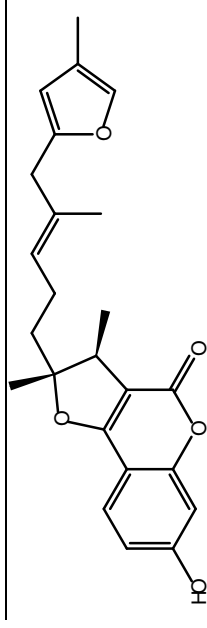

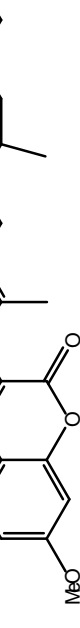
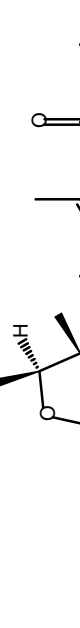
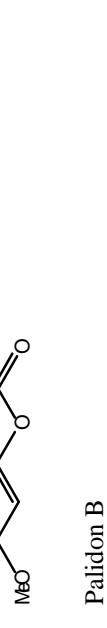
Sanadajin

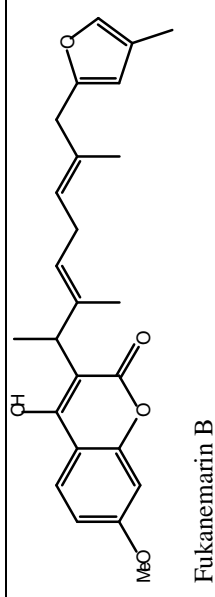
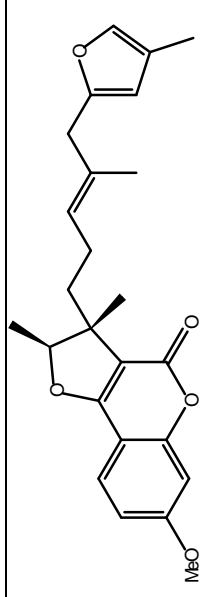
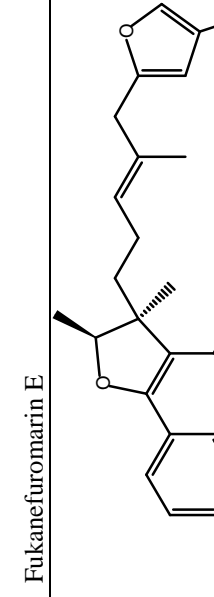
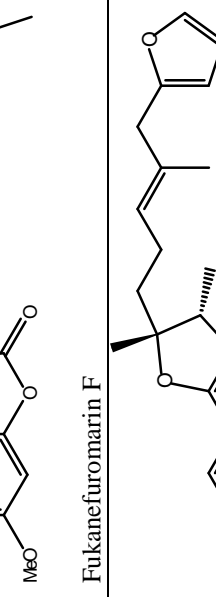
 <p>Epoksisfarnohrol</p>	<p><i>F. jaeskeana</i> C. B. Clarke</p> <p>Razdan i sar., 1989</p>
 <p>Drimatrol B</p>	<p><i>F. jaeskeana</i> C. B. Clarke</p> <p>Razdan i sar., 1989</p>
 <p>Ferulenol: R=H</p>	<p><i>F. communis</i> Lamnaouer i sar., 1987</p> <p><i>F. vesceritensis</i> Lahouel i sar., 2007</p> <p><i>F. ovina</i> Aburjai i sar., 2001</p>

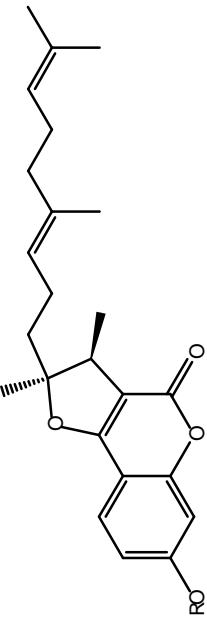
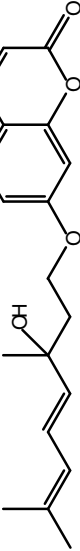
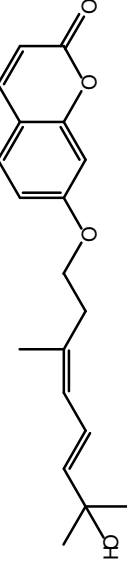
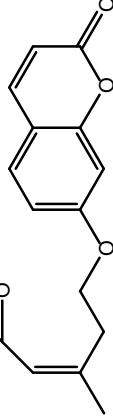
Amorezinol: R=OH	<i>F. ferulaeoides</i> (Steud.) Korovin	Meng i sar., 2013
	<i>F. communis</i>	Appendino i sar., 1988
<i>E</i> - $\omega$ -Hidroksiferulenol	<i>F. communis</i>	Appendino i sar., 1988
		
<i>Z</i> - $\omega$ -Hidroksiferulenol		
<i>E</i> - $\omega$ -Oksoferulenol		
<i>E</i> - $\omega$ -Acetoksiferulenol		
<i>Z</i> - $\omega$ -Acetoksiferulenol		
		
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>S</i> *, 3 <i>R</i> *-dimetil-3-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadienil]-furo[3,2- <i>c</i> ]kumarin		
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>R</i> *, 3 <i>R</i> *-dimetil-3-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadienil]-furo[3,2- <i>c</i> ]kumarin	<i>F. feruloides</i>	Kojima i sar., 2000

<p>2,3-Dihidro-7-metoksi-2<i>S</i>*,3<i>R</i>*-dimetil-3-[4,8-dimetil-3(<i>E</i>),7-nonadienil]-furo[3,2-<i>c</i>]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p>	<p>Kojima i sar., 2000</p>
<p>             Ferulin A</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p>	<p>Meng i sar., 2013</p>
<p>             Ferulin B</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p>	<p>Meng i sar., 2013</p>
<p>Ferulin C (7-metoksi derivat ferulina A)</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p>	<p>Meng i sar., 2013</p>
<p>             2,3-Dihidro-7-hidroksi-2<i>S</i>*,3<i>R</i>*-dimetil-3-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>)-pentenil]-furo[3,2-<i>c</i>]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p>	<p>Kojima i sar., 2000</p>

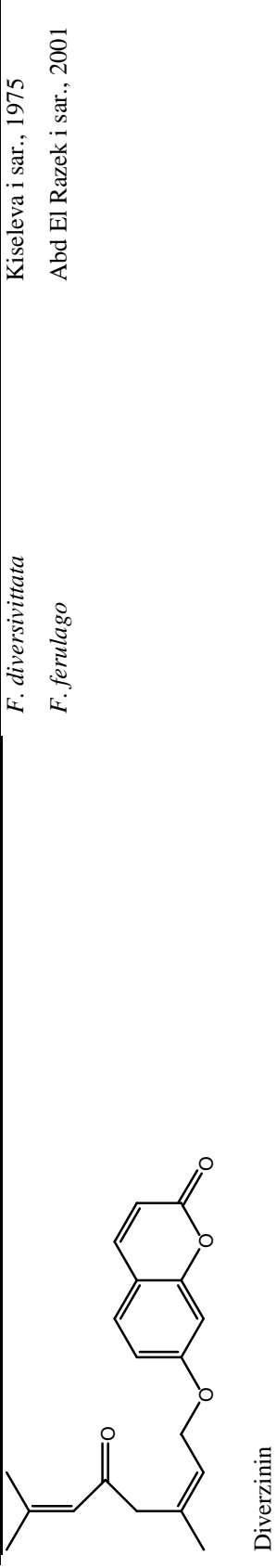
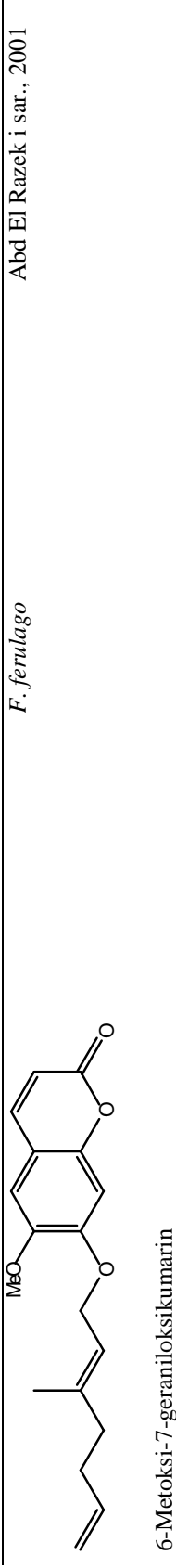
 <p>2,3-Dihidro-7-hidroksi-2S*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>
<p>2,3-Dihidro-7-hidroksi-2R*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>
<p>2,3-Dihidro-7-metoksi-2S*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>
<p>2,3-Dihidro-7-metoksi-2R*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>
 <p>2,3-Dihidro-7-metoksi-2S*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>
<p>2,3-Dihidro-7-metoksi-2S*,3R*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(E),7-nonadienil]-furo[3,2-c]kumarin</p>	<p><i>F. ferulioides</i></p> <p>Isaka i sar., 2001</p>

<p style="text-align: center;"><i>F. ferulioides</i></p>  <p style="text-align: center;">2,3-Dihidro-7-hidroksi-2<i>S</i><sup>*</sup>,3<i>R</i><sup>*</sup>-dimetil-2-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>)-pentenil]-furo[3,2-<i>c</i>]kumarin</p>	<p style="text-align: center;">Isaka i sar., 2001</p>
<p style="text-align: center;"><i>F. ferulioides</i></p>  <p style="text-align: center;">2,3-Dihidro-7-hidroksi-2<i>R</i><sup>*</sup>,3<i>R</i><sup>*</sup>-dimetil-2-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>)-pentenil]-furo[3,2-<i>c</i>]kumarin</p>	<p style="text-align: center;">Isaka i sar., 2001</p>
<p style="text-align: center;"><i>F. ferulioides</i></p>  <p style="text-align: center;">2,3-Dihidro-7-metoksi-2<i>R</i><sup>*</sup>,3<i>R</i><sup>*</sup>-dimetil-2-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>)-pentenil]-furo[3,2-<i>c</i>]kumarin</p>	<p style="text-align: center;">Isaka i sar., 2001</p>
<p style="text-align: center;"><i>F. pallida</i></p>  <p style="text-align: center;">Palidon A</p>	<p style="text-align: center;">Su i sar., 2000</p>
<p style="text-align: center;"><i>F. pallida</i></p>  <p style="text-align: center;">Palidon B</p>	<p style="text-align: center;">Su i sar., 2000</p>

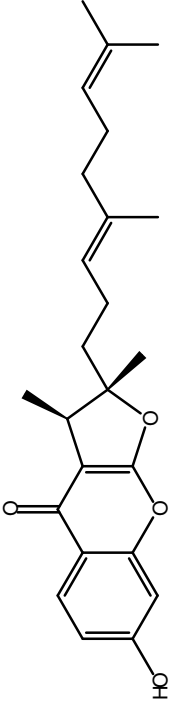
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Fukanemarin B</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p> <p>Motai i Kitanaka, 2004</p>
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Fukanefuromarin E</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p> <p>Motai i Kitanaka, 2004</p>
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Fukanefuromarin F</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p> <p>Motai i Kitanaka, 2004</p>
<p style="text-align: center;">  </p> <p style="text-align: center;">Fukanefuromarin G</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p> <p>Motai i Kitanaka, 2004</p>

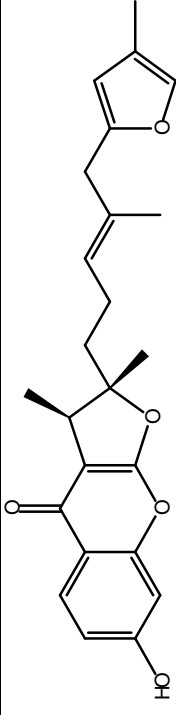
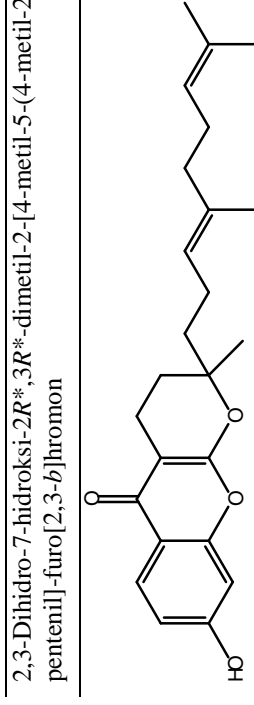
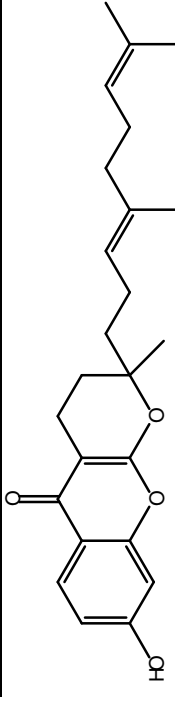
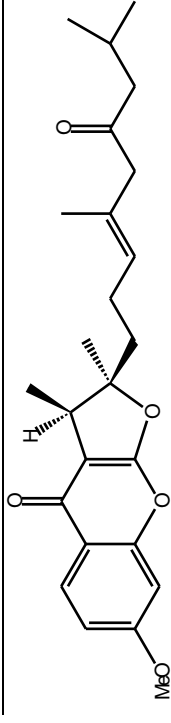
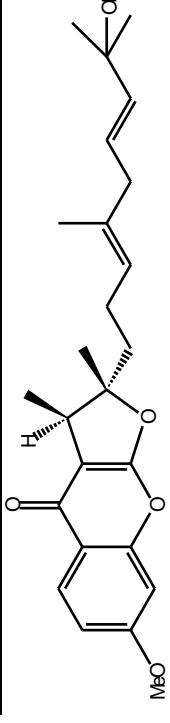
		
Bajgen C: R=H	<i>F. mongolica</i> V.M.Vinogr. & Kamelin	Choudhary i sar., 2001
<i>O</i> -Methylbajgen C: R=CH <sub>3</sub>	<i>F. mongolica</i>	Choudhary i sar., 2001
	<i>F. ferulago</i>	Abd El Razeq i sar., 2001
Ferulagol A	<i>F. ferulago</i>	Abd El Razeq i sar., 2001
	<i>F. diversivittata</i>	Zarei i sar., 2013
Ferulagol B	<i>F. ferulago</i>	Abd El Razeq i sar., 2001
		
Diverzin		



 <p>Diverzinin</p>	<p><i>F. diversivittata</i> <i>F. ferulago</i></p> <p>Kiseleva i sar., 1975 Abd El Razeq i sar., 2001</p>
 <p>6-Metoksi-7-geraniloksikumarin</p>	<p><i>F. ferulago</i></p> <p>Abd El Razeq i sar., 2001</p>

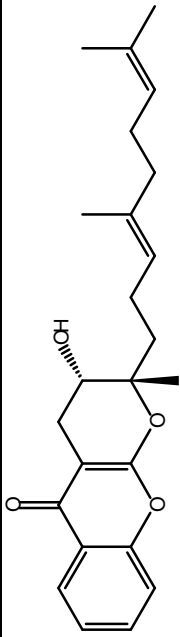
**Tabela 2.** Hromoni izolovani iz vrsta roda *Ferula*

Jedinjenje	Biljna vrsta	Referenca
	<i>F. feruliooides</i>	Nagatsu i sar., 2002
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>S</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadienil]-furo[2,3- <i>b</i> ]hromon	<i>F. feruliooides</i>	Meng i sar., 2013
2,3-Dihidro-7-metoksi-2 <i>S</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadienil]-furo[2,3- <i>b</i> ]hromon (ferulin D)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2, <i>R</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadien-6-onil]-furo[2,3- <i>b</i> ]hromon (fukanefurohromon A)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2, <i>R</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-3( <i>E</i> ),7-nonadien-6-onil]-furo[2,3- <i>b</i> ]hromon (fukanefurohromon B)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>S</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-4( <i>E</i> ),7-nonadien-6-onil]furo[3,2- <i>b</i> ]hromon (fukanefurohromon C)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>S</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-4( <i>Z</i> ),7-nonadien-6-onil]furo[3,2- <i>b</i> ]hromon (fukanefurohromon D)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a
2,3-Dihidro-7-hidroksi-2 <i>R</i> <sup>*</sup> ,3 <i>R</i> <sup>*</sup> -dimetil-2-[4,8-dimetil-4( <i>Z</i> ),7-nonadien-6-onil]furo[3,2- <i>b</i> ]hromon (fukanefurohromon D)	<i>F. fukanensis</i>	Motai i Kitanaka, 2005a

 <p>2,3-Dihidro-7-hidroksi-2<i>S</i>*,3<i>R</i>*-dimetil-2-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>),7-pentenil]-furo[2,3-<i>b</i>]hromon</p>	<p><i>F. feruloides</i></p> <p>Nagatsu i sar., 2002</p>
 <p>2,3-Dihidro-7-hidroksi-2<i>R</i>*,3<i>R</i>*-dimetil-2-[4-metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>),7-pentenil]-furo[2,3-<i>b</i>]hromon</p>	<p><i>F. feruloides</i></p> <p>Nagatsu i sar., 2002</p>
 <p>Ferulin D</p>	<p><i>F. feruloides</i></p> <p>Meng i sar., 2013</p>
 <p>Palidon I</p>	<p><i>F. pallida</i></p> <p>Su i sar., 2000</p>
 <p>Palidon J</p>	<p><i>F. pallida</i></p> <p>Su i sar., 2000</p>

Miski i Jakupovic, 1990a

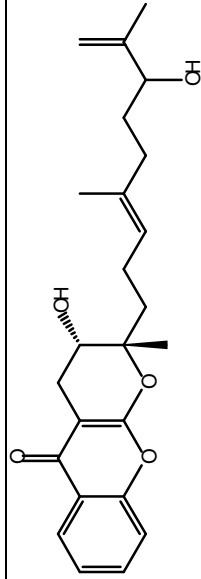
*F. communis*



Ferthromon

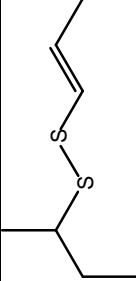
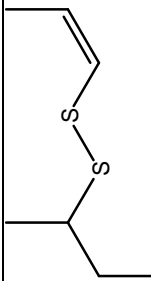
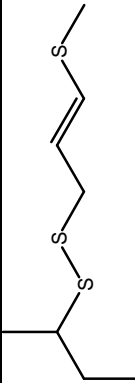
Miski i Jakupovic, 1990a

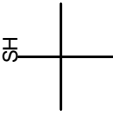
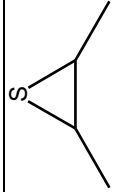

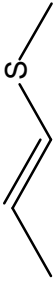
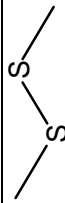
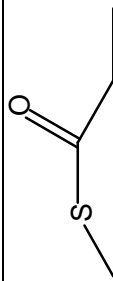
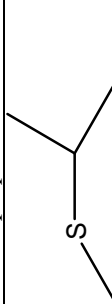
*F. communis*

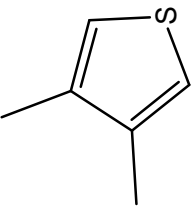
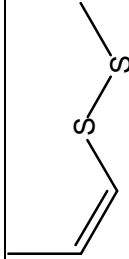
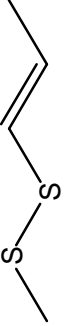
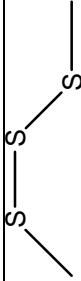
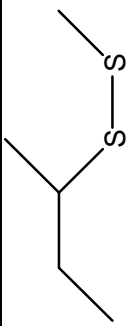


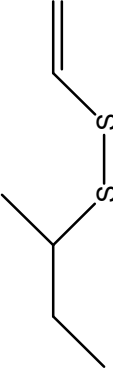
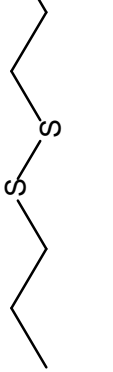
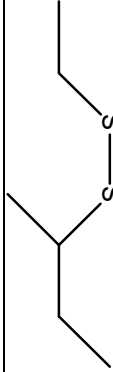
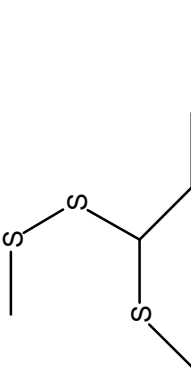
Ferthromonol

**Tabela 3.** Jedinjenja sa sumporom izolovana iz vrsta roda *Ferula*

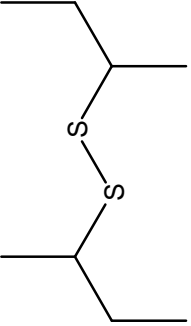
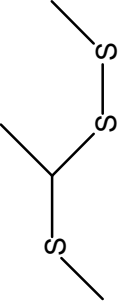
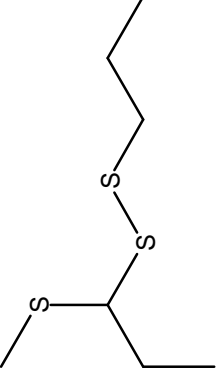
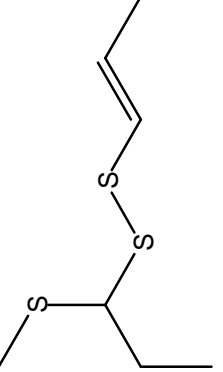
Jedinjenje	Biljna vrsta	Referenca
	<i>F. assa-foetida</i>	Kavoosi i Rowshan, 2013
	<i>F. gummosa</i>	Meshkatalasadat i sar., 2013
	<i>F. latisecta</i>	Sahebkar i sar., 2010
	<i>F. sinkiangensis</i>	Dai i Qiu, 1992
2-Butil-(E)-1-propenil-disulfid	<i>F. fukanensis</i>	Dai i Qiu, 1992
	<i>F. iliensis</i>	Sinitzin i sar., 1982
	<i>F. assa-foetida</i>	Kavoosi i Rowshan, 2013
	<i>F. latisecta</i>	Sahebkar i sar., 2010
	<i>F. sinkiangensis</i>	Dai i Qiu, 1992
	<i>F. iliensis</i>	Sinitzin i sar., 1982
2-Butil-(Z)-1-propenil-disulfid	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
2-Butil-3-(metiltio)-2-propenil-disulfid		

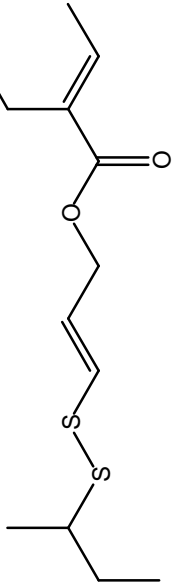
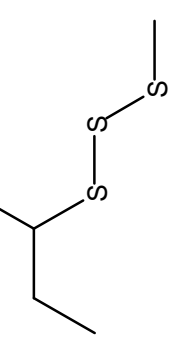
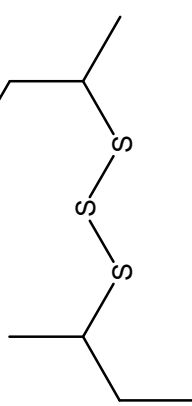
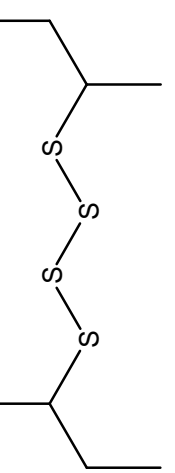
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
2-Metil-2-propanetiol		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
2,3-Dimetiltiiran		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
1-Metiltio-(Z)-1-propen		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
1-Metiltio-(E)-1-propen		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Dimetil-disulfid		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
S-Metilpropanetioat		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
2-Metiltiobutan		

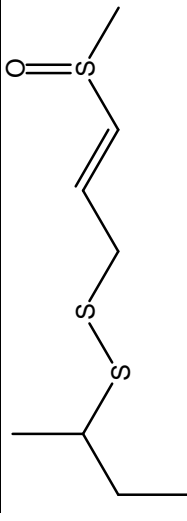
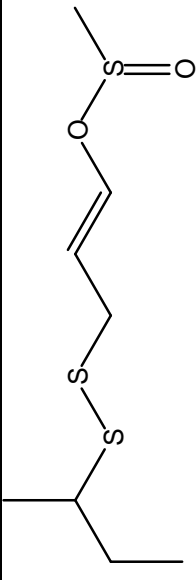
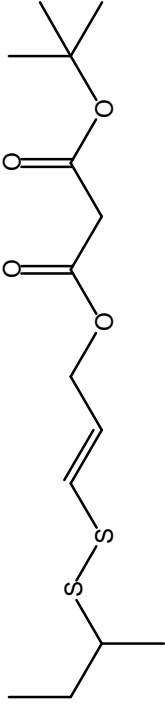
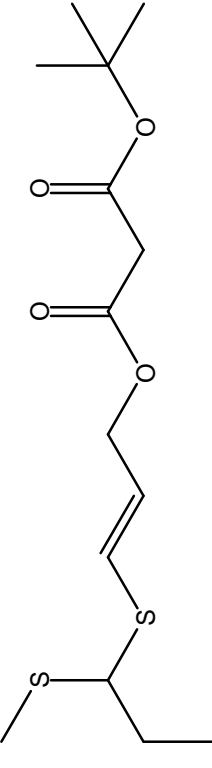
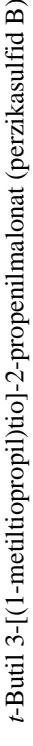
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
3,4-Dimetiltiofen		
2,3,4-Trimetiltiofen	<i>F. iliensis</i>	Dembitskii i sar., 1985
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Metil-(Z)-1-propenil-disulfid		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Metil-(E)-1-propenil-disulfid		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Dimetil-trisulfid	<i>F. persica</i>	Iranshahi i sar., 2006
	<i>F. fukanensis</i>	Wang, 2007
	<i>F. foetida</i>	Kanani i sar., 2011
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
2-Butilmetil-disulfid	<i>F. iliensis</i>	Sinitsin i sar., 1982

	<i>F. assa-foetida</i> <i>F. latisecta</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011 Sahebkar i sar., 2010
2-Butilvinil-disulfid	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Dipropil-disulfid	<i>F. assa-foetida</i> <i>F. songorica</i> <i>F. sinkiangensis</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011 Du i sar., 1989 Dai i Qiu, 1992
	<i>F. assa-foetida</i> <i>F. sinkiangensis</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011 Deng i sar., 2007
2-Butiletil-disulfid	<i>F. assa-foetida</i> <i>F. persica</i> var. <i>persica</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011 Iranshahi i sar., 2006
2-Butilpropil-disulfid	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Metil-1-(metiltio)propil-disulfid		


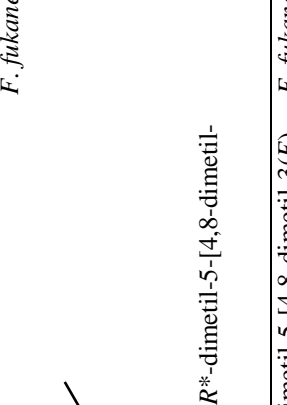
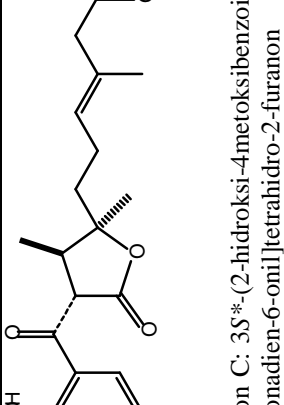



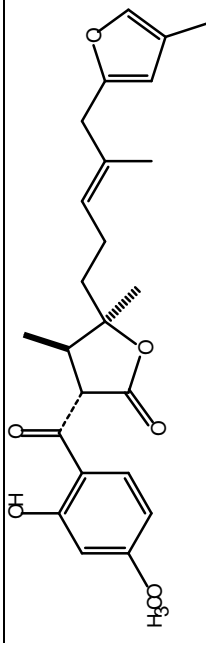
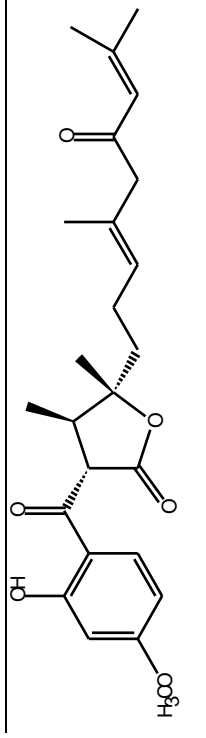
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Di-2-butyl-disulfid	<i>F. iliensis</i>	Sinitsin i sar., 1982
	<i>F. latisecta</i>	Iranshahi i sar., 2008c
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
Metil-1-(metiljo)etil-disulfid		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
1-(Metiljo)propil-disulfid		
	<i>F. assa-foetida</i>	Iranshahy i Iranshahi, 2011
1-(Metiljo)propil-1-propenil-disulfid		

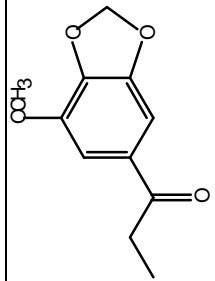
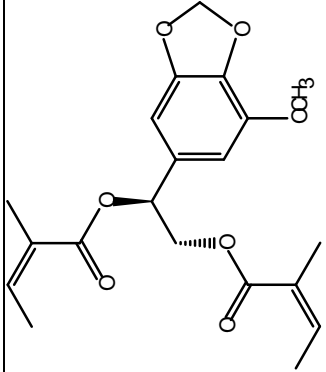
 <p>Chemical structure of 2-ethyl-2-butylsulfide, showing a central sulfur atom bonded to an ethyl group and a 2-butyl group.</p>	<p><i>F. assa-foetida</i></p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
<p>Asadisulfid</p>  <p>Chemical structure of Asadisulfid, showing a central sulfur-sulfur bond with a methyl group and an ethyl group attached to the second sulfur atom.</p>	<p><i>F. assa-foetida</i></p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
<p>2-Butilmetil-trisulfid</p>  <p>Chemical structure of 2-Butilmetil-trisulfid, showing a chain of three sulfur atoms with a methyl group and a 2-butyl group attached to the central sulfur atom.</p>	<p><i>F. assa-foetida</i></p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
<p>Di-2-butyl-trisulfid</p>  <p>Chemical structure of Di-2-butyl-trisulfid, showing a chain of three sulfur atoms with two 2-butyl groups attached to the central sulfur atom.</p>	<p><i>F. assa-foetida</i></p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
<p>Di-2-butyl-tetrasulfid Dimetil-tetrasulfid</p>	<p><i>F. persica</i> var. <i>persica</i></p> <p>Iranshahi i sar., 2006</p>

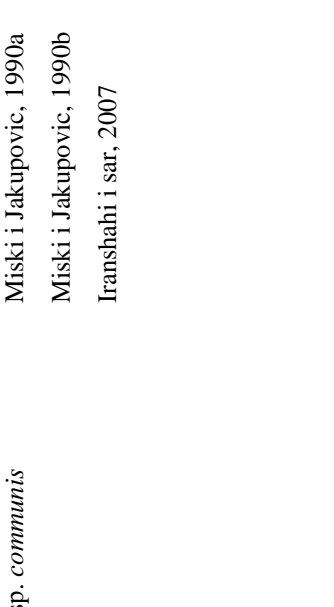
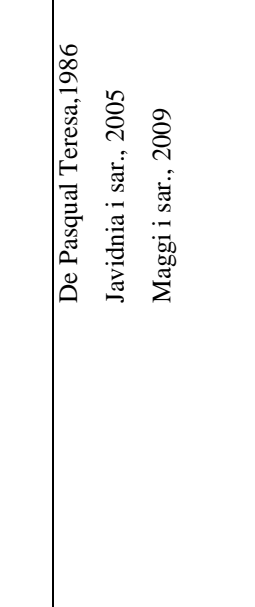
 <p>Fetisulfid A</p>	<p><i>F. assa-foetida</i> <i>F. foetida</i></p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011 Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
 <p>Fetisulfid B</p>	<p><i>F. assa-foetida</i> <i>F. foetida</i></p> <p><i>F. persica</i> Willd. var. <i>latisecta</i> D. F. Chamberlain</p> <p>Iranshahy i Iranshahi, 2011 Iranshahy i Iranshahi, 2011</p>
 <p><i>F. persica</i> Willd. var. <i>latisecta</i> D. F. Chamberlain</p>	<p><i>F. persica</i> Willd. var. <i>latisecta</i> D. F. Chamberlain</p> <p>Iranshahy i sar., 2003</p>
 <p><i>t</i>-Butil 3-[(1-metilpropil)tio]-2-propenilmalonat (perzikasulfid A)</p>	<p><i>F. persica</i> Willd. var. <i>latisecta</i> D. F. Chamberlain</p> <p>Iranshahy i sar., 2003</p>
 <p><i>t</i>-Butil 3-[(1-metilpropil)tio]-2-propenilmalonat (perzikasulfid B)</p>	

**Tabela 4.** Fenilpropani izolovani iz vrsta roda *Ferula*

Jedinjenje	Biljna vrsta	Referenca
 <p>Diverzivitatin</p>	<p><i>F. diversivittata</i></p>	<p>Iranshahi i sar., 2010c</p>
 <p>Fukanedon A: 3<i>S</i>*(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)-4<i>R</i>*,5<i>R</i>*-dimetil-5-[4,8-dimetil-3(<i>E</i>)-7-nonadien-1-il]tetrahidro-2-furanon</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p>	<p>Motai i Kitanaka, 2005b</p>
 <p>Fukanedon B: 3<i>S</i>*(2,4-dihidroksibenzoil)-4<i>R</i>*,5<i>S</i>*-dimetil-5-[4,8-dimetil-3(<i>E</i>)-7-nonadien-1-il]tetrahidro-2-furanon</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p>	<p>Motai i Kitanaka, 2005b</p>
 <p>Fukanedon C: 3<i>S</i>*(2-hidroksi-4-metoksibenzoil)-4<i>R</i>*,5<i>R</i>*-dimetil-5-[4,8-dimetil-3(<i>E</i>)-7-nonadien-6-onil]tetrahidro-2-furanon</p>	<p><i>F. fukanensis</i></p>	<p>Motai i Kitanaka, 2005b</p>

<p>Fukanedon D: 3<i>S</i>*(2-hidroksi-4-metoksibenzoi)-4<i>R</i>*,5<i>R</i>*-dimetil-5-[4,8-dimetil-3(<i>Z</i>)-7-nonadien-6-onil]tetrahidro-2-furanon</p>	<p>Motai i Kitanaka, 2005b</p>
<p></p> <p>F. <i>fukanensis</i></p>	<p>Motai i Kitanaka, 2005b</p>
<p>Fukanedon E: 3<i>S</i>*(2-hidroksi-4-metoksibenzoi)-4<i>R</i>*,5<i>R</i>*-dimetil-5-[4metil-5-(4-metil-2-furil)-3(<i>E</i>)-penten-1-il]tetrahidro-2-furanon</p>	<p>Su i sar., 2000</p>
<p></p> <p>F. <i>pallida</i></p>	<p>Su i sar., 2000</p>
<p>Palidon G</p>	<p>Palidon H</p>

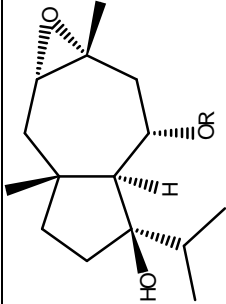
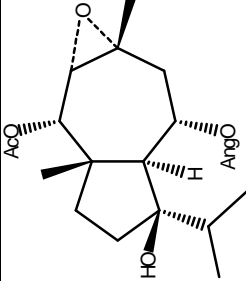
	<i>F. tunetana</i> Pom.	Jabrane i sar., 2010
	<i>F. tunshamica</i> Su	Zhu i sar., 1996
	<i>F. kirialovii</i>	Bukreeva, 1987
	<i>F. communis</i>	De Pasqual Teresa, 1986
	<i>F. sinaica</i>	Al Hazimi, 1986
	<i>F. caucasica</i>	Serkerov i sar., 1985
	<i>F. tingitana</i>	Miski i sar., 1985
	<i>F. equisetacea</i> Koso-Pol.	Kadyrov i sar., 1980
	<i>F. persica</i>	Bagirov i sar., 1977
	<i>F. rigidula</i>	Serkerov, 1975
	<i>F. ugamica</i> Korovin	Kadyrov i Nikonov, 1973
	<i>F. linkii</i>	Gonzalez i sar., 1993
	<i>F. communis</i>	Appendino i sar., 1990
	<i>F. tingitana</i>	Miski i Mabry, 1986a
	<i>F. loscosii</i>	Pinar i Fernandez, 1983
		
Latifolon (krokaton)		
Laserin		


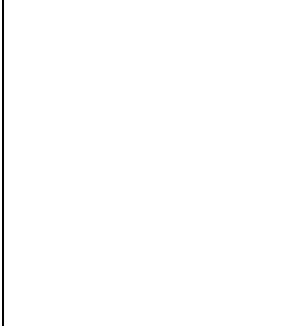
 <p>The structure of Epihelimantacin is a complex polyketide. It features a central benzene ring with a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 3-position and a furfuryl group at the 4-position. The 1-position of the benzene ring is substituted with a side chain containing a chiral center with a methyl group (wedge), a hydroxyl group (dash), and a methyl ester group (-COOCH<sub>3</sub>). This side chain is further substituted with a methyl group and a methyl ester group. The 2-position of the benzene ring is substituted with a side chain containing a methyl group and a methyl ester group.</p>	<p><i>F. communis</i> ssp. <i>communis</i>  <i>F. rigidula</i>  <i>F. szowitziana</i></p>	<p>Miski i Jakupovic, 1990a  Miski i Jakupovic, 1990b  Iranshahi i sar, 2007</p>
<p>Epihelimantacin</p>  <p>The structure of Elemicin is a substituted benzene ring. It has a methoxy group (-OCH<sub>3</sub>) at the 3-position and a furfuryl group at the 4-position. The 1-position of the benzene ring is substituted with a side chain containing a methyl group and a methyl ester group. The 2-position of the benzene ring is substituted with a side chain containing a methyl group and a methyl ester group.</p>	<p><i>F. communis</i>  <i>F. persica</i>  <i>F. glauca</i></p>	<p>De Pasqual Teresa, 1986  Javidnia i sar., 2005  Maggi i sar., 2009</p>
<p>Elemicin</p>		

**Tabela 5.** Seskviterpeni i seskviterpenski estri izolovani iz vrsta roda *Ferula*

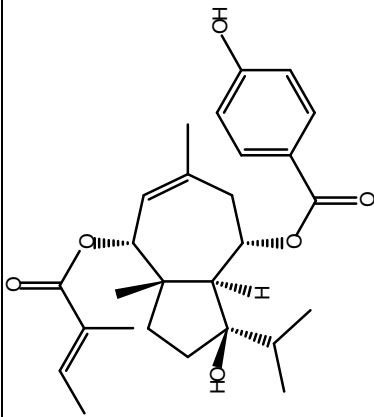
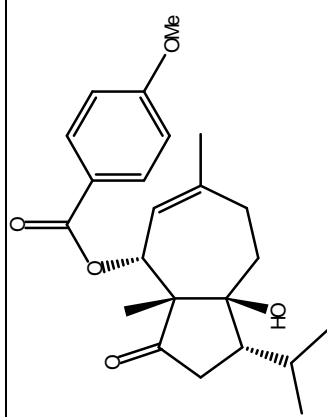
Jedinjenje	Biljna vrsta	Referenca
	<p>Ferutidin: <math>R_1=H, H; R_2=p\text{-Anis}; R_3=H</math></p> <p>2<math>\alpha</math>-Hidroksiferutidin: <math>R_1=\alpha\text{-OH}, \beta\text{-H}; R_2=p\text{-Anis}; R_3=H</math></p> <p>Ferutinon: <math>R_1=O, \beta\text{-H}; R_2=p\text{OHbz}; R_3=H</math></p> <p>2-Oksoferutidin: <math>R_1=O, \beta\text{-H}; R_2=p\text{-Anis}; R_3=H</math></p> <p>Ješkeanadiolveratrat: <math>R_1=H,H; R_2=Ver; R_3=H</math></p> <p>Tingitanol: <math>R_1=OH; R_2=Ang; R_3=OAn</math></p>	<p><i>F. arrigonii</i></p> <p><i>F. communis</i></p> <p><i>F. sinaica</i></p> <p><i>F. kuhistanica</i></p> <p><i>F. jaeschkeana</i></p> <p><i>F. linkii</i></p> <p><i>F. arrigonii</i></p> <p><i>F. jaeskeana</i></p> <p><i>F. arrigonii</i></p> <p><i>F. communis</i></p> <p><i>F. tingitana</i></p>
	<p>Appendino i sar., 1997</p> <p>Arnoldi i sar., 2004</p> <p>Tawaha i sar., 2001</p> <p>Chen i sar., 2000</p> <p>Khailova i sar., 1998</p> <p>Gonzalez i sar., 1993</p> <p>Appendino i sar., 1997</p> <p>Razdan i sar., 1989</p> <p>Appendino i sar., 1997</p> <p>Lammaouer i sar., 1987</p> <p>Miski i Marby, 1986a</p>	

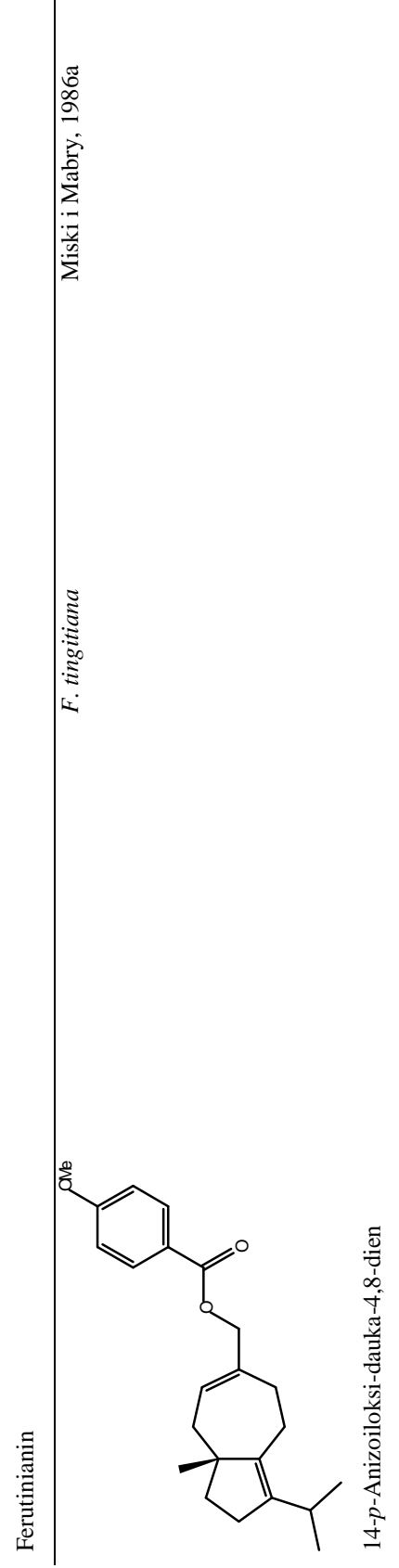
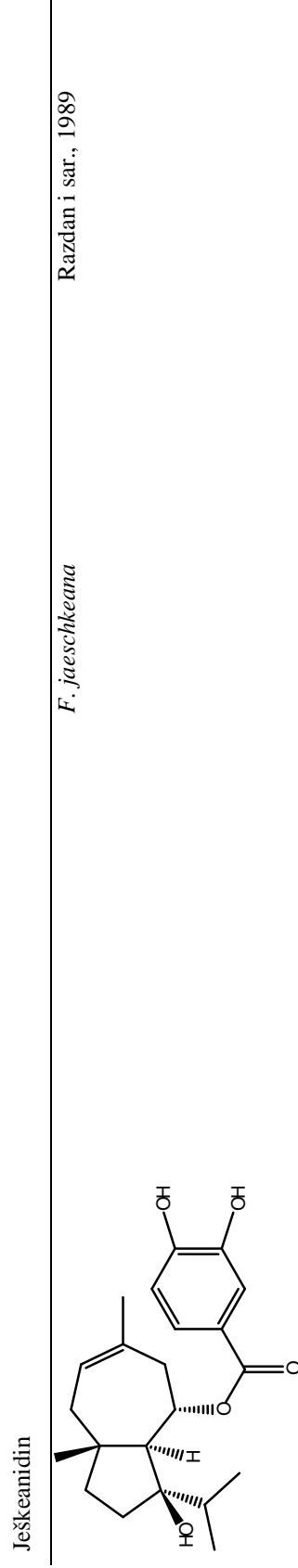
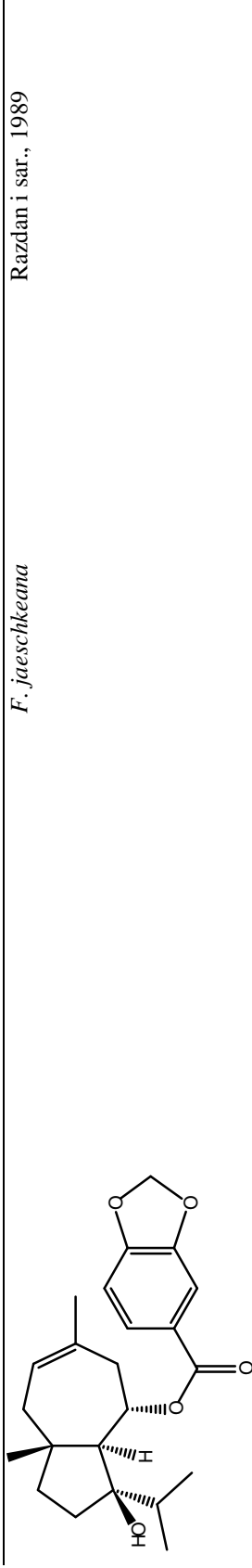


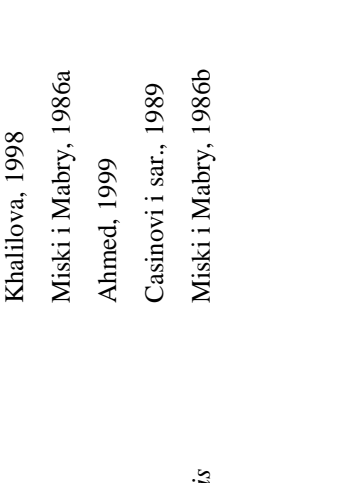
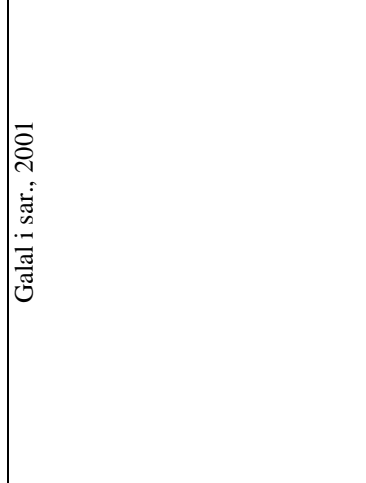
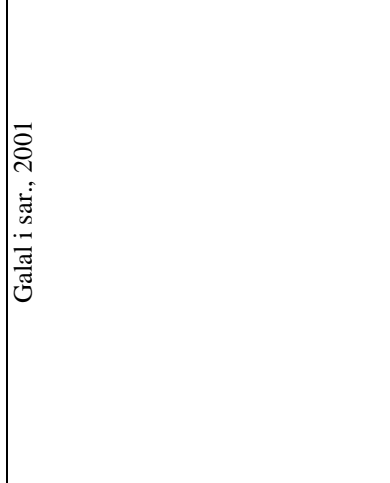
Acetiltingtanol:	$R_1=OAc; R_2=Ang; R_3=OAng$	<i>F. tingitiana</i>	Miski i Marby, 1986a
Dezoksodehidrolaserpicin:	$R_1=OAng; R_2=Ang; R_3=OH$	<i>F. tingitiana</i>	Miski i Marby, 1986a
Acetildezoksodehidrolaserpicin:	$R_1=OAng; R_2=Ang; R_3=OAc$	<i>F. tingitiana</i>	Miski i Marby, 1986a
4- $\beta$ -Hidroksi-6- $\alpha$ - <i>p</i> -hidroksibenzoiloksi-10- $\alpha$ -angeloiloksi-dauka-8-en: $R_2=pOHBz; R_3=OAng$	$R_1=H,H;$	<i>F. tingitiana</i>	Miski i Marby, 1986a
			
Epoksiješkeanadiol: R=H		<i>F. hermonis</i>	Galal i sar., 2001
Epoksiješkeanadiolbenzoat: R=Bz		<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
Epoksiješkeanadiol- <i>p</i> -hidroksibenzoat: R= <i>p</i> OHBz		<i>F. hermonis</i>	Ibarheim i sar., 2012
Epoksiješkeanadiolvanilat: R=Van		<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
			
Lapiferin		<i>F. arrigonii</i>	Appendino i sar., 1997
		<i>F. vesceritensis</i>	Gamal-Eldeen, 2010
		<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
		<i>F. lapidosa</i>	Zamarava i sar., 1999
		<i>F. latipinna</i> Santos	Gonzalez i sar., 1988
		<i>F. soongarica</i>	Golovina i sar., 1987
		<i>F. linkii</i>	Diaz i sar., 1984

 <p>Lapiferol</p>	<p><i>F. latipinna</i></p> <p>Gonzalez i sar., 1988</p>
 <p>Ferutinol (ješkeanadiol):</p>	<p><i>F. hermonis</i></p> <p><i>F. sinaica</i></p> <p><i>F. tatarica</i></p> <p><i>F. soongarica</i></p> <p><i>F. jaeschkeana</i></p> <p><i>F. hermonis</i></p> <p><i>F. ovina</i></p> <p><i>F. tenuisecta</i></p> <p><i>F. elaeochoytris</i></p> <p><i>F. communis</i></p>
<p>Ferutinol (ješkeanadiol):</p>	<p><math>R_1=OH; R_2=H</math></p> <p>Al-Ja'fari i sar., 2011</p> <p>Tawaha i sar., 2001</p> <p>Nazhimitdinova, 1995</p> <p>Golovina i sar., 1987</p> <p>Garg i sar., 1987</p>
<p>Ferutinin (ješkeanadiol-<i>p</i>-hidroksi benzoat):</p>	<p><math>R_1=pOHBz; R_2=H</math></p> <p>Lhullter i sar., 2005</p> <p>Iranshahi i sar., 2010d</p> <p>Saidkhodzhaev i sar., 1975</p> <p>Alkhatib i sar., 2008</p> <p>Arnoldi i sar., 2004</p>

	<i>F. kuhistanica</i>	Chen i sar., 2000
	<i>F. jaeschkeana</i>	Khalilova i sar., 1998
	<i>F. soongarica</i>	Nazhimitdinova, 1993
	<i>F. akitschkensis</i>	Sadikhodzhaev i sar., 1985
	<i>F. lancerottensis</i>	Fraga i sar., 1985
	<i>F. pallida</i>	Potapov i Nikonov, 1976
2-Acetoksiferutinini:	<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
Teferin:	<i>F. hermonis</i>	Geroushi i sar., 2011
	<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
	<i>F. kuhistanica</i>	Chen i sar., 2000
	<i>F. sinaica</i>	Ahmed, 1999
	<i>F. nuratavica</i> Pimenov	Kobilov i sar., 1995
	<i>F. tatarica</i>	Nazhimitdinova i sar., 1995
	<i>F. soongarica</i>	Nazhimitdinova i sar., 1993
	<i>F. jaeschkeana</i>	Garg i sar., 1987
	<i>F. elaeochytris</i>	Miski i sar., 1983
	<i>F. stylosa</i> Korovin	Bagirov i Aliev, 1981
	<i>F. tenuisecta</i>	Melitbaev i sar., 1980
	<i>F. pallida</i>	Potapov i Nikonov, 1976
<i>p</i> -Kumariloksijsškeanadiol:	<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
Akiferin:	<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
	<i>F. akitschkensis</i>	Kadyrov i sar., 1977
Teferidin (jsškeanadiolbenzoat):	<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
	<i>F. hermonis</i>	Al-Ja'fari i sar., 2013

<i>F. glauca</i>	Maggi i sar., 2009
<i>F. elaeochoytris</i>	Alkhatib i sar., 2008
<i>F. sinaica</i>	Tawaha i sar., 2001
<i>F. pallida</i>	Potapov i Nikonov, 1976
<i>F. tenuisecta</i>	Saidkhodzhaev i sar., 1976
<i>F. jaeschkeana</i>	Razdan i sar., 1989
<i>F. communis</i>	Arnoldi i sar., 2004
	
<i>F. communis</i>	Valle i sar., 1986
	
Fertidin	
Siolanizat	



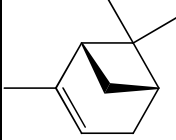
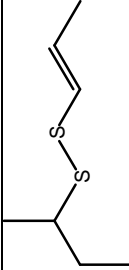
 <p>Ferkomin</p>	<p><i>F. jaeschkeana</i>  <i>F. tingitiana</i>  <i>F. sinaica</i>  <i>F. arrigonii</i>  <i>F. communis</i> ssp. <i>communis</i></p>	<p>Khalilova, 1998  Miski i Mabry, 1986a  Ahmed, 1999  Casinovi i sar., 1989  Miski i Mabry, 1986b</p>
	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Galal i sar., 2001</p>
<p>14-(4-Hidroksibenzoiloksi)-dauka-4,8-dien</p> 	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Galal i sar., 2001</p>
<p>14-(4'-Hidroksi, 3'metoksibenzoiloksi)-dauka-4,8-dien</p>		

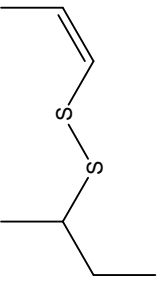
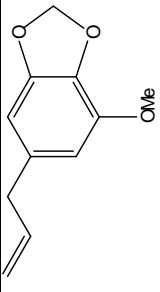
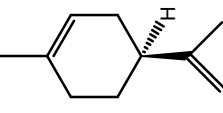
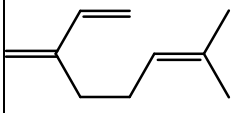
	<p>Feruhermonin B: R=Bz</p>	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Ibraheim i sar., 2012</p>
	<p>4β,8β-Dihidroksi-6α-p-hidroksibenzoil-dauka-9-en: R=pOHBz</p>	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Ibraheim i sar., 2012</p>
	<p>4β,8β-Dihidroksi-6α-(4' hidroksi,3' metoksibenzoil)-dauka-9-en: R=Van</p>	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Ibraheim i sar., 2012</p>
	<p>Feruhermonin D</p>	<p><i>F. hermonis</i></p>	<p>Ibraheim i sar., 2012</p>
	<p>Lancerodiol: R<sub>1</sub>=O; R<sub>2</sub>=H</p>	<p><i>F. nuratavica</i> <i>F. lancerottensis</i></p>	<p>Kobilov i sar., 1995 Fraga i sar., 1985</p>

Feruhhermonin A: R <sub>1</sub> =O; R <sub>2</sub> =Bz	<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
Lancerodiol- <i>p</i> -hidroksibenzoat: R <sub>1</sub> =O; R <sub>2</sub> = <i>p</i> OHBz	<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
Lancerodiol- <i>p</i> -metoksibenzoat: R <sub>1</sub> =O; R <sub>2</sub> = <i>p</i> OMeBz	<i>F. lancerottensis</i>	Fraga i sar., 1985
Lancerdiolvamilat: R <sub>1</sub> =O; R <sub>2</sub> =Van	<i>F. lancerottensis</i>	Fraga i sar., 1985
Lancerotriolbenzoat: R <sub>1</sub> = $\alpha$ OH, $\beta$ H; R <sub>2</sub> =Bz	<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
Lancerotriol- <i>p</i> -hidroksibenzoat: R <sub>1</sub> = $\alpha$ OH, $\beta$ H; R <sub>2</sub> = <i>p</i> OHBz	<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012
Lancerotriolvamilat: R <sub>1</sub> = $\alpha$ OH, $\beta$ H; R <sub>2</sub> =Van	<i>F. lancerottensis</i>	Fraga i sar., 1985
	<i>F. hermonis</i>	Ibraheim i sar., 2012



**Tabela 6.** Pregled najzastupljenijih komponenata u etarskim uljima podzemnih organa vrsta roda *Ferula*

Jedinjenje	Biljna vrsta	Udeo u etarskom ulju (%)	Referenca
 $\alpha$ -Pinen	<i>F. hermonis</i>	43,3	Al-Ja'fari i sar., 2011
	<i>F. glauca</i>	24,2	Maggi i sar., 2009
	<i>F. jaeschkeana</i>	9,5	Kapahi i sar., 1985
	<i>F. ovina</i>	13,8	Karim i Bhatta, 1978
	<i>F. penninervis</i>	80,2	Goryaev i sar., 1971
	<i>F. pseudooreoselinum</i>	$\approx$ 90	Tsoukervanik i sar., 1935
	<i>F. gummosa</i>	2,8	Sahebkar i Iranshahi, 2011
	<i>F. galbaniflua</i>	58,8	Rustaiyan i sar., 2002
	<i>F. glauca</i>	14,7	Maggi i sar., 2009
	<i>F. jaeschkeana</i>	5,2	Kapahi i sar., 1985
$\beta$ -Pinen	<i>F. latisecta</i>	6,2	Sahebkar i sar., 2010
	<i>F. assa-foetida</i>	do 30,7	Mirzaei i Hasanloo, 2009
	<i>F. iliensis</i>	42,0	Simitsin i sar., 1982
 2-Butil-( <i>E</i> )-1-propenil-disulfid			

	<i>F. latisecta</i>	50,5	Sahebkar i sar., 2010
	<i>F. assa-foetida</i>	do 12,4	Mirzaei i Hasanloo, 2009
	<i>F. iliensis</i>	20,0	Sinitsin i sar., 1982
2-Butil-(Z)-1-propenil-disulfid			
	<i>F. glauca</i>	7,4	Maggi i sar., 2009
	<i>F. persica</i> var. <i>persica</i>	8,9	Iranshahi i sar., 2006
	<i>F. oopoda</i> Boiss.	11,2	Karim i sar., 1979
Miristicin			
	<i>F. jaeschkeana</i>	26,0	Garg i sar., 1989
	<i>F. ovina</i>	14,2	Karim i Bhaty, 1978
	<i>F. feruloides</i>	2,8	Sahebkar i Iranshahi, 2011
	<i>F. oopoda</i>	2,1	Karim i sar., 1979
(-)-Limonen			
	<i>F. ovina</i>	10,0	Karim i Bhaty, 1978
	<i>F. gummosa</i>	3,7	Sahebkar i Iranshahi, 2011
Mircen			

### 3. Tradicionalna upotreba vrsta roda *Ferula*

Različite vrste roda *Ferula* primenjuju se u tradicionalnoj medicini, ali i svakodnevno u ishrani, pre svega u azijskim zemljama. Najvažniji primer svakako predstavlja *F. assa-foetida*. Zasecanjem podzemnih organa ove, ali i nekih drugih vrsta, dobija se oleogumirezina asafetida. U ajurvedskoj medicini, primena ove oleogumirezine preporučuje se u terapiji gastrointestinalnih tegoba. U Indiji, asafetida se tradicionalno primenjuje kao antibakterijski agens, spazmolitik, diuretik i laksativ. Vodeni ekstrakt ove oleogumirezine se koristi i kao antihelmintik. U iranskoj narodnoj medicini upotrebljava se takođe kao spazmolitik, antihelmintik, karminativ, i kao laksativ kod starijih osoba. U SAD se primenjuje oralno kao antihelmintik i spazmolitik, a u Kini za terapiju infekcija crevnim parazitima. Asafetida se u ajurvedskoj medicini i Avganistanu primenjuje i kao veoma značajan agens u terapiji histerije. Narod Nepala je koristi svakodnevno u ishrani kao začim koji poseduje sedativno i diuretično delovanje. U iranskoj tradicionalnoj medicini asafetida se koristi kao antikonvulzivno sredstvo, u Maroku kao antiepileptik, dok u SAD smatraju da deluje stimulatивно na mozak i nerve. Možda je ipak najvažnija tradicionalna primena asafetide u terapiji astme. U ajurvedskoj medicini, ali i Saudijskoj Arabiji, preporučuje se u terapiji velikog kašlja, pneumonije i bronhitisa kod dece. Takođe, u iranskoj narodnoj medicini asafetida se primenjuje u terapiji astme, dok se u Avganistanu i na Fidžiju koristi u terapiji velikog kašlja. U ajurvedskoj medicini, kao i tradicionalnoj medicini različitih zemalja (npr. SAD i Brazil), asafetidi se pripisuju i afrodisijalna svojstva. Nasuprot tome, njeno konzumiranje je najstrože zabranjeno u koreanskom Budizmu. Može se zaključiti da se asafetida u tradicionalnoj medicini različitih naroda koristi najčešće u terapiji astme, bronhitisa i velikog kašlja (kao ekspektorans), kao i gastrointestinalnih poremećaja kao spazmolitik, antiflatulens i antihelmintik (Iranshahy i Iranshahi, 2011). U homeopatiji asafetida se koristi za terapiju hipoaciditeta, flatulencije, nadimanja i dijareje.

I oleorezine nekih drugih predstavnika roda *Ferula* primenjuju se u tradicionalnoj medicini, pre svega naroda u Aziji. Oleogumirezina vrste *F. gummosa*, koja naseljava centralnu Aziju, tradicionalno se koristi kao antidijariok, za ublažavanje bolova u stomaku, u terapiji horeje, epilepsije i za brže zarastanje rana (Sadraei i sar., 2001; Sayyah i sar., 2002).

Za vrstu *F. hermonis*, koja samoniklo raste u Libanu i Siriji, smatra se da poseduje snažno afrodizijačno delovanje i na tržištu Libana, Sirije i Jordana mogu se naći biljni proizvodi na bazi ove vrste koji se popularno nazivaju „libanska vijagra“. Danas se čak i u SAD mogu naći dijetetski suplementi koji sadrže *F. hermonis* i koji se preporučuju za poboljšanje seksualne aktivnosti (Hadidi i sar, 2003).

Podzemni organi vrste *F. persica* tradicionalno se koriste u terapiji dijabetesa (Iranshahi i sar., 2006; Iranshahi i sar., 2008b).

Vrsta *F. sinkiangensis*, koja raste uglavnom u Kini, tradicionalno se upotrebljava u terapiji inflamatornih stanja, alergije i stomačnih problema (Teng i sar., 2013), dok se *F. szowitsiana* u tradicionalnoj medicini naroda Irana, Turske i Avganistana koristi kao antihelmintik i antiseptik (Paydar i sar., 2013).

*Ferula fukanensis*, još jedna vrsta koja naseljava centralnu Aziju, tradicionalno se koristi u terapiji reumatoidnog artritisa i bronhitisa (Motai i sar., 2013).

U terapiji artritisa kroz istoriju koristila se i vrsta *F. ferulaeoides*. Pored toga, ova vrsta je primenjivana i kao spazmolitik i uopšte u terapiji poremećaja digestivnog trakta (Meng i sar., 2013).

Podzemni organi vrste *F. varia* Trautv. se u Uzbekistanu tradicionalno koriste u terapiji stanja povezanih za groznicom, kao antiparazitik i za ispiranje usta (Suzuki i sar, 2007).

*Ferula narthex*, koja uglavnom naseljava Pakistan, tradicionalno se upotrebljava za ublažavanje kašlja, u terapiji astme, zubobolje, opstipacije, želudačnih tegoba i angine pectoris (Bashir i sar., 2013).

#### 4. Farmakološka aktivnost vrsta roda *Ferula*

Farmakološka aktivnost izolata vrsta roda *Ferula* intenzivno je ispitivana u poslednjih dvadesetak godina. Najintenzivnije je ispitivana vrsta *F. assa-foetida* koja je, kao što je već napomenuto, najčešće korišćena u tradicionalnoj medicini različitih naroda. Dosadašnja farmakološka ispitivanja asafetide pokazala su da ova oleogumirezina deluje antioksidantno, antivirusno, antifungalno, hemopreventivno, antidijabetično, spazmolitično, hipotenzivno i moluscidno (Iranshahy i Iranshahi, 2011). Rezultati dosadašnjih farmakoloških ispitivanja asafetide dati su u Tabeli 7.

Za izolate vrste *F. szowtsiana* pokazano je da ostvaruju brojna farmakološka delovanja. Metanolni ekstrakt ove vrste je dozno-zavisno inhibirao proliferaciju ćelijske linije humanog karcinoma pluća A549. Dalje ispitivanje uticaja ovog ekstrakta na ekspresiju gena uključenih u proces apoptoze (Bcl-2, Bcl-xL, Bax i p53), potvrdila su značajan citotoksičan efekat.

Metanolni ekstrakt je takođe pokazao značajan antiradikalni efekat u DPPH testu koji je bio uporediv sa efektom rutina. Acetonski ekstrakt korena ove vrste ostvario je takođe i značajnu antilaišmanijoznu aktivnost prema promastigotnom obliku *Leishmania major* (Paydar i sar., 2013).

Hloroformski ekstrakt korena vrste *F. persica* pokazao je značajnu antimikrobnu aktivnost. Inhibicija rasta standardnih sojeva bakterija ispitivana je disk difuzionom metodom, a ekstrakt je ostvario najbolju aktivnost u najvećoj testiranoj koncentraciji (4 mg/disku) (Shahverdi i sar., 2005).

Vodeni ekstrakt herbe ove vrste ostvario je značajan *in vivo* hipotenzivni efekat na pacovima kod kojih je hipertenzija izazivana Goldblatt-ovom metodom. Rezultati eksperimenata takođe ukazuju na činjenicu da ekstrakt ostvaruje ovaj efekat makar delimično interakcijom sa M receptorima i oslobađanjem NO (Ghanbari i sar., 2012a). Dalja ispitivanja su pokazala da vodeni ekstrakt herbe ove vrste ostvaruje isti efekat i prema normotenzivnim pacovima (Ghanbari i sar., 2012b)

Nepolarni ekstrakti (hloroformski i heksanski) herbe iste vrste ostvarili su značajan *in vitro* citotoksičan efekat prema nekoliko malignih ćelijskih linija (MCF7, HepG2, HT29, A549), ali i prema zdravoj ćelijskoj liniji bubrega goveda (Hajimehdipoor i sar., 2012).

Vrsta *F. gummosa* primenjivala se u medicinske svrhe još od antičkih vremena i danas predstavlja jedan od najproučavanijih predstavnika ovog roda. Različiti izolati ove vrste su u nekoliko studija pokazali značajno antimikrobno delovanje. Etarsko ulje oleogumirezine inhibiralo je rast bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, pri čemu su Gram (+) sojevi bili osetljiviji od Gram (-) (Abedi i sar., 2008). Etarsko ulje ploda ostvarilo je sličan efekat inhibirajući rast pre svega Gram (+) bakterija, ali i *E. coli* (Eftekhar i sar., 2004). Za etarska ulja ove vrste takođe je pokazano da ostvaruju i značajnu antifungalnu aktivnost (Jahansooz i sar., 2008).

Za izolate ove vrste pokazano je da ostvaruju i antikonvulzivnu aktivnost. Acetonski ekstrakt ploda ostvario je protektivni efekat prema konvulzijama izazvanim elektrošokovima, a naročito prema konvulzijama izazvanim pentilentetrazolom, dok je acetonski ekstrakt korena uticao samo na konvulzije izazvane pentilentetrazolom. Etarsko ulje ploda je, slično acetonskom ekstraktu korena, protektivni efekat ostvarilo samo prema konvulzijama izazvanim pentilentetrazolom, ali je doza kojom je ostvaren ovaj efekat bila gotovo jednaka LD<sub>50</sub> (Sayyah i sar., 2001; Sayyah i sar., 2002; Sayyah i Mandgary, 2003).

Ispitivanja vodeno-etanolnog ekstrakta korena pokazala su da ovaj ekstrakt ostvaruje blagu antioksidantnu aktivnost koja se pre svega ogleda u nešto slabijoj antiradikalnoj aktivnosti (anti-DPPH, anti-NO) i nešto boljoj sposobnosti heliranja Fe<sup>2+</sup> jona. Ovaj ekstrakt je pokazao i dozno-zavisan antihemolitički efekat (Ebrahimzadeh i sar., 2011). Koristeći iste eksperimentalne modele, ova grupa autora ispitala je i antioksidantni potencijal vodeno-etanolnih ekstrakata stabljika, listova i cvetova. Ovi ekstrakti su ostvarili bolje efekte u poređenju sa ekstraktom podzemnih organa, a najjači antioksidantni potencijal ostvario je ekstrakt listova. Sva tri ekstrakta su pokazala i antihemolitički efekat (Nabavi i sar., 2010).

Velika studija ispitivanja citotoksičnog potencijala 264 vrsta upotrebljvanih u tradicionalnoj kineskoj i egipatskoj medicini iz 2010. god. svrstala je etanolni ekstrakt

galbanuma, oelogumirezine dobijene zasecanjem stabljika *F. gummosa* i *F. galbaniflua* Boiss. & Buhse, u kategoriju ekstrakata sa najsnažnijom citotoksičnom aktivnošću na ćelijskoj liniji neuroblastoma miševa ( $IC_{50}=78 \mu\text{g/ml}$ ) (Mazzio i Soliman, 2010). Etanolni ekstrakti cvetova i listova ove vrste ostvarili su antiproliferativni efekat prema ćelijskoj liniji humanog kancera želuca (AGS). Dalja ispitivanja pokazala su da ova dva ekstrakta pritom indukuju i rane i kasne procese apoptoze na ovoj ćelijskoj liniji (Gharaei i sar., 2013).

Etarsko ulje, kao i vodeno-alkoholni, etarski, benzinski i metanolni ekstrakt oelogumirezine *F. gummosa*, relaksirali su dozno-zavisno kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM) i ACh. Najsnažnije delovanje je ostvario etarski ekstrakt, a nešto slabiju aktivnost ostvarili su benzinski, metanolni, vodeno-etanolni ekstrakt i etarsko ulje, navedenim redom (Sadraei i sar., 2001).

Metanolno-hloroformski ekstrakt herbe ublažio je simptome apstinencijalnog sindroma izazvanog naloksonom (Ramezani i sar., 2001). Takođe je pokazano da etanolni ekstrakt korena ima osteoprotektivni efekat (Mahmoudi i sar., 2013).

Etanolni ekstrakt korena vrste *F. sinaica* Boiss. relaksirao je spontane kontrakcije uterusa pacova i zamoraca, kao i kontrakcije izazvane oksitocinom. Ovaj ekstrakt je takođe relaksirao kontrakcije glatkih mišića digestivnog trakta, aorte i traheje zečeva i zamoraca. Ekstrakt je ostvario spazmolitičko delovanje prema spontanim kontrakcijama ileuma zamoraca i jejunuma zečeva, kao i prema kontrakcijama izazvanim ACh. Relaksantni efekat je uočen i prema kontrakcijama traheje zečeva izazvanim ACh i histaminom, kao i prema kontrakcijama glatkih mišića aorte zečeva izazvanim norepinefrinom. Ostvareni spazmolitički efekti bili su dozno-zavisni i reverzibilni (Aqel i sar., 1991a; Aqel i sar., 1991b).

Metanolni ekstrakt korena vrste *F. narthex* pokazao je dozno-zavisan *in vivo* analgetski efekat, pri čemu je u dozi od 100 i 200 mg/kg ovaj efekat imao statistički značaj. Ekstrakt je takođe inhibirao motilitet digestivnog trakta miševa *in vivo* (Bashir i sar., 2013). Polarni i nepolarni ekstrakt oelogumirezine *F. foetida* ostvarili su u istom eksperimentu nefroprotektivan efekat na pacovima u modelu nefrotoksičnosti izazvane gentamicinom (Javaid i sar., 2012).

Etilacetatni i *n*-butanolni ekstrakt cvetova *F. lutea* (Poir.) Maire pokazali su antioksidantnu, antiholinesteraznu, antidijabetičnu, antimikrobnu i citostatsku aktivnost, a za ove ekstrakte je pokazano da poseduju i alelopatski potencijal (Znati i sar., 2014).



**Tabela 7.** Rezultati dosadašnjih farmakoloških/bioloških ispitivanja asafetide

<b>Aktivnost</b>	<b>Izolat/način aplikovanja</b>	<b>Koncentracije/doze</b>	<b>Biološki sistem</b>	<b>Rezultati</b>
Antidijabetična	Infuz oleogumirezine ( <i>i.p.</i> )	0,2 g/kg, 14 dana	Aloksanom izazvan dijabetes kod pacova ( <i>in vivo</i> ).	Povećanje telesne mase i nivoa insulina uz smanjenje nivoa glukoze.
Kontraceptivna	Metanolni ekstrakt ( <i>p.o.</i> )	400 mg/kg	Sprague-Dawley pacovi ( <i>in vivo</i> ).	Prevenција začeca (80%).
Antifungalna	Oleogumirezina	0,1, 1,2 i 0,5% na krompir-dekstroza agaru	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Inhibicija rasta za 24% u svim testiranim koncentracijama.
Spazmolitička	Vodeni ekstrakt oleogumirezine	1, 2, 3, 5 i 7 mg/ml	Izolovani ileum zamoraca ( <i>in vitro</i> ).	Dozno-zavisna spazmolitička aktivnost je ostvarena prema spontanim kontrakcijama.
Spazmolitička	Vodeni ekstrakt oleogumirezine	3 mg/ml	Izolovani ileum zamoraca ( <i>in vitro</i> ).	Relaksantno delovanje prema kontrakcijama izazvanim KCl (28 mM), ACh i histaminom. Efekat prema kontrakcijama izazvanim KCl izostaje u prisustvu indometacina, atropina, propranolola i hlorfeniramina.

Antitumorska <sup>1</sup>	Vodeni ekstrakt ( <i>p.o.</i> )	50 mg/životinji, 5 dana	Inbredni soj Swiss- albino miševa ( <i>in vivo</i> ).	Produženje životnog veka (53%).
Antivirusna <sup>1</sup>	Oleogumirezina	0,75-25 µg/ml	HeLa ćelijska linija inficirana rinovirusom ( <i>in vitro</i> ).	Inhibicija citopatološkog efekta HRV-2 virusa (IC <sub>50</sub> =10,98 µg/ml).
Antiulkusna <sup>1</sup>	Koloidni rastvor oleogumirezine ( <i>p.o.</i> )	50 mg/kg	Pacov ( <i>in vivo</i> ).	Statistički značajan gastroprotektivni efekat
Hemopreventivno <sup>1</sup>	Acetonski ekstrakt oleogumirezine (topikalno)	Pretretman životinja 300, 400 i 500 µg/ 0,2 ml/asafetide	Miševi muškog pola ( <i>in vivo</i> ).	Značajno povećanje nivoa kutanih antioksidanasa i značajno smanjenje kutanih oksidativnih parametara.
Hemopreventivno <sup>1</sup>	Oleogumirezina ( <i>p.o.</i> )	1,25 i 5% u peletima hrane	Sprague-Dawley pacovi ženskog roda ( <i>in vivo</i> ).	Povećanje latence (prve pojave tumora), i smanjenje volumena tumora i srednjeg broja tumora/životinji.
Inhibicija digestivnih enzima <sup>1</sup>	Oleogumirezina ( <i>p.o.</i> )	250 mg, 8 nedelja	Pacovi ( <i>in vivo</i> ).	Smanjenje nivoa fosfataze i saharaze i povećanje aktivnosti pankreasne lipaze i himotripsina.
Hipotenzivna <sup>1</sup>	Vodeni ekstrakt oleogumirezine.	0,3-2,2 mg/100 g u 0,4 ml	Anestezirani pacovi ( <i>in vivo</i> ).	Dozno-zavisno smanjenje krvnog pritiska.

Moluscidna <sup>1</sup>		70, 90, 120 i 170 mg/l u različitim vremenskim intervalima (14, 48, 72 i 96 h).	Puževi ( <i>in vivo</i> ).	Najbolju moluscidnu aktivnost pokazao je etanolni ekstrakt.
Mutagena <sup>1</sup>	Oleogumirezina	200 mg/ml na agar pločama	<i>Salmonella typhimurium</i>	Aktivnost prema <i>S. typhimurium</i> TA 1537, a ne i prema <i>S. typhimurium</i> TA 1538 i TA 98.
Antinociceptivna <sup>2</sup>	Vodeni ekstrakt oleogumirezine.	25, 50 i 100 mg/kg ( <i>i.p.</i> )	Albino miševi.	Statistički značajan antinociceptivni efekat u modelima hroničnog i akutnog bola.
Inhibicija acetilholinesteraze <sup>3</sup>	Vodeno-metanolni ekstrakt oleogumirezine	100 µg/ml	Spektrofotometrijsko određivanje brzine inhibicije enzima.	Umerena aktivnost (IC <sub>50</sub> =281,3±5,23 µg/ml)
Antikonvulzivno <sup>4</sup>	Vodeno-alkoholni ekstrakt oleogumirezine	25, 50 i 100 mg/kg	Albino miševi.	Ekstrakt je dozno-zavisno smanjio dužinu i trajanje napada izazvanih pentilentetrazolom.

Antimikrobno <sup>5</sup>	Etarsko ulje oleogumirezine prikupljene u tri različita vremenska perioda.	0,0 – 0,3 mg/ml	<i>Salmonella typhi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus niger</i> i <i>Candida albicans</i> .	Značajna aktivnost prema testiranim mikroorganizmima.
Antioksidantno <sup>5</sup>	Etarsko ulje oleogumirezine prikupljene u tri različita vremenska perioda	0,0 – 0,3 mg/ml	Ukupni flavonoidi, ukupni polifenoli, antiradikalna aktivnost prema ABTS, NO, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> i TBARS radikalima.	Dozno-zavisna aktivnost u svim testovima.
Anksiolitično <sup>6</sup>	Vodeni ekstrakt ologumirezine	250 i 500 mg/kg ( <i>p.o.</i> )	Swiss albino miševi.	Dozno-zavisni anksiolitički i analgetski efekat. Ekstrakt je takođe ostvario i blag sedativni efekat.

<sup>1</sup> – Iranshahy i Iranshahi, 2011; <sup>2</sup> – Bagheri i sar., 2014; <sup>3</sup> – Jazayeri i sar., 2014; <sup>4</sup> – Kiasalari i sar., 2013; <sup>5</sup> – Kavooosi i Rowshan, 2013; <sup>6</sup> – Alqasumi, 201

**CILJ**

Cilj ove doktorske disertacije je hemijska i farmakološka karakterizacija podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*. Mnogi predstavnici vrsta roda *Ferula* su intenzivno ispitivani u poslednjih tridesetak godina u pogledu hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti i rezultati ovih istraživanja ukazuju na veliki potencijalni značaj koji bi predstavnici ovog roda, kao i njihovi sekundarni metaboliti mogli imati u medicini i farmaciji. Srpska velestika do sada nije ispitivana, niti postoje podaci o njenoj primeni u narodnoj medicini.

Hemijska karakterizacija podzemnih organa *F. heuffelii* obuhvatiće ispitivanje prisustva sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju u nepolarnom i polarnom ekstraktu, njihovo izolovanje i određivanje sadržaja, kao i izolovanje etarskog ulja i hemijsku analizu njegovog sastava.

Farmakološka karakterizacija izolata (etarskog ulja, ekstrakata i/ili izolovanih sekundarnih metabolita) obuhvatiće ispitivanje antioksidantne, spazmolitičke, antiinflamatorne, gastroprotektivne, antimikrobne i/ili citotoksične aktivnosti.

# **MATERIJAL I METODE**

## 1. Biljni materijal

U okviru ove doktorske disertacije ispitivani su podzemni organi (rizom i koren) srpske velestike, *Ferula heuffelii*. Lokaliteti u Republici Srbiji, vreme sakupljanja biljnog materijala, kao i herbarski podaci, dati su u Tabeli 8. Biljni materijal je identifikovao viši naučni saradnik dr sc. Marjan Niketić, kustos Prirodnjačkog muzeja u Beogradu, a herbarski primerci deponovani su u Herbarijumu Prirodnjačkog muzeja u Beogradu (BEO).

Sakupljen biljni materijal osušen je na senovitom, dobro provetrenom mestu, na sobnoj temperaturi. Materijal je nakon toga čuvan u papirnim kesama na sobnoj temperaturi do momenta ekstrakcije, odnosno destilacije vodenom parom.

**Tabela 8:** Lokaliteti u Republici Srbiji i vreme prikupljanja podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*

Lokalitet i vreme prikupljanja	Kolektorski broj (BEO)
Brdo Oblik, Sićevačka klisura, maj 2007. god.	ko20070502 BEO
Gvozdena kapija, Đerdapska klisura, april 2008. god.	ko20080403/1 BEO
Debeli lug, klisura Peka, april 2010. god.	ko20100404/5 BEO

## 2. Aparatura

GC-FID analiza etarskih ulja urađena je na gasnom hromatografu SRI 8610C opremljenom FID detektorom, *split/splitless* injektorom (split ratio 1:20; zapremina injektovanja 1  $\mu$ l) i kapilarnom kolonom DB-5 (30 m  $\times$  0,32 mm; debljina filma 0,25  $\mu$ m), a kao noseći gas korišćen je helijum (He). Temperature injektora i detektora iznosile su 280 °C.

GC-MS analiza etarskih ulja sprovedena je na gasnom hromatografu Hewlett Packard 6890 sa MS detektorom Hewlett Packard 5973, *split/splitless* injektorom (split ratio 1:10) i kapilarnom kolonom HP-5MS (30 m  $\times$  0,25 mm; debljina filma 0,25  $\mu$ m).



Helijum (He) je korišćen kao noseći gas, a temperaturni program je bio identičan programu korišćenom za GC-FID analizu.

HPLC analiza hloroformskog i metanolnog ekstrakta izvršena je na uređaju Aglient 1100 sa DAD detektorom, uz upotrebu Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub> kolone (250 × 4,6 mm; veličina čestica 5 μm).

Semipreparativna HPLC analiza izvedena je na uređaju Aglient 1100 sa DAD detektorom, uz upotrebu Zorbax Eclipse XDB C<sub>18</sub> kolone (9,4 × 250 mm; veličina čestica 5 μm).

Hromatografija na koloni urađena je na stubu silikagela 60 (0,063 – 0,200 mm) (Merck, Nemačka).

Hromatografija na tankom sloju silikagela izvedena je na silikagel TLC pločama 60 F<sub>254</sub> (Merck, Nemačka).

Jednodimenzionalni (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR) i dvodimenzionalni NMR spektri (COSY i HMBC) snimljeni su korišćenjem magneta od 400 MHz na uređaju Avance (Bruker). Uzorci su rastvarani u deuterohloroformu (CDCl<sub>3</sub>). Kao interni standard korišćen je tetrametilsilan.

Maseni spektri i precizna masa (MS) snimani su na Waters (Miliford, MA) SYNAPT hibridnom kvadrupol/TOF (*time-of-flight*) masenom spektrometru. Uzorci su analizirani pri pozitivnom modu elektrosprej jonizacije, ESI<sup>+</sup> (eng. *positive ion electrospray mode*). Podaci su dobijeni pri rezoluciji od 10000 Da uz korišćenje leucinenkefalina kao standarda i analizirani u MassLynx kompjuterskom softveru (Waters, Miliford, MA).

Spektrofotometrijsko određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti, ukupnih polifenola i sposobnosti neutralizacije DPPH radikala vršeno je na spektrofotometru SPECOL 11 (Carl Zeiss, Jena, Nemačka), dok je spektrofotometrijsko određivanje sposobnosti neutralizacije ·OH radikala vršeno na spektrofotometru Evolution 300 (Thermo Scientific, SAD).

Za *in vitro* ispitivanje spazmolitičke aktivnosti izolata na izolovanom ileumu pacova, korišćen je izotonični davač sile (TSZ-04-E, Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska). Efekti ispitivanih izolata na kontrakcije ileuma snimani su i analizirani korišćenjem kompjuterskog softvera SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska).

Za *in vitro* ispitivanje spazmolitičke aktivnosti izolata na izolovanoj traheji pacova korišćen je davač sila-pomeranje, a podaci su snimani na fiziografu (Narco-Bio system, Hjuston, SAD).

Za merenje apsorbancije u *in vitro* testu ispitivanja citotoksične aktivnosti izolata korišćen je ELISA čitač Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific), a test je sproveden na transparentnim mikrotitracionim pločama ravnog dna sa 96 bazena (Nunc, Nalgene).

### **3. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja**

#### **3.1. Izolovanje etarskih ulja**

Etarska ulja su izolovana iz podzemnih organa (rizom i koren) srpske velestike, *F. heuffelii* sakupljenih na tri lokaliteta u Republici Srbiji: na brdu Oblik, Sićevačka klisura, maja 2007. god.; na Gvozdenoj kapiji, Đerdapska klisura, aprila 2008. god. i u Debelom lugu, klisura Peka, aprila 2010. god.

Etarsko ulje je u podzemnim organima srpske velestike lokalizovano endogeno, zbog čega je neposredno pre izolovanja etarskih ulja osušeni biljni materijal usitnjen do stepena grubog praška.

Etarska ulja su izolovana postupkom destilacije vodenom parom u aparaturi po *Clevenger*-u, prema propisu datom u Ph. Eur. 6, uz dodatak *n*-heksana (1 ml) u bočnu cev. Destilacija je trajala 2 h, a masa izolovanih etarskih ulja je merena nakon otparavanja *n*-heksana na sobnoj temperaturi.

Sadržaj etarskih ulja određivan je gravimetrijski (*m/m*) i izračunavan prema formuli:

$$\% (m) \text{ etarskog ulja} = b/a \times 100$$

*a* – masa osušenog biljnog materijala (g);

*b* – masa etarskog ulja (g).

### 3.2. GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja

Kvalitativna i kvantitativna analiza etarskih ulja urađena je primenom metoda gasne hromatografije: GC-FID i GC-MS.

Uslovi GC-FID analize:

- gasni hromatograf SRI 8610C;
- kapilarna kolona DB-5 (30 m × 0,32 mm; debljina filma 0,25 μm);
- FID detektor (280 °C);
- temperatura injektora 280 °C;
- noseći gas helijum (1,2 ml/min);
- temperaturni program 60-280 °C, linearan porast 3 °C/min.

Uslovi GC-MS analize:

- aparat Hewlett Packard 6890- 5973 GC-MS;
- kapilarna kolona HP 5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm);
- *split/splitless* injektor (200 °C), split mod (1:10);
- temperatura transfer linije 250 °C;
- noseći gas helijum (1,0 ml/min);
- tehnika jonizacije: EI, 70 eV;
- zapremina injektovanog uzorka 1,0 μl.

Za GC-FID i GC-MS analizu pripremani su rastvori etarskih ulja u *n*-heksanu (10% V/V).

Identifikacija komponenata analiziranih etarskih ulja izvršena je poređenjem njihovih retencionih vremena, Kovačevih indeksa (RI) i masenih spektara sa odgovarajućim podacima za referentne supstance i/ili jedinjenja iz kompjuterske datoteke (NIST/NBS, Wiley) i literature (Adams, 2001). Linearni retencioni indeksi (Kovačevi indeksi, RI) određivani su u odnosu na homologi niz *n*-alkana (C<sub>9</sub>-C<sub>24</sub>) pod istim eksperimentalnim uslovima (Van den Dool i Kratz, 1963).

Procentualni sadržaj pojedinačnih komponenti određivan je metodom normalizacije integrisanih površina pikova.

#### **4. Izrada ekstrakata**

Osušen i sprašen biljni materijal (630 g), prikupljen na brdu Oblik (Sićevačka klisura, Republika Srbija), ekstrahovan je postupkom bimaceracije na sobnoj temperaturi najpre hloroformom, a zatim metanolom. Svaki od dva postupka maceracije izveden je u tamnim bocama tokom 48 h uz mešanje u ravnomernim vremenskim intervalima, a odnos droga:ekstrakciono sredstvo iznosio je 1:10 (*m/V*). Nakon 48 h ekstrakti su filtrirani, a rastvarači uklonjeni uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Masa dobijenog suvog hloroformskog ( $\text{CHCl}_3$ ) ekstrakta iznosila je 64,13 g (prinos u odnosu na osušen biljni materijal: 10,18%), dok je masa suvog metanolnog (MeOH) ekstrakta iznosila 49,14 g (prinos u odnosu na osušen biljni materijal: 7,81%).

#### **5. Izolovanje sekundarnih metabolita iz hloroformskog ekstrakta**

##### **5.1. Razdvajanje hloroformskog ekstrakta hromatografijom na stubu silikagela**

U cilju izolovanja sekundarnih metabolita iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* izvedeno je hromatografsko razdvajanje na stubu silikagela (Silica gel 60; 0,063–0,200 mm, Merck, Nemačka), dimenzija 85 × 2,9 cm. Suvi hloroformski ekstrakt (6,8 g) adsorbovan je na silikagel i nanet u tankom sloju na stub silikagela. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 50 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:hloroform (1:1-1:8; *V:V*), nakon toga čistim hloroformom, a zatim u sistemu hloroform:metanol (1:0-4:1; *V:V*). Na ovaj način sakupljeno je 217 frakcija koje su dalje testirane na tankom sloju silikagela (TLC 60  $F_{254}$ , 20 × 10 cm, Merck, Nemačka), u sistemu veće polarnosti od onog u kome je vršeno eluiranje kada su prikupljene frakcije koje se analiziraju. TLC hromatogrami su posmatrani pre i posle

derivatizacije etanolnim rastvorom KOH u UV svetlosti na 256 nm i 365 nm i frakcije su spajane na osnovu sličnosti.

Jedinjenje **1** nalazilo se u frakcijama 84-87, prikupljenim sa kolone nakon eluiranja sistemom rastvarača heksan:hloroform – 1:2. Iz frakcije 84 (20 mg), jedinjenje **1** (1,4 mg) izolovano je *metodom 1* preparativne HPLC.

Jedinjenje **2** nalazilo se u frakcijama 85-87, prikupljenim sa kolone nakon eluiranja sistemom rastvarača heksan:hloroform – 1:2. Iz frakcije 87 (18,4 mg), primenom iste metode, izolovana je dodatna količina jedinjenja **1** (0,9 mg), kao i jedinjenje **2** (0,6 mg).

Jedinjenje **3** nalazilo se u frakcijama 92-95, dobijenim sa kolone eluiranjem smešom heksan:hloroform – 1:2.

Jedinjenje **4** nalazilo se u frakcijama 92-95, dobijenim sa kolone eluiranjem smešom heksan:hloroform – 1:2. Ova dva jedinjenja izolovana su iz spojenih frakcija 92-95 (116,5 mg) *metodom 2* semipreparativne HPLC i dobijeno je po 5,8 mg oba jedinjenja.

Jedinjenje **5** nalazilo se u frakcijama 121-137, dobijenim sa kolone nakon eluiranja sistemom heksan:hloroform – 1:4. Spojene frakcije 121-137 (676 mg) rastvorene su u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajane na stubu silikagela dimenzija  $46,5 \times 1$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 7 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim i u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljene su 173 frakcije (A1-A173), koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **5** (0,6 mg) izolovano je iz frakcija A90-A111 (27 mg) *metodom 3* semipreparativne HPLC.

Jedinjenja **6** i **7** nalazila su se u frakcijama 139-163 dobijenim sa kolone nakon eluiranja sistemom heksan:hloroform – 1:4 i 1:8. Frakcije 139-148 (163 mg) rastvorene su u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajane na stubu silikagela dimenzija  $28 \times 1$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 7 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljeno je 158 frakcija (B1-B158),

koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **6** (2,1 mg) izolovano je iz frakcija B25–B37 (53,3 mg) *metodom 4* semipreparativne HPLC. Spojene frakcije 149-163 (388 mg), dobijene sa kolone nakon eluiranja sistemom rastvarača heksan:hloroform 1:8, rastvorene su u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajane na stubu silikagela dimenzija  $45 \times 1$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 5 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljeno je 170 frakcija (C1-C170), koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **6** (287,3 mg) nalazilo se u frakcijama C70-C90. Jedinjenje **7** (2,2 mg) izolovano je i prečišćeno *metodom 5* semipreparativne HPLC iz frakcija C109-C121 (19,3 mg).

Jedinjenje **8** nalazilo se u frakcijama 164-178, dobijenim sa kolone nakon eluiranja čistim hloroformom. Spojene frakcije 164-178 (324,1 mg) rastvorene su u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajane na stubu silikagela dimenzija  $42,5 \times 1$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 5 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim i u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljeno je 196 frakcija (D1-D196), koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **8** (3,2 mg) izolovano je iz frakcija D101-D111 (62 mg) *metodom 6* semipreparativne HPLC.

Jedinjenje **9** nalazilo se u frakcijama 179-198, dobijenim sa kolone nakon eluiranja čistim hloroformom (frakcije 179-190) i sistemom rastvarača hloroform:metanol – 8:1 (frakcije 191-198). Frakcije 179-198 (260 mg) rastvorene su u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajane na stubu silikagela dimenzija  $41,5 \times 1$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 7 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim i u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljene su 192 frakcije (E1-E192), koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **9** (ukupno 4,7 mg) izolovano je iz frakcija E70-E82 *metodom 7* semipreparativne HPLC, kao i iz frakcija E88-E100 *metodom 8* semipreparativne HPLC.

Jedinjenje **10** nalazilo se u frakciji 200, dobijenoj sa kolone nakon eluiranja sistemom rastvarača hloroform:metanol – 8:1. Frakcija 200 (881 mg) rastvorena je u minimalnoj količini  $\text{CHCl}_3$  i dalje razdvajana na stubu silikagela dimenzija  $53 \times 2,9$  cm. Eluiranje je izvedeno u gradijent sistemu mobilnih faza uz postepeno povećanje polarnosti. Sakupljane su frakcije zapremine 9 ml, eluiranje je započeto u sistemu heksan:etilacetat (1:0-0:1; V:V), nakon toga čistim etilacetatom, a zatim u sistemu etilacetat:metanol (1:0-0:1; V:V). Na ovaj način sakupljeno je 266 frakcija (F1-F266), koje su dalje testirane metodom tečne hromatografije (HPLC). Jedinjenje **10** (0,8 mg) je izolovano iz frakcija F178-F198 *metodom 9* semipreparativne HPLC.

## **5.2. Analitička i semipreparativna HPLC analiza hloroformskog ekstrakta**

Analitička (kvalitativna i kvantitativna) HPLC analiza hloroformskog ekstrakta izvedena je na uređaju Agilent 1100 uz primenu Zorbax Eclipse XDB- $\text{C}_{18}$  kolone ( $4,6 \times 250$  mm;  $5 \mu\text{m}$ ). Semipreparativna HPLC analiza izvedena je na istom uređaju uz primenu kolone Eclipse XDB- $\text{C}_{18}$  ( $9,4 \times 250$  mm;  $5 \mu\text{m}$ ). Mobilne faze koje su korišćene za analitičku i semipreparativnu HPLC analizu bile su: voda (A), acetonitril (B), smeša acetonitril:metanol (3:1) (C) i smeša acetonitril:metanol (6:1) (D).

Za analitičku analizu frakcija uzorci su rastvarani u acetonitrilu. Brzina protoka mobilne faze bila je 1,0 ml/min; radna temperatura  $25^\circ\text{C}$ , zapremina injektovanja  $20 \mu\text{l}$ , a talasna dužina detekcije 210 nm. Režim eluiranja dat je u Tabeli 9.

Devet različitih metoda semipreparativne HPLC analize korišćeno je za izolovanje čistih metabolita i/ili prečišćavanje izolovanih metabolita. Brzina protoka mobilne faze bila je 3,3 ml/min, radna temperatura  $25^\circ\text{C}$ , zapremina injektovanja  $500 \mu\text{l}$ , a talasna dužina detekcije 210 nm. Detalji ovih 9 metoda dati su u Tabeli 9.

Kvantifikacija prethodno izolovanih i identifikovanih metabolita izvršena je metodom eksternog standarda, pri čemu su izolovani metaboliti korišćeni kao standardne supstance. Metoda korišćena za kvantifikovanje ekstrakta prikazana je u Tabeli 9.

**Tabela 9.** Režimi eluiranja korišćeni za analitičku (kvalitativnu i kvantitativnu) HPLC analizu frakcija hloroformskog ekstrakta, kao i za izolovanje i/ili prečišćavanje izolovanih metabolita metodom semipreparativne HPLC

<b>Metoda</b>	<b>Vreme (min)</b>	<b>Gradijent A (%)</b>	<b>Gradijent B (%)</b>	<b>Gradijent C (%)</b>	<b>Gradijent D (%)</b>
Kvalitativna HPLC analiza	0 30	70 10	30 90	0 0	0 0
Kvantitativna HPLC analiza	0 30 35 50	40 20 20 5	0 0 0 0	0 0 0 0	60 80 80 95
Semipreparativna HPLC analiza					
<i>Metoda 1</i>	0 15	70 10	30 90	0 0	0 0
<i>Metoda 2</i>	0 10	20 10	0 0	0 0	80 90
<i>Metoda 3</i>	0 15	55 10	45 90	0 0	0 0
<i>Metoda 4</i>	0 10	40 10	60 90	0 0	0 0
<i>Metoda 5</i>	0 15	50 10	50 90	0 0	0 0
<i>Metoda 6</i>	0 10	15 10	85 90	0 0	0 0
<i>Metoda 7</i>	0 10	35 10	0 0	65 90	0 0
<i>Metoda 8</i>	0 15	25 10	0 0	75 90	0 0
<i>Metoda 9</i>	0 10	20 10	80 90	0 0	0 0



## 6. Analitička HPLC analiza metanolnog ekstrakta

Kvalitativna i kvantitativna HPLC analiza metanolnog ekstrakta izvršena je na uređaju Agilent 1100 uz primenu Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> kolone (4,6 × 250 mm; 5 μm). Mobilne faze korišćene za analizu bile su: voda (A), smeša acetonitril:metanol (3:1) (B), 0,03% rastvor H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u vodi (C) i smeša mobilne faze C (10%) u acetonitrilu (D).

Kvalitativna HPLC analiza sprovedena je korišćenjem sledeće metode: C:D (90:10-75:25), 5 min, nakon toga C:D (75:25), 10 min, nakon toga C:D (75:25-70:30), 5 min, nakon toga C:D (70:30-50:50), 5 min, nakon toga C:D (50:50-30:70), 5 min, nakon toga C:D (30:70-90:10), 5 min, eluiranje je u sledećih 3 min nastavljeno izokratski, pri čemu je volumen injektovanja izosio 20 μl, temperatura 25 °C, a brzina protoka 0,8 ml/min.

Dve metode su korišćene za kvantifikaciju identifikovanih jedinjenja i one su obuhvatale kombinaciju izokratskog i gradijent eluiranja.

*Metoda 1* – A:B (40:60-20:80), tokom 30 min, zatim je u toku 5 min eluiranje nastavljeno u izokratskim uslovima i nakon toga A:B (20:80-5:95) 15 min; zapremina injektovanja iznosila je 20 μl, temperatura 25 °C, a brzina protoka 1 ml/min.

*Metoda 2* – C:D (90:10) tokom 5 min, zatim C:D (90:10-75:25) tokom 10 min, zatim C:D (75:25-70:30), tokom 5 min, zatim C:D (70:30-50:50), tokom 5 min, zatim C:D (50:50-30:70), tokom 5 min, zatim C:D (30:70-10:90), tokom 5 min, eluiranje je u sledećih 10 min nastavljeno izokratski, i na kraju C:D (10:90-90:10), 10 min; zapremina injektovanja izosila je 20 μl, temperatura 25 °C i brzina protoka 0,8 ml/min.

## 7. Određivanje ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja određivan je u metanolnom ekstraktu podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*, sakupljenih na brdu Oblik (Sićevačka klisura) u maju 2007. god.

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja zasniva se na reakciji sa *Folin-Ciocalteu* (FC) reagensom (fosfomolibdovolframova kiselina) u

baznoj sredini, pri čemu polifenoli redukuju  $W^{6+}$ -jon do  $W^{4+}$ -jona i  $Mo^{6+}$ -jon do  $Mo^{4+}$ -jona (volfram-molibdensko plavo), a sami se oksiduju do *o*-hinona (Velioglu i sar., 1998; Petrović i sar., 2009).

Metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* rastvoren je u metanolu u koncentraciji 1 mg/ml. 100  $\mu$ l ovako pripremljenog rastvora pomešano je sa 750  $\mu$ l komercijalnog FC reagensa razblaženog 10 puta. Nakon 5 min u smešu je dodato 750  $\mu$ l rastvora  $Na_2CO_3$  (60 g/l). Ovako dobijena smeša snažno je promućkana i ostavljena da stoji 90 min na tamnom mestu na sobnoj temperaturi. Na isti način pripremljena je i slepa proba, osim što je umesto 100  $\mu$ l metanolnog ekstrakta dodato 100  $\mu$ l rastvarača. Apsorbancija rastvora merena je posle 90 min na 725 nm, a rezultati su izraženi kao % galne kiseline, odnosno mg galne kiseline/100 mg suvog ekstrakta.

## 8. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja

Parcijalna redukcija kiseonika u procesu ćelijskog disanja u mitohondrijama predstavlja glavni izvor reaktivnih kiseoničnih vrsta (eng. *reactive oxygen species* – ROS) i ove vrste se u fiziološkim uslovima stvaraju u maloj količini. Slobodni radikali su atomi, molekuli ili joni sa nesparenim elektronima koji su jako nestabilni i vrlo lako stupaju u reakciju sa biomolekulima. Humani organizam poseduje antioksidativni sistem odbrane kojim sprečava stvaranje većih količina ROS, neutrališe slobodne radikale, odnosno popravlja nastala oštećenja i na taj način održava homeostazu organizma. Međutim, preduga izloženost ćelije ROS može dovesti do situacije da je premašen kapacitet sistema odbrane organizma i tada u organizmu nastaju oksidativna oštećenja. Danas se zna da ROS igraju važnu ulogu u patogenezi različitih bolesti: malignih oboljenja, kardiovaskularnih bolesti, šećerne bolesti, inflamatornih bolesti, bolesti CNS-a itd.

Brojni predstavnici iz klase polifenola, primenjeni u odgovarajućim koncentracijama, mogu ostvariti snažno antioksidantno delovanje. Takođe, u novije vreme se sve češće ispituje i antioksidantni potencijal etarskih ulja.

Za ispitivanje antioksidantne aktivnosti metanolnog i hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* korišćena su tri *in vitro* testa:

- FRAP test kojim se određuje ukupna antioksidantna aktivnost;
- DPPH test kojim se određuje sposobnost neutralizacije 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala i
- 2-dezoksiriboza test kojim se ispituje sposobnost neutralizacije  $\cdot\text{OH}$  radikala.

Za ispitivanje antioksidantnog delovanja etarskih ulja izolovanih iz podzemnih organa *F. heuffelii* korišćen je DPPH test.

### 8.1. Ispitivanje ukupnog antioksidantnog potencijala (FRAP test) ekstrakata

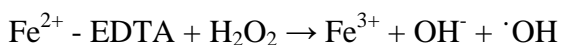
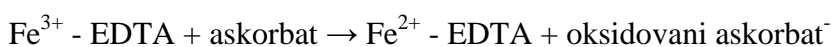
FRAP test (eng. *Ferric Reducing Ability of Plasma*) predstavlja metodu koja se zasniva na redukciji Fe(III)-tripiridil-triazin kompleksa (Fe(III)-TPTZ) do plavog Fe(II)-tripiridil-triazin kompleksa (Fe(II)-TPTZ) pri niskim pH vrednostima. Intenzitet dobijene plave boje meri se spektrofotometrijski, na 593 nm. Ovaj test se koristi za određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala ispitivanog uzorka.

*Postupak:* pomešano je 3 ml FRAP reagensa i 100  $\mu\text{l}$  rastvora metanolnog ekstrakta podzemnih organa vrste *F. heuffelii* u metanolu, odnosno 100  $\mu\text{l}$  rastvora hloroformskog ekstrakta podzemnih organa vrste *F. heuffelii* u 96% etanolu. Nakon toga je sadržaj epruvete dobro promućkan. Apsorbancija plavo obojenog rastvora merena je posle 5 min na 593 nm, a kao rastvor za kompenzaciju (slepa proba) korišćen je FRAP reagens. FRAP reagens je pripremljen na sledeći način: pomešano je 25 ml acetatnog pufera (pH=3,6; 300 mM) sa 2,5 ml rastvora 2,4,6-tripiridil-S-triazina u 40 mM HCl i 2,5 ml 20 mM  $\text{FeCl}_3$ .

Rezultati su izraženi kao FRAP vrednost, tj. kao  $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$  suvog ekstrakta. Za izračunavanje ove vrednosti korišćena je jednačina kalibracione krive koja je konstruisana pomoću rastvora  $\text{FeSO}_4$  (100-1000  $\mu\text{l/l}$ ) pri uslovima koji važe za tok određivanja. Kao referentna supstanca sa kojom je upoređena aktivnost ekstrakata korišćena je askorbinska kiselina. (Luximon-Ramma i sar., 2002)

## 8.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije $\cdot\text{OH}$ radikala ekstrakata

Za ispitivanje sposobnosti neutralizacije hidroksil ( $\cdot\text{OH}$ ) radikala najčešće se primenjuje 2-dezoksiriboza test. Hidroksil radikal je najpotentniji ROS. Ima izuzetno kratak život što navodi na zaključak da je jako reaktivan. Ovaj radikal neselektivno i velikom brzinom reaguje sa biomolekulima iz svog okruženja (npr. DNK) i utiče na funkcionalnost i integritet ćelije.  $\cdot\text{OH}$  radikal se *in vitro* i *in vivo* stvara u tzv. Fentonovoj reakciji (reakciji  $\text{H}_2\text{O}_2$  i metala sa promenljivom valencom). U osnovi ovog ispitivanja je reakcija razgradnje 2-dezoksiriboze posredstvom  $\cdot\text{OH}$  radikala:



Proizvodi ove reakcije reaguju dalje sa tiobarbiturnom kiselinom gradeći purpurno obojene komplekse sa apsorpcionim maksimumom na 532 nm (Lee i Lim, 2000).

*Priprema reagensa:* reagens se priprema od sledećih sastojaka:

- fosfatni pufer (pH=7,4, I=0,1)
- EDTA (0,004 M)
- $\text{FeCl}_3$  (0,004 M)
- 2-dezoksiriboza (0,05 M)
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (1,5%)
- L-askorbinska kiselina (0,004 M)
- trihlorsirćetna kiselina (TCA, 2,8% u vodi)
- tiobarbiturna kiselina (TBA, 1% u 0,05 M NaOH).

*Postupak.* Metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* rastvoren je u metanolu. Zatim su pripremljena razblaženja ekstrakta i ekstrakt je testiran u opsegu koncentracija od 5-160 µg/ml. Hloroformski ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* rastvoren je u 96% etanolu, a zatim su pripremljena razblaženja ekstrakta. Ekstrakt je testiran u opsegu koncentracija od 3,12-100,00 µg/ml.

Svaka reakciona smeša sadržavala je sledeće reagente: 100 µl FeCl<sub>3</sub> (100 µM), 100 µl EDTA (100 µM), 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2,2 mM), 200 µl 2-dezoksiriboze (2,5 µM), 100 µl L-askorbinske kiseline (100 µM), 20 µl odgovarajućeg razblaženja MeOH ekstrakta i fosfatni pufer (PBS, pH = 7,4; I = 0,1), dodat do konačne zapremine od 4 ml. Kontrolni uzorci su umesto ispitivanog ekstrakta sadržali 20 µl odgovarajućeg rastvarača, dok je slepa proba sadržala samo PBS (3,78 ml), 200 µl 2-dezoksiriboze i 20 µl odgovarajućeg rastvarača.

Reakcione smeše inkubirane su 60 min na temperaturi od 37 °C. Zatim je u svaku smešu dodat po 1 ml 1% (*m/V*) tiobarbiturine kiseline (TBA) u 0,05 M NaOH i po 1 ml 2,8% (*m/V*) trihlorsirćetne kiseline (TCA). Smeše su nakon toga zagrevane 15 min na 100 °C i potom ohlađene. Posle hlađenja merena je apsorbancija rastvora na 532 nm, u odnosu na odgovarajuću slepu probu (rastvor za kompenzaciju) i kontrolu (Lee i Lim, 2000).

Procenat neutralizacije hidroksil radikala izračunavan je prema formuli:

$$I(\%) = (A_k - A_a) \times 100 / A_k$$

gde je  $A_k$  apsorbancija kontrole, a  $A_a$  apsorbancija analize.

Rezultati su izraženi kao neutralizacija ·OH radikala (%) i kao koncentracija uzorka koja dovodi do 50% neutralizacije ·OH radikala – SC<sub>50</sub> vrednost (µg/ml).

### 8.3. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala ekstrakata i etarskih ulja

2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal je stabilan slobodni radikal koji ima nespareni valentni elektron na jednom atomu azota na azotnom mostu. Neutralizacija ovog radikala predstavlja osnovu danas veoma popularnog testa ispitivanja antioksidantne aktivnosti u kome se meri intenzitet promene boje ljubičastog DPPH radikala do žutog, neutralnog oblika (difenilpikrilhidrazina) u reakciji sa hvatačima slobodnih radikala. Promena boje meri se spektrofotometrijski, na 517 nm, i predstavlja meru antiradikalske aktivnosti ispitivanog uzorka (Sharma i Bhat, 2009).

*Postupak.* Etarska ulja kao i hloroformski ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* rastvoreni su u apsolutnom etanolu, dok je metanolni ekstrakt rastvoren u metanolu. Svakom od uzoraka (u zapremini od 2,5 ml) dodato je po 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH, pripremljenog u odgovarajućem rastvaraču (apsolutnom etanolu za etarska ulja i hloroformski ekstrakt, odnosno metanolu za metanolni ekstrakt). Ovako dobijene smeše su snažno promućkane i ostavljene da stoje 30 min na tamnom mestu. Nakon toga je izmerena apsorbancija, na 517 nm. Kao kontrola korišćene su smeše 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH radikala u apsolutnom etanolu, odnosno metanolu kome je dodato 2,5 ml apsolutnog etanola, odnosno metanola. Neutralizacija DPPH radikala izračunata je korišćenjem formule:

$$I(\%) = (A_k - A_a) \times 100 / A_k$$

gde je  $A_k$  apsorbancija kontrole, a  $A_a$  apsorbancija analize.

Rezultati su izraženi kao neutralizacija DPPH radikala (%) i kao koncentracija uzorka koja dovodi do 50% neutralizacije DPPH radikala ( $SC_{50}$ ).

## **9. Eksperimentalne životinje korišćene za ispitivanje spazmolitičke, antiinflamatorne i gastroprotektivne aktivnosti izolata**

U svim *in vivo* eksperimentima, tj. za ispitivanje antiinflamatorne i gastroprotektivne aktivnosti, kao i za ispitivanje spazmolitičke aktivnosti, korišćeni su pacovi soja *Wistar* oba pola, telesne mase 270 - 310 g, starosti od 3 do 5 meseci, koji su odgajeni u odgovarajućim laboratorijskim uslovima (čuvani u kavezima, na temperaturi vazduha 20-24 °C sa slobodnim pristupom vodi i hrani). *In vivo* eksperimenti sprovedeni su prema direktivama Saveta Evrope (*The European Council Directive of November 24, 1986; 86/609/EEC*).

## **10. Ispitivanje spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja, ekstrakata i metabolita**

Glatka mišićna vlakna u digestivnom traktu poređana su u snopove od oko 1000 paralelno postavljenih vlakana. U svakom snopu su ova vlakna međusobno električno povezana velikim brojem komunikativnih veza. Ove veze pružaju jako mali otpor kretanju jona, pa električni signali mogu lako da prelaze sa jednog vlakna na drugo. Ovi snopovi se u pojedinim tačkama preklapaju, ali se između njih nalazi, pre svega, rastresito vezivno tkivo. Mišićni sloj funkcioniše dakle kao sincicijum i akcioni potencijal se kroz mišić prenosi u svim pravcima, a put koji pređe zavisi od ekscitabilnosti mišića. Postoje takođe i veze između longitudinalnog i cirkularnog mišićnog sloja, pa se ekscitacija jednog sloja najčešći pranosu na drugi. Čelijska membrana glatkog mišića u odnosu na skeletni, ima znatno više voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala, a mali broj voltažno-zavisnih natrijumskih kanala. Ova činjenica navodi na zaključak da natrijum vrlo malo učestvuje u stvaranju akcionog potencijala većine glatkih mišića, dok je ulazak kalcijumovih jona u unutrašnjost vlakna najodgovorniji za stvaranje akcionog potencijala. Kalcijumski kanali se otvaraju sporije od natrijumskih, ali ostaju duže otvoreni. Kalcijum u sarkoplazmu dolazi iz

ekstraćelijskog prostora (neophodan za dugotrajne kontrakcije) ili iz unutrašnjih depoa (dovoljan samo za kratkotrajne kontrakcije). Pored već pomenutih voltažno-zavisnih kanala, kalcijumovi joni ulaze u ćeliju i preko receptorskih (ligand-zavisnih kanala), kao i kanala koji se aktiviraju sekundarnim glasnikom. Kalcijum iz unutrašnjih rezervi se iz sarkoplazminog retikuluma (SR) oslobađa pod uticajem inozitoltrifosfata. Nakon vezivanja odgovarajućeg liganda za receptor, preko G proteina se aktivira fosfolipaza C koja cepa fosfatidilinozitol-1,4-difosfat na inozitol-3-fosfat (IP<sub>3</sub>) i diacilglicerol (DAG). IP<sub>3</sub> aktivira istoimene receptore na SR, otvaraju se kalcijumski kanali i kalcijum iz depoa stiže u sarkoplazmu. Kalcijum iz SR može preći u sarkoplazmu i preko rianodinskih receptora. Rianodinski receptori (RIR), nazvani i kalcijum aktivirajući kalcijumski kanali, slični su istoimenim receptorima u skeletnim mišićima. Ove jonske kanale otvara povećana koncentracija kalcijuma u sarkoplazmi. Povećanje kalcijuma u sarkoplazmi, koje izaziva IP<sub>3</sub>, utiče na kalcijumske kanale zavisne od kalcijuma preko kojih se dodatna količina kalcijuma mobilise iz sarkoplazminog retikuluma. Tako npr. kofein može da isprazni depoe kalcijuma preko ovih kanala.

Glatka muskulatura digestivnog trakta ispoljava sporu, ali kontinuiranu električnu aktivnost koja se manifestuje kao:

- spori talasi – oscilacije membranskog potencijala koje određuju ritam kontrakcija GIT-a; nisu akcioni potencijali
- šiljati potencijali – pravi akcioni potencijali. Nastaju kada membranski potencijal glatke muskulature GIT-a postane veći od -40 mV, a posledica su ulaska velikog broja Ca<sup>2+</sup> jona (kao što je prethodno objašnjeno).

Faktori koji dovode do depolarizacije membrane glatkih mišićnih ćelija GIT-a su:

- istezanje mišića
- stimulacija acetilholinom (ACh)
- stimulacija parasimpatičkim nervima koji sekretuju ACh
- stimulacija izazvana specifičnim GIT hormonima.

Faktori koji dovode do hiperpolarizacije membrane su:

- uticaj adrenalina i noradrenalina
- stimulacija simpatičkim nervima koji luče noradrenalin (Guyton i Hall, 1999).



Acetilholin (ACh) je jedan od dva najvažnija neurotransmitera u glatkomišićnim sinapsama i on svoje efekte ostvaruje pokrećući kaskadu nakon vezivanja za odgovarajući receptor na membrani. Muskarinski agonisti (kao npr. ACh) izazivaju kontrakcije većine glatkih mišića u organizmu (sfinktera dužice, disajnih puteva u plućima, mokraćne bešike, gastrointestinalnog trakta, kao i nekih krvnih sudova). Ovakav odgovor je posledica aktivacije muskarinskih receptora na sarkolemi. Glavni podtipovi muskarinskih receptora koji se mogu naći na sarkolemi glatkih ćelija GIT-a su  $M_2$  i  $M_3$ , pri čemu je podtip  $M_2$  tri do četiri puta rasprostranjeniji. Aktivacija  $M_3$  receptora preko  $G_q$  proteina dovodi do aktivacije fosfolipaze C- $\beta$ , hidrolize fosfoinozitid inozitol-1,4-difosfata na  $IP_3$  i DAG.  $IP_3$  se, kao što je već naglašeno, vezuje za istoimene receptore na SR i dovodi do mobilizacije  $Ca^{2+}$  jona. Ipak, dalja istraživanja su pokazala da i  $M_2$  podtip igra indirektnu ulogu u procesu kontrakcije. Kao što je već pomenuto,  $M_2$  podtip inhibira akumulaciju cAMP, a samim tim i relaksantnu ulogu cAMP-stimulirajućih agenasa. Međutim, kada se izolovani preparati glatkih mišića GIT-a izlože delovanju muskarinskih agonista, kontrakcije mogu biti inhibirane delovanjem kompetitivnih antagonista mehanizmom koji je povezan sa  $M_3$  podtipom (Ehlert i sar., 1999).

## **10.1. Izolovanje i postavljanje preparata**

### **10.1.1. Izolovanje i postavljanje ileuma pacova**

Nakon dvanaestočasovnog gladovanja, pacov je žrtvovan cervikalnom dislokacijom. Ileum je brzo izolovan, ubačen u Petrijevu šolju sa aerisanim fiziološkim rastvorom, očišćen od crevnog sadržaja i ostataka mezenterijuma. Preparati dužine od oko 2 cm uronjeni su u vodeno kupatilo zapremine 10 ml, ispunjeno Tyrod-ovim rastvorom (sastav rastvora u mM: NaCl 136,9; KCl 2,68;  $CaCl_2$  1,8;  $MgCl_2$  1,05;  $NaHCO_3$  11,9;  $NaH_2PO_4$  0,42 i glukoza 5,55), zagrejanim na 37 °C i u koje se uvodi smeša kiseonika sa 5%  $CO_2$ . Jedan kraj ispitivanog segmenta izolovanog ileuma vezuje se za dno kupatila, a drugi kraj sa izotoničnim transduktorom (TSZ-04-E, Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska). Kontrakcije ileuma snimljene su i analizirane korišćenjem

kompjuterskog programa SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska). Pre eksperimenta preparati su podešeni na opterećenje od 1 g i ostavljeni da se adaptiraju 30 min do jednog sata, do postizanja bazalnog tonusa. Rastvori ispitivanih uzoraka (etarskog ulja, ekstrakata i čistih metabolita) dodavani su direktno u vodeno kupatilo (Sadraei et al., 2001, Fleer i Verspohl, 2007).

### **10.1.2. Izolovanje i postavljanje traheje pacova**

Nakon žrtvovanja životinje, traheja je brzo odvajana iz grudnog koša i isecana na male segmente od tri do četiri prstena. Prstenovi traheje postavljani su u vodeno kupatilo zapremine 10 ml ispunjeno *Krebs-Ringer*-ovim rastvorom (koncentracije komponenata u mM: NaCl 137; KCl 2,81; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 0,1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,417; NaHCO<sub>3</sub> 11,9, i glukoza 11,10) pod prethodno opisanim eksperimentalnim uslovima. Prstenovi su ostavljeni da se stabilizuju pri opterećenju od 0,5 g, tokom 30 min. Posle uspostavljanja stabilnog tonusa, odgovarajuće koncentracije hloroformskog ekstrakta dodavane su direktno u vodeno kupatilo u količini koja nije prelazila 2% ukupne zapremine kupatila (Fleer i Verspohl, 2007).

## **10.2. Uticaj izolata na spontane kontrakcije izolovanog ileuma**

Nakon uspostavljanja bazalnog tonusa i pravilne spontane kontraktilnosti, u kupatilo su dodavani ispitivani uzorci u rastućim (logaritamskim) koncentracijama. Uvek je dodavana ista zapremina rastvora sa različitom količinom aktivne materije tako da se u kupatilu postigne odgovarajuća koncentracija. Serija razblaženja ispitivanih uzoraka dodavana je kumulativno. Promene tonusa (kontrakcija ili relaksacija) merene su kao površina ispod krive, a rezultat spazmolitičke aktivnosti izražen je preko efekta kontrolne supstance (atropin) koji predstavlja pozitivnu kontrolu. Atropin je dodavan u vodeno kupatilo u rastućim koncentracijama. Razlika između površine ispod krive pre i

nakon davanja koncentracije koja je dovela do maksimalnog efekta predstavljala je maksimalni spazmolitički efekat atropina. Paralelno, na istom tkivu, u drugom vodenom kupatilu, ispitan je efekat ispitivanog uzorka. Za svaku koncentraciju ispitivanog uzorka efekat je izračunavan u procentima u odnosu na maksimalnu relaksaciju izazvanu atropinom.

### **10.3. Uticaj izolata na kontrakcije izolovanog ileuma izazvane acetilholinom (ACh)**

Nakon adaptacije preparata ileuma, izazivane su njegove kontrakcije kumulativnim dodavanjem rastućih koncentracija ACh u vodeno kupatilo. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva koncentracijski-zavisnih kontrakcija. Preparat je zatim ispiran *Tyrod*-ovim rastvorom na svakih 15 min, tokom 30-45 min, kako bi se ponovo uspostavile stabilne spontane kontrakcije. Po uspostavljanju bazalnog tonusa u vodeno kupatilo je dodavan ispitivani uzorak u koncentraciji koja se ispituje. Tri minuta nakon dodavanja, ponovljena je serija sa istim koncentracijama ACh i formirana nova kriva kontraktilnog efekta ACh u prisustvu odgovarajuće koncentracije ispitivanog uzorka. Preparat ileuma je ponovo ispiran i postupak se ponavljao sa većom koncentracijom ispitivanog uzorka (Sadraei i sar., 2001; Fleer & Verspohl, 2007). Spazmolitički efekat ispitivanih izolata predstavljen je kroz seriju krivih na kojima je prikazan kontraktilni efekat ACh koji je ostvaren u prisustvu ispitivanih izolata i upoređen sa efektom samog ACh.

### **10.4. Uticaj izolata na kontrakcije izolovanog ileuma i traheje izazvane kalijum-hloridom (KCl)**

U prisustvu visoke koncentracije KCl izazivaju se tonične kontrakcije segmenata ileuma. Povećana količina  $K^+$  jona u rastvoru izaziva depolarizaciju glatkih mišićnih vlakana i otvaranje voltažno zavisnih kanala L tipa. To omogućava difuziju  $Ca^{2+}$  jona u ćeliju koji izazivaju dugotrajnu kontrakciju glatkih mišića.

Preparat izolovanog organa postavlja se u vodeno kupatilo i ostavlja 30 min da razvije spontanu kontraktilnost. Nakon toga u vodeno kupatilo se dodaje 80 mM KCl da bi se postigla visoka koncentracija u rastvoru. Kada se tonična kontrakcija izazvana KCl ustali, dodaje se ispitivani uzorak kumulativno u rastućim koncentracijama. Spazmolitički efekat izolata izračunava se na osnovu razlika površina ispod krive, kao procenat inhibicije efekta KCl (Sadraei i sar., 2001; Karamenderes & Apaydin, 2003).

## **11. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata**

### **11.1. Ispitivanje antiedematozne aktivnosti ekstrakata**

Ispitivanje antiedematozne aktivnosti sprovedeno je na pacovima u modelu inflamacije proinflamatornom supstancom, karageninom. U ovom modelu, nakon primene intraplantarne injekcije karagenina dolazi do pojave osnovnih znakova inflamacije: edema, hiperalgezije i eritema. Znaci inflamacije javljaju se pod dejstvom proinflamatornih supstanci – bradikinina, histamina, tahikinina, komplementa i reaktivnih kiseoničnih i azotnih radikala. Informatorni odgovor se najčešće kvantifikuje uvećanjem (edemom) tretirane šape, koje dostiže maksimum oko 5 h nakon davanja injekcije karagenina, a koji se može modulirati inhibitorima specifičnih molekula unutar inflamatorne kaskade. Model inflamacije izazvane karageninom je dobro proučen i visoko ponovljiv (reproducibilan), pa ima važnu ulogu u proučavanju antiinflamatorne aktivnosti i razvoju novih lekova (Morris, 2003).

Ovaj model inflamacije iskorišćen je za ispitivanje antiedematozne aktivnosti metanolnog i hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*. Ispitivana grupa životinja prvobitno je tretirana rastućim dozama ekstrakata koji su aplikovani oralno (*p.o.*) gastričnom sondom (Instech Solomon, Plymouth Meeting, SAD), dok su kontrolne grupe tretirane rastvaračem (DMSO) kao i lekom sa potvrđenim antiinflamatornim delovanjem (indometacinom), koji su aplikovani na isti način kao i ispitivani ekstrakti, 1 h pre nego što se supkutano, u desnu zadnju šapicu, ubrizga karagenin i na taj način izazove inflamacija. Četiri sata nakon toga životinje su

žrtvovane i antiedematozni efekat ekstrakata i referentnog leka je bio procenjen na osnovu razlike u masi šapica. Šema ispitivanja data je u Tabeli 10.

## **11.2. Histološka analiza poprečnih preseka šapica pacova**

Nakon što je izmerena razlika u masi šapica i izračunat antiedematozni efekat ekstrakata, šapice su, nakon amputacije, bile fiksirane u 10% formalinu i kalupljene u parafinske blokove. Nakon toga su pripremljena 4 poprečna preseka, debljine 5  $\mu\text{m}$ , koji su zatim obojeni hematoksilin-eozin metodom. Na histološkim presecima je pod mikroskopom (uvećanje 100 $\times$ ) analiziran intenzitet inflamacije na osnovu prisustva infiltracije mononuklearnih i polimorfonuklearnih ćelija i intersticijalnog edema.

**Tabela 10.** Šema ispitivanja antiedematozne aktivnosti ekstrakata podzemnih organa *F. heuffelii* u modelu karageninom izazvane inflamacije šapica pacova.

<b>Grupa životinja</b>	<b>Tretman</b>	<b>Broj životinja</b>
Kontrolna grupa	Proinflamatorno sredstvo (karagenin) 0,5%; 0,1 ml/šapi	7 pacova (Wistar)
Eksperimentalne grupe 1 - 4	karagenin + metanolni ekstrakt (4 doze aplikovane <i>p.o.</i> )	4 × 7 pacova (Wistar)
Eksperimentalne grupe 5 - 7	karagenin + hloroformski ekstrakt (3 doze aplikovane <i>p.o.</i> )	3 × 7 pacova (Wistar)
Kontrolna grupa (rastvarač, DMSO)	karagenin + dimetilsulfoksid (aplikovan <i>p.o.</i> )	7 pacova (Wistar)
Kontrolna grupa (indometacin)	karagenin + indometacin (8 mg/kg aplikovan <i>p.o.</i> )	7 pacova (Wistar)

## 12. Ispitivanje gastroprotektivne aktivnosti ekstrakata

Peptička ulkusna bolest obuhvata heterogenu grupu poremećaja i podrazumeva prisustvo oštećenja sluzokože želuca i/ili duodenuma, koje se prostire sve do submukoznog sloja, ima prečnik veći od 5 mm i uglavnom je lokalizovano u antrumu želuca, odnosno u bulbusu duodenuma. Uzrok peptičkog ulkusa još uvek nije u potpunosti definisan. Prema ustaljenom shvatanju, bolest će se razviti kada agresivni faktori (HCl, pepsin, žučne kiseline) prevladaju nad protektivnim (protok krvi, bikarbonati, mukus, prostaglandini i faktori rasta). Međutim, novija shvatanja peptičkog ulkusa u etiopatogenezi bolesti najvažniju ulogu pripisuju infekcijama Gram (-) bakterijom *Helicobacter pylori* (odgovorna je za oko 70% slučajeva bolesti), kao i sve učestalijoj primeni nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL). Pored ova dva pomenuta faktora, sigurno je da određenu ulogu u patogenezi imaju i alkohol, stres, pušenje, način ishrane i genetska predispozicija (Adinortey i sar., 2013).

Za ispitivanje gastroprotektivnog delovanja ekstrakata podzemnih organa *F. heuffelii* korišćen je *in vivo* model akutnog stres ulkusa izazvanog oralnom (*p.o.*) primenom apsolutnog etanola na pacovima (etanolni stres-ulkus). Ovaj eksperimentalni model peptičkog ulkusa je zbog patofizioloških mehanizama koji se nalaze u njegovoj osnovi, pogodan za ispitivanje efikasnosti supstanci sa potencijalnom citoprotektivnom i/ili antioksidantnom aktivnošću, a ne i za evaluaciju antisekretorne aktivnosti. Šema ispitivanja data je u Tabeli 11.

Etanol se smatra faktorom rizika za nastanak ulkusne bolesti. Zahvaljujući sposobnosti da solubilizuje mukusni sloj, etanol penetrira kroz gastričnu mukozu i izlaže epitelne ćelije štetnom delovanju HCl i pepsina što posledično dovodi do oštećenja integriteta sluznice želuca. Etanol takođe stimuliše sekreciju kiseline i smanjuje prokrvljenost sluznice što dovodi do mikrovaskularnih oštećenja. Važan mehanizam oštećenja predstavlja i oksidativni stres, jer etanol dovodi do disbalansa u ćelijskim antioksidantnim procesima, kao i do stvaranja slobodnih radikala. Direktnim toksičnim efektom na epitelne ćelije želudačne sluzokože (koji podrazumeva smanjenje sekrecije mukusa i bikarbonata), etanol dovodi do stvaranja nekrotičnih lezija u sluzokoži želuca. Oštećenje ćelijske membrane, usled povećane permeabilnosti za  $\text{Na}^+$  i

vodu, ima za posledicu povećanje koncentracije intracelularnog  $\text{Ca}^{2+}$  što dovodi do smrti ćelija i eksfolijacije epitela (Adinortey i sar., 2013).

### **12.1. Eksperimentalni protokol ispitivanja gastroprotektivnog delovanja ekstrakata**

Životinje iz eksperimentalne grupe najpre su tretirane rastućim dozama metanolnog i hloroformskog ekstrakta podzemnih organa vrste *F. heuffelii*. Jedan sat nakon toga, u cilju izazivanja oštećenja na sluzokoži želuca, oralno je aplikovan apsolutni etanol (5 ml/kg *p.o.*). Jedan sat nakon primene etanola životinje su žrtvovane i iz njih je uklonjen želudac. Želudac je otvoren duž velike krivine i ispran fiziološkim rastvorom. Efekat ekstrakata je nakon toga procenjen na osnovu makroskopskog pregleda (uz pomoć lupe) sluzokože želuca tretiranih životinja u poređenju sa netretiranim životinjama (negativna kontrolna grupa); kao i životinja tretiranih ranitidinom (20 mg/kg *p.o.*), koji je korišćen kao referentni lek (pozitivna kontrolna grupa). Intenzitet lezija na sluzokoži želuca procenjen je na osnovu kriterijuma (modifikovanog sistema) koji je 1964. god. dao Adami i izražen je kao gastrični skor:

- **0:** bez prisutnih lezija;
- **0,5:** blaga hiperemija ili  $\leq 5$  petehija;
- **1:**  $\leq 5$  erozija, dužine  $\leq 5$  mm;
- **1,5:**  $\leq 5$  erozija, dužine  $\leq 5$  mm uz prisustvo brojnih petehija;
- **2:** 6-10 erozija, dužine  $\leq 5$  mm;
- **2,5:** 1-5 erozija, dužine  $> 5$  mm;
- **3:** 5-10 erozija, dužine  $> 5$  mm;
- **3,5:**  $> 10$  erozija, dužine  $> 5$  mm;
- **4:** 1-3 erozije, dužine  $\leq 5$  mm i širine 0,5-1 mm;
- **4,5:** 4-5 erozija, dužine  $\leq 5$  mm i širine 0,5-1 mm;
- **5:** 1-3 erozije, dužine  $> 5$  mm i širine 0,5-1 mm;
- **6:** 4 ili 5 lezija kategorije 5;
- **7:**  $\geq 6$  lezija kategorije 5
- **8:** kompletna lezija sluzokože sa hemoragijom (Adami i sar., 1964).



**Tabela 11.** Šema ispitivanja gastroprotektivnog efekta ekstrakata podzemnih organa *F. heuffelii* u modelu etanolom izazvanog ulkusa pacova

<b>Grupa životinja</b>	<b>Tretman</b>	<b>Broj životinja</b>
Kontrolna grupa (netretirana)	Apsolutni etanol 5 ml/kg <i>p.o.</i>	6 pacova (Wistar)
Eksperimentalne grupe 1 - 3	Apsolutni etanol+metanolni ekstrakt (3 doze) (aplikovano <i>p.o.</i> )	3 × 6 pacova (Wistar)
Eksperimentalne grupe 4 - 6	Apsolutni etanol+hloroformski ekstrakt (3 doze) (aplikovano <i>p.o.</i> )	3 × 6 pacova (Wistar)
Kontrolna grupa (rastvarač-DMSO)	Apsolutni etanol+dimetilsulfoksid (aplikovano <i>p.o.</i> )	6 pacova (Wistar)
Kontrolna grupa (referentni lek)	Apsolutni etanol+ranitidin 20 mg/kg (aplikovano <i>p.o.</i> )	6 pacova (Wistar)

## 13. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja, ekstrakata i metabolita

Za utvrđivanje antimikrobne aktivnosti izolata podzemnih organa *F. heuffelii* (etarska ulja, ekstrakti i metaboliti) korišćen je bujon mikrodilucioni metod (Candan i sar., 2003).

### 13.1. Standardni sojevi mikroorganizama

U cilju ispitivanja antimikrobne aktivnosti izolata (hloroformskog i metanolnog ekstrakta, etarskih ulja, izolovanih jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6**, kao i hlorigenske kiseline), korišćeni su standardni mikroorganizmi iz kolekcija:

- ATCC (American Type of Culture Collection)
- NCIMB (National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen).

Svi standardni sojevi nabavljeni su iz Instituta za imunologiju i virusologiju Torlak u Beogradu.

Antibakterijska aktivnost hloroformskog i metanolnog ekstrakta ispitivana je prema:

Gram (+) bakterijama

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

#### Gram (–) bakterijama

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti hloroformskog i metanolnog ekstrakta sprovedeno je na jednom standardnom soju kandidate:

- *Candida albicans* ATCC 10231.

Antibakterijska aktivnost metabolita (izolovanih jedinjenja **1, 3, 4, 6**, kao i hlorogenske kiseline ), ispitivana je prema:

#### Gram (+) bakterijama

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

i

#### Gram (–) bakterijama

- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti metabolita (izolovanih jedinjenja **1, 3, 4, 6**, kao i hlorogenske kiseline ), sprovedeno je na jednom soju kandidate:

- *Candida albicans* ATCC 10231.

Antibakterijska aktivnost etarskih ulja ispitivana je prema:

Gram (+) bakterijama

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- *Micrococcus luteus* ATCC 9341
- *Micrococcus flavus* ATCC 10240
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633

i

Gram (–) bakterijama

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Ispitivanje antifungalne aktivnosti etarskih ulja sprovedeno je na tri soja kandidate:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida albicans* ATCC 10259
- *Candida albicans* ATCC 24433.

## 13.2. Kultivacija mikroorganizama

Bakterijski sojevi korišćeni u eksperimentima su najpre presejani u 10 ml *Müller-Hinton* bujona i dalje inkubirani na 37 °C. Posle 24 h bakterije su presejane na 10 ml sveže tečne podloge i inkubirane 18 h. Dobijena kultura mikroorganizama presejana je na agar.

Pri kultivaciji sojeva gljivice *C. albicans* korišćen je identičan postupak osim što je umesto *Müller-Hinton* bujona korišćen *Sabouraud* bujon.

### 13.3. Standardni antibiotici

Kao referentni lekovi korišćeni su sledeći standardni antibiotici proizvođača Sigma-Aldrich:

- ampicilin
- amikacin
- ciprofloksacin
- streptomycin
- nistatin
- amfotericin

### 13.4. Bujon mikrodilucioni test

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja, hloroformskog i metanolnog ekstrakta, izolovanih metabolita (jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6**) i hlorogenske kiseline ispitivana je bujon mikrodilucionim testom, a rezultati su izražavani kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) (Candan i sar., 2003). Eksperiment je izveden u duplikatu u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom i 96 bunarića.

Korišćene su osamnaestočasovne kulture navedenih bakterijskih sojeva (inokulum:  $5 \times 10^5$  cfu/ml, cfu-colony forming units) u *Müller-Hinton* bujonu (za ispitivane bakterijske sojeve) i *Sabouraud* bujonu (za ispitivane sojeve *C. albicans*) sa dodatkom Tween 80 (finalna koncentracija 0,5% V/V). Za ispitivanje su korišćeni rastvori etarskih ulja, ekstrakata, izolovanih metabolita i hlorogenske kiseline u dimetilsulfoksidu (DMSO).

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja ispitivana je u rasponu koncentracija od 6,25-226,5 µg/ml, aktivnost metanolnog i hloroformskog ekstrakta u rasponu od 12,5-200,0 µg/ml, a aktivnost izolovanih metabolita (jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6**) i hlorogenske kiseline od 2,0-64 µg/ml. Pozitivnu kontrolu su predstavljale bakterije inkubirane samo sa odgovarajućom količinom rastvarača (DMSO).

Nakon osamnaestočasovne inkubacije (za ispitivanje na bakterijskim sojevima) i četrdesetosmočasovne inkubacije (za ispitivanje na sojevima *C. albicans*) kao indikacija rasta mikroorganizama uočavano je prisustvo, odnosno odsustvo taloga na dnu svakog bazena na mikrotitracionoj ploči. Rezultati su izražavani kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK), odnosno minimalna koncentracija ispitivanog uzorka koja dovodi do inhibicije rasta mikroorganizama.

## **14. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata i metabolita**

### **14.1. Čelijske linije**

U cilju ispitivanja citotoksične aktivnosti izolata podzemnih organa *F. heuffelii* korišćeno je nekoliko čelijskih linija:

- HeLa - imortalizovana linija dobijena od ćelija karcinoma grlića materice
- MCF7 - čelijska linija humanog karcinoma dojke
- K562 - čelijska linija humane mijeloidne leukemije.

Za procenu potencijalnog selektivnog delovanja testiranih metabolita prema tumorskim čelijskim linijama korišćena je čelijska linija:

- MRC5 - čelijska linija humanih fetalnih fibroblasta

### **14.2. Hranljiva podloga**

Maligne čelijske linije su održavane u kulturi u vidu monosloja u hranljivom medijumu RPMI 1640 („Roswell Park Memorial Institute medium”), pH 7,2, u koji je dodat 10% fetalni goveđi serum, termički inaktivisan na 56 °C (30 min), L-glutation (3 mM), streptomycin (200 µl/ml), penicilin (192 IU/ml) i Hepes (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetan-sulfonska kiselina) (25 mM). Praškasti RPMI 1640 hranljivi medijum je proizvod istraživača Moore i saradnika sa instituta "*Roswell Park Memorial Institute*".

Osnovu ove hranljive podloge predstavlja fosfatni pufer. U podlogu su nakon toga dodati vitamini i aminokiseline i ovako pripremljen medijum je dalje rastvaran u sterilisanoj destilovanoj vodi (102 g/l), uz mešanje na temperaturi od 15-20 °C, i u taj rastvor je dodato 2 g NaHCO<sub>3</sub>. Za vreme pripreme hranljivog medijuma pH vrednost je podešavana rastvorima 1N HCl i 1N NaOH na 0,1-0,2 jedinice ispod željene vrednosti (6,7-7). Za sterilizaciju hranljive podloge korišće je membranski filter poroznosti 0,22 µm (hladna sterilizacija). Pripremljena podloga je čuvana u frižideru, a pre upotrebe je zagrevana u vodenom kupatilu na 37 °C.

### **14.3. Tretman ćelijskih linija**

Ispitivani izolati (ekstrakti i izolovani sekundarni metaboliti) najpre su rastvoreni u DMSO-u, do štok koncentracije od 10 mg/ml, nakon čega su u hranljivom medijumu rezblaženi do odgovarajućih radnih koncentracija. Za određivanje ćelijskog preživljavanja MTT testom korišćene su mikrotitar ploče sa 96 bunarića. Ćelije su ravnomerno zasejane u odgovarajućoj gustini. Gustina HeLa ćelija je bila 2000 ćelija po bunariću, gustina K562 ćelija 5000 ćelija po bunariću, gustina MCF7 ćelija 3000 ćelija po bunariću, a MRC-5 ćelija 5000 ćelija po bunariću u 100 µl podloge. Kao slepa proba korišćen je hranljivi medijum. 24 h nakon zasejavanja ćelija u bunariće sa malignim ćelijama dodato je po 50 µl pet različitih koncentracija ispitivanih izolata, dok je u kontrolne ćelije i slepe probe dodato po 50 µl svežeg hranljivog medijuma. Finalne koncentracije ispitivanih izolata primenjene na ciljne maligne ćelije bile su: 0-200 µg/ml za ekstrakte i 0-200 µM za ispitivane metabolite. Ćelije su inkubirane 72 h u inkubatoru na 37 °C pod istim uslovima koji su korišćeni i za održavanje ćelijskih linija. Nakon toga, u svaki bunarić dodato je po 20 µl rastvora 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida - MTT reagensa (5 mg MTT/ml fosfatnog pufera, PBS), a 4 h kasnije je u svaki bunarić dodato još 100 µl rastvora 10% natrijum-dodecilsulfata (SDS). Absorbanca je merena na ELISA čitaču, sledećeg dana, na 570 nm. Preživljavanje ćelija je izračunato korišćenjem sledeće formule:

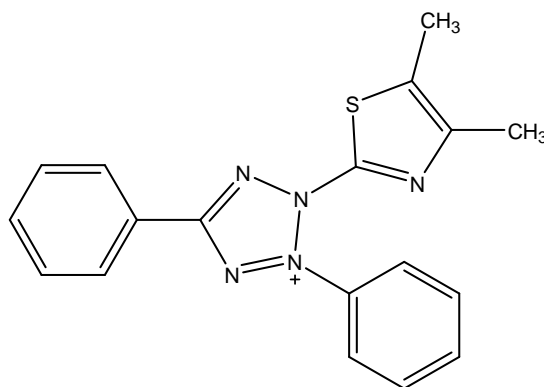
$$S(\%) = (A_t - A_s) \times 100 / (A_k - A_s)$$

gde su:  $A_s$ - absorbanca slepe probe;  $A_t$ -apsorbanca tretiranih uzoraka.

Rezultati su izraženi kao  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija ispitivanog uzorka koja za 50% inhibira ćelijsko preživljavanje u odnosu na netretiranu kontrolu).

#### 14.4. Određivanje ćelijskog preživljavanja – MTT test

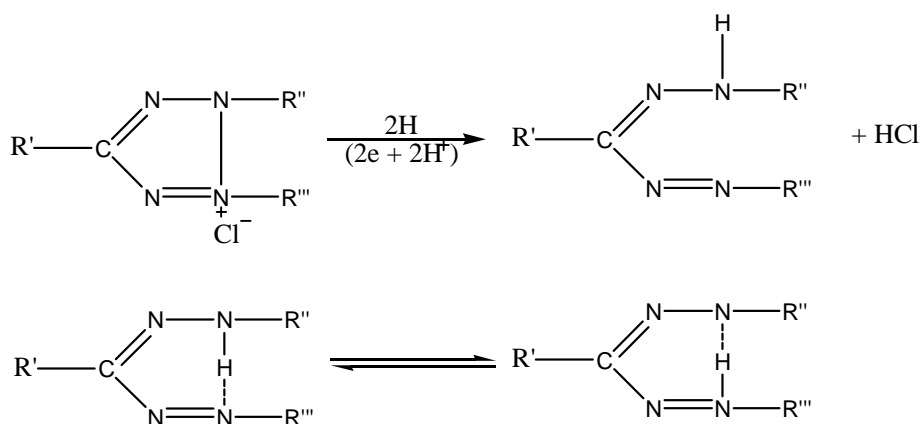
MTT test u mikrokulturi (eng. *Microculture Tetrazolium Test*) je kolorimetrijski test kojim se meri redukcija tetrazolijumske soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromida (MTT , Slika 6.) mitohondrijalnom sukcinat dehidrogenazom.



**Slika 6.** Hemijska struktura MTT-a



MTT nakon ulaska u ćeliju dolazi do mitohondrija, ulazi u njih i redukuje se do nerastvorljivog ljubičasto obojenog formazana.



**Slika 7.** Osnovna struktura tetrazolijumske soli i njena redukcija do obojenog formazana. Odmah nakon redukcije, tetrazolijumski prsten se otvara i kvaternarni amin se konvertuje u tercijarni amin. Jedan od amina se vezuje za atom vodonika.

Za rastvaranje kristala formazana u ćelijama koriste se različite supstance: organski rastvarači (npr. izopropanol), deterdženti kao što je 10% natrijum-dodecilsulfat (SDS) u 0,01 M HCl, ili TritonX-100, zatim, kombinacije propanol/etanol, i dimetilformamid/SDS, kao i mravlja kiselina u izopropanolu i na kraju dimetilsulfoksid (DMSO). Korišćenje više različitih metoda za rastvaranje formazana ima za cilj uklanjanje mogućih sistemskih grešaka u ovoj metodi. Intenzivna obojenost formazana koja se pri tom javlja, omogućuje korišćenje ove metode za citohemijsku kvantifikaciju broja metabolički aktivnih ćelija.

Citotoksični efekti izolata ispitivani su korišćenjem modifikovane metode po Mosmanu koju su dali Ohno i Abe (Ohno i Abe, 1991). Ova modifikacija podrazumeva korišćenje natrijum-dodecilsulfata (SDS) za rastvaranje ljubičastog formazana umesto dimetilsulfoksida (DMSO). Korišćenje DMSO uključuje odlivanje podloge iz uzoraka ćelija tretiranih bojom MTT. Ohno i Abe su svojom modifikacijom poboljšali osetljivost metode, i omogućili da se prevaziđu problemi kod odlivanja uzoraka što može dovesti do gubitka ćelija koje su bile u mitozu.

Nakon inkubacije tokom 72 h, u mikrotitar ploče dodavano je po 20 µl MTT rastvorenog u fosfatnom puferu do koncentracije od 5 mg/ml. Uzorci su inkubirani

naredna 4 h u inkubatoru, na 37 °C, u sredini obogaćenoj 5% CO<sub>2</sub>. Nakon toga, u uzorke je dodavano po 100 µl 10% SDS-a u 0,01 M HCl. Narednog dana merena je optička gustina uzoraka (eng. *optical density*, OD) na talasnoj dužini od 570 nm mikrotitar čitačem (eng. *ELISA reader*). Rezultati su obrađivani korišćenjem studentovog t-testa.

Novije kolorimetrijske metode, bazirane na redukciji tetrazolijumove soli, primenjuju se u formi mnogobrojnih komercijalnih kitova čiji je cilj merenje ćelijske proliferacije.

Ograničenje MTT testa je činjenica da se tetrazolijumska so metaboliše od strane mitohondrijalne dehidrogenaze, i da je samim tim u direktnoj vezi sa brojem mitohondrija, što može biti ograničavajući faktor u korišćenju ove metode.

## **REZULTATI I DISKUSIJA**

## 1. Hemijski sastav etarskih ulja

Etarska ulja izolovana iz podzemnih organa *F. heuffelii* bila su bledožuta. Prinos etarskih ulja izračunat je u odnosu na suv biljni materijal. Prinos je iznosio 0,25% (m/m) za podzemne organe *F. heuffelii* poreklom iz Sićevačke klisure, 0,08% (m/m) za podzemne organe ove vrste sakupljene u Đerdapskoj klisuri i 0,18% za podzemne organe ove vrste sakupljene u klisuri Peka.

Rezultati GC-FID i GC-MS analize etarskih ulja *F. heuffelii* dati su u Tabeli 12.

U etarskom ulju izolovanom iz podzemnih organa *F. heuffelii* poreklom iz Sićevačke klisure (uzorak F1) identifikovana su 73 jedinjenja, što je predstavljalo 89,1% ukupne količine etarskog ulja. Ulje je bilo bogato seskviterpenskim ugljovodonicima (48,7%), a imalo je i značajnu količinu fenilpropanskih jedinjenja (17,0%). Glavni sastojak bio je elemicin (12,5%), a po količini su sledili  $\beta$ -kopaen (9,5%),  $\beta$ -gurjunen (7,5%), kedrol (5,4%),  $\beta$ -kubeben (5,2%) i miristicin (4,5%).

Šezdeset sedam jedinjenja, odnosno 94,4% od ukupnog etarskog ulja, identifikovano je u ulju izolovanom iz podzemnih organa *F. heuffelii* poreklom iz Đerdapske klisure (uzorak F2). Ovaj uzorak karakterisao je visok sadržaj fenilpropanskih jedinjenja (56,0%), dok je sadržaj seskviterpenskih ugljovodonika (10,6%) bio oko pet puta manji u poređenju sa uzorkom F1. U uzorku F2 glavne komponente bili se elemicin (35,4%) i miristicin (20,6%).

U etarskom ulju izolovanom iz podzemnih organa *F. heuffelii* poreklom iz klisure Peka (uzorak F3), identifikovano je 66 jedinjenja, što je predstavljalo 93,1% ukupnog ulja. I u ovom uzorku najzastupljeniji su bili elemicin (16,8%) i miristicin (12,9%), a u značajnoj količini bio je prisutan i  $\alpha$ -pinen (10,3%).

Može se zaključiti da su testirana etarska ulja podzemnih organa *F. heuffelii* karakterisali fenilpropani i seskviterpenski ugljovodonici. Glavni sastojak sva tri uzorka bio je elemicin. Etarska ulja podzemnih organa ove vrste sakupljenih na tri lokaliteta u Republici Srbiji kvalitativno su bila slična. Međutim, treba napomenuti da dva seskviterpena  $\beta$ -kopaen,  $\beta$ -gurjunen, koji su u ulju F1 pratili po zastupljenosti elemicin, nisu identifikovana u uljima F2 i F3. Takođe, uočene su i značajne razlike u količini

pojedinih sastojaka u testiranim etarskim uljima. U cilju razumevanja i objašnjavanja ovih razlika potrebna su dodatna istraživanja.

Analizom rezultata dosadašnjih istraživanja sastava etarskih ulja podzemnih organa predstavnika roda *Ferula* može se zaključiti da ne postoje jasna pravila u pogledu zastupljenosti pojedinih klasa jedinjenja.

Monoterpeni ugljovodonici su predstavljali glavne sastojke etarskih ulja podzemnih organa *F. jaeschkeana* (53,03%) i *F. gummosa* (69,5%), a najzastupljeniji predstavnici ove klase jedinjenja bili su  $\alpha$ -pinen (8,3%), *p*-cimen (14,3%), limonen (26%) u ulju *F. jaeschkeana*, odnosno  $\beta$ -pinen (58,8%), mircen (3,7%) i  $\alpha$ -pinen (2,6%) u ulju *F. gummosa* (Sahebkar i Iranshahi, 2011). Visok sadržaj monoterpena može se uočiti i u etarskom ulju korena *F. ovina* u kome su dominirali limonen (14,2%),  $\alpha$ -pinen (13,8%), mircen (10,0%) i kamfen (9,5%) (Karim i Bhatti, 1978). Veoma visok sadržaj  $\alpha$ -pinena uočen je u etarskom ulju korena *F. penninervis* (80,2%) i *F. pseudoreoselinum* (oko 90%) (Goryaev i sar., 1971; Tsoukervanik i sar., 1935). Nasuprot tome, etarska ulja korena *F. glauca* i *F. latisecta* nisu u svom sastavu imala nijedan monoterpen u količini iznad 2%, a etarsko ulje korena *F. persica* nije uopšte sadržalo monoterpeneske ugljovodonike. Oksidovani monoterpeni su predstavljali najzastupljeniju klasu jedinjenja samo u etarskom ulju nadzemnih delova *F. ovina*. U izvesnom procentu bili su prisutni u uljima *F. jaeschkeana* (21,5%), *F. feruloides* (5,7%) i *F. gummosa* (7,1%). Generalno, njihova zastupljenost u do sada analiziranim etarskim uljima podzemnih organa vrsta ovog roda je uglavnom bila mala, a u uljima izolovanim iz korena *F. glauca* i *F. latisecta* nije identifikovan nijedan oksidovani monoterpen.

Seskviterpeni ugljovodonici su predstavljali najzastupljeniju klasu u etarskom ulju izolovanom iz korena *F. glauca* (56,1%). Ovo etarsko ulje je imalo najraznovrsniji sastav seskviterpenske frakcije u poređenju sa uljima dobijenim i iz drugih organa *Ferula* vrsta. Najzastupljeniji seskviterpeni u ovom ulju bili su (*E*)- $\beta$ -farnezen (10,0%), *epi*-zonaren (7,1%) i  $\gamma$ -kadinen (6,8%). Oksidovani seskviterpeni su predstavljali glavnu frakciju u etarskom ulju izolovanom iz korena *F. feruloides* (77,6%) u kome je glavni sastojak bio gvajol (58,8%), a sledili su po količini (*E*)-nerolidol (10,2%) i  $\alpha$ -eudezmol (3,0%). Ovo etarsko ulje je imalo najveći sadržaj oksidovanih seskviterpena u odnosu na sva etarska ulja do sada izolovana iz različitih organa vrsta roda *Ferula*. Nasuprot tome, u etarskim uljima izolovanim iz korena *F. persica* i *F. latisecta* nisu

identifikovani predstavnici ove grupe sekundarnih metabolita (Sahebkar i Iranshahi, 2011). Visok sadržaj oksidovanih seskvitepena (20,7%) uočen je i u ulju rizoma i korena *F. hermonis*, u kome je  $\alpha$ -bisabolol bio zastupljen u značajnim količinama (11,1%) (Al-Ja'fari i sar., 2011).

Fenilpropani su u visokom procentu bili zastupljeni u etarskom ulju izolovanom iz korena *F. glauca* (16,4%). Glavni sastojci u ovom etarskom ulju bili su elemicin (9,0%) i miristicin (7,4%) (Maggi i sar., 2009), slično uljima podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* testiranim u okviru ove disertacije. U etarskom ulju korena *F. persica* var. *persica* potvrđeno je značajno prisustvo miristicina (8,9%), dok je sadržaj elemicina bio relativno mali (1,8%) (Iranshahi i sar., 2006). Miristicin je bio i jedan od glavnih metabolita prisutnih u etarskom ulju korena *F. oopoda* (11,2 %) (Al-Ja'fari i sar., 2011).

U etarskim uljima nekih drugih vrsta roda *Ferula*, pored seskviterpena, fenilpropana i/ili monoterpena uočeno je i prisustvo jedinjenja sa sumporom koja su u pojedinim uljima bila prisutna u značajnim količinama. Zbog toga neki autori upravo dele sva etarska ulja izolovana iz vrsta roda *Ferula* na ona u kojima ima i na ona u kojima nema jedinjenja sa sumporom. U uljima izolovanim iz korena *F. persica* i *F. latisecta* jedinjenja sa sumporom su predstavljala najzastupljeniju grupu metabolita (28,6 i 75,5%, redom). Takođe, sadržaj ovih jedinjenja bio je visok i u uljima dobijenim destilacijom oleogumirezina *F. fukanensis*, *F. sinkiangensis* i *F. assa-foetida*. Zanimljiva je činjenica da su polisulfidi, kada su bili prisutni u nekom etarskom ulju, predstavljali ujedno i najzastupljeniju grupu sekundarnih metabolita. Najčešći predstavnici u etarskim uljima vrsta roda *Ferula* su svakako *sec*-butil-(*Z*)-propenil-disulfid i *sec*-butil-(*E*)-propenil-disulfid (Sahebkar i Iranshahi, 2011). Etarsko ulje korena vrste *F. persica* var. *persica* je, pored sadržaja miristicina, karakterisao i visok sadržaj dimetil-trisulfida (18,2%) i dimetil-tetrasulfida (7,6%) (Iranshahi i sar., 2006). U testiranim etarskim uljima podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* nije uočeno prisustvo jedinjenja sa sumporom.

**Tabela 12.** Hemijski sastav etarskih ulja podzemnih organa *F. heuffelii*

Redni broj	Jedinjenje	KI Exp <sup>a</sup>	Sadržaj (%)		
			F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>b</sup>	F3 <sup>b</sup>
1	$\alpha$ -Pinen	938	3,3	4,0	10,3
2	Kamfen	953	0,6	1,1	0,9
3	$\beta$ -Pinen	980	1,0	0,9	1,7
4	6-Metil-5-hepten-2-on	987	-	tr	tr
5	2-Pentilfuran	992	0,3	tr	tr
6	<i>n</i> -Oktanal	999	tr	tr	tr
7	<i>n</i> -Dekan	1000	tr	-	-
8	$\alpha$ -Felandren	1002	0,4	tr	tr
9	<i>p</i> -Cimen	1027	0,5	0,9	tr
10	Limonen	1032	0,4	0,5	0,9
11	$\beta$ -Felandren	1032	0,4	0,5	0,7
12	( <i>Z</i> )- $\beta$ -Ocimen	1035	tr	tr	-
13	$\gamma$ -Terpinen	1059	tr	1,2	tr
14	3-Metildekan	1072	0,3	1,0	0,8
15	3-Oktilacetat	1080	0,3	0,9	1,0
16	Terpinolen	1090	tr	tr	0,3
17	<i>p</i> -Cimenen	1091	tr	-	-
18	<i>n</i> -Undekan	1100	tr	tr	tr
19	<i>n</i> -Nonanal	1100	tr	tr	tr
20	( <i>2E</i> )-Nonen-1-al	1163	tr	0,4	0,3
21	Borneol	1168	tr	tr	0,3

Redni broj	Jedinjenje	KI Exp <sup>a</sup>	Sadržaj		
			(%)		
			F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>b</sup>	F3 <sup>b</sup>
22	Timol, metiletar	1233	tr	tr	tr
23	Karvakrol, metiletar	1241	tr	0,4	0,3
24	3-Metildodekan	1273	0,4	2,0	1,8
25	Bornilacetat	1286	0,6	1,9	1,6
26	<i>n</i> -Tridekan	1300	tr	tr	0,3
27	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> )-Dekadienal	1317	tr	tr	tr
28	Izolen	1374	tr	tr	0,5
29	$\alpha$ -Kopaen	1377	1,1	0,5	1,0
30	$\beta$ -Kubeben	1388	5,2	-	-
31	$\beta$ -Elemen	1390	2,3	-	-
32	<i>n</i> -Tetradekan	1400	tr	tr	tr
33	Ciperen	1404	1,0	-	-
34	Sibiren	1405	0,4	-	-
35	$\alpha$ -Gurjunen	1409	0,6	0,5	1,0
36	Aristolen	1419	1,3	-	-
37	$\beta$ -Duprezianen	1423	1,0	-	-
38	$\beta$ -Kopaen	1434	9,5	tr	tr
39	$\beta$ -Gurjunen	1437	7,5	tr	tr
40	Aromadendren	1440	1,9	1,8	4,4
41	Geranilaceton	1455	-	0,8	0,9
42	( <i>E</i> )- $\beta$ -Farnezen	1455	0,6	tr	tr
43	<i>allo</i> -Aromadendren	1461	tr	tr	0,7



Redni broj	Jedinjenje	KI Exp <sup>a</sup>	Sadržaj		
			(%)		
			F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>b</sup>	F3 <sup>b</sup>
44	4,5-di- <i>epi</i> -Aristolohen	1471	tr	-	-
45	<i>trans</i> -Kadina-1(6),4-dien	1474	1,0	tr	0,7
46	$\gamma$ -Murolen	1477	0,5	0,7	1,4
47	$\beta$ -Selinen	1486	2,3	tr	0,7
48	Viridifloren	1495	3,2	2,1	4,3
49	Epizonaren	1498	0,8	tr	1,5
50	$\alpha$ -Murolen	1499	1,1	1,7	2,1
51	$\beta$ -Bisabolen	1509	0,5	0,8	0,8
52	$\gamma$ -Kadinen	1514	2,2	1,6	2,9
53	Miristicin	1523	4,5	20,6	12,9
54	$\delta$ -Kadinen	1525	3,3	-	-
55	$\alpha$ -Kadinen	1539	0,5	0,3	1,0
56	$\alpha$ -Kopaen-11-ol	1542	-	tr	0,7
57	$\alpha$ -Kalakoren	1545	0,9	0,6	tr
58	<i>epi</i> -Globulol	1559	1,8	-	-
59	Elemicin	1560	12,5	35,4	16,8
60	( <i>E</i> )-Nerolidol	1568	-	0,8	0,9
61	Viridiflorol	1584	1,9	1,0	0,9
62	Kedrol	1599	5,4	5,1	5,7
63	<i>epi</i> -Kedrol	1620	1,8	-	-
64	1,10-di- <i>epi</i> -Kubenol	1628	0,4	tr	0,5
65	<i>epi</i> - $\alpha$ -Kadinol	1641	0,6	0,7	1,7

Redni broj	Jedinjenje	KI Exp <sup>a</sup>	Sadržaj		
			(%)		
			F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>b</sup>	F3 <sup>b</sup>
66	<i>epi</i> - $\alpha$ -Murolol	1642	0,6	tr	0,7
67	$\alpha$ -Kadinol	1655	tr	tr	tr
68	6,8-Heptadekadien	1670	tr	0,4	0,6
69	<i>n</i> -Tetradekanol	1678	-	0,4	0,6
70	$\alpha$ -Bisabolol	1683	-	tr	tr
71	<i>n</i> -Heptadekan	1700	0,4	0,7	1,2
72	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> )-Farnezol	1716	0,4	tr	0,2
73	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> )-Farnezol	1748	0,7	tr	0,2
74	<i>n</i> -Nonadekan	1900	0,9	1,3	2,2
75	<i>n</i> -Eikozan	2000	tr	tr	0,4
76	<i>n</i> -Heneikozan	2100	tr	0,4	0,7
77	<i>n</i> -Trikozan	2300	tr	0,5	0,8
78	<i>n</i> -Tetrakozan	2400	tr	tr	tr
79	<i>n</i> -Pentakozan	2500	tr	tr	0,3
Zbirno					
	Monoterpenski ugljovodonici		6,6	9,1	14,8
	Oksidovani monoterpeni		tr.	0,4	0,6
	Seskviterpenski ugljovodonici		48,7	10,6	23,0
	Oksidovani seskviterpeni		13,6	7,6	11,5

Redni broj	Jedinjenje	KI Exp <sup>a</sup>	Sadržaj		
			(%)		
			F1 <sup>b</sup>	F2 <sup>b</sup>	F3 <sup>b</sup>
	Fenilpropani		17,0	56,0	29,7
	Ostalo		3,2	10,7	13,5
	Ukupno identifikovano		89,1	94,4	93,1

<sup>a</sup> KI exp- Relativni retencioni indeksi izračunati preko serije homologih n-alkana na HP-5MS koloni.

<sup>b</sup> %- Relativni udeo komponente (procenat površine pika) u odnosu na ukupnu površinu pikova hromatograma detektovanog FID detektorom.

<sup>c</sup> U tragovima (< 0,05%).

## 2. Identifikacija sekundarnih metabolita izolovanih iz hloroformskog ekstrakta

### 2.1. Jedinjenje 1 (latifolon)

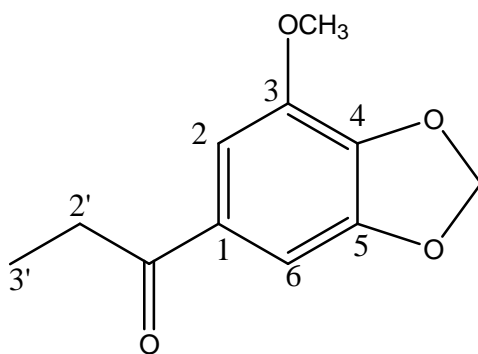
Jedinjenje **1** eluirano je u frakcijama 84-87 sa kolone silikagela (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcije 84 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 1*): acetonitril:voda (70:30-10:90) u toku 15 min izolovano je 1,4 mg jedinjenja **1** u obliku bezbojnih kristala. Prečišćavanjem frakcije 87 istom metodom izolovano je dodatnih 0,9 mg ovog jedinjenja.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 51 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  209,0802 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 209,0814; greška -5,7 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **1** odgovara molekulska formula C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slika 52 i 53 u Prilogu), uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama latifolona, tj. 4,5-metilendioksi-3-metoksi-propiofenona (Slika 8), jedinjenja koje je prethodno već izolovano iz podzemnih organa vrsta *F. sinaica*, *F. ugamica* (Kadyrov i Nikonov, 1973; Al-Hazimi, 1986) i *F. communis* (De Pasqual i sar., 1986). NMR signali ukazuju na prisustvo 1,3,4,5-tetrasupstituisanog benzenovog prstena ( $\delta_H$  7,28 i 7,15). Podaci iz snimljenog 1D NMR spektra dati su u Tabeli 13.

**Tabela 13.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR spektra (400 MHz), snimljenog u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)
1	-
2	7,28 (1H), <i>s</i>
3	-
4	-
5	-
6	7,15 (1H), <i>br s</i>
1'	-
2'	2,92 (2H), <i>q</i> (7,2)
3'	1,21 (3H), <i>t</i> (7,3)
—OCH <sub>2</sub> O—	6,06 (2H), <i>s</i>
—OCH <sub>3</sub>	3,95 (3H), <i>s</i>



**Slika 8.** Jedinjenje 1 (latifolon)

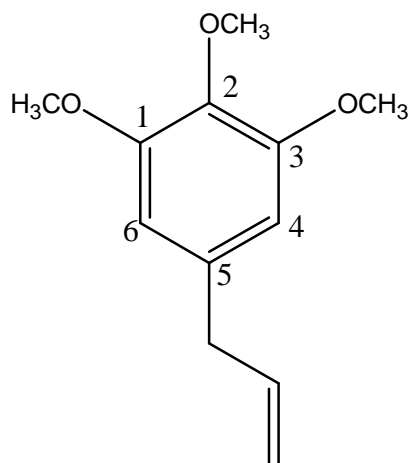
## 2.2. Jedinjenje 2 (elemicin)

Jedinjenje 2 eluirano je u frakcijama 85-87 sa kolone silikagela (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcije 87 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 1*): acetonitril:voda (70:30-10:90) u toku 15 min izolovano je 0,6 mg jedinjenja 2 u obliku bezbojne tečnosti.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru, signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  209,0826 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 209,0736), pa je zaključeno da jedinjenju 2 odgovara molekulska formula C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>4</sub>.

Analizom MS spektra (Slika 54 u Prilogu) uočena je podudarnost sa masenim spektralnim karakteristikama elemicina, odnosno 1,2,3-trimetoksi-5-(2-propen-1-il)-benzena (Slika 9). Ovo isparljivo jedinjenje je prethodno identifikovano u etarskim uljima različitih vrsta roda *Ferula*: korena *F. communis* (De Pasqual i sar., 1986), *F. persica* (Javidnia i sar., 2005, Iranshahi i sar., 2006), *F. glauca* (Maggi i sar., 2009) i nadzemnih delova *F. foetida* (Kanani i sar., 2011).

Prisustvo ovog jedinjenja prethodno je u okviru ove doktorske disertacije potvrđeno i u etarskom ulju srpske velestike, *F. heuffelii*.



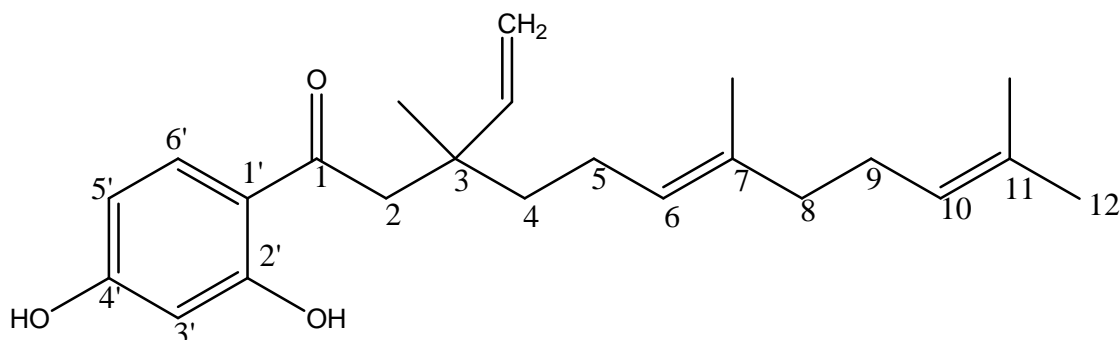
**Slika 9.** Jedinjenje 2 (elemicin)

### 2.3. Jedinjenje 3 ((6E)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on)

Jedinjenje **3** izolovano je iz frakcija 92-95 dobijenih sa kolone silikagela (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja metodom semipreparativne HPLC (*metoda 2*): acetonitril-metanol(6:1):voda (80:20-10:90) u toku 10 min izolovano je 5,8 mg jedinjenja **3**. Izolovano jedinjenje bilo je smolaste konzistencije i žućkastobeličaste boje.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 55 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  357,2449 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 357,2430; greška 5,3 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **3** odgovara molekulska formula C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slike 56 i 57 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama (6E)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-ona (Slika 10), jedinjenja koje je prethodno već izolovano iz korena *F. feruloides* (Kojima i sar., 1998). Podaci iz snimljenog <sup>1</sup>H NMR spektra dati su u Tabeli 14.



**Slika 10.** Jedinjenje **3** ((6E)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on)

**Tabela 14.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR spektra (400 MHz), snimljenog u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)
1	-
2	2,89 (2H), <i>d</i> (2,0)
3	-
4	1,53 <i>m</i>
5	1,95*
6	5,1*
7	-
8	1,95*
9	2,05 (2H), <i>m</i>
10	5,1*
11	-
12	1,68 (3H), <i>s</i>
3Me	1,17 (3H), <i>s</i>
7Me	1,59 (3H), <i>s</i>
11Me	1,61 (3H), <i>s</i>
vinil-CH	5,88 (1H), <i>dd</i> (17,5; 10,8)
vinil-CH <sub>2</sub>	4,96 (1H), <i>br d</i> (17,4)
	5,01 (1H), <i>br d</i> (10,7)
1'	-
2'	-
3'	6,33* (1H)
4'	-
5'	6,33* (1H)
6'	7,62 (1H), <i>d</i> (8,8)

\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima

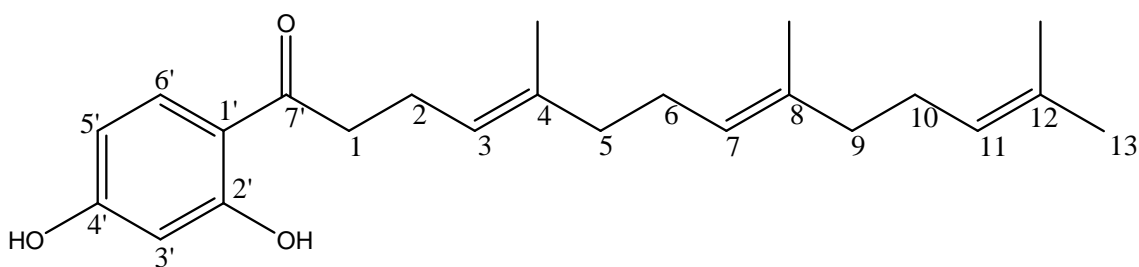


## 2.4. Jedinjenje 4 (džamiron)

Jedinjenje **4** izolovano je takođe iz frakcija 92-95 dobijenih sa kolone silikagela (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja metodom semipreparativne HPLC (*metoda 2*): acetonitril-metanol (6:1):voda (80:20-10:90) u toku 10 min izolovano je 5,8 mg jedinjenja **4**. Izolovano jedinjenje bilo je smolaste konzistencije i žutobele boje.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 58 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  357,2417 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 357,2430; greška -3,6 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **4** odgovara molekulska formula C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>O<sub>3</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (Slike 59, 60 i 61 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama džamirona, tj. (4*E*,8*E*)-1-(2,4-dihidroksifenil)-5,9,13-trimetiltetradeka-4,8,12-trien-1-ona (Slika 11), jedinjenja koje je prethodno već izolovano iz korena vrsta *F. feruloides* (Kojima i sar., 1998), *F. mongolica*, *F. dshaudshamyr* (Choudhary i sar., 2001). Podaci iz snimljenih 1D i 2D NMR spektara dati su u Tabeli 15. <sup>1</sup>H NMR spektar ukazuje na prisustvo signala sistema tipičnih za trisupstituisano benzenovo jezgro. Za razliku od spektra jedinjenja **4**, u spektru jedinjenja **3** uočavaju se signali koji potiču od nezasićenja na C3-C4 ( $\delta_H$  4,96 i 5,01) u okviru farnezilne grupe/lanca (sistema) i prisustvo signala kvarternernog ugljenikovog atoma C-3.



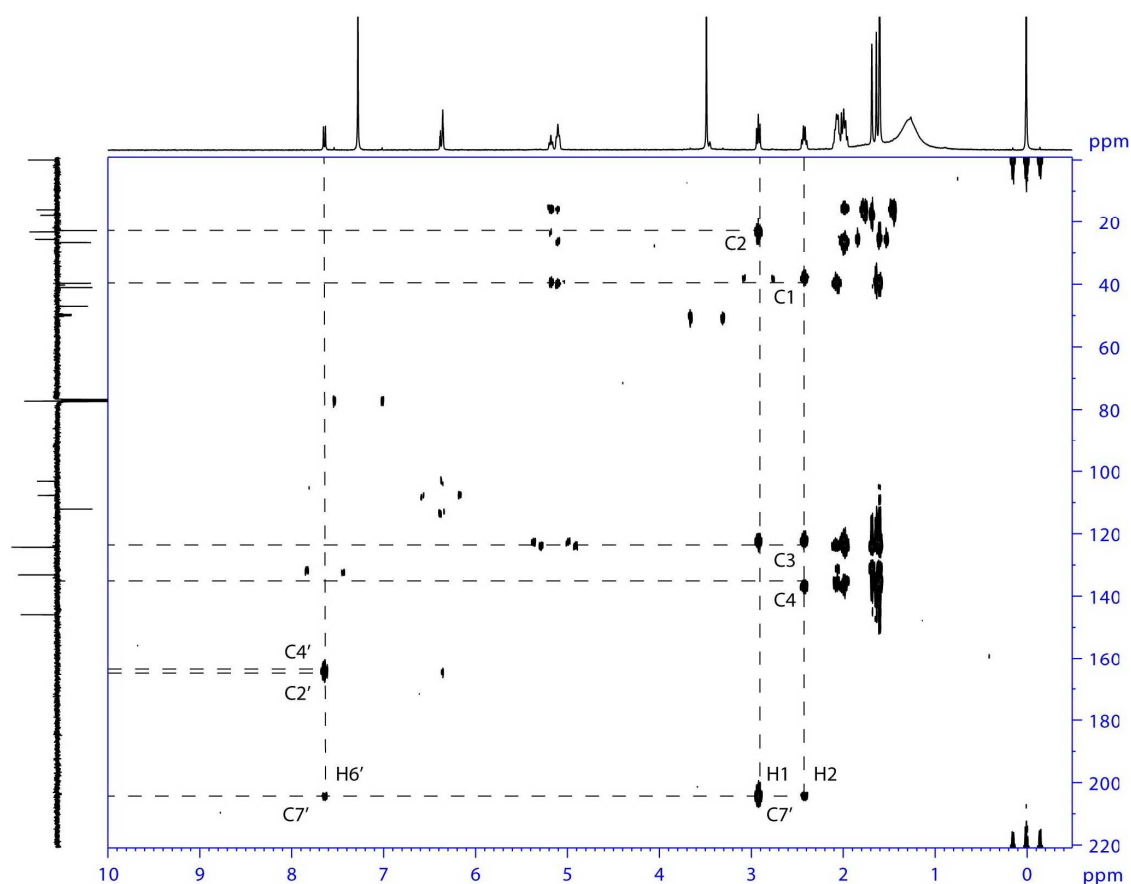
Slika 11. Jedinjenje **4** (džamiron)

**Tabela 15.** Podaci dobijeni iz NMR spektara:  $^1\text{H}$  (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  i gHMBC snimljenih u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)	$\delta_{\text{C}}$	gHMBC
1	2,91 (2H), <i>t</i> , (7,6)	39,60	2, 3, 7'
2	2,41 (2H), <i>q</i> , (7,5)	23,30	1, 3, 4, 7'
3	5,17 (1H), <i>t</i> , (7,2)	122,40	1, 2, 4Me
4	-	136,67	-
5	1,97* (2H)	39,65	4, 6, 4Me
6	2,04* (2H)	26,49	5, 7, 8
7	5,10*	124,00	5, 6, 8Me
8	-	135,40	-
9	1,97* (2H)	37,97	8, 10, 8Me
10	2,04* (2H)	26,71	8, 11, 12
11	5,10*	124,30	n.d.
12	-	132,20	-
13	1,67 <i>s</i> (3H)	25,63	10, 11, 12
4Me	1,63 <i>s</i> (3H)	15,98	n.d.
8Me	1,59* <i>s</i> (3H)	15,95	7
12Me	1,59* <i>s</i> (3H)	17,62	10, 11, 12, 13
1'	-	113,2	-
2'	-	164,8	-
3'	6,33 (1H) <i>d</i> (2,4)	103,03	2', 4'
4'	-	164,6	-
5'	6,37 (1H) <i>dd</i> (8,7, 2,4)	108,04	1'
6'	7,63 (1H), <i>d</i> (8,8)	n.d.	2', 4', 7'
7'	-	204,36	1, 2, 6'

\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima;

n.d. – nije detektovan



**Slika 12.**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektar jedinjenja 4. Projekcija po F1 osi predstavlja snimljeni DEPTQ-135 spektar, a po F2 protonski spektar. Na slici su prikazane neke od važnijih korelacija.

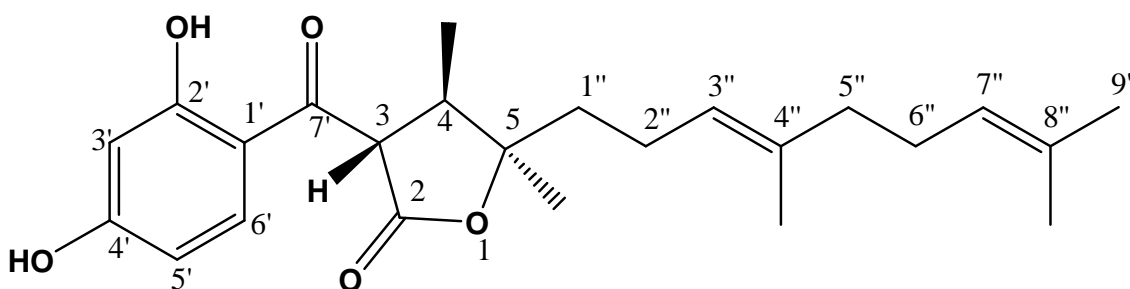
Iz  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC spektra (Slika 12), može se primetiti postojanje korelacija sa ugljenikovim atomima koji nisu inače detektovani u DEPTQ spektru (ispod 150 ppm) ili su dali pikove niskog intenziteta (oko 100 ppm). Na ovaj način indirektno su detektovani odgovarajući ugljenikovi atomi, izuzev C-6'. U HMBC spektru jasno se može uočiti korelacija protona H-6' sa ugljenicima C-2' (sprezanje preko tri veze), C-4' (sprezanje preko tri veze) i C-7' (sprezanje preko tri veze), kao i oba protona H-2 sa ugljenicima C-1 (sprezanje preko dve veze), C-3 (sprezanje preko dve veze) i C-4 (sprezanje preko tri veze). Takođe, u spektru se jasno uočava korelacija ugljenika C-7' sa protonima H-1 (sprezanje preko dve veze), H-2 (sprezanje preko tri veze) i već spomenutom protonu H-6' (sprezanje preko tri veze).

## 2.5. Jedinjenje 5 ((3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-on)

Jedinjenje 5 eluirano je u frakcijama 121-137 sa kolone silikagela (Odeljak 5.1). Ove frakcije su spojene (676 mg), nanete na nov stub silikagela i razdvajanjem dobijene 173 nove frakcije (A1-A173). Nakon prečišćavanja frakcija A90-A111 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 3*): acetonitril:voda (55:45-10:90) u toku 15 min izolovano je 0,6 mg jedinjenja 5. Izolovano jedinjenje bilo je smolaste konzistencije i žutobele boje.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 62 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  401,2323 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 401,2328; greška -1,2 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju 5 odgovara molekulska formula C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slike 63 i 64 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama (3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-ona (Slika 13), jedinjenja koje je prethodno već izolovano iz korena *F. feruloides* (Kojima i Isaka, 1999). Snimljeni spektralni podaci dati su u Tabeli 16. <sup>1</sup>H NMR signali ukazuju na prisustvo 1,2,4-trisupstituisanog benzenovog prstena ( $\delta_H$  6,37; 6,42 i 7,66), tri olefinske metil grupe ( $\delta_H$  1,62; 1,64 i 1,69) i dve trisupstituisane dvostruke veze ( $\delta_H$  5,11 i 5,12).



**Slika 13.** Jedinjenje 5 ((3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-on)

**Tabela 16.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR spektra (400 MHz), snimljenog u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)
2	-
3	4,24 (1H), <i>d</i> (12,0)
4	3,09 (1H), <i>m</i>
5	-
1'	-
2'	-
3'	6,37 (1H), <i>br s</i>
4'	-
5'	6,42 (1H), <i>d</i> (9,8)
6'	7,66 (1H) <i>d</i> (8,9)
1''	n.d.
2''	2,20 (2H); <i>m</i>
3''	5,12*
4''	-
5''	2,01 <i>m</i>
6''	2,08 <i>m</i>
7''	5,11*
8''	-
9''	1,69 <i>s</i>
4Me	1,08 <i>d</i> (6,9)
5Me	1,52, (3H), <i>s</i>
4''Me	1,64 (3H), <i>s</i>
8''Me	1,62 (3H), <i>s</i>

\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima;

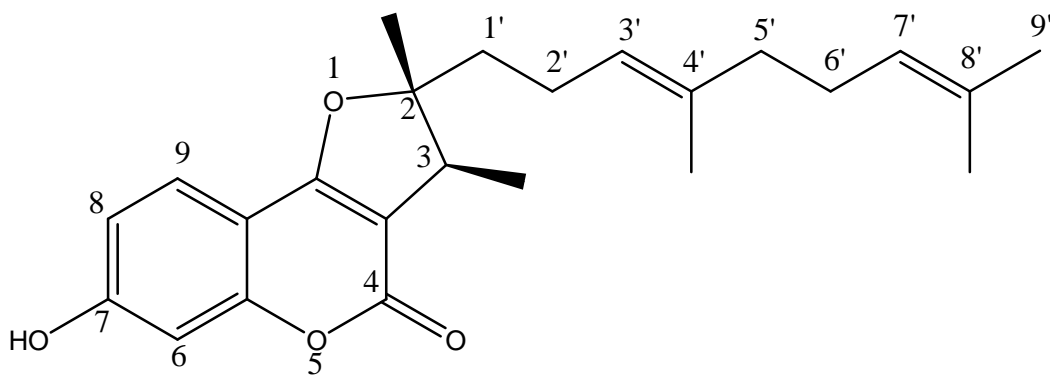
n.d. – nije detektovan

## 2.6. Jedinjenje 6 ((2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin)

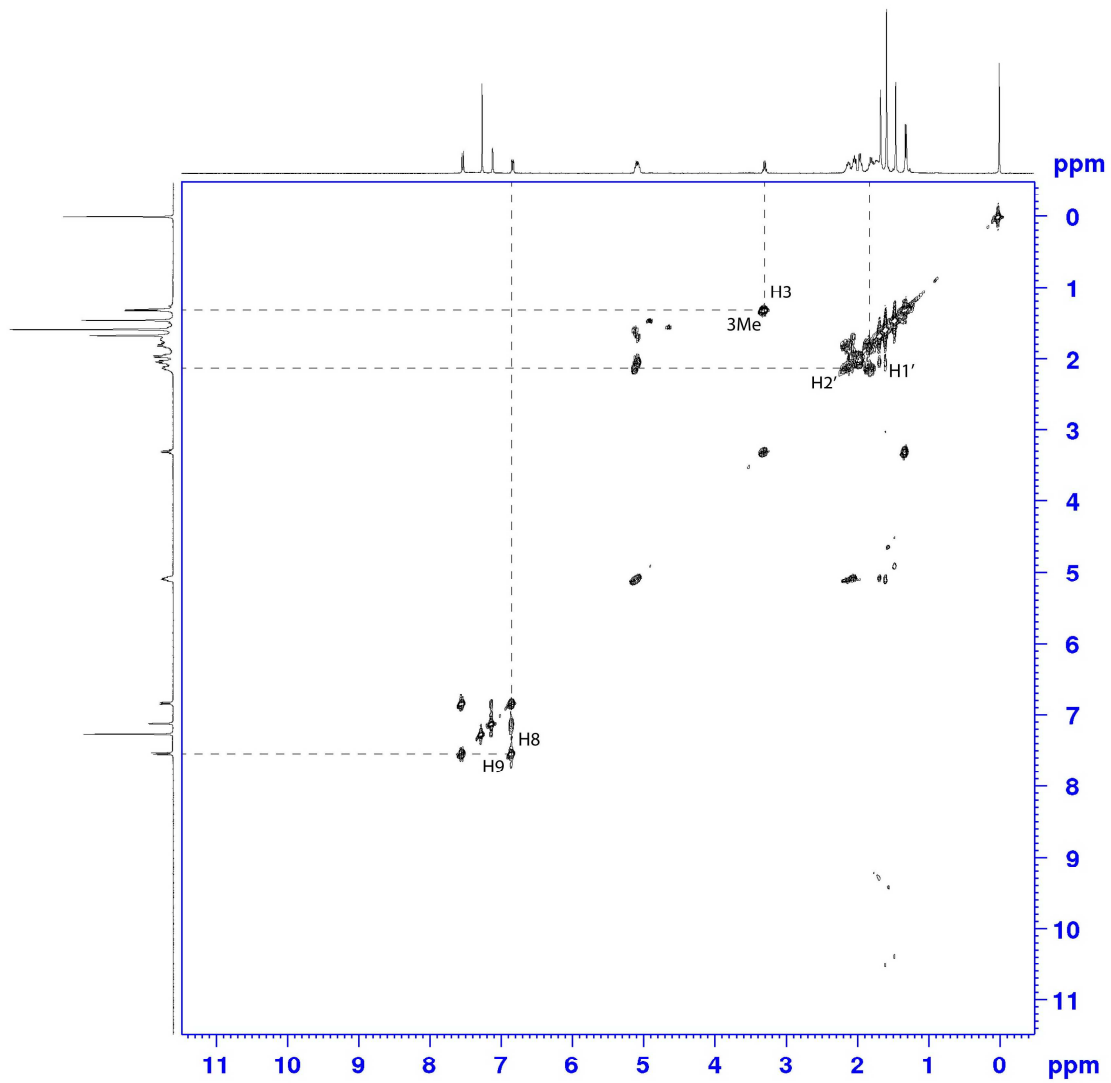
Jedinjenje 6 eluirano je u frakcijama 139-163 sa stuba silikagela. Frakcije 139-148 su spojene (143 mg), ponovo razdvajane na stubu silikagela i dobijeno je 158 novih frakcija (B1-B158) (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcija B25-B37 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 4*): acetonitril:voda (40:60-10:90) u toku 10 min izolovano je 2,1 mg jedinjenja 6. Izolovano jedinjenje je bilo smolasto i žutobele boje. Frakcije 148-163 su takođe spojene i razdvajane na stubu silikagela (388 mg) i dobijeno je 170 frakcija (C1-C170). Iz frakcija C70-C90, direktno sa kolone, sakupljeno je 287,3 mg jedinjenja 6.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 65 u Prilogu), signal molekuskog jona nalazi se na *m/z* 383,2216 (preračunato za [M + H]<sup>+</sup>, 383,2222; greška -1,6 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju 6 odgovara molekulska formula C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR spektara (Slike 66, 67 i 68 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (Slika 14), prethodno izolovanog iz korena vrste *F. feruloides* (Isaka i sar., 2001). <sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C NMR signali ukazuju na prisustvo 1,2,4-trisupstituisanog benzenovog prstena ( $\delta_{\text{H}}$  6,84; 7,12 i 7,54), tri olefinske metil grupe ( $\delta_{\text{H}}$  1,59; 1,59 i 1,67), dve trisupstituisane dvostruke veze čiji su se signali preklapili ( $\delta_{\text{H}}$  5,09), kao i kvarternernog ugljenika C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  97,31) (Tabela 17). Iz 2D COSY spektra (Slika 15) može se jasno uočiti međusobna korelacija vodonika H-8 i H-9 kao i korelacija protona H-3 i protona metil grupe vezane za ugljenik C-3



**Slika 14.** Jedinjenje **6** ((2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin)



**Slika 15.** 2D COSY spektar jedinjenja **6**



**Tabela 17.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz),  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) i 2D COSY spektara snimljenih u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)	$\delta_{\text{C}}$	COSY
2	-	97,31	-
3	3,30 (1H), <i>q</i> (7,0)	41,78	3Me
3a	-	103,00	-
4	-	162,87	-
5a	-	156,62	-
6	7,12 (1H), <i>d</i> (2,4)	103,24	-
7	-	161,31	-
8	6,84 (1H), <i>dd</i> (8,6; 2,3)	113,66	9
9	7,54 (1H), <i>d</i> (8,6)	124,14	8
9a	-	105,5	-
9b	-	166,46	-
1'	1,81 (2H), <i>m</i>	41,70	2'
2'	2,12 (2H), <i>m</i>	22,08	1',3'
3'	5,09*	123,03	2'
4'	-	135,95	-
5'	1,95 (2H), <i>m</i>	39,59	7'
6'	2,03 (2H), <i>m</i>	26,58	7'
7'	5,09*	124,2	6',5'
8'	-	131,39	-
9'	1,67 (3H) <i>s</i>	25,65	-
2Me	1,45 (3H), <i>s</i>	20,43	-
3Me	1,31; 3H; <i>d</i> (7,0)	14,11	3
4'Me	1,59 (3H), <i>s</i>	15,97	-
8'Me	1,59 (3H), <i>s</i>	17,65	-

\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima

## 2.7. Jedinjenje 7 (samarkandinacetat)

Jedinjenje 7 eluirano je u frakcijama 149-163 sa stuba silikagela. Ove frakcije su spojene, ponovo razdvajane na stuba silikagela (388 mg) i dobijeno 170 novih frakcija (C1-C170) (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcija C109-C121 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 5*): acetonitril:voda (50:50-10:90) u toku 15 min, izolovano je 2,2 mg jedinjenja 7. Izolovano jedinjenje bilo je smolaste konzistencije i žutobele boje.

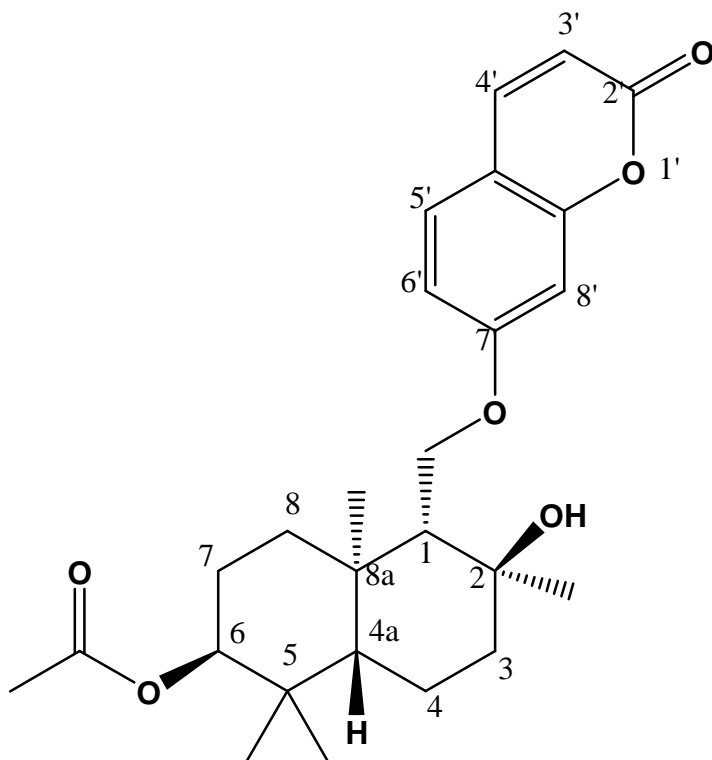
U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 69 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  443,2444 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 443,2434; greška 2,3 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju 7 odgovara molekulska formula C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>6</sub>. Najintenzivniji signal u spektru koji se nalazi na  $m/z$  383,2216 potiče od fragmenta koji nastaje gubitkom acetatne grupe. U spektru se još može uočiti i signal na  $m/z$  465,2266 koji potiče od aduktne grupe  $[M + Na]^+$ .

Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slike 70 i 71 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama samarkandinacetata, tj. (2*S*,4*aR*,5*R*,6*S*,8*aS*)-6-hidroksi-1,1,4*a*,6-tetrametil-5-[[2-okso-2H-hromen-7-il]oksi]metil}dekahidro-2-naftalenilacetata (Slika 16), prethodno izolovanog iz korena vrsta *F. persica*, *F. pseudooreoselinum*, *F. teterrima* i *F. lypskii* (Saidkhodzhaev i sar., 1991b; Sokolova i sar., 1978; Bagirov i sar., 1977; Kir'yalov i Bukreeva, 1972). Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra mogu se uočiti singleti na 0,89, 0,91 i 0,97 ppm koji potiču od metil grupa koje se nalaze na kvaternim C atomima, kao i singlet na 1,26 ppm koji potiče od metil grupe na C-2. Na hemijskom pomeranju od 2,08 ppm može se uočiti singlet koji potiče od metil grupe iz acetyl ostatka. Protoni na metilenskoj grupi vezanoj za C-1 uočavaju se kao dubleti dubleta na 4,20 i 4,37 ppm, dok se signal protona na C-1 uočava kao široki singlet na 4,67 ppm. Protoni iz 7-hidroksikumarinskog jezgra se mogu uočiti kao dubleti u opsegu pomeranja od 6,26 do 7,37 ppm (Tabela 18).

**Tabela 18.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR spektra (400 MHz), snimljenog u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)
1	1,30-2,00*
2	-
3	1,30-2,00*
4	1,30-2,00*
4a	1,30-2,00*
5	-
6	4,67 (1H), <i>br s</i>
7	1,30-2,00*
8	1,30-2,00*
8a	-
1'	-
2'	-
3'	6,26 (1H), <i>d</i> (9,5)
4'	7,63 (1H), <i>d</i> (9,4)
5'	7,37 (1H), <i>d</i> (8,6)
6'	6,87 <i>dd</i> (4,2, 2,0)
7'	-
8'	6,91 (1H), <i>d</i> (2,0)
2Me	1,26 (3H), <i>s</i>
5Me	0,89 (3H), <i>s</i>
5Me	0,91 (3H), <i>s</i>
OAc	2,08 (3H), <i>s</i>
8aMe	0,97 (3H), <i>s</i>
7'OCH <sub>2</sub>	4,20 (1H), <i>dd</i> (9,8, 5,3)
7'OCH <sub>2</sub>	4,37 (1H), <i>dd</i> (9,8, 5,0)

\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima



**Slika 16.** Jedinjenje 7 (samarkandinacetat)

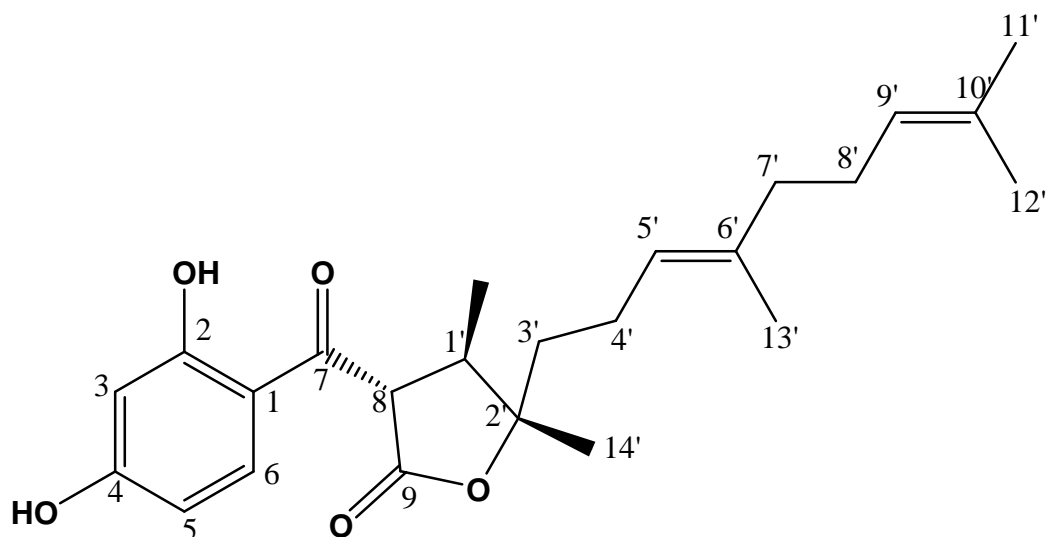
## 2.8. Jedinjenje 8 (fukanedon B)

Jedinjenje **8** eluirano je u frakcijama 164-178 sa stuba silikagela. Ove frakcije su spojene (324,1 mg), ponovo razdvajane na stubu silikagela i dobijeno je 196 novih frakcija (D1-D196) (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcija D101-D111 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 6*): acetonitril:voda (15:85-10:90) u toku 10 min izolovano je 3,2 mg jedinjenja **7**. Izolovano jedinjenje je bilo bezbojno i uljaste konzistencije.

U HR-MS ( $\text{ESI}^+$ ) spektru (Slika 72 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  401,2342 (preračunato za  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 401,2328; greška 3,5 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **7** odgovara molekulska formula  $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_5$ . U spektru se mogu uočiti i signali na  $m/z$  423,2157 i 439,1898 koji potiču od aduktivnih jona  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  i  $[\text{M} + \text{K}]^+$ , redom.

Analizom  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektara (Slike 73, 74 i 75 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama fukanedona B, odnosno ( $3S^*$ ,  $4R^*$ ,  $5S^*$ )-3-

(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-ona (Slika 17), prethodno izolovanog iz korena vrste *F. fukanensis* (Motai i Kitanaka, 2005b). <sup>1</sup>H NMR signali ukazuju na prisustvo 1,2,4-trisupstituisanog benzenovog prstena ( $\delta_{\text{H}}$  6,38; 6,43 i 7,67), vodonično vezane fenolne hidroksilne grupe ( $\delta_{\text{H}}$  12,39) na C-2, dok su ostali signali karakteristični za seskviterpenski deo (Tabela 19).



**Slika 17.** Jedinjenje **8** (fukanedon B)

**Tabela 19.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) i  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) spektara, snimljenih u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	-	n.d.
2	-	n.d.
3	6,38 (1H), <i>br s</i>	103,52
4	-	n.d.
5	6,43 (1H), <i>br d</i>	108,40
6	7,67 (1H), <i>d</i> (8,8)	133,65
7	-	n.d.
8	4,23 (1H), <i>d</i> (11,8)	54,60
9	-	n.d.
1'	3,16 (1H), <i>m</i>	41,11
2'	-	n.d.
3'	1,79 <i>m</i>	39,70
4'	2,18 (2H), <i>m</i>	22,21
5'	5,12*	122,89
6'	-	n.d.
7'	1,99 (2H), <i>m</i>	39,62
8'	2,07 (2H), <i>m</i>	26,61
9'	5,12*	124,17
10'	-	n.d.
11'	1,69 (3H), <i>s</i>	25,67
12'	1,61 (3H), <i>s</i>	17,67
13'	1,63 (3H), <i>s</i>	16,04
14'	1,36 (3H), <i>s</i>	20,55
15'	1,07 (3H), <i>d</i> (6,8)	13,42
2OH	12,39 (1H), <i>s</i>	-

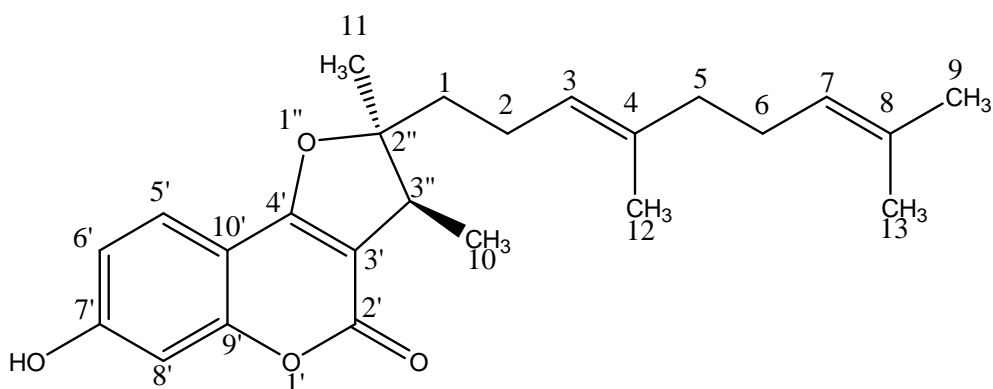
\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima

## 2.9. Jedinjenje 9 (bajgen C)

Jedinjenje **9** eluirano je u frakcijama 179-198 sa stuba silikagela. Ove frakcije su spojene (260 mg), ponovo razdvajane na stubu silikagela i dobijene 192 nove frakcije (E1-E192) (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcija E70-E82 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 7*): acetonitril-metanol (3:1):voda (35:65-10:90) u toku 10 min izolovano je 3,0 mg jedinjenja **9**. Izolovano jedinjenje bilo je bezbojno i uljaste konzistencije. Nakon prečišćavanja frakcija E88-E100 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 8*): acetonitril-metanol (3:1):voda (25:75-10:90) u toku 15 min izolovana je dodatna količina jedinjenja **9** (1,7 mg).

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 76 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  383,2215 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 383,2222; greška -1,8 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **9** odgovara molekulska formula C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>O<sub>5</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H i HMBC NMR spektara (Slike 77, 78 i 79 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama bajgena C, odnosno (2*R*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (Slika 18), prethodno izolovanog iz korena vrste *F. mongolica* (Choudhary i sar., 2001). <sup>1</sup>H NMR signali ukazuju na prisustvo 1,2,4-trisupstituisanog benzenovog prstena ( $\delta_H$  7,51; 6,89 i 6,79), dva tripleta na  $\delta_H$  5,17 i 5,10 potiču od olefinskih protona, a multipleti na pomeranjima od 1,70 – 2,23 ppm potiču od 4 CH<sub>2</sub> grupe u bočnom lancu (Tabela 20).



**Slika 18.** Jedinjenje **9** (bajgen C)

**Tabela 20.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR i HMBC spektara (400 MHz), snimljenih u deuterohloroformu. Pomeranja ugljenikovih atoma određena su indirektno iz HMBC spektra.

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)	$\delta_{\text{C}}$	HMBC
1	1,70 <i>m</i>	34,2	3, 4
2	2,23 <i>m</i>	23,1	1, 3, 4, 2''
3	5,17 (1H) <i>t</i> (7,1)	123,4	2, 5, 12
4	-	135,9	-
5	1,9 <i>m</i>	39,9	3, 9
6	1,98-2,10 <i>m</i>	~27	3, 4, 5, 12
7	5,1 (1H), <i>t</i>	124,5	6, 13
8	-	130,5	-
9	1,68 (3H) <i>s</i>	25,4	7, 8, 13
10	1,28 (3H), <i>d</i>	13,7	2'', 3'', 3'
11	1,48 (3H), <i>s</i>	25,3	1, 2'', 3''
12	1,64 (3H), <i>s</i>	15,3	3, 4, 5
13	1,61 (3H), <i>s</i>	18,6	7, 8, 9
2''	-	97,8	-
3''	3,19 (1H), <i>q</i> (7,0)	44,0	1, 10, 11, 2', 3', 2''
1'	-	-	-
2'	-	165,3	-
3'	-	103,8	-
4'	-	164,9	-
5'	7,51 (1H), <i>d</i> (7,0)	n.d.	4', 7', 9'
6'	6,79 (1H) <i>dd</i> (8,5; 2,2)	113,0	10', 8'
7'	-	161,9	-
8'	6,89 (1H), <i>d</i> (2,3)	102,9	6', 7', 9', 10'
9'	-	164,9	-
10'	-	105,5	-

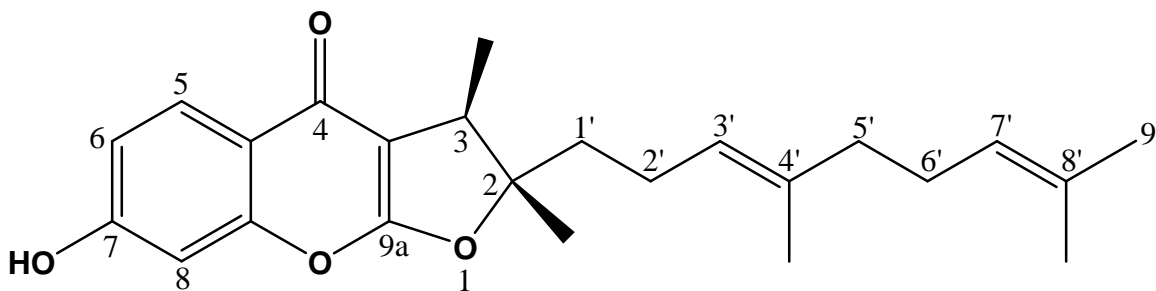


## 2.10. Jedinjenje 10 ((2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon)

Jedinjenje **10** je eluirano u frakciji 200 na stubu silikgela. Ova frakcija (881 mg) je ponovo razdvajana na stubu silikagela i dobijeno je 266 novih frakcija (F1-F266) (Odeljak 5.1). Nakon prečišćavanja frakcija F178-F198 metodom semipreparativne HPLC (*metoda 9*): acetonitril:voda (20:80-10:90) u toku 10 min izolovano je 0,8 mg jedinjenja **10**. Izolovano jedinjenje je bilo bezbojno i uljaste konzistencije.

U HR-MS (ESI<sup>+</sup>) spektru (Slika 80 u Prilogu), signal protonovanog molekula nalazi se na  $m/z$  383,2229 (preračunato za  $[M + H]^+$ , 383,2222; greška 1,8 ppm), pa je zaključeno da jedinjenju **10** odgovara molekulska formula C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>.

Analizom <sup>1</sup>H NMR spektra (Slika 81 i 82 u Prilogu) uočena je podudarnost sa spektralnim karakteristikama (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromona (Slika 19), prethodno izolovanog iz korena vrste *F. ferulaeoides* (Nagatsu i sar., 2002). Analizom spektra uočeni su signali koji potiču od tri protona hromonskog jezga ( $\delta$ H 6,85, 6,90, 8,09), singleti koji potiču od metil grupa uključujući i olefinske ( $\delta$ H 1,46, 1,59, 1,59 i 1,67), dva signala protona koji se nalaze na trisupstituisanoj olefinskoj vezi ( $\delta$ H 5,09), kao i dublet na pomeranju  $\delta$ H 1,36 koji potiče od metil grupe na C-3 (Tabela 21).



**Slika 19.** Jedinjenje **10** ((2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon)

**Tabela 21.** Podaci dobijeni iz  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) spektra, snimljenog u deuterohloroformu

Položaj	$\delta_{\text{H}}$ (J u Hz)
2	-
3	3,41 (1H), <i>q</i> (6,6)
3a	-
4	-
4a	-
5	8,09 (1H), <i>d</i> (8,7)
6	6,90 (1H), <i>dd</i> (8,3; 2,4)
7	-
8	6,85, (1H), <i>d</i> (2,5)
8a	-
9a	-
1'	1,82 (2H) <i>m</i>
2'	2,13 (2H), <i>m</i>
3'	5,09*
4''	-
5'	1,97 (2H), <i>m</i>
6'	2,04 (2H), <i>m</i>
7'	5,09*
8'	-
9'	1,67 (3H), <i>s</i>
2Me	1,46 (3H) <i>s</i>
3Me	1,36 (3H) <i>d</i> (7)
4'Me	1,59 (3H), <i>s</i>
8'Me	1,59 (3H), <i>s</i>

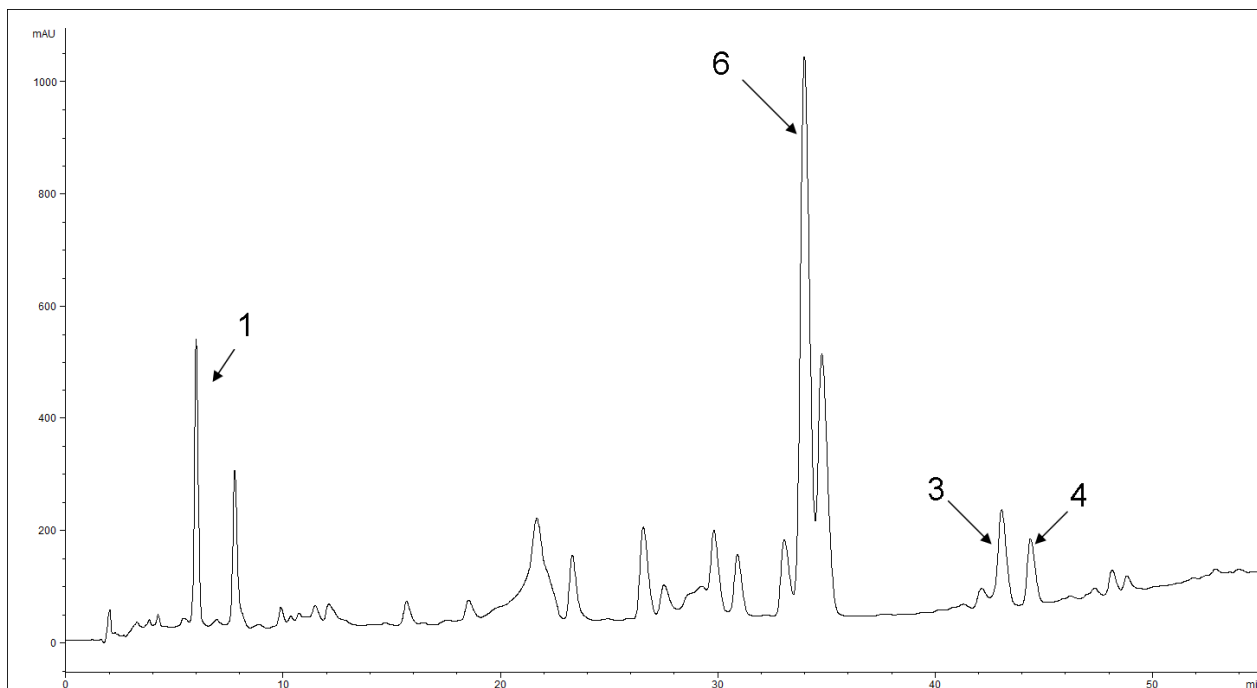
\* - signali su preklapljeni sa drugim odgovarajućim signalima

### 3. HPLC analiza hloroformskog ekstrakta – identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita

HPLC analiza hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* sprovedena je u uslovima koji su bili optimizovani za razdvajanje terpenkih jedinjenja. Hloroformski ekstrakt je suspendovan u metanolu, kratko sonifikovan na ultrazvučnom kupatilu i filtriran kroz membranski filter (0,45 µm). Mobilna faza korišćena za ovu analizu bila je voda (A) i smeša acetonitril:metanol (6:1) (D). Metoda korišćena za identifikaciju izolovanih metabolita u hloroformskom ekstraktu bila je: A:D (40:60-20:80) u toku 30 min, nakon toga u toku 5 min eluiranje je nastavljeno u izokratskim uslovima i nakon toga A:D (20:80-5:95) u toku 15 min. Volumen injektovanja izosio je 20 µl, temperatura 25 °C i brzina protoka 1 ml/min (Odeljak 5.2).

HPLC hromatogram dobijen u navedenim eksperimentalnim uslovima na detekcionoj talasnoj dužini 210 nm dat je na Slici 20.

Kvantifikacija najzastupljenijih komponenata u delu hloroformskog ekstrakta koji se rastvorio u metanolu izvršena je HPLC metodom u kojoj su korišćeni isti eksperimentalni uslovi kao i za kvalitativnu HPLC analizu metodom eksternog standarda. Kao standardi korišćena su jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6**, prethodno izolovana iz hloroformskog ekstrakta. Svi standardi korišćeni su u opsegu koncentracija 50–1000 µg/ml. Nakon toga su konstruisane kalibracione krive, čija je linearnost potvrđena koeficijentima korelacije, iz njih je izračunat sadržaj metabolita u delu hloroformskog ekstrakata koji se rastvorio u metanolu i nakon toga je preračunat sadržaj ovih metabolita u sirovom hloroformskom ekstraktu. Dominantan pik (retenciono vreme 33,99 min) odgovarao je (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarinu (jedinjenje **6**). Pik na retencionom vremenu 6,00 min poticao je od latifolona (jedinjenje **1**), a pikovi na 43,07 min i 44,39 min od (6*E*)-1-(2,4-dihidroksifenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-ona (jedinjenje **3**) i džamirona (jedinjenje **4**), redom. Sadržaj jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6** u delu hloroformskog ekstrakta koji se rastvorio u metanolu, kao i u sirovom hloroformskom ekstraktu podzemnih organa *F. heuffelii*, dat je u Tabeli 22.



**Slika 20.** HPLC hromatogram dela hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* rastvorenog u metanolu

**Tabela 22.** Sadržaj jedinjenja **1**, **3**, **4** i **6** u delu hloroformskog (CHCl<sub>3</sub>) ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* rastvorenom u metanolu (MeOH), kao i u sirovom CHCl<sub>3</sub> ekstraktu. Sadržaj je izražen u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Sadržaj u delu CHCl <sub>3</sub> ekstrakta rastvorenom u MeOH (mg/g)	Sadržaj u CHCl <sub>3</sub> ekstraktu (mg/g)
Latifolon ( <b>1</b> )	71,97	68,37
(6 <i>E</i> )-1-(2,4-Dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on ( <b>3</b> )	43,74	41,56
Džamiron ( <b>4</b> )	18,33	17,42
(2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *)-2-[(3 <i>E</i> )-4,8-Dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2- <i>c</i> ]kumarin ( <b>6</b> )	114,90	109,16

#### 4. HPLC analiza metanolnog ekstrakta – identifikacija i kvantifikacija sekundarnih metabolita

U cilju identifikacije i kvantifikacije sekundarnih metabolita prisutnih u metanolnom ekstraktu podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* korišćene su dve različite HPLC metode i na taj način dobijena su dva HPLC hromatograma. Jedan hromatogram je dobijen u uslovima optimizovanim za razdvajanje terpenkih jedinjenja, dok je drugi hromatogram dobijen u uslovima optimizovanim za razdvajanje polifenolnih jedinjenja (Odeljak 6). Hromatogrami su dati na Slikama 21, 22 i 23. HPLC analizom metanolnog ekstrakta identifikovana su 4 jedinjenja: hlorogenska kiselina (**11**), 3,5-dikafeoilhina kiselina (**12**), latifolon (**1**) i (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**). Jedinjenja su identifikovana poređenjem njihovih retencionih vremena i UV spektara sa standardima. Za identifikaciju jedinjenja **11** korišćena je komercijalno dostupna hlorogenska kiselina (Sigma Aldrich). Za identifikaciju jedinjenja **12** korišćena je 3,5-dikafeoilhina kiselina prethodno izolovana iz herbe *Hieracium gymnocephalum*

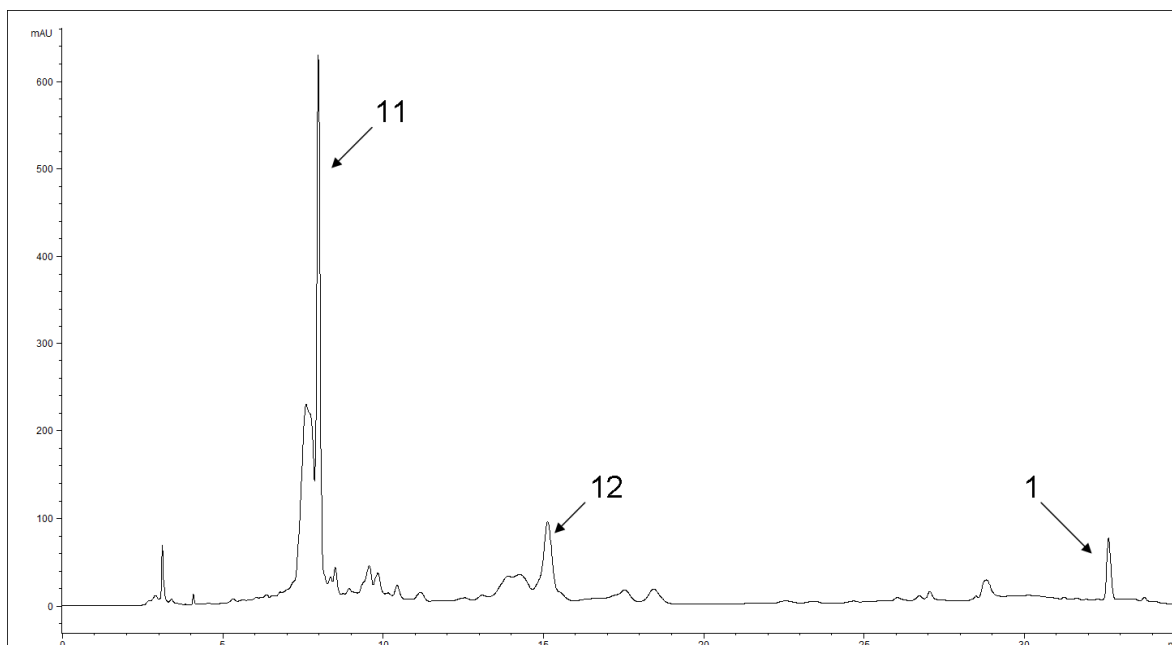
Griseb. ex Pant (Petrović i sar., 1999). Za identifikaciju jedinjenja **1** i **6** kao standardi korišćena su jedinjenja prethodno, u okviru ove doktorske disertacije, izolovana iz hlorofomskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*.

Jedinjenja **1** i **6** kvantifikovana su u uslovima optimizovanim za analizu terpenskih jedinjenja na detekcionoj talasnoj dužini od 210 nm. Mobilna faza bila je voda (A) i smeša acetonitril:metanol (3:1) (B), a metoda korišćena za kvantifikaciju: A:B (40:60-20:80) u toku 30 min, nakon toga u toku 5 min eluiranje je nastavljeno u izokraskim uslovima i nakon toga A:D (20:80-5:95) u toku 15 min, pri čemu je volumen injektovanja izosio 20 µl, temperatura 25 °C i brzina protoka 1 ml/min. Sadržaj hlorogenske kiseline (jedinjenje **11**) određen je u uslovima optimizovanim za analizu fenolnih jedinjenja na detekcionoj talasnoj dužini od 210 nm. Mobilna faza bila je 0,03% rastvor H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u vodi (C) i smeša mobilne faze C (10%) u acetonitrilu (D), a metoda: C:D (90:10), 5 min, nakon toga C:D (90:10-75:25), 10 min, nakon toga C:D (75:25-70:30), 5 min, nakon toga C:D (70:30-50:50), 5 min, nakon toga C:D (50:50-30:70), 5 min, nakon toga C:D (30:70-10:90), 5 min, eluiranje je u sledećih 10 min nastavljeno izokraski, i na kraju C:D (10:90-90:10), 10 min pri čemu je volumen injektovanja iznosio 20 µl, temperatura 25 °C, a brzina protoka 0,8 ml/min.

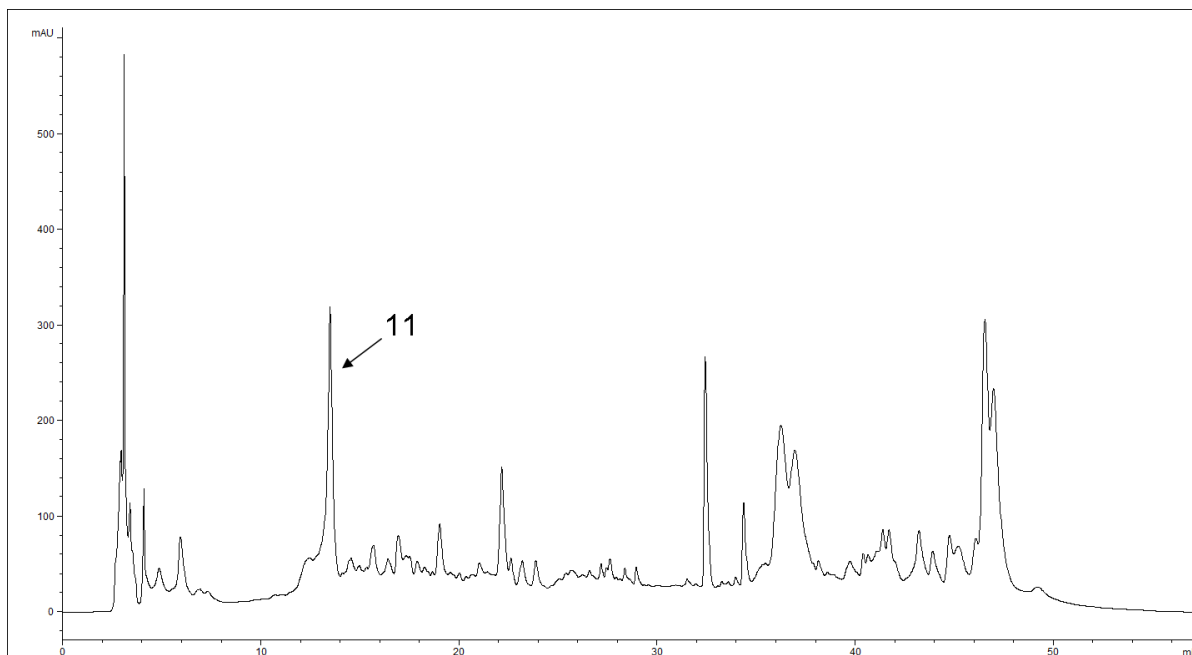
Sadržaj jedinjenja **11**, **1** i **6**, određen metodom eksternog standarda, dat je u Tabeli 23.

**Tabela 23.** Sadržaj jedinjenja **1**, **6** i **11** u metanolnom (MeOH) ekstraktu podzemnih organa *F. heuffelii*. Sadržaj je izražen u mg jedinjenja/g suvog ekstrakta.

Jedinjenje	Sadržaj u MeOH ekstraktu (mg/g)
Latifolon ( <b>1</b> )	13,22
(2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *)-2-[(3 <i>E</i> )-4,8-Dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2- <i>c</i> ]kumarin ( <b>6</b> )	13,86
Hlorogenska kiselina ( <b>11</b> )	34,65

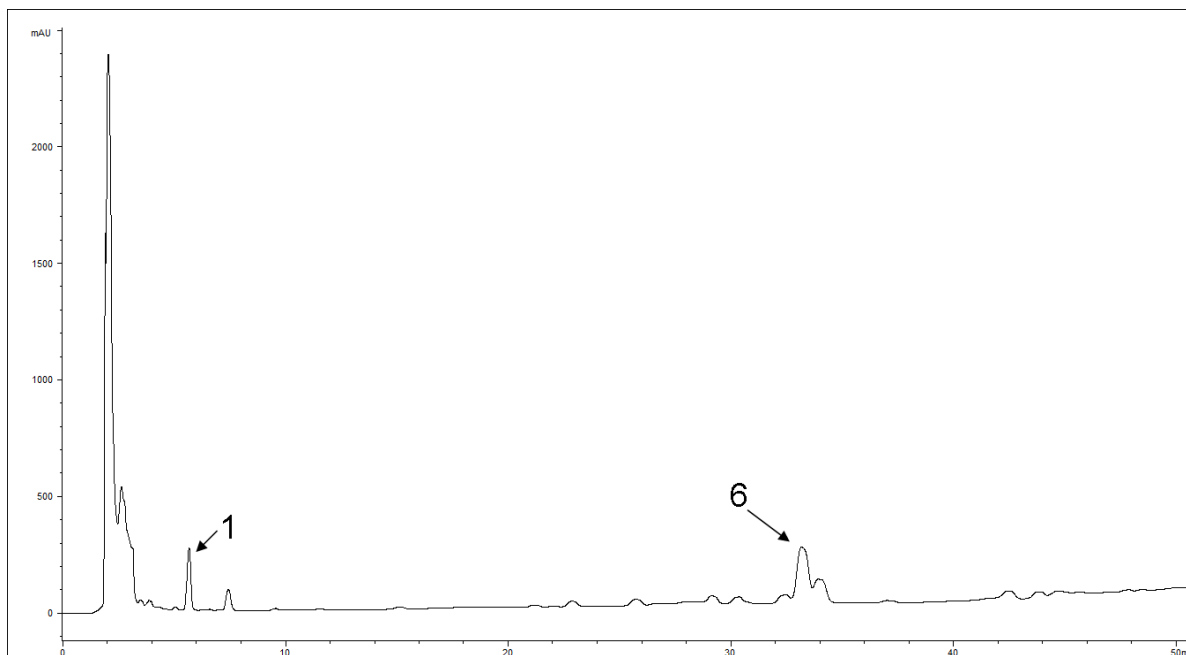


**Slika 21.** HPLC hromatogram korišćen za identifikaciju jedinjenja **11** i **12**. Binarna mobilna faza bila je: C – 0,03% rastvor H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u vodi i D - 10% C u acetonitrilu; metoda: C:D (90:10-75:25), 5 min, nakon toga C:D (75:25), 10 min, nakon toga C:D (75:25-70:30), 5 min, nakon toga C:D (70:30-50:50), 5 min, nakon toga C:D (50:50-30:70), 5 min, nakon toga C:D (30:70-90:10), 5 min, eluiranje je u sledećih 3 min nastavljeno izokratski, pri čemu je volumen injektovanja iznosio 20 µl, temperatura 25 °C, a brzina protoka 0,8 ml/min.



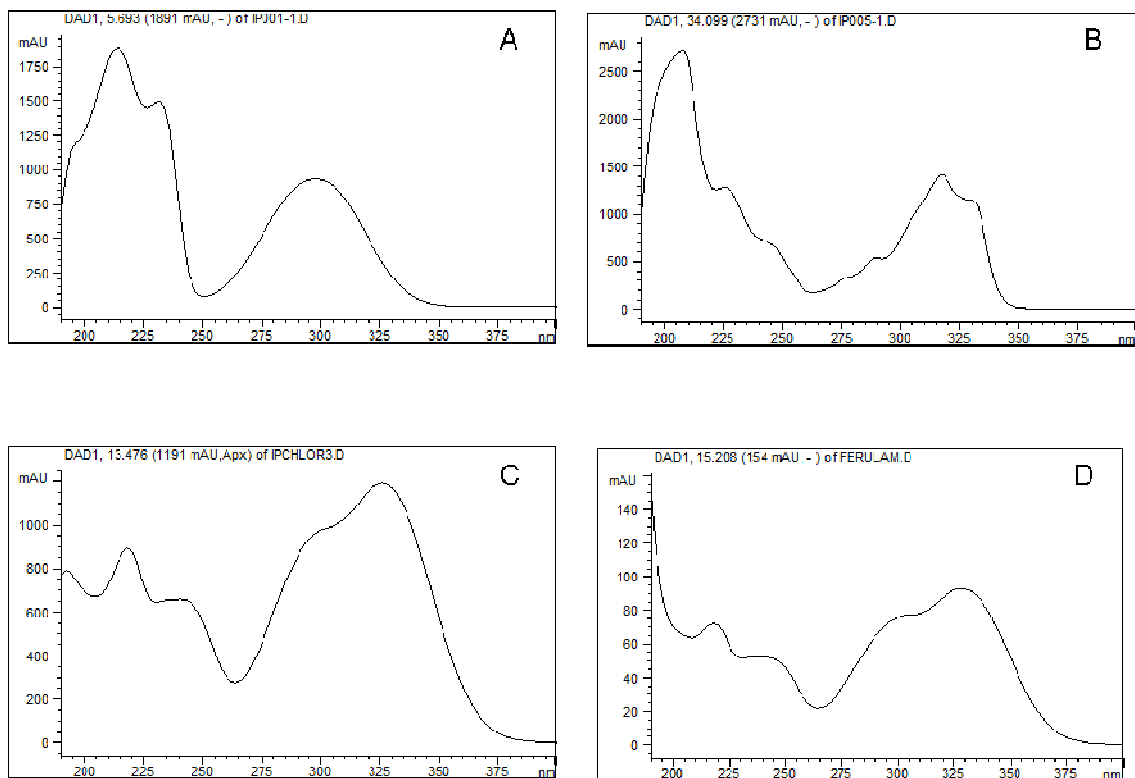
**Slika 22.** HPLC hromatogram korišćen za kvantifikovanje jedinjenja **11**. Binarna mobilna faza bila je: C – 0,03% rastvor  $\text{H}_3\text{PO}_4$  u vodi i D - 10% C u acetonitrilu; metoda: C:D (90:10), 5 min, nakon toga C:D (90:10-75:25), 10 min, nakon toga C:D (75:25-70:30), 5 min, nakon toga C:D (70:30-50:50), 5 min, nakon toga C:D (50:50-30:70), 5 min, nakon toga C:D (30:70-10:90), 5 min, eluiranje je u sledećih 10 min nastavljeno izokratski, i na kraju C:D (10:90-90:10), 10 min pri čemu je volumen injektovanja iznosio 20  $\mu\text{l}$ , temperatura 25  $^\circ\text{C}$ , a brzina protoka 0,8 ml/min.



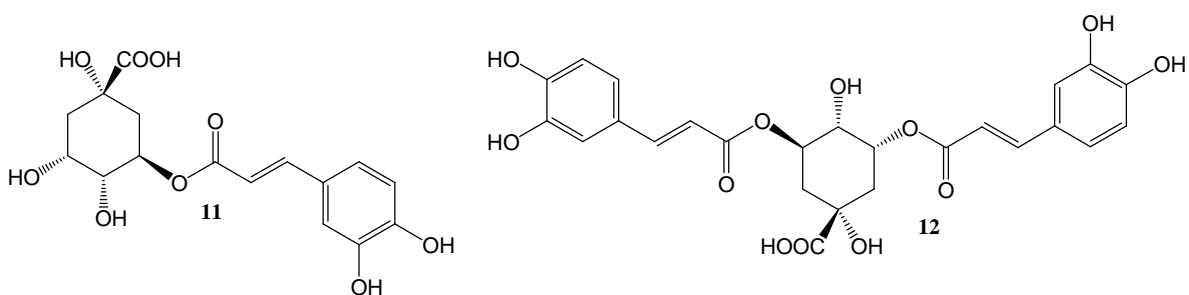


**Slika 23.** HPLC hromatogram korišćen za kvantifikovanje jedinjenja **1** i **6**. Binarna mobilna faza bila je: A – voda i B – smeša acetonitril:metanol (3:1), a metoda korišćena za kvantifikovanje: A:B (40:60-20:80) u toku 30 min, nakon toga u toku 5 min eluiranje je nastavljeno u izokratskim uslovima i nakon toga A:B (20:80-5:95) u toku 15 min, pri čemu je volumen injektovanja izosio 20  $\mu$ l, temperatura 25 °C i brzina protoka 1 ml/min.

UV spektri jedinjenja identifikovanih u MeOH ekstraktu podzemnih organa prikazani su na Slici 24. Hemijske strukture identifikovanih fenolkarboksilnih kiselina date su na Slici 25.



**Slika 24.** UV spektri jedinjenja identifikovanih u MeOH ekstraktu podzemnih organa *F. heuffelii*: A – jedinjenja **1** (latifolona); B – jedinjenja **6** ( $2S^*,3R^*$ )-2-[( $3E$ )-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina); C – jedinjenja **11** (hlorogenske kiseline); D – jedinjenja **12** (3,5-dikafeoilhina kiseline).



**Slika 25.** Hlorogenska kiselina (jedinjenje **11**) i 3,5-dikafeoilhina kiselina (jedinjenje **12**).

## 5. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu određen je spektrofotometrijski na bazi reakcije sa *Folin-Ciocalteu* reagensom i iznosio je 0,112 mg ekvivalenata galne kiseline/mg suvog ekstrakta.

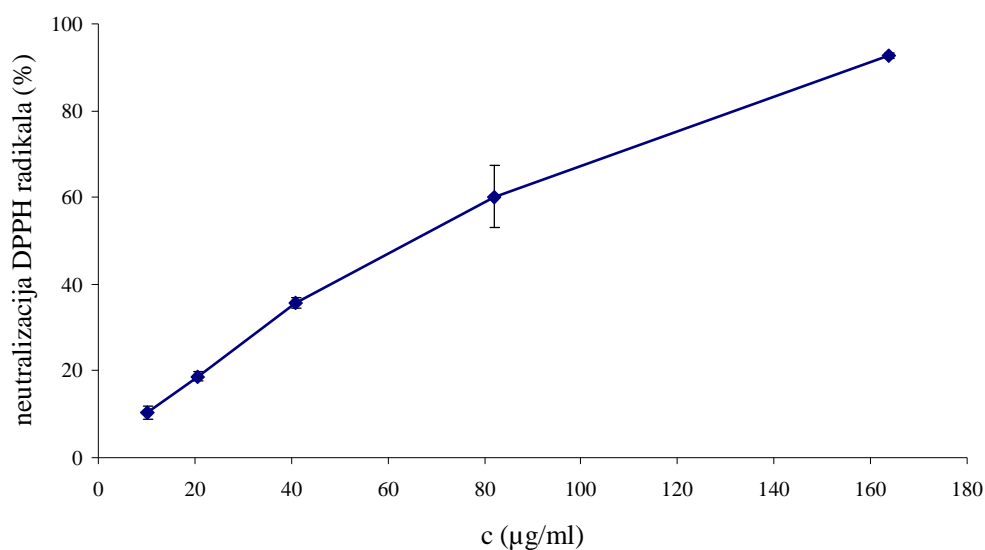
## 6. Antioksidantna aktivnost ekstrakata i etarskih ulja

### 6.1. Antioksidantna aktivnost metanolnog ekstrakta

Antioksidantna aktivnost metanolnog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* ispitana je različitim *in vitro* testovima. Ukupna antioksidantna aktivnost ispitana je FRAP testom, a antiradikalska aktivnost dezoksiriboza i DPPH testom.

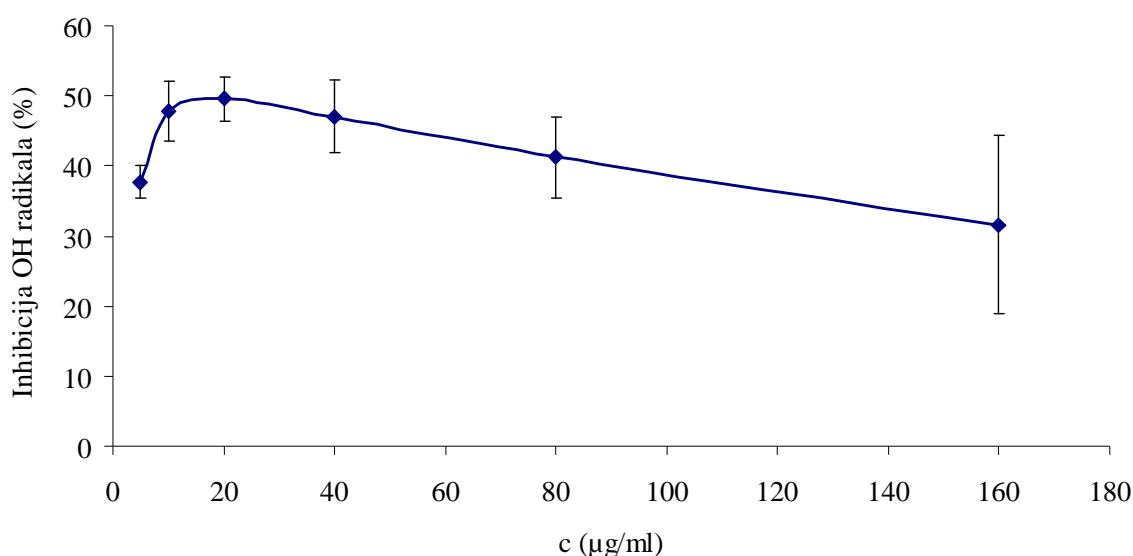
Ukupna antioksidantna aktivnost, određena FRAP testom, iznosila je 0,98  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg suvog ekstrakta. Aktivnost L-askorbinske kiseline, korišćene kao referentne supstance, iznosila je 7,41  $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ /mg (Kukić i sar., 2006).

Metanolni ekstrakt (10,24-163,84  $\mu\text{g/ml}$ ) je dozno-zavisno neutralisao DPPH radikal (Slika 26), i u najvećoj testiranoj koncentraciji (163,84  $\mu\text{g/ml}$ ) ostvario efekat od  $92,71 \pm 0,68\%$ , dok je  $SC_{50}$  vrednost iznosila 62,5  $\mu\text{g/ml}$ . Kao referentna supstanca za poređenje korišćena je L-askorbinska kiselina čija je  $SC_{50}$  vrednost (4,09  $\mu\text{g/ml}$ ) određena ranije (Kukić i sar., 2006).



**Slika 26.** Sposobnost metanolnog ekstrakta da neutrališe DPPH radikal

Ispitivanje sposobnosti neutralizacije  $\cdot\text{OH}$  radikala pokazalo je da u opsegu koncentracija od 5-20  $\mu\text{g/ml}$  metanolni ekstrakt dozno-zavisno inhibira stvaranje  $\cdot\text{OH}$  radikala. Efekat se kretao u opsegu od  $37,67 \pm 2,38\%$  do  $49,54 \pm 3,16\%$ , a najsnažnije delovanje ostvareno je u koncentraciji od 20  $\mu\text{g/ml}$ . Aktivnost kvercetina, koji je korišćen kao standard, je prethodno ispitivana i  $\text{SC}_{50}$  je iznosila 3,1  $\mu\text{g/ml}$  (Kukić i sar., 2006). Primenjen u većim koncentracijama (40, 80 i 160  $\mu\text{g/ml}$ ), ekstrakt je ostvario slabiju aktivnost i uočeno je da je došlo do smanjenja aktivnosti kako su primenjene koncentracije ekstrakta rasle (Slika 26). Ovakvi rezultati, koji ukazuju na smanjenje sposobnosti neutralizacije  $\cdot\text{OH}$  radikala u koncentracijama većim od 20  $\mu\text{g/ml}$ , mogli bi se, makar delimično, objasniti pro-oksidantnom aktivnošću nekih komponenata ovog ekstrakta.



**Slika 27.** Sposobnost metanolnog ekstrakta da neutrališe  $\cdot\text{OH}$  radikal

Aktivnost testiranog ekstrakta bila je jača od aktivnosti vodeno-etanolnog ekstrakta korena *F. gummosa* ( $\text{SC}_{50}=579,6\pm 19,4$  µg/ml) (Ebrahimzadeh i sar., 2011), metanolnog ekstrakta herbe *F. assa-foetida* ( $\text{SC}_{50}=380\pm 12$  µg/ml) (Dehpour i sar., 2009), kao i vodeno-etanolnih ekstrakata stabla ( $\text{SC}_{50}=775,9\pm 26,4$  µg/ml), lista ( $\text{SC}_{50}=192,5\pm 8,6$  µg/ml) i cveta ( $\text{SC}_{50}=471,6\pm 19,4$  µg/ml) vrste *F. foetida* (Nabavi i sar., 2010). Prethodno je ispitivana i anti-DPPH aktivnost različitih ekstrakata herbe *F. orientalis*. Može se konstatovati da metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* poseduje jači anti-DPPH potencijal u poređenju sa vodeno-metanolnim ekstraktom herbe *F. orientalis*, čija je  $\text{SC}_{50}$  vrednost iznosila  $99,1\pm 0,5$  µg/ml (Kartal i sar., 2007).

Pokazana antioksidantna aktivnost metanolnog ekstrakta može se, makar delimično, objasniti prisustvom dve fenolkarboksilne kiseline: hlorogenske i 3,5-dikafeoilhina kiseline. Antioksidantna aktivnost ove dve kiseline potvrđena je brojnim testovima i smatra se da one svoju aktivnost ostvaruju pre svega inhibicijom stvaranja slobodnih kiseoničnih vrsta (Upadhyay i Mohan Rao, 2013). Prethodno je pokazano da hlorogenska kiselina ostvaruje jako neutrališuće delovanje prema DPPH radikalu, pri čemu je  $\text{SC}_{50}$  vrednost iznosila  $4,42\pm 0,13$  µg/ml (Olszewska i sar., 2012). Drugo ispitivanje pokazalo je da 3,5-dikafeoilhina kiselina u istom modelu ostvaruje približno dvostruko veću aktivnost u odnosu na hlorogensku kiselinu (Ohnishi i sar., 1994). Takođe, prethodno je ispitivan i ukupni antioksidantni potencijal hlorogenske

kiseline i iz dobijenih rezultata ustanovljeno je da  $EC_{50}$  vrednost iznosi  $18,04 \pm 0,79$  mmol  $Fe^{2+}$ /g suvog ekstrakta (Olszewska et al., 2012).

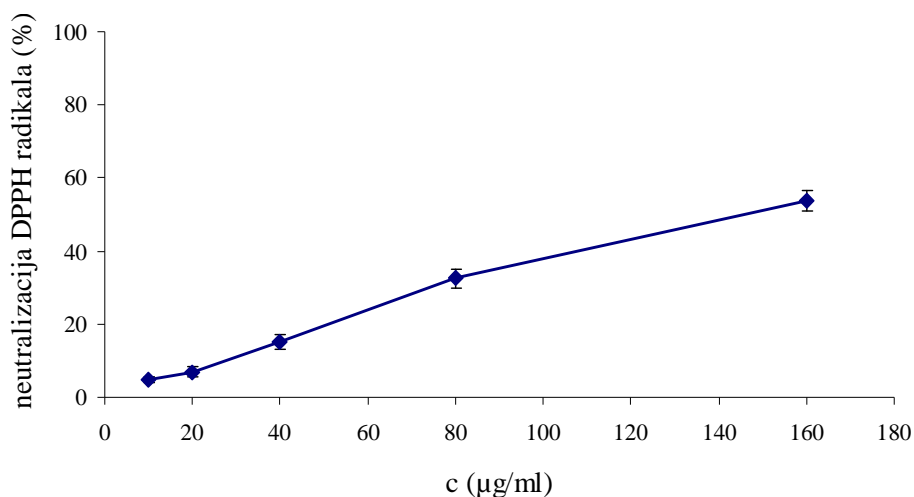
Prethodno je pokazano da i smeša dva dihidrofurokumarina, (-)-5-hidroksiprantčimgina i (-)-5-hidroksideltoina, izolovanih iz korena vrste *F. lutea* ostvaruju snažnu antiradikalisku aktivnost, pri čemu je njihova  $SC_{50}$  vrednost u DPPH testu iznosila  $18,56 \pm 1,22$   $\mu$ M (Ben Salem i sar., 2013). Istraživači su činjenicu da prisustvo ferulsinaične kiseline produžava životni vek nematode *Caenorhabditis elegans* objasnili njegovim potencijalnim antioksidantnim efektom, s obzirom da ovaj kumarin inhibira lipidnu peroksidaciju i formiranje završnih proizvoda metabolizma glutaciona (Sayed, 2011).

## 6.2. Antioksidantna aktivnost hloroformskog ekstrakta

Antioksidantna aktivnost hloroformskog ekstrakta podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* ispitana je istim *in vitro* testovima koji su korišćeni za ispitivanje aktivnosti metanolnog ekstrakta.

Ukupna antioksidantna aktivnost, određena FRAP testom, iznosila je  $0,13$   $\mu$ mol  $Fe^{2+}$ /mg suvog ekstrakta.

Ekstrakt je ostvario slabu anti-DPPH aktivnost (Slika 28) i u opsegu koncentracija od 10-160  $\mu$ g/ml doveo do neutralizacije DPPH radikala od  $4,87 \pm 0,72$  do  $53,80 \pm 2,86\%$ .  $SC_{50}$  vrednost iznosila je  $145,5$   $\mu$ g/ml.



**Slika 28.** Spособnost hloroformskog ekstrakta da neutrališe DPPH radikal

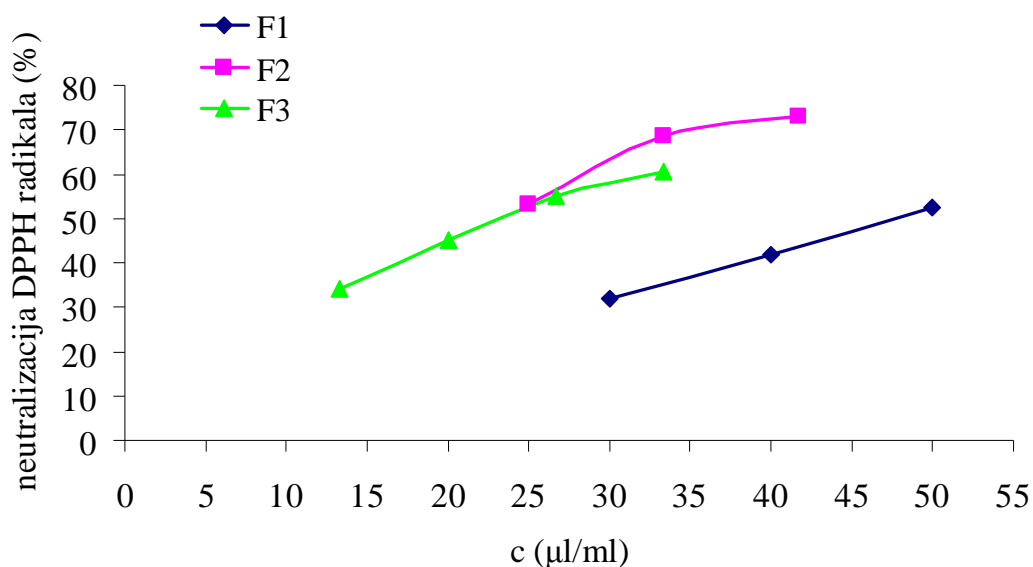
Testirani hloroformski ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* ostvario je međutim jače anti-DPPH delovanje u poređenju sa delovanjem acetonskog i deodorisanog acetonskog ekstrakta herbe *F. orientalis* ( $SC_{50}=310\pm 0,5$  i  $118\pm 0,8$   $\mu\text{g/ml}$ , redom), kao i u odnosu na heksanski ekstrakt iste vrste koji je okarakterisan kao neaktivan (Kartal i sar., 2007).

Antiradikalni efekat hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* ispitan je i testom sposobnosti neutralizacije  $\cdot\text{OH}$  radikala. Ekstrakt u opsegu koncentracija od 3,12-100,00  $\mu\text{g/ml}$  nije neutralisao ovaj radikal.

### 6.3. Antioksidantna aktivnost etarskih ulja

Antioksidantna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz podzemnih organa *F. heuffelii* prikupljenih u Sićevačkoj klisuri (F1), Đerdapskoj klisuri (F2) i klisuri reke Pek (F3), ispitivana je DPPH-testom. Sva tri uzorka pokazala su zadovoljavajuću aktivnost koja je bila koncentraciono zavisna (Slika 29).  $SC_{50}$  vrednosti iznosile su 22,43; 23,17 i 47,75  $\mu\text{l/ml}$  za F2, F3 i F1, redom. Miristicin, jedan od sastojaka testiranih etarskih ulja, mogao bi, makar delimično, biti odgovoran za pokazanu anti-DPPH aktivnosti. Naime, prethodna istraživanja su pokazala da miristicin deluje kao antiradikalni agens, a razlikom u sadržaju miristicina bi se mogla objasniti i dvostruko

jača aktivnost ulja F2 i F3 u poređenju sa uljem F1. Naime, sadržaj miristicina u aktivnijim uljima F2 i F3 iznosio je 20,6 i 12,9%, redom, dok je sadržaj ovog fenilpropanoida u ulju F1 iznosio 4,5%.



**Slika 29.** Sposobnost etarskih ulja da neutrališu DPPH radikal

Prethodna ispitivanja antioksidantne aktivnosti etarskog ulja herbe *F. orientalis* pokazala su da i ovo ulje ostvaruje anti-DPPH efekat ( $SC_{50}=423\pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ) (Kartal i sar., 2007).

## 7. Spazmolitička aktivnost etarskog ulja, ekstrakata i metabolita

Spazmolitička aktivnost izolata (etarskog ulja, ekstrakata i čistih metabolita), ispitivana je *in vitro* na izolovanom ileumu i izolovanoj traheji pacova. Ispitivanje je obuhvatilo tri eksperimentalna modela, tj. ispitivan je uticaj etarskog ulja, ekstrakata i čistih metabolita na:

- spontanu kontraktilnost izolovanog ileuma;
- kontrakcije izolovanog ileuma izazvane ACh i
- kontrakcije izolovanog ileuma i izolovane traheje izazvane KCl (80 mM).



Izolovani ileum je bio uronjen u kupatilo napunjeno *Tyrod*-ovim rastvorom (koncentracije komponenata u mM: NaCl 136,9; KCl 2,68; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1,05; NaHCO<sub>3</sub> 11,9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42, i glukoza 5,55), a izolovana traheja u kupatilo napunjeno *Krebs-Ringer*-ovim rastvorom (koncentracije komponenata u mM: NaCl 137; KCl 2,81; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 0,1; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,417; NaHCO<sub>3</sub> 11,9, i glukoza 11,10), pod prethodno opisanim eksperimentalnim uslovima u Odeljku 9.2. Segmenti su ostavljeni da se stabilizuju 30 min i pod ovim eksperimentalnim uslovima uočene su spontane ritmične kontrakcije segmenata. Odgovarajući rastvori ispitivanih uzoraka (etarsko ulje, ekstrakti, metaboliti), dodati su direktno u vodeno kupatilo u količini koja nije prelazila 2% ukupne zapremine kupatila (Sadraei i sar., 2001, Fleer i Verspohl, 2007). Statistička značajnost (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01) određivana je u poređenju sa kontrolnom grupom (tretiranom rastvaračem) *Mann-Whitney U*-testom korišćenjem računarskog paketa SPSS 11.5.

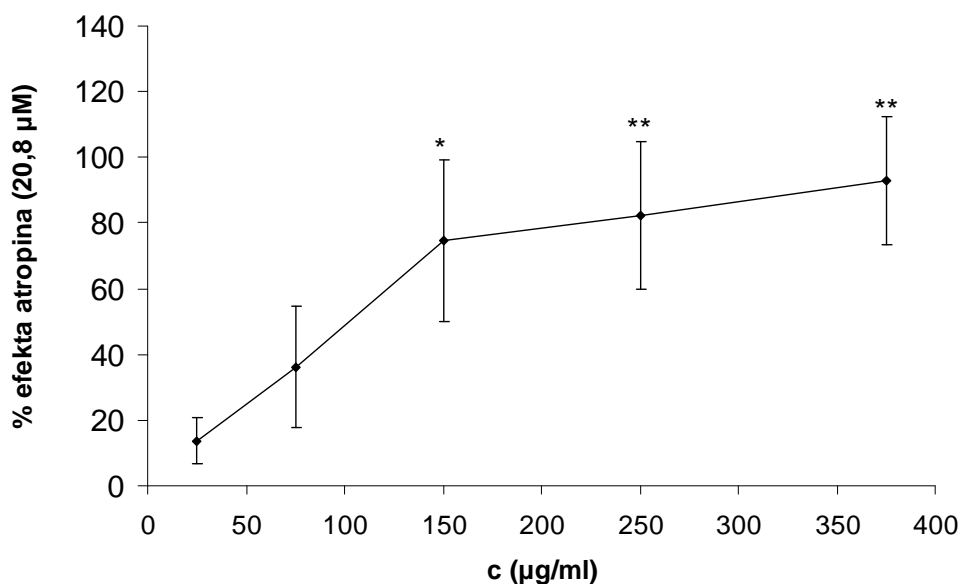
## **7.1. Spazmolitička aktivnost etarskog ulja**

Ispitivana je spazmolitička aktivnost etarskog ulja (F2) dobijenog destilacijom podzemnih organa *F. heuffelii* prikupljenih u Đerdapskoj klisuri,

### ***Efekat ulja na spontanu aktivnost ileuma***

U prvoj seriji eksperimenata ispitivan je uticaj atropina (0,01–14,44 µg/ml) na spontanu kontraktilnost izolovanog ileuma. Maksimalni efekat atropina postignut je u koncentraciji 14,44 µg/ml i ova vrednost spazmolitičkog efekta je korišćena za poređenje sa efektima etarskog ulja. Etarsko ulje je u koncentracijskom opsegu 25-375 µg/ml snažno i koncentraciono-zavisno inhibiralo spontanu kontraktilnost ileuma (Slika 30). Ovaj efekat je prikazan kao % maksimalnog spazmolitičkog efekta atropina i iz rezultata se može videti da je u koncentraciji od 150 µg/ml etarsko ulje ispoljilo 74,67±24,74% efekta atropina, a u koncentraciji od 375,00 µg/ml 92,91±19,45% efekta atropina. Važno je naglasiti da je u koncentracijskom opsegu od 150-375 µg/ml efekat etarskog ulja bio statistički značajan u poređenju sa kontrolnom

grupom tretiranom rastvaračem (koloidni rastvor 0,5% karboksimetilceluloze u vodi). Ovaj efekat se može smatrati reverzibilnim, jer se nakon ispitanja *Tyrod*-ovim rastvorom tonus preparata vraćao na početne vrednosti.

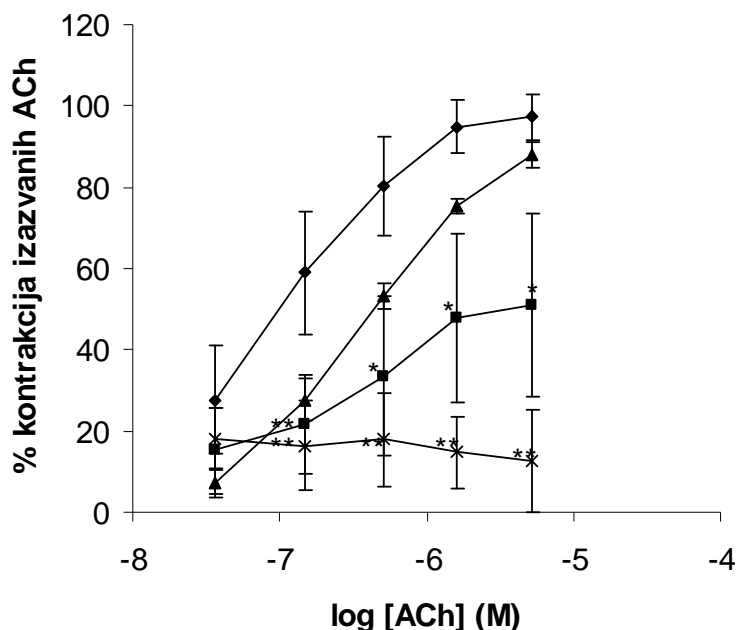


**Slika 30.** Spazmolitička aktivnost etarskog ulja: uticaj na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Aktivnost etarskog ulja izražena je kao % maksimalnog spazmolitičkog efekta koji je ostvario atropin u koncentraciji 20,8 μM (100%). Koncentracije etarskog ulja prikazane na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD efekata dobijenih merenjem na 6 preparata.

#### ***Efekat ulja na kontrakcije ileuma izazvane ACh***

Etarsko ulje je u koncentracijama od 15 do 75 μg/ml inhibiralo kontrakcije ileuma izazvane ACh. U koncentraciji od 15 μg/ml izazvalo je veoma slabu inhibiciju efekta ACh koja nije statistički značajna, a maksimalni spazmogeni efekat ACh smanjilo na 88,11±3,19%. Nasuprot tome, efekti ostvareni u većim koncentracijama bili su statistički značajni u poređenju sa kontrolnom grupom. U koncentraciji od 25 μg/ml ulje je redukovalo maksimalni efekat ACh na 50,81±22,59 %, a u koncentraciji od 75 μg/ml na 12,75±12,66%. Značajno je primetiti da nakon inkubacije preparata

najvećim koncentracijama etarskog ulja (75  $\mu\text{g/ml}$ ) ACh gotovo da nije izazvao koncentracijski zavisne kontrakcije ileuma (Slika 31).

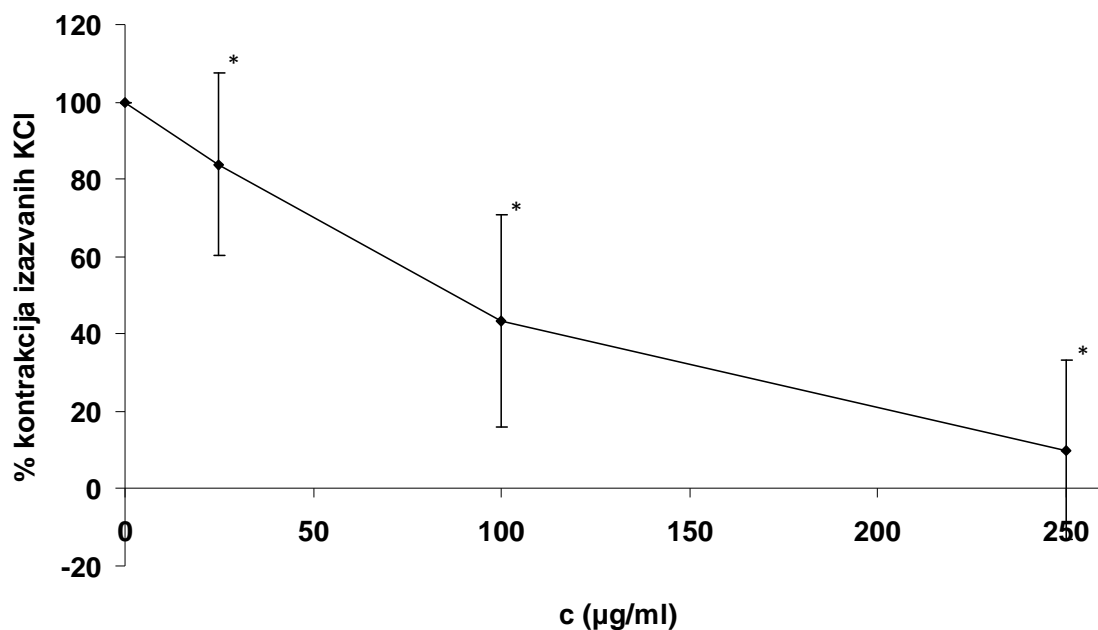


**Slika 31.** Spazmolitička aktivnost etarskog ulja: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (romb) i prisustvu 15  $\mu\text{g/ml}$  etarskog ulja (trougao), 25  $\mu\text{g/ml}$  etarskog ulja (kvadrat) i 75  $\mu\text{g/ml}$  etarskog ulja (krst). Aktivnost etarskog ulja izražena je kao % maksimalnog kontraktilnog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

Prikazani efekti su i u ovom modelu bili reverzibilni pošto se poništavaju nakon ispiranja preparata *Tyrod*-ovim rastvorom.

#### ***Efekat ulja na kontrakcije ileuma izazvane KCl***

Etarsko ulje je u koncentracijskom opsegu od 25 – 250  $\mu\text{g/ml}$  takođe dozno-zavisno inhibiralo efekat KCl (80 mM). KCl u visokim koncentracijama, kao što je već naglašeno, dovodila je do pojave toničnih kontrakcija. U koncentraciji od 250  $\mu\text{g/ml}$ , etarsko ulje je gotovo potpuno poništilo tonični efekat KCl ( $10,01 \pm 23,35\%$ ).

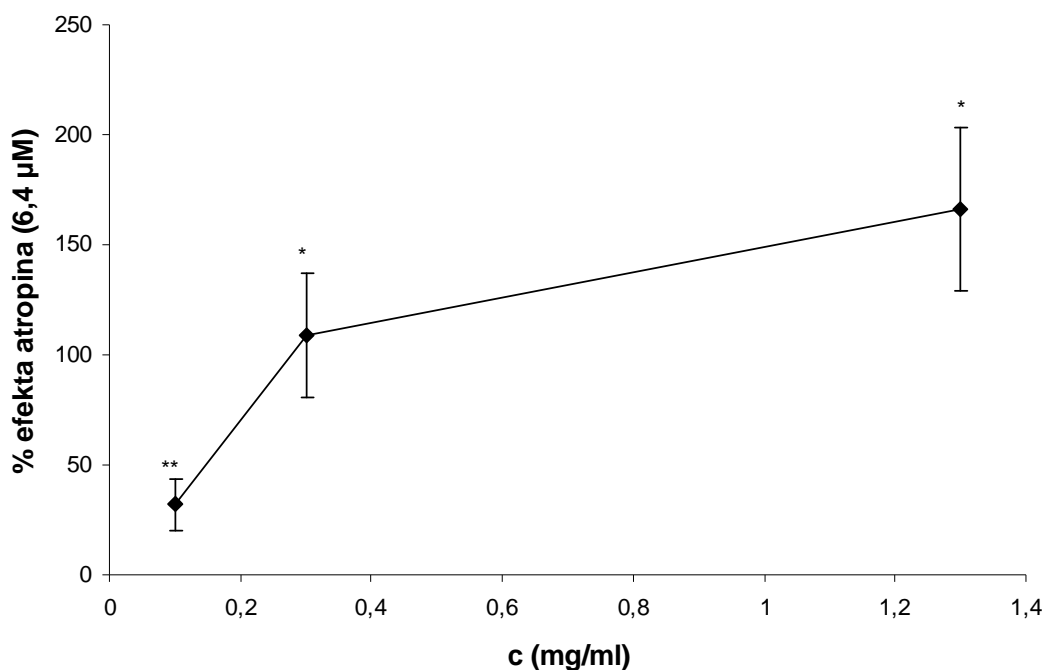


**Slika 32.** Spazmolitička aktivnost etarskog ulja: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM). Na krivoj su prikazani koncentracijski-zavisni efekti etarskog ulja, a koncentracije na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije ulja. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD efekata dobijenih merenjem na 6 preparata.

## 7.2. Spazmolitička aktivnost hloroformskog ekstrakta

### *Efekat hloroformskog ekstrakta na spontanu aktivnost ileuma pacova*

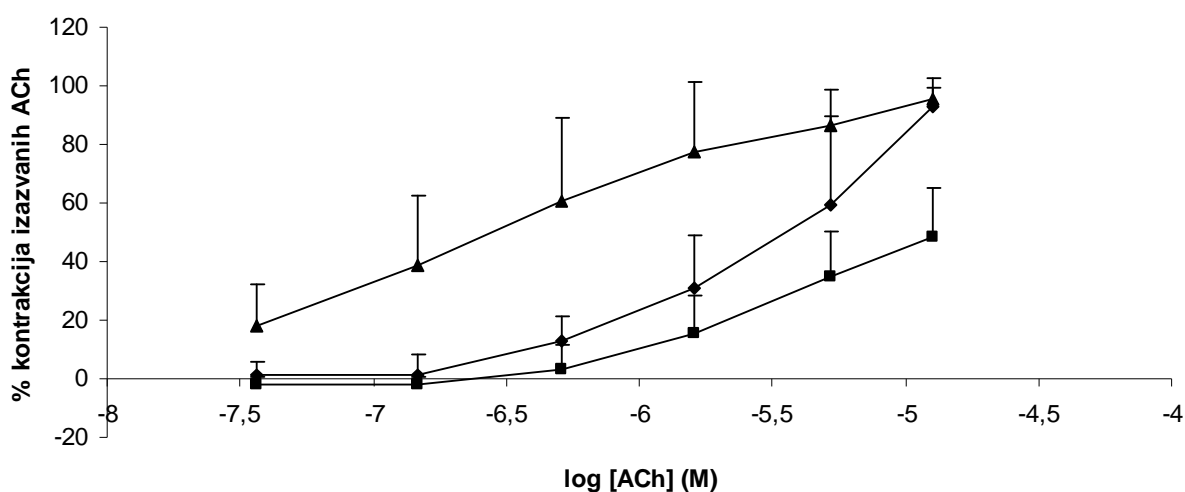
U prvoj seriji eksperimenata ispitivan je uticaj atropina (0,01–4,44  $\mu\text{g/ml}$ ) na spontane kontrakcije ileuma. Maksimalno smanjenje tonusa dobijeno inkubacijom sa 4,44  $\mu\text{g/ml}$  (6,4  $\mu\text{M}$ ) korišćeno je za poređenje sa efektima hloroformskog ekstrakta. Hloroformski ekstrakt je rastvoren u DMSO i dodavan kumulativno u vodeno kupatilo. U koncentracijama 0,1-1,3 mg/ml ekstrakt je koncentraciono-zavisno i statistički značajno inhibirao spontane kontrakcije izolovanog ileuma (Slika 33). U koncentraciji od 0,3 mg/ml ekstrakt je ostvario efekat uporediv sa efektom atropina ( $109,19 \pm 28,26\%$ ).



**Slika 33.** Spazmolitička aktivnost hloroformskog ekstrakta: uticaj na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Aktivnost ekstrakta izražena je kao % maksimalnog spazmolitičkog efekta koji je ostvario atropin u koncentraciji 6,4  $\mu\text{M}$  (100%). Koncentracije ekstrakta prikazane na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD efekata dobijenih merenjem na 5 preparata.

### *Efekat hloroformskog ekstrakta na kontrakcije ileuma izazvane ACh*

Hloroformski ekstrakt primenjen u koncentracijama: 30 i 100  $\mu\text{g/ml}$  smanjio je i kontraktilne efekte ACh. U koncentraciji od 30  $\mu\text{g/ml}$ , ekstrakt nije umanjio efekat najveće primenjene koncentracije ACh (4,44  $\mu\text{g/ml}$ ). U koncentraciji od 100  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakt je redukovao efekte ACh u svim primenjenim koncentracijama i smanjio maksimalni efekat ACh na  $48,53 \pm 16,68\%$ . Međutim, poređenjem sa kontrolnom grupom nijedan od postignutih efekata nije ispoljio statističku značajnost (Slika 34).

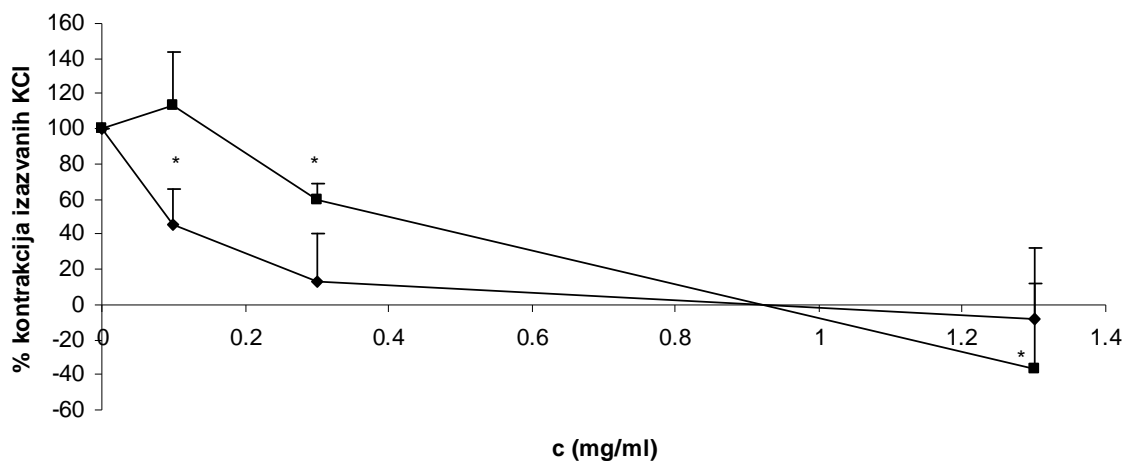


**Slika 34.** Spazmolitička aktivnost hloroformskog ekstrakta: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (trougao) i prisustvu 30  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakta (romb) i 100  $\mu\text{g/ml}$  ekstrakta (kvadrat). Aktivnost ekstrakta izražena je kao % maksimalnog kontraktilnog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + SD efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

### *Efekat hloroformskog ekstrakta na kontrakcije ileuma izazvane KCl*

Uticaj hloroformskog ekstrakta na kontrakcije izazvane KCl (80 mM) ispitivan je u istom opsegu kao i uticaj na spontanu kontraktilnost (0,1-1,3 mg/ml). Ekstrakt je statistički značajno i koncentraciono-zavisno uticao na efekte KCl. U koncentraciji od 0,3 mg/ml, smanjio je kontraktilni efekat KCl na  $13,19 \pm 26,79\%$ , dok je u koncentraciji

od 1,3 mg/ml doveo do pada tonusa ileuma ispod početnih vrednosti (Slika 35). Hloroformski ekstrakt (0,1-1,3 mg/ml) je takođe delovao relaksantno i na kontrakcije glatkih mišića traheje pacova izazvane KCl (80 mM). U manjim koncentracijama, ekstrakt je koncentraciono-zavisno inhibirao kontrakcije dok je u koncentraciji od 1,3 mg/ml potpuno poništio efekat KCl (Slika 35).

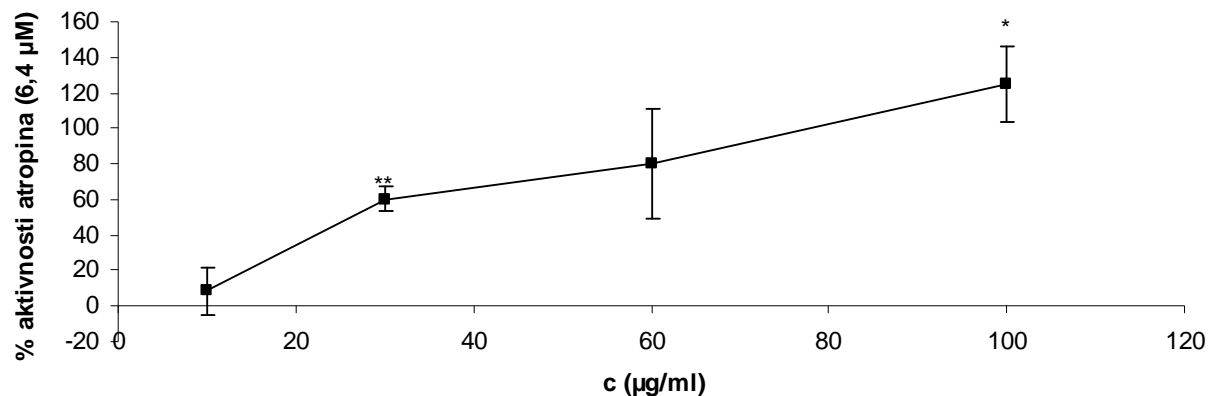


**Slika 35.** Spazmolitička aktivnost hloroformskog ekstrakta: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma (romb) i traheje (kvadrat) pacova izazvanim KCl (80 mM). Na krivoj su prikazani koncentracijski-zavisni efekti ekstrakta, a koncentracije na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije ulja. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + SD efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

### 7.3. Spazmolitička aktivnost metanolnog ekstrakta

#### *Efekat metanolnog ekstrakta na spontanu aktivnost ileuma*

U koncentracijama od 10-100 µg/ml MeOH ekstrakt je koncentraciono-zavisno i statistički značajno uticao na spontanu kontraktilnost ileuma (Slika 36). Već u koncentraciji od 30 µg/ml ekstrakt je ostvario 60,39±7,37% efekta atropina (6,4 µM), dok je u koncentraciji od 100 µg/ml ispoljio snažniji efekat od efekta atropina (124,57±21,39%). Metanolni ekstrakt je u poređenju sa hloroformskim ekstraktom u nižem opsegu koncentracija ostvario spazmolitičko delovanje.

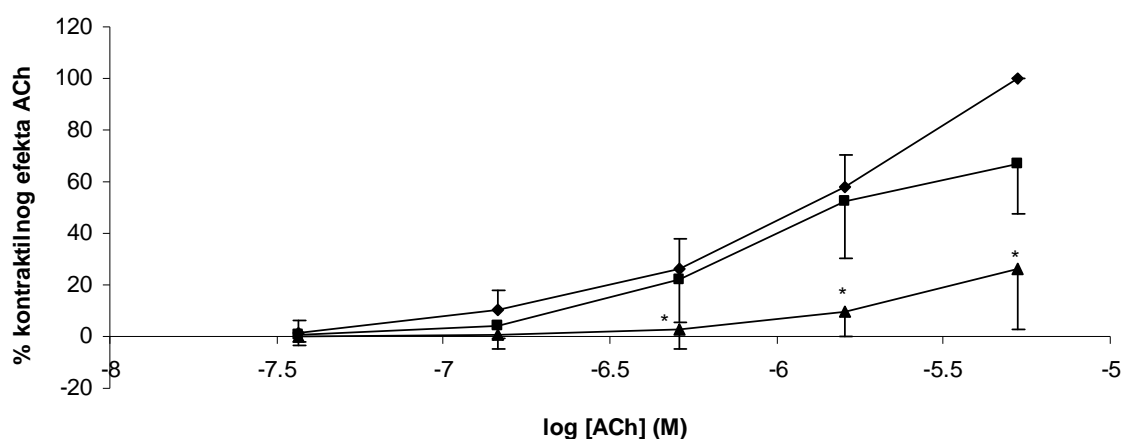


**Slika 36.** Spazmolitička aktivnost metanolnog ekstrakta: uticaj na spontane kontrakcije izolovanog ileuma. Aktivnost ekstrakta izražena je kao % maksimalnog spazmolitičkog efekta koji je ostvario atropin u koncentraciji 6,4 μM (100%). Koncentracije ekstrakta prikazane na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost ± SD efekata dobijenih merenjem na 5 preparata.

#### ***Efekat metanolnog ekstrakta na kontrakcije ileuma izazvane ACh***

Uticaj metanolnog ekstrakta na kontrakcije izazvane ACh ispitivan je u dve koncentracije: 60 i 120 μg/ml. U nižoj testiranoj koncentraciji ekstrakt nije ostvario značajan relaksantni efekat, dok je u koncentraciji od 120 μg/ml ekstrakt značajno i koncentraciono-zavisno inhibirao kontrakcije smanjivši maksimalan efekat ACh na  $26,35 \pm 23,69\%$  (Slika 37).



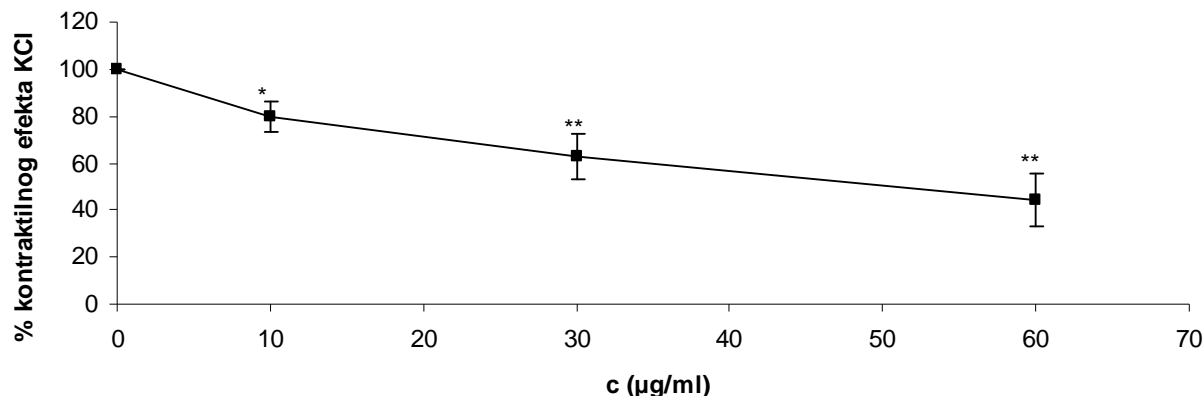


**Slika 37.** Spazmolitička aktivnost metanolnog ekstrakta: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (romb) i prisustvu 60 µg/ml ekstrakta (kvadrat) i 120 µg/ml ekstrakta (trougao). Aktivnost ekstrakta izražena je kao % maksimalnog kontraktilnog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + ili - SD efekata dobijenih merenjem na 6 ili više preparata.

Ispoljeni efekat je bio reverzibilan, pošto se preparat oporavio nakon ispiranja vodenog kupatila *Tyrod*-ovim rastvorom.

#### ***Efekat metanolnog ekstrakta na kontrakcije ileuma izazvane KCl***

Uticaj metanolnog ekstrakta na kontrakcije izazvane KCl takođe je bio koncentraciono-zavisan i statistički značajan. Aktivnost ekstrakta testirana je u opsegu koncentracija 10-60 µg/ml, pri čemu je u koncentraciji od 60 µg/ml ekstrakt redukovao efekat KCl na 44,42±11,26% (Slika 38).



**Slika 38.** Spazmolitička aktivnost metanolnog ekstrakta: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM). Na krivoj su prikazani koncentracijski-zavisni efekti ekstrakta, a koncentracije na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije ekstrakta. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD efekata dobijenih merenjem na 7 preparata.

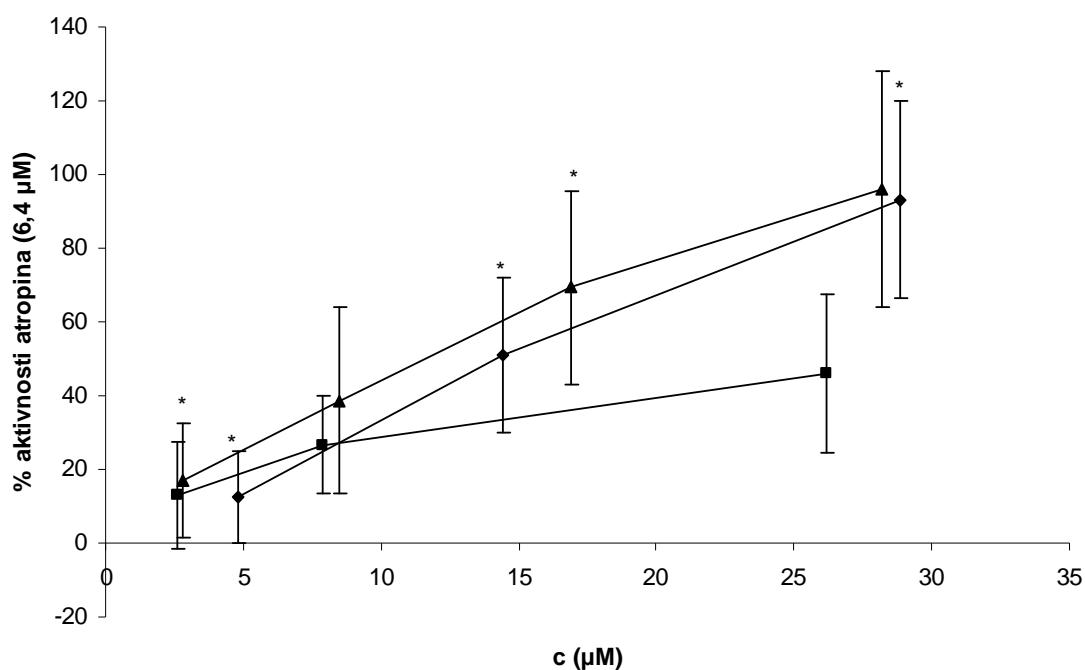
#### 7.4. Spazmolitička aktivnost metabolita

U cilju pronalaženja jedinjenja koja makar delom doprinose pokazanom spazmolitičkom delovanju hloroformskog i metanolnog ekstrakta, ispitivan je uticaj četiri metabolita: latifolona (**1**), džamirona (**4**), (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**) i hlorogenske kiseline (**11**) u istim modelima koji su primenjeni za ispitivanje aktivnosti ekstrakata.

##### *Efekat metabolita na spontanu aktivnost ileuma*

Jedinjenja **1** (1-6 µg/ml), **6** (1-10 µg/ml) i **11** (1-10 µg/ml) dovela su do relaksacije spontanijih kontrakcija izolovanog ileuma. Jedinjenje **1** je u koncentraciji od 6 µg/ml (28,8 µM) ostvarilo statistički značajan efekat (93,20 $\pm$ 26,57%) približan efektu atropina (6,4 µM). Jedinjenje **11** je takođe pokazalo značajan relaksantni efekat ostvarivši u koncentraciji od 10 µg/ml (28,2 µM) efekat koji je iznosio 95,95 $\pm$ 31,90%

efekta atropina, dok je jedinjenje **6** u koncentraciji od 10  $\mu\text{g/ml}$  (26,2  $\mu\text{M}$ ) ostvarilo relaksaciju koja je iznosila  $46,13 \pm 21,50\%$  (Slika 39). Aktivnost jedinjenja **4** ispitivana je samo u koncentraciji od 8  $\mu\text{g/ml}$  (22,5  $\mu\text{M}$ ) i iznosila je  $37,03 \pm 21,86\%$  efekta atropina.



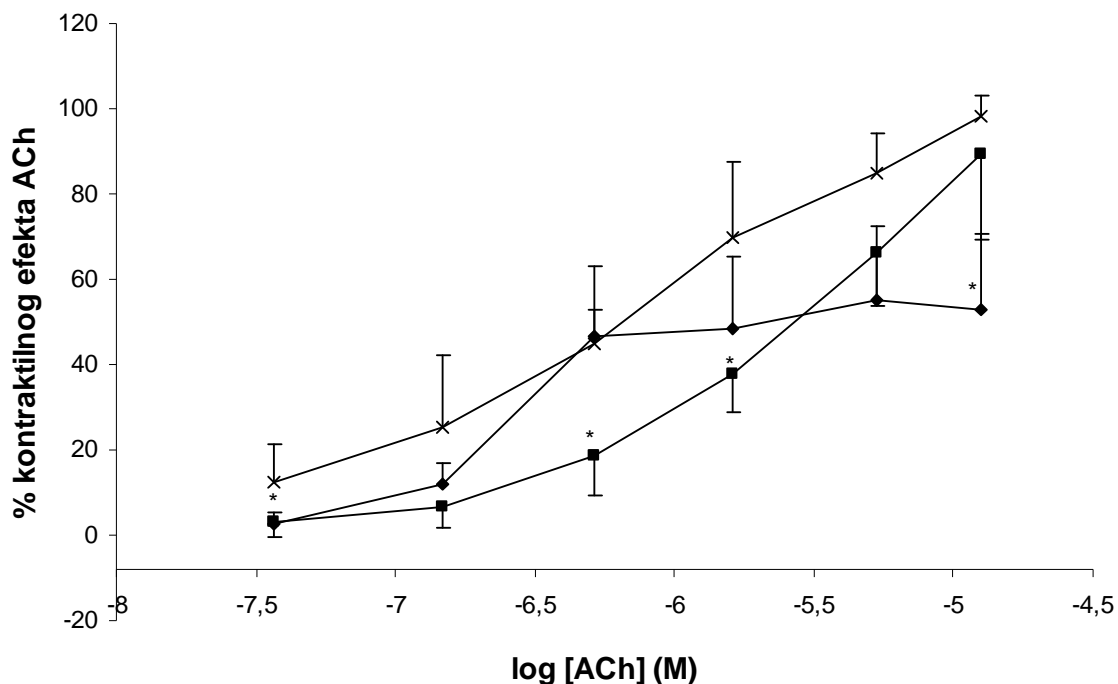
**Slika 39.** Spazmolitička aktivnost jedinjenja **1** (romb), **6** (kvadrat) i **11** (trougao): uticaj na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Aktivnost testiranih jedinjenja izražena je kao % maksimalnog spazmolitičkog efekta koji je ostvario atropin u koncentraciji od 6,4  $\mu\text{M}$  (100%). Koncentracije testiranih jedinjenja prikazane na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD izmerenih efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

#### ***Efekat metanolnog ekstrakta na kontrakcije ileuma izazvane ACh***

Sva četiri testirana jedinjenja inhibirala su kontrakcije ileuma izazvane ACh. Aktivnost jedinjenja **1** ispitivana je u koncentracijama od 2  $\mu\text{g/ml}$  i 4  $\mu\text{g/ml}$ . U koncentraciji od 2  $\mu\text{g/ml}$  (9,6  $\mu\text{M}$ ) ovo jedinjenje je relativno malo smanjilo maksimalni efekat ACh (na  $89,34 \pm 19,92\%$ ), ali je zato statistički značajno redukovalo efekte nižih

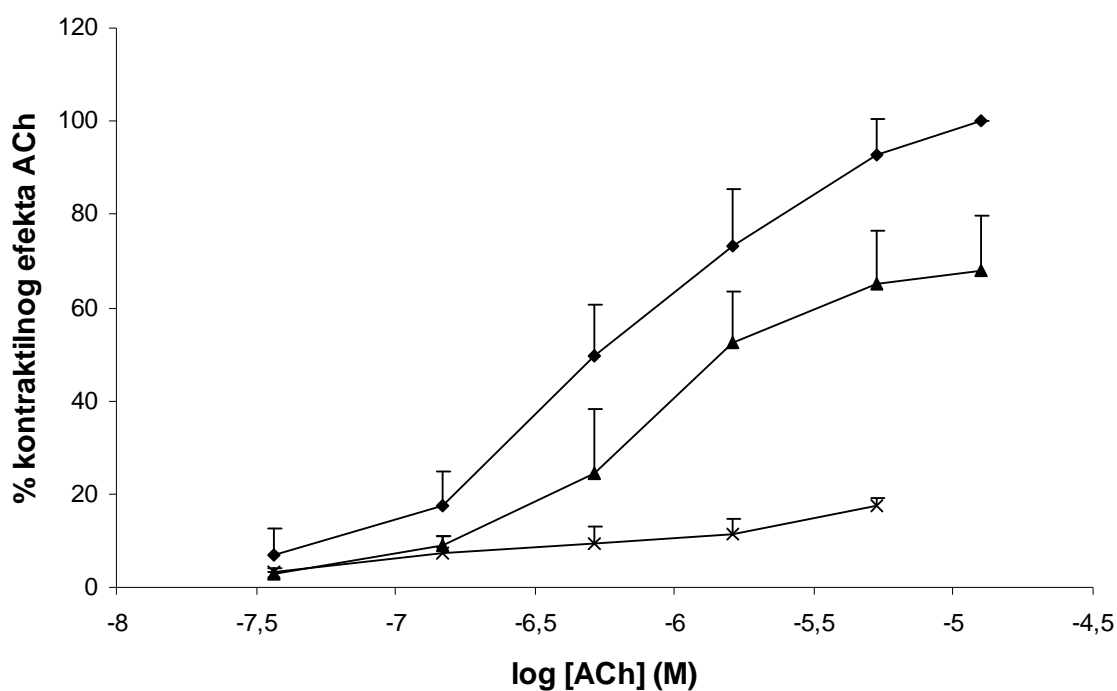
koncentracija ACh. Nasuprot tome, u većoj koncentraciji jedinjenje **1** nije ostvarilo spazmolitički efekat.

Jedinjenje **6** u koncentraciji od 8  $\mu\text{g/ml}$  (20,9  $\mu\text{M}$ ) dovelo je do statistički značajnog smanjenja spazmogenog efekta ACh na  $52,91 \pm 17,75\%$  (Slika 40).



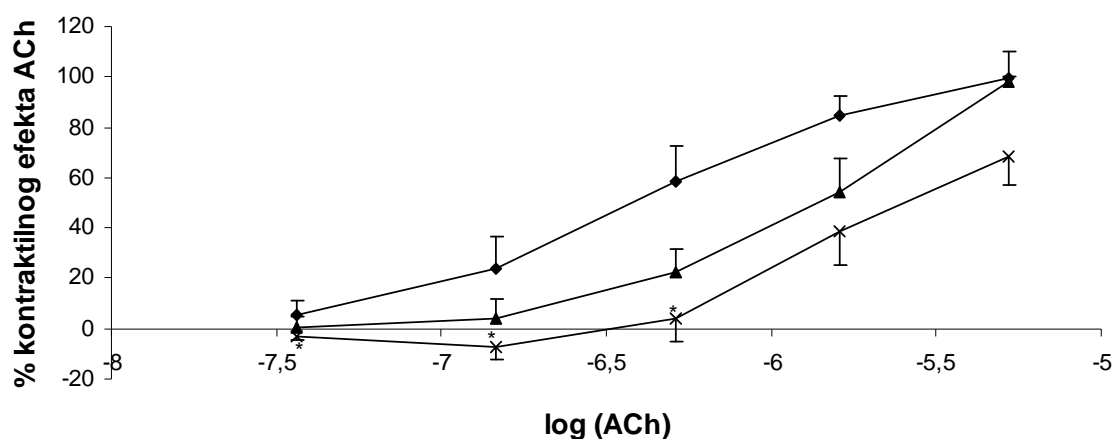
**Slika 40.** Spazmolitička aktivnost jedinjenja **1** i **6**: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (krst) i prisustvu 2  $\mu\text{g/ml}$  jedinjenja **1** (kvadrat) i 8  $\mu\text{g/ml}$  jedinjenja **6** (romb). Aktivnost testiranih jedinjenja izražena je kao % maksimalnog kontraktinog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + ili - SD efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

Aktivnost jedinjenja **4** je takođe ispitivana u dve koncentracije: 4  $\mu\text{g/ml}$  i 8  $\mu\text{g/ml}$ . U nižoj koncentraciji ovaj metabolit je ostvario slab spazmolitički efekat, dok je u koncentraciji od 8  $\mu\text{g/ml}$  (22,5  $\mu\text{M}$ ) efekat bio jači što je rezultovalo smanjenjem maksimalnog efekta ACh na  $68,09 \pm 11,50\%$  (Slika 41).



**Slika 41.** Spazmolitička aktivnost jedinjenja **4** i atropina: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (romb) i prisustvu 8 µg/ml jedinjenja **4** (trougao) i 0,1 µg/ml atropina (krst). Aktivnost testiranih jedinjenja izražena je kao % maksimalnog kontraktinog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + SD izmerenih efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

Aktivnost jedinjenja **11** ispitivana je u koncentracijama od 8 µg/ml i 16 µg/ml. U koncentraciji od 8 µg/ml mogao se uočiti relaksantni efekat prema kontrakcijama izazvanim svim koncentracijama ACh osim najveće, dok je u koncentraciji od 16 µg/ml došlo i do smanjenja maksimalnog efekta ACh na  $68,22 \pm 11,35\%$  uz statističku značajnost rezultata ostvarenih prema efektima nižih koncentracija ACh (Slika 42).



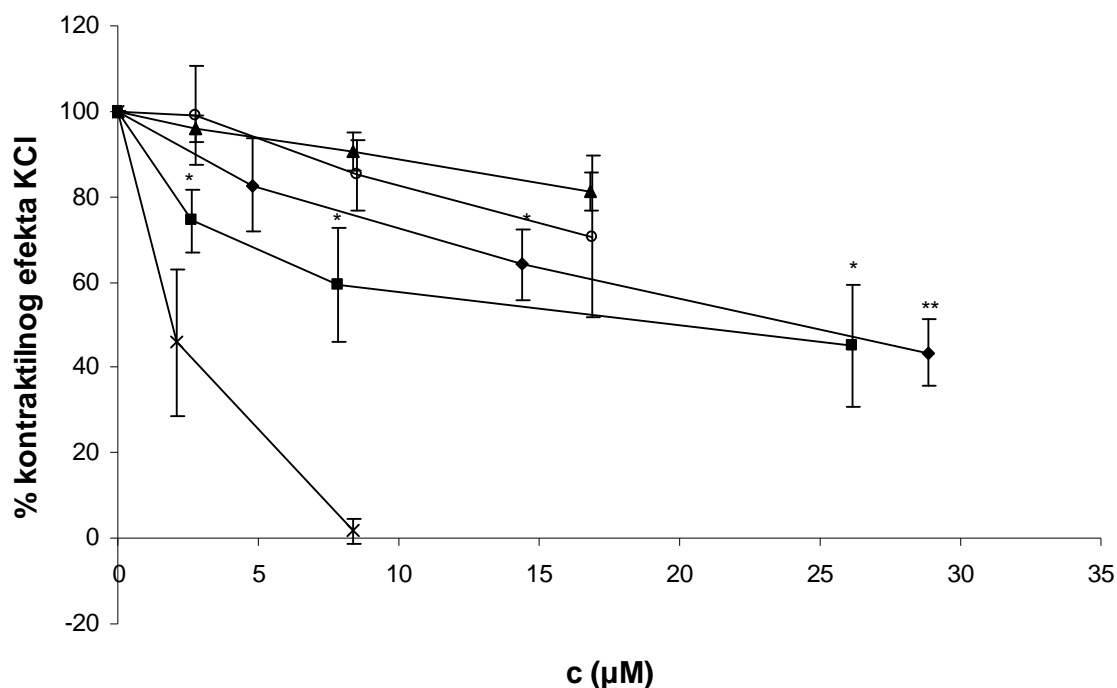
**Slika 42.** Spazmolitička aktivnost jedinjenja **11**: uticaj na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane ACh. Na grafiku su predstavljene krive kontraktilne aktivnosti ACh u odsustvu (romb) i prisustvu 8 µg/ml (trougao) i 16 µg/ml jedinjenja **11** (krst). Aktivnost testiranog jedinjenja izražena je kao % maksimalnog kontraktilnog efekta koji je ostvario ACh i kome je dodeljena vrednost 100%. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost + ili - SD izmerenih efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

U ovom eksperimentalnom modelu atropin je korišćen kao referentna supstanca. Efekti atropina ispitivani su za dve koncentracije: 0,01 µg/ml i 0,1 µg/ml. U koncentraciji od 0,1 µg/ml (0,14 µM), atropin je značajno inhibirao efekte ACh, a maksimalni efekat ACh smanjio na 17,38±1,62% (Slika 41).

#### ***Efekat metabolita na kontrakcije ileuma izazvane KCl***

Jedinjenja **1** i **6** su takođe statistički značajno inhibirala kontrakcije ileuma izazvane KCl. Najsnažniju aktivnost ispoljilo je jedinjenje **1** (1-6 µg/ml) koje je u koncentraciji od 6 µg/ml (28,8 µM) smanjilo efekat KCl na 43,53±7,78% (p<0,01). Jedinjenje **6** (1-10 µg/ml) ostvarilo je sličan efekat, redukujući efekat KCl na 45,11±14,10% u koncentraciji od 10 µg/ml (26,2 µM) (p<0,05). Jedinjenja **4** (1-6 µg/ml) i **11** (1-6 µg/ml) ostvarila su slab relaksantni efekat koji u poređenju sa kontrolom nije imao statistički značaj. U najvišim testiranim koncentracijama ova dva jedinjenja su smanjila tonične kontrakcije izazvane KCl, jedinjenje **4** na 81,14±4,56, a

jedinjenje **11** na  $70,57 \pm 18,90\%$ . Sva testirana jedinjenja su pokazala slabiju aktivnost u poređenju sa alverinom (1-4  $\mu\text{g/ml}$ ), jedinjenjem koje je korišćeno kao referentni lek. Alverin je spazmolitik koji inhibira osetljivost kontraktilnih proteina prema  $\text{Ca}^{2+}$  (Hayase i sar., 2007). U koncentraciji od 4  $\mu\text{g/ml}$  ovaj agens je doveo do skoro kompletne inhibicije kontraktilnog efekta KCl ( $1,75 \pm 2,96\%$ ) (Slika 43).



**Slika 43.** Spazmolitička aktivnost jedinjenja **1** (romb), **4** (trougao), **6** (kvadrat), **11** (krug) i alverina (krst): ispitivanje uticaja na kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM). Na krivoj su prikazani koncentracijski-zavisni efekti metabolita, a koncentracije na apscisi predstavljaju finalne kumulativne koncentracije metabolita. Svaka tačka predstavlja srednju vrednost  $\pm$  SD izmerenih efekata dobijenih merenjem na 4 ili više preparata.

Etarsko ulje ostvarilo je potentnu inhibitornu aktivnost u sva tri eksperimentalna modela, pri čemu je najjače inhibiralo kontrakcije izazvane ACh. Ova činjenica navodi na zaključak da etarsko ulje svoje efekte ostvaruje pre svega kao antagonista muskarinskih receptora, pri čemu se ovaj spazmolitički efekat ne može pripisati samo antiholinergičkom delovanju, pošto ispoljava relaksantne efekte i na spontane, i na

kontrakcije izazvane KCl. Prethodna ispitivanja su pokazala da najzastupljeniji metaboliti ovog etarskog ulja, elemicin i miristicin, ostvaruju antiholinergičko delovanje (McKenna i sar., 2004), a da se spazmolitičko delovanje ploda peršuna može makar delimično objasniti spazmolitičkim delovanjem miristicina (Czygan i Hiller, 2002).

Oba ispitivana ekstrakta su ispoljila značajno relaksantno delovanje u sva tri eksperimentalna modela pa se može pretpostaviti da ekstrakti svoj spazmolitički efekat ostvaruju različitim mehanizmima. Inhibitorski efekat prema spontanijama i kontrakcijama izazvanim KCl mogao bi da se objasni blokadom  $Ca^{2+}$  kanala, odnosno otvaranjem  $K^+$  kanala, jer je poznato da do kontrakcija izolovanog ileuma dolazi usled povećanja koncentracije  $Ca^{2+}$  jona u citoplazmi. Relaksantni efekat prema kontrakcijama indukovanim ACh najverovatnije predstavlja posledicu blokade muskarinskih receptora. Poznato je da su u gastrointestinalnom traktu najzastupljeniji  $M_2$  i  $M_3$  podtipovi muskarinskih receptora, pri čemu je podtip  $M_2$  3 – 4 puta zastupljeniji od podtipa  $M_3$ . Ipak, ACh izaziva kontrakcije na izolovanom ileumu pre svega preko  $M_3$  receptorskog puta koji podrazumeva hidrolizu fosfoinozitola i mobilizaciju  $Ca^{2+}$  jona (Ehlert i sar., 1999).

Može se zaključiti da je metanolni ekstrakt ostvario jače spazmolitičko delovanje prema spontanijama, kao i prema kontrakcijama izazvanim KCl u odnosu na hloroformski ekstrakt, dok je njihov efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh bio međusobno uporediv. Jedinjenja **1** i **6** koja su ostvarila relaksantni efekat u sva tri modela prisutna su u oba testirana ekstrakta, pri čemu je njihova zastupljenost bila višestruko veća u hloroformskom nego u metanolnom ekstraktu. Analizirajući dobijene rezultate i zastupljenost ovih jedinjenja u hloroformskom ekstraktu (6,84 i 10,92%, redom), može se pretpostaviti da su upravo ova dva jedinjenja uz elemicin (čije je prisustvo takođe potvrđeno u hloroformskom ekstraktu) u značajnoj meri odgovorna za aktivnost ekstrakta. Metanolni ekstrakt je, kao što je već rečeno, pokazao jaču spazmolitičku aktivnost u kojoj učestvuju sva četiri identifikovana metabolita. Uz već spomenuta jedinjenja **1** i **6**, i jedinjenje **11** je relaksiralo izolovani ileum u sva tri eksperimentalna modela, dok su prethodna ispitivanja pokazala da jedinjenje **12** ostvaruje snažan spazmolitički efekat (Trute i sar., 1997).

Prethodno je pokazano da i izolati drugih vrsta roda *Ferula* ostvaruju značajnu spazmolitičku aktivnost. Etarsko ulje, vodeno–alkoholno, etarski, benzinski i metanolni



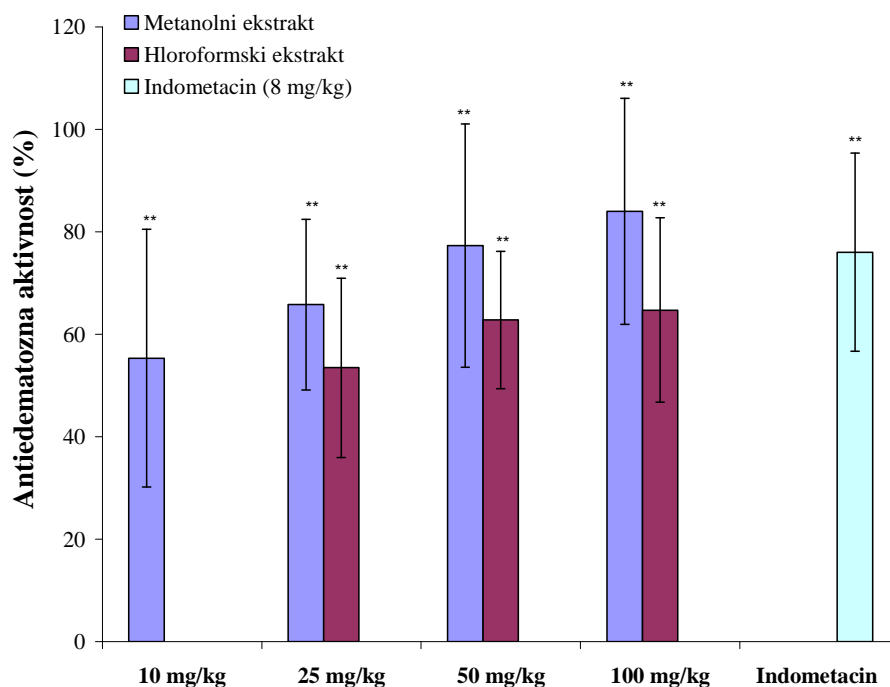
ekstrakt oleogumirezine dobijene iz *F. gummosa* su koncentraciono-zavisno inhibirali kontrakcije izolovanog ileuma pacova izazvane KCl (80 mM) i ACh u istom eksperimentalnom modelu. Najjaču aktivnost pokazao je etarski ekstrakt, a kvalitativno sličan efekat ostvarili su i benzinski i metanolni ekstrakt, dok su slabiju aktivnost ostvarili vodeno-alkoholni ekstrakt i etarsko ulje. Etarski (0,06-2,1 µg/ml), benzinski (0,3-10 µg/ml) i metanolni ekstrakt (1,5-24 µg/ml) su u poređenju sa testiranim ekstraktima podzemnih organa *F. heuffelii* u nižem opsegu koncentracija inhibirali spazmogeno delovanje KCl, dok su efekti vodeno-alkoholnog ekstrakta (10-320 µg/ml) i etarskog ulja (10-360 µg/ml) ostvareni u sličnom opsegu koncentracija kao i efekti testiranih izolata *F. heuffelii*. Etarski i benzinski ekstrakt *F. gummosa* su takođe ostvarili snažnije delovanje od testiranih ekstrakata *F. heuffelii* i na kontrakcije izazvane ACh. U koncentracijama od 10 i 20 µg/ml etarski ekstrakt smanjuje maksimalni efekat ACh na 57 i 92%, a i benzinski na 77 i 100%. Metanolni ekstrakt *F. gummosa* je takođe u poređenju sa metanolnim ekstraktom *F. heuffelii* u nižim koncentracijama (24 µg/ml) ostvario inhibitorni efekat prema kontrakcijama izazvanim ACh. Efekat etarskog ulja *F. gummosa* je, međutim, bio slabiji od testiranog etarskog ulja *F. heuffelii* i tek u koncentraciji od 360 µg/ml doveo do kompletne inhibicije efekata ACh. Bitno je takođe istaći da, za razliku od testiranog etarskog ulja *F. heuffelii*, u opsegu koncentracija od 10-360 µg/ml etarsko ulje *F. gummosa* nije ostvarilo nikakav efekat prema spontanim kontrakcijama izolovanog ileuma (Sadrei i sar., 2001).

Etarsko ulje oleogumirezine *F. assa-foetida* je snažno inhibiralo kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane KCl (80 mM) ( $IC_{50}=5,8\pm 1,1$  nl/ml) i nešto slabije kontrakcije izazvane ACh i 5-HT (Sadrei i sar., 2003). Prethodno je takođe pokazano da i vodeni ekstrakt oleogumirezine dobijene iz *F. assa-foetida* ostvaruje relaksantni efekat prema spontanim kontrakcijama, kao i prema kontrakcijama izazvanim ACh, histaminom i KCl. Ovi efekti su ostvareni u značajno višim testiranim koncentracijama (1-7 mg/ml) u poređenju sa ispitivanim izolatima *F. heuffelii*. Bitno je, međutim, istaći da je za ispitivanje efekta vodenog ekstrakta *F. assa-foetida* na kontrakcije izazvane ACh korišćen drugačiji eksperimentalni model, kao i da su eksperimenti sprovedeni na izolovanom ileuma zamoraca, a ne pacova (Fatehi i sar., 2004). Vodeni ekstrakt (2, 5 i 10 mg/ml) oleogumirezine iz *F. assa-foetida* ostvario je relaksantno delovanje i prema kontrakcijama izolovane traheje zamoraca izazvanim

metaholinom koje je bilo uporedivo sa efektom teofilina (0,25, 0,5 i 0,75 mM). Ekstrakt je u koncentraciji od 10 mg/ml gotovo potpuno poništio kontraktilni efekat metaholina ( $91,43 \pm 2,83\%$ ). Ispitivanja potencijalnog mehanizma kojim ovaj ekstrakt relaksira glatku muskulaturu traheje su pokazala da je efekat najverovatnije ostvaren uglavnom preko muskarinskih receptora uz veoma mali doprinos efekata koji potiču od histaminskih receptora (Gholamnezhad i sar., 2011).

## 8. Antiinflamatorna aktivnost ekstrakata

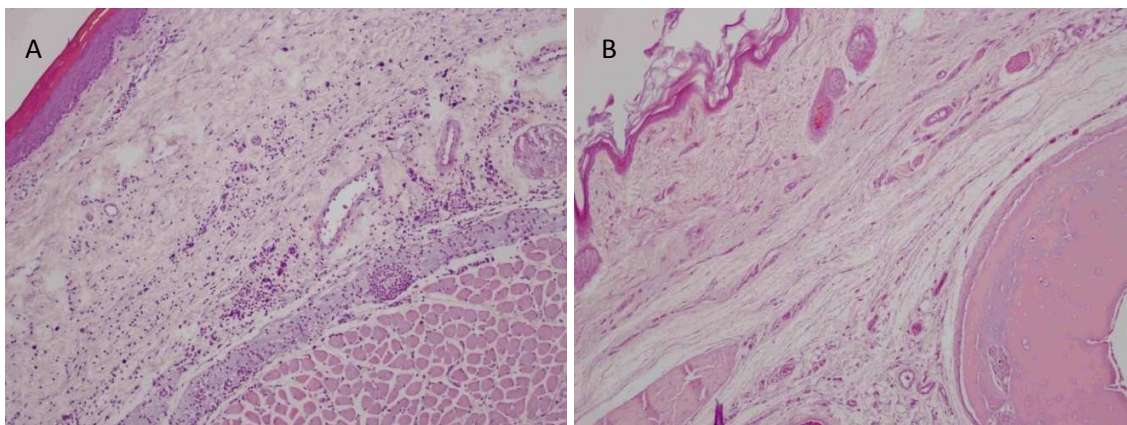
Hloroformski i metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* su u opsegu doza od 10-100 mg/kg *p.o.* ostvarili dozno-zavisno i statistički značajno smanjenje edema šapica pacova izazvano intraplantarnom injekcijom karagenina. Antiedematozni efekat metanolnog ekstrakta je u dozi od 50 mg/kg iznosio  $77,28 \pm 23,72\%$  i ovaj efekat je bio uporediv sa efektom indometacina (8 mg/kg *p.o.*) koji je korišćen kao referentni lek ( $76,00 \pm 19,32\%$ ) (Slika 44). Primenjen u većoj dozi (100 mg/kg *p.o.*) MeOH ekstrakt je ostvario još jači efekat ( $84,00 \pm 22,03\%$ ). Efekat hloroformskog ekstrakta je bio nešto slabiji. Primenjen u dozama od 50 i 100 mg/kg *p.o.* ekstrakt je ostvario sličan efekat ( $62,78 \pm 13,42\%$  i  $64,71 \pm 17,98\%$ , redom).



**Slika 44.** Antiedematozno delovanje hloroformskog i metanolnog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* u modelu karageninom izazvanog edema šapica pacova; statistička značajnost (\*\* $p < 0,01$ ) određivana je *Mann-Whitney U*-testom u poređenju sa kontrolnom grupom (tretiranom rastvaračem).

Analizom histoloških preparata šapica u kontrolnoj grupi uočeno je prisustvo izražene inflamacije koja se karakteriše prisustvom edema i ćelijskih infiltrata (Slika 45 A), dok navedene inflamatorne promene nisu detektovane u grupi koja je tretirana

metanolnim ekstraktom u dozi 100 mg/kg (Slika 45 B). Na osnovu histološkog nalaza potvrđena je antiinflamatorna aktivnost ispitivanih ekstrakata.



**Slika 45.** Histologija šapica pacova (*Hematoksilin-eozin* bojenje, uvećanje 100×). A – kontrolna grupa; B – grupa tretirana metanolnim ekstraktom (100 mg/kg. *p.o.*).

Rezultati prethodnih ispitivanja pokazuju da hlorogenska kiselina, jedan od metabolita prisutnih u ispitivanom metanolnom ekstraktu, ostvaruje antiinflamatornu aktivnost inhibicijom produkcije azot-monoksida (NO) i ekspresije ciklooksigenaze-2 (COX-2) i inducibilne NO-sintaze (iNOS). Pokazano je takođe da hlorogenska kiselina inhibira biosintezu proinflamatornih citokina (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i IL-6) u monocitima tretiranim LPS, kao i da inhibira translokaciju transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B u jedro (Shi i sar., 2013; Hwang i sar., 2013). I 3,5-dikafeoilhina kiselina, druga identifikovana fenolkarboksilna kiselina u metanolnom ekstraktu, deluje antiinflamatorno, i to tako što inhibira produkciju PGE<sub>2</sub>. Pokazano je takođe i da izolati koji su sadržali smešu 3,5- i 3,4-dikafeoilhina kiselina dovode do supresije COX-2/PGE<sub>2</sub> i iNOS/NO puteva (dos Santos i sar., 2010; Puangpraphant i sar., 2011). Neki seskviterpenski kumarini (fukanefuomarini E, F, G, H, I, J, K i L), koji su strukturno slični jedinjenjima **6** i **9**, ostvaruju takođe antiinflamatornu aktivnost inhibirajući produkciju NO *in vitro* (Nazari i Iranshahi, 2011).

Makrofage igraju važnu ulogu u imunskom odgovoru i procesu inflamacije. Nakon aktivacije, makrofage iniciraju produkciju citokina, kiseoničnih i azotnih vrsta, kao i eikozanoida. Bakterijski lipopolisaharid (LPS), sam ili u kombinaciji sa rekombinantnim mišjim interferonom  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), najpoznatiji je stimulus koji dovodi do

indukcije transkripcije gena za proinflamatorne proteine. Ovakav stimulus rezultuje oslobađanjem citokina i sintezom enzima, kao npr. COX-2 i iNOS. NO je radikal koji igra važnu ulogu u imunskom odgovoru, kao i u procesu inflamacije. Međutim, prevelika produkcija NO može dovesti do oštećenja tkiva. Tako je npr. kod nekih inflamatornih bolesti, kao što je reumatoidni artritis, potvrđeno da dolazi do prevelike produkcije NO.

Prethodna ispitivanja pokazala su da jedinjenje **10**, izolovano iz podzemnih organa *F. heuffelii*, inhibira produkciju NO stimulisanu LPS/IFN- $\gamma$  i efekat ovog jedinjenja

(IC<sub>50</sub>=10,7  $\mu$ M) bio je jači od efekta kvercetina koji je korišćen kao referentna supstanca (IC<sub>50</sub>=26,8  $\mu$ M). Dalja ispitivanja su pokazala da jedinjenje **10** ne dovodi do inhibicije ekspresije iNOS te je pretpostavljeno da ovo jedinjenje svoj efekat ostvaruje inhibicijom enzima (Motai i Kitanaka, 2005a). Isti autori su ispitivali i aktivnost jedinjenja **3** i **4**, izolovanih iz korena *F. fukanensis*, koja su takođe u okviru ove disertacije izolovana i iz vrste *F. heuffelii*. Ovi metaboliti su inhibirali produkciju NO kao i ekspresiju iNOS u RAW264.7 ćelijskoj liniji, stimulisanu LPS/IFN- $\gamma$ , ali su u istim koncentracijama ostvarili i citotoksičan efekat. Smanjenjem koncentracija (na 10  $\mu$ M) došlo je do smanjenja citotoksičnog efekta, ali i antiinflamatorne aktivnosti (Motai i Kitanaka, 2006). Jedinjenja **6** i **8** u istom modelu, u koncentracijama od 10 i 30  $\mu$ g/ml, redom, nisu inhibirala produkciju NO (Motai i Kitanaka, 2004 i 2005b).

Pokazano je da su i drugi seskviterpenski kumarini, seskviterpenski fenilpropani i seskviterpenski hromoni izolovani iz vrste *F. fukanensis* inhibirali u istom modelu produkciju NO. Fukanefuromarini E, F i G, izolovani iz korena *F. fukanensis* inhibirali su produkciju NO prevencijom ekspresije NO-sintaze u ćelijskoj liniji sličnoj mišjim makrofagama (RAW264.7) *in vitro*. Pored toga, fukanefuromarin E, kao i još neki seskviterpenski kumarini vrsta roda *Ferula* (fukanemarin B), koncentraciono-zavisno su nishodno regulisali ekspresiju iRNK transkripta iNOS u pomenutoj ćelijskoj liniji. RT-PCR (Lančana reakcija polimerizacije kojoj prethodi reverzna transkripcija) eksperimenti pokazali su da inkubacija ćelija LPS/IFN- $\gamma$  dovodi do porasta nivoa iNOS i da fukanefuromarin E i fukanemarin B inhibiraju ovaj porast (Motai i Kitanaka, 2004). Fukanefuromarini H-K, izolovani iz iste vrste, inhibirali su u jednoj novoj studiji produkciju NO nakon indukcije LPS/IFN- $\gamma$ . Ova jedinjenja su svoj efekat ostvarila u

niskim mikromolarnim koncentracijama, a RT-PCR analiza je nakon toga pokazala da fukanefuromarin H i K nishodno regulišu ekspresiju iRNK, iNOS, IL-6, kao i TNF- $\alpha$  i da je ova inhibicija koncentraciono-zavisna. Poređenjem strukture i aktivnosti ovih jedinjenja došlo se do zanimljivih zaključaka. Fukanefuromarin H delovao je jače od fukanefuromarina I, kao i fukanefuromarin J u poređenju sa fukanefuromarinom K, što navodi na zaključak da je konfiguracija dimetildihidrofuranskog prstena značajna za inhibitornu aktivnost ovih kumarina. Fukanefuromarin H je jako sličan jedinjenju **6** izolovanom iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*, a razlikuju se samo u pogledu prisustva OH grupe na atomu C-9' ugljovodoničnog lanca (Motai i sar., 2013). Još jedan metabolit strukturno veoma sličan jedinjenju **6**, 2,3-dihidro-7-metoksi-2*S*\*,3*R*\*-dimetil-2-[4,8-dimetil-3(*E*),7-nonadienil]-furo[3,2-*c*]kumarin, koji se od jedinjenja **6** razlikuje samo po prisustvu OCH<sub>3</sub> umesto OH grupe na položaju C-7 kumarinskog jezgra, inhibirao je produkciju NO, kao i ekspresiju iRNK i iNOS u istom eksperimentalnom modelu (Motai i Kitanaka, 2006). Iako postojeći podaci pokazuju da jedinjenje **6** ne inhibira produkciju NO, zbog njegovog visokog sadržaja u hloroformskom ekstraktu (10,92%) i pokazane aktivnosti njemu strukturno veoma sličnih jedinjenja, u perspektivi bi trebalo sprovesti dodatna ispitivanja kako bi se ispitala njegova potencijalna uloga (i u većim koncentracijama od 10  $\mu$ g/ml) u antiinflamatornoj aktivnosti ekstrakata *F. heuffelii*.

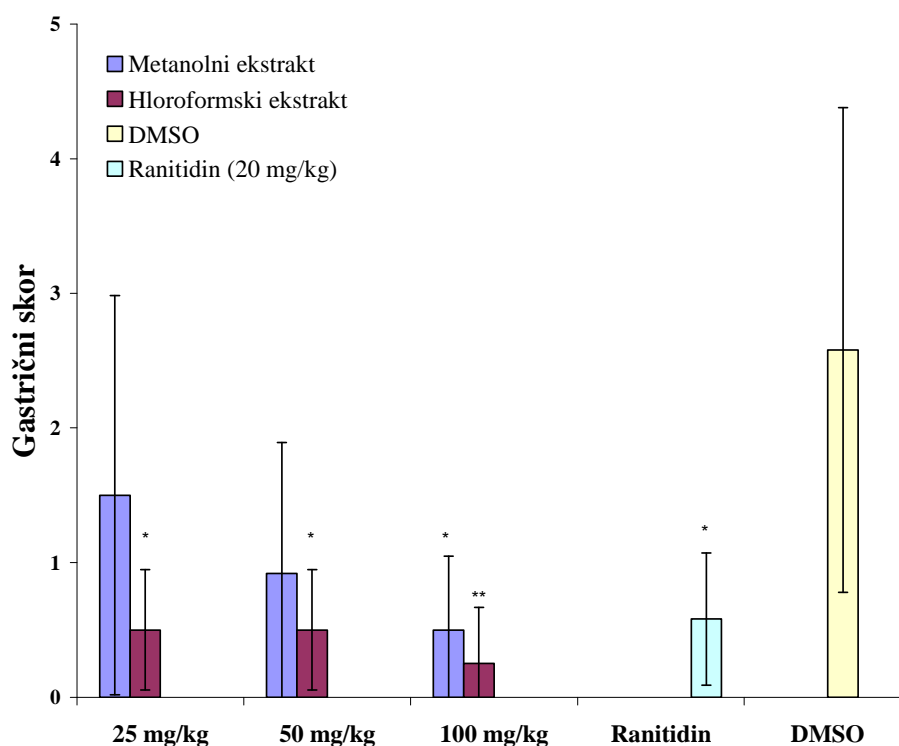
Uzimajući u obzir postojeće literaturne podatke može se zaključiti da jedinjenja **3**, **4** i **10** svakako doprinose antiinflamatornom delovanju hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*. Antiinflamatorna aktivnost metanolnog ekstrakta podzemnih organa ove biljke može se makar delom objasniti aktivnošću prisutnih fenolkarboksilnih kiselina (jedinjenja **11** i **12**).

## 9. Gastroprotektivna aktivnost ekstrakata

Hloroformski i metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* su nakon oralne (*p.o.*) primene ostvarili dozno-zavisni gastroprotektivni efekat u eksperimentalnom modelu akutnog ulkusa pacova indukovano oralnom primenom apsolutnog etanola (akutni stres-ulkus) *in vivo*.

Hloroformski ekstrakt ostvario je snažan i statistički značajan efekat u sve tri primenjene doze (25, 50 i 100 mg/kg). Gastroprotektivni efekat hloroformskog ekstrakta je u dozama od 25 i 50 mg/kg *p.o.* (gastrični skor je u oba slučaja iznosio  $0,5 \pm 0,45$ ) bio uporediv sa efektom 20 mg/kg *p.o.* ranitidina ( $0,58 \pm 0,49$ ), koji je primenjen kao referentni lek. Gastrični skor je u grupi tretiranoj hloroformskim ekstraktom u dozi od 100 mg/kg *p.o.* iznosio  $0,25 \pm 0,42$  ( $p < 0,01$ ), te se može zaključiti da je u ovoj dozi hloroformski ekstrakt ostvario jači efekat od referentnog leka (Slika 46).

Metanolni ekstrakt je u istim dozama ostvario nešto slabiju aktivnost, a efekat je takođe bio dozno-zavisan. Nakon primene maksimalne testirane doze od 100 mg/kg *p.o.* metanolni ekstrakt je ostvario protektivni efekat (gastrični skor iznosio je  $0,5 \pm 0,55$ ) koji je bio uporediv sa efektom ranitidina.



**Slika 46.** Gastroprotektivni efekat hloroformskog i metanolnog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* ispitivan u modelu akutnog ulkusa pacova izazvanog etanolom; statistička značajnost (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ) određivana je *Mann-Whitney U*-testom u poređenju sa kontrolnom grupom (tretiranom rastvaračem).

Prethodna ispitivanja pokazala su da hlorogenska kiselina deluje gastroprotektivno. U eksperimentalnim modelima ulkusa izazvanim smešom etanola (60%) i HCl (0,03M), (100  $\mu$ l/10 g telesne mase), kao i nesteroidnim antiinflamatornim lekom piroksikamom (100 mg/kg *p.o.*), hlorogenska kiselina je ostvarila gastroprotektivni efekat inhibirajući migraciju neutrofila, i vraćajući nivoe katalaze, superoksid dismutaze, glutaciona peroksidaze i glutationa na miševima kod kojih je ulkus izazvan rastvorom etanol/HCl. Pored toga, hlorogenska kiselina je inhibirala porast koncentracije TNF $\alpha$  i LTB $_4$ , ali nije dovela do normalizacije smanjenog nivoa prostaglandina u modelu ulkusa izazvanog primenom piroksikama. Na osnovu navedenih podataka iz literature može se dakle pretpostaviti da hlorogenska kiselina, makar delimično, doprinosi gastroprotektivnom delovanju metanolnog ekstrakta (Shimoyama i sar., 2013; Klein-Junior, 2012).



Istraživanje sprovedeno 2011. god. je ukazalo na gastroprotektivni potencijal koloidnog rastvora oleogumirezine *F. assa-foetida*. U dozi od 50 mg/kg *p.o.* koloidni rastvor asafetide ostvario je značajan efekat u nekoliko *in vivo* modela ulkusa: izazvanog imobilizacijom i potapanjem eksperimentalne životinje u hladnu vodu u toku 2 h („*cold restraint stress*“), primenom aspirina (200 mg/kg, u toku 4 h) i podvezivanjem pilorusa u toku 4 h (Iranshahi i Iranshahi, 2011). Takođe, hloroformski, etilacetatni, *n*-butanolni ekstrakti oleogumirezine *F. sinkiangensis*, kao i ostatak nakon ekstrakcije ove oleogumirezine vodom odnosno destilacije vodenom parom, ostvarili su gastroprotektivno delovanje kod pacova u modelu indometacinom (3 mg/kg, *s.c.*) izazvanog ulkusa. U dozi od 1,3515 g/kg, hloroformski i etilacetatni ekstrakt primenjeni intragastrično ispoljili su efekat uporediv sa efektom kontrolnog leka famotidina (0,003 g/kg) koji je primenjen na isti način. *n*-Butanolni ekstrakt je u istoj dozi ostvario nešto slabiji efekat, dok je ostatak nakon ekstrakcije i destilacije u istoj dozi ostvario za oko 50% jače delovanje od kontrolnog leka (Teng i sar., 2013).

## 10. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja, ekstrakata i metabolita

### 10.1. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja

Gotovo sve aromatične biljke, kao i izolovana etarska ulja ostvaruju slabije ili jače antimikrobno delovanje. Komponente etarskih ulja se, zahvaljujući lipofilnom karakteru, najčešće inkorporiraju u ćelijsku membranu mikroorganizama i na taj način inhibiraju transport elektrona u procesu oksidativne fosforilacije. Visoke koncentracije etarskih ulja takođe su u stanju da dovedu do lize ćelijske membrane i denaturacije citoplazmatskih proteina. Veoma često je dezinfekcijski efekat etarskih ulja i njihovih komponenti uporediv (ili čak i prevazilazi) efekat fenola koji se koristi kao agens za poređenje (fenolni koeficijent predstavlja vrednost koja upoređuje baktericidnu aktivnost etarskih ulja i fenola) (Teuscher, 2006).

Antimikrobna aktivnost izolata (etarskih ulja, hloroformskog i metanolnog ekstrakta, kao i izabranih čistih metabolita podzemnih organa vrste *F. heuffelii*) ispitivana je bujon mikrodilucionim testom. Eksperimentalni protokol opisan je u poglavlju 12.4. Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ispitivanih izolata i odgovarajućih antibiotika i antimikotika prema standardnim sojevima dati su u Tabelama 24 i 25.

Sva tri etarska ulja su pokazala izraženu antimikrobnu aktivnost prema Gram (+) bakterijama *S. epidermidis* (MIK=10,2-25,0 µg/ml), *M. flavus* (MIK=6,8-28,2 µg/ml) i *M. luteus* (MIK=10,2-13,7 µg/ml), dok je efekat prema Gram (-) bakterijama bio generalno slabiji, sa izuzetkom ulja F1 koje je snažno inhibiralo rast soja *K. pneumoniae* ATCC 13883 (MIK=6,2 µg/ml). Sva tri etarska ulja su takođe snažno inhibirala rast sva tri soja kvasnice *C. albicans*, a MIK vrednosti su se nalazile u opsegu od 6,25-13,7 µg/ml.

Prethodna ispitivanja pokazala su da elemicin, jedan od glavnih sastojaka sva tri etarska ulja, poseduje snažno antibakterijsko i naročito antifungalno delovanje (Rossi et al., 2007; Marston i sar., 1995). Međutim, u ispitivanju antimikrobne aktivnosti (metodom bioautografije) petroletarskog ekstrakta korena vrste *F. communis* prema Gram (+) bakterijama, ovaj fenilpropan se nalazio u neaktivnoj frakciji (Al-Yahya i sar.,

1998). Takođe, postoje rezultati koji ukazuju da i miristicin, kao i  $\alpha$ -pinen, koji su zastupljeni u testiranim uljima u značajnim količinama, deluju antibakterijski i antifungalno (Narasimhan i Dhake, 2006; Marston et al., 1995; Andrews i sar., 1980). Dakle, pokazana antimikrobna aktivnost testiranih etarskih ulja može se, barem delom, objasniti prisustvom pomenutih metabolita, uzimajući u obzir njihovu zastupljenost.

Prethodno je ispitivan uticaj vremena prikupljanja asafetide na hemijski sastav i farmakološku aktivnost etarskog ulja dobijenog destilacijom ove oleogumirezine. Uzorci prikupljeni u junu i julu pokazali su značajnu antimikrobnu aktivnost, pri čemu je najjače delovanje ostvario uzorak prikupljen u julu (MIK=15,0-65,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Ovaj uzorak je jače inhibirao rast *E. coli* od ulja F2 i F3, ali slabije od ulja F1. Inhibicija rasta *S. aureus* (MIK=65,0 $\pm$ 9,3  $\mu\text{g/ml}$ ) bila je jača od inhibicije koju su ostvarila sva tri etarska ulja *F. heuffelii*. Aktivnost prema soju *B. subtilis* bila je uporediva sa aktivnošću uzoraka F2 i F3, dok je antifungalna aktivnost prema kvasnici *C. albicans* (MIK=18 $\pm$ 28  $\mu\text{g/ml}$ ) bila slabija od aktivnosti sva tri etarska ulja *F. heuffelii*. Etarsko ulje asafetide inhibiralo je rast i *Salmonella typhi* (MIK=58 $\pm$ 7,1  $\mu\text{g/ml}$ ) i *Aspergillus niger* (MIK=22 $\pm$ 3,9  $\mu\text{g/ml}$ ) (Kavoosi i Rowshan, 2013).

Ispitivana etarska ulja F1, F2 i F3 pokazala su i jaču aktivnost prema bakterijama *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli* i kvasnici *C. albicans* od etarskog ulja korena *F. glauca* čije su se MIK vrednosti kretale od 78  $\mu\text{g/ml}$  (za *B. subtilis*) do 1250  $\mu\text{g/ml}$  (za *S. aureus* i *C. albicans*) (Maggi i sar., 2009). Etarsko ulje oleogumirezine *F. gummosa* pokazalo je zadovoljavajuću aktivnost prema Gram (+) bakterijama *S. aureus* i *Listeria monocytogenes* (MIK=1,56  $\mu\text{l/ml}$ ), dok je aktivnost prema Gram (-) bakterijama bila slabija. Autori pretpostavljaju da bi antimikrobna aktivnost mogla biti u velikoj meri posledica aktivnosti monoterpena  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinena (Abedi i sar., 2008).

## 10.2. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i metabolita

Ekstrakti podzemnih organa *F. heuffelii* pokazali su osrednju antimikrobnu aktivnost. Oba ekstrakta su snažnije inhibirala rast Gram (+) bakterija, a najjače dejstvo

hloroformski i metanolni ekstrakt ostvarili su prema bakterijama *Staphylococcus aureus* (MIK=12,5 µg/ml) i *Micrococcus luteus* (MIK=50,0 i 12,5 µg/ml, redom).

Testirana je i aktivnost 5 metabolita (u opsegu koncentracija 2-64 µg/ml) prisutnih u testiranim ekstraktima: latifolona (**1**), (6*E*)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-ona (**3**), džamirona (**4**), (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarina (**6**) i hlorogenske kiseline (**11**).

Jedinjenja **1** i **11** nisu inhibirala rast nijednog mikroorganizma u testiranom opsegu koncentracija. Jedinjenje **3** je snažno inhibiralo rast Gram (+) bakterija: *M. luteus* (MIK= 4 µg/ml; 11,2 µM), *B. subtilis* (MIK=4 µg/ml; 11,2 µM) i *S. epidermidis* (MIK=8 µg/ml; 22,5 µM). Jedinjenje **6** je takođe snažno inhibiralo rast Gram (+) bakterija *M. luteus* (MIK=2 µg/ml; 5,2 µM) i *S. epidermidis* (MIK=4 µg/ml; 10,5 µM), dok je jedinjenje **4** najjače delovanje ostvarilo prema bakteriji *B. subtilis* (MIK=8 µg/ml; 22,5 µM).

Aktivnošću jedinjenja **3**, **4** i **6** može se objasniti antimikrobni efekat hlороformskog ekstrakta prema bakterijama *M. luteus* (MIK=50 µg/ml), *B. subtilis* (MIK=100 µg/ml) i *S. epidermidis* (MIK=50 µg/ml). Naime, efekat ekstrakta je jači prema bakterijama *M. luteus* i *S. epidermidis* čiji je rast snažno inhibiralo i jedinjenje **6**, najzastupljenije u ovom ekstraktu. Aktivnost ovog ekstrakta prema bakteriji *S. aureus* najverovatnije je posledica antibakterijskog delovanja nekih drugih metabolita, jer je jedino jedinjenje **4**, i to samo u najvećoj testiranoj koncentraciji (64 µg/ml), inhibiralo njen rast. Aktivnost metanolnog ekstrakta ne može se objasniti aktivnošću ispitivanih metabolita, s obzirom da je jedino jedinjenje **6**, prisutno u procentu od 1,39%, ostvarilo antimikrobnu aktivnost, dok jedinjenja **1** i **11**, prisutna u ukupnom procentu od 4,61%, nisu u testiranom opsegu inhibirala rast nijedne bakterije. Može se, dakle, zaključiti da jedinjenje **6**, makar delimično, doprinosi antimikrobnom delovanju metanolnog ekstrakta, a da su neophodna dalja ispitivanja u cilju identifikovanja metabolita odgovornih za pokazano delovanje ovog ekstrakta.

Prethodno je ispitivana antifungalna aktivnost različitih ekstrakata korena *F. hermonis* prema sojevima *Alternaria solani*, *Cladosporium* sp., *Colletotrichum* sp., *Fusarium oxysporum*, *Mucor* sp., *Penicillium italicum*, *Pythium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus stolonifer*, *Stemphylium solani*, i *Verticillium dahliae*. Među testiranim

ekstraktima najjaču aktivnost ostvario je etilacetatni ekstrat. Značajnu aktivnost ostvarili su i petroletarski, vodeno-etilacetatni i benzinski ekstrakt, dok je najslabiju aktivnost ostvario vodeni ekstrakt (Al-Mughrabi i Aburjai, 2003).

Prethodna ispitivanja pokazala su da brojna jedinjenja izolovana iz vrsta roda *Ferula* ostvaruju značajno antimikrobno delovanje. Iz petroletarskog ekstrakta korena *F. communis* izolovana su tri aktivna jedinjenja. Daukanski estar, 14-(*o*-hidroksicinamoiloksi)-dauka-4,8-dien, ostvario je prema sojevima *S. aureus*, *B. subtilis*, *Streptococcus durans* i *E. faecalis* inhibitornu aktivnost (MIK=6,83  $\mu$ M) uporedivu sa aktivnošću streptomycin sulfata.

Ferulenol je ostvario još jaču aktivnost prema pomenutim sojevima (MIK=1,72  $\mu$ M), pri čemu je ovaj seskviterpenski kumarin ostvario snažno delovanje i prema nekoliko *Mycobacterium* sp. sojeva pa bi se ovaj metabolit mogao smatrati potencijalnim kandidatom u terapiji infekcija patogenim *Mycobacterium* sojevima (Al-Yahya i sar., 1998). Činjenica je, međutim, da je ferulenol ipak najslabiju aktivnost ostvario prema najpatogenijem soju *M. tuberculosis*, čak i u kombinaciji sa izoniazidom (Nazari i Iranshahi, 2011). Strukturne modifikacije na molekulu ferulenola su pokazale da uvođenje hidroksi ili acetoksi grupe na C<sub>12'</sub> dovodi do smanjenja antimikrobne aktivnosti, dok prisustvo benzoiloksi supstituenta na istom položaju pojačava aktivnost.

El-Bassuony i saradnici ispitivali su antibakterijski potencijal feruzinola i dijastereoizomera samarkandina prema Gram (+) (*B. cereus* i *S. aureus*) i Gram (–) (*Serratia* sp., *Pseudomonas* sp i *E. coli*) bakterijama. Feruzinol je ostvario snažan inhibitorni efekat i prema Gram (+) i prema Gram (–) bakterijama, dok je samarkandin ostvario efekat samo prema Gram (+) bakterijama (Gliszczyńska i Brodelius, 2012). Galbanična kiselina pojačava antimikrobnu aktivnost penicilina G i cefaleksina prema *S. aureus*. Dalja ispitivanja su pokazala da u koncentracijama koje su značajno niže od citotoksičnih ovaj kumarin dovodi do smanjenja MIK vrednosti za sve antibiotike prema meticilin-, tetraciklin- i ciprofloksacin-rezistentnom soju *S. aureus*, pa se danas razmatra i njena potencijalna primena kao adjuvansa u terapiji infektivnih stanja (Nazari i Iranshahi, 2011).

**Tabela 24.** Antimikrobna aktivnost etarskih ulja podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* i referentnih antibiotika. Rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

Mikroorganizam	Etarsko ulje (µg/ml)			Ampicilin (µg/ml)		Amikacin (µg/ml)		Streptomycin* (µg/ml)		Ciprofloksacin (µg/ml)		Nistatin (µg/ml)		Amfotericin (µg/ml)	
	F1 MIK	F2 MIK	F3 MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	100,00	226,50	138,12	0,50	2,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<b>25,00</b>	<b>17,60</b>	<b>10,25</b>	0,25	n.t.	100,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	n.t.	<b>13,70</b>	<b>10,25</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,10	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>M. flavus</i> ATCC 10240	<b>12,50</b>	<b>28,20</b>	<b>6,80</b>	3,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	25,00	113,20	82,625	0,50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>E. coli</i> ATCC 25922	25,00	113,20	221,00	2,00	4,00	50,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	6,25	169,88	221,00	2,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>K. pneumoniae</i> NCIMB 9111	n.t.	n.t.	n.t.	2,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	n.t.	21,15	13,77	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,30	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	50,00	>226,50	>221,00	3,00	0,50	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>C. albicans</i> ATCC 10259	<b>6,25</b>	<b>7,00</b>	<b>6,80</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,25
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	n.t.	<b>13,70</b>	<b>6,80</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,50
<i>C. albicans</i> ATCC 24433	<b>6,25</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	0,50

\* - rastvor streptomicina pripremljen je rastvaranjem 1 ml aktivne supstance u 1 ml rastvarača (DMSO)

n.t. – nije testirano

**Tabela 25.** Antimikrobna aktivnost ekstrakata i metabolita podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*, i referentnih antibiotika. Rezultati su izraženi kao minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

Mikroorganizam	Ekstrakt		Metabolit (µg/ml)						Ampicilin (µg/ml)		Ciprofloksacin (µg/ml)		Amfotericin (µg/ml)	
	CHCl <sub>3</sub> MIK	MeOH MIK	1 MIK	3 MIK	4 MIK	6 MIK	11 MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	MIK	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	12,50	12,50	>64,00	>64,00	64,00	>64,00	>64,00	>64,00	0,50	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	50,00	50,00	>64,00	8,00	32,00	4,00	>64,00	>64,00	0,25	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	50,00	12,50	>64,00	4,00	64,00	2,00	>64,00	>64,00	n.t.	0,10	n.t.	n.t.		
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	200,00	200,00	>64,00	32,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	0,50	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>E. coli</i> ATCC 25922	200,00	>200,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,00	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>E. coli</i> ATCC 10536	n.t.	n.t.	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	2,00	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	n.t.	n.t.	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	2,00	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>K. pneumoniae</i> NCIMB 9111	200,00	>200,00	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	2,00	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	100,00	50,00	>64,00	4,00	8,00	32,00	>64,00	>64,00	n.t.	0,30	n.t.	n.t.		
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	100,00	>200,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	3,00	n.t.	n.t.	n.t.		
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	50,00	100,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	>64,00	n.t.	n.t.	n.t.	0,50		

n.t. – nije testirano

## 11. Citotoksična aktivnost ekstrakata i metabolita

### 11.1. Citotoksična aktivnost ekstrakata

Hloroformski i metanolni ekstrakt ispitivani su u opsegu koncentracija od 0-200 µg/ml i oba ekstrakta su pokazala snažno citotoksično delovanje. Rezultati su izraženi kao IC<sub>50</sub> vrednosti (koncentracija koje inhibira 50% ćelijskog rasta) i prikazani su u Tabeli 26. Hloroformski ekstrakt je ostvario nekoliko puta jače delovanje od metanolnog i IC<sub>50</sub> vrednosti su za sve ćelijske linije bile manje od 11 µg/ml, a najjaču aktivnost pokazao je prema MCF7 ćelijskoj liniji (IC<sub>50</sub>=6,09±0,52 µg/ml). Metanolni ekstrakt je najjaču aktivnost takođe ostvario prema MCF7 ćelijskoj liniji i ovaj efekat je bio oko 1,5 puta jači u poređenju sa druge dve ćelijske linije.

**Tabela 26.** Koncentracije hloroformskog i metanolnog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* koje su dovodile do 50% inhibicije preživljavanja ćelijskih linija HeLa, MCF7 i K562 nakon inkubacije tokom 72 h. IC<sub>50</sub> vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD izračunate iz rezultata tri nezavisna eksperimenta.

Ekstrakt	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
	HeLa	MCF7	K562
CHCl <sub>3</sub>	10,24±1,41	6,09±0,52	9,45±2,33
MeOH	70,28±3,76	47,57±1,49	76,48±7,42

Prethodno su i druge vrste roda *Ferula* ispitivane u cilju procene njihovog citotoksičnog delovanja. Hajimehdipoor i saradnici ispitivali su citotoksični potencijal različitih ekstrakata nadzemnih delova vrsta *F. persica* var. *persica* i *F. hezarlalehzarica* MTT testom na ćelijskim linijama kancera jetre (HepG2), dojke (MCF-7), kolona (HT29), pluća (A549), kao i zdravih ćelija bubrega govečeta (MDBK). Rezultati su pokazali da samo heksanski i hloroformski ekstrakt nadzemnih delova ove dve vrste ostvaruju citotoksičan efekat prema pomenutim ćelijskim linijama u testiranom opsegu koncentracija (do 100 µg/ml). Ekstrakti vrste *F. persica* var.



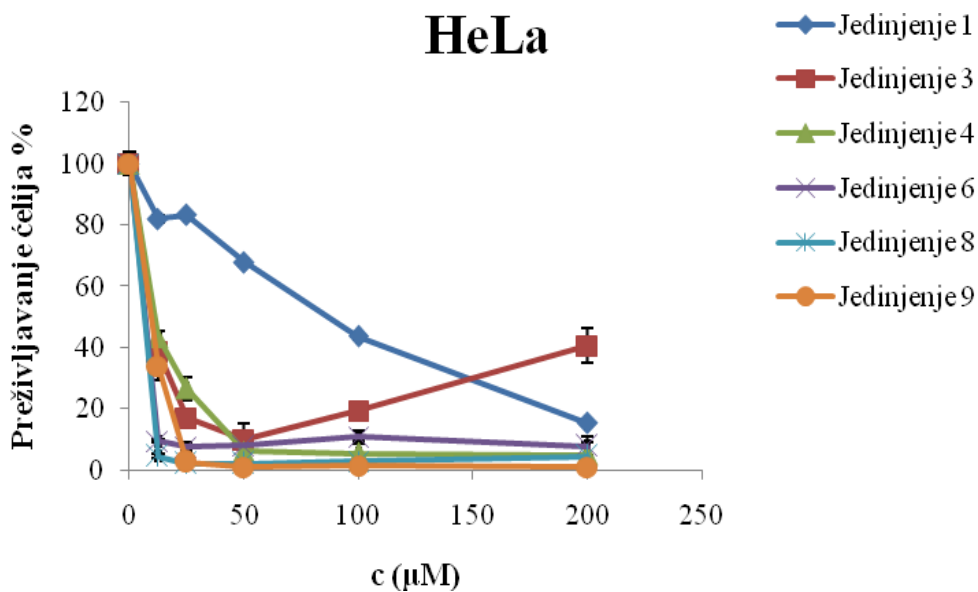
*persica* su ostvarili jače delovanje ( $IC_{50}=22,3-71,8 \mu\text{g/ml}$ ) od ekstrakata *F. hezarlalehzarica* ( $IC_{50}=76,7-105,3 \mu\text{g/ml}$ ). Prema liniji MCF-7, koja je korišćena i u ispitivanjima u okviru ove disertacije, ekstrakti obe vrste pokazali su ne samo višestruko slabiji efekat od hloroformskog ekstrakta *F. heuffelii*, već je citotoksičnost bila slabija i od metanolnog ekstrakta *F. heuffelii* (Hajimehdipoor i sar., 2012). Prethodno je pokazano da i deo metanolnog ekstrakta oleogumirezine vrste *F. assa-foetida* rastvorljiv u hloroformu ostvaruje jak citotoksični efekat prema linijama humnih kancera ( $IC_{50}<20 \mu\text{g/ml}$ ).

## 11.2. Citotoksična aktivnost metabolita

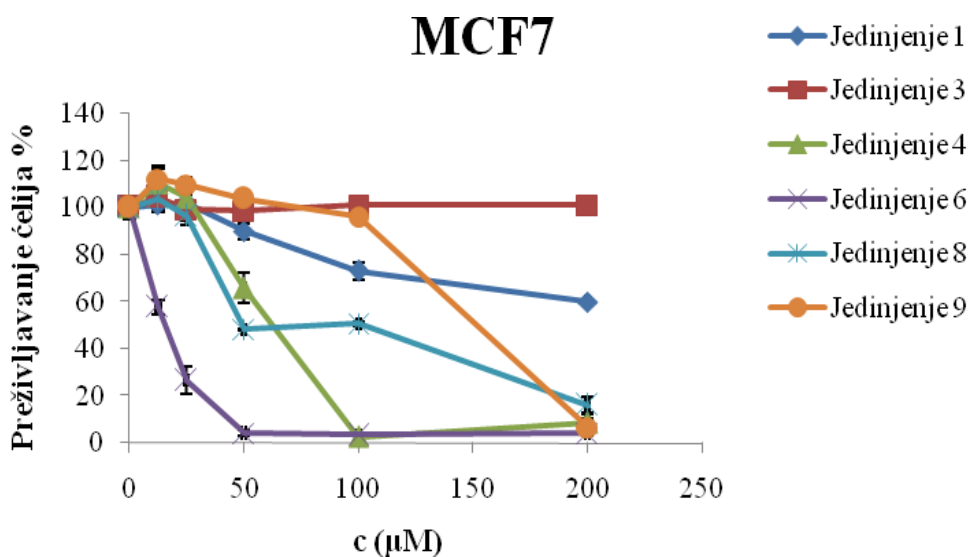
U cilju identifikacije metabolita odgovornih za pokazano citotoksično delovanje ekstrakata, testirano je 6 izolovanih jedinjenja: latifolon (**1**), (6*E*)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on (**3**), džamiron (**4**), (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**), fukanedon B (**8**) i bajgen C (**9**), u opsegu koncentracija 0-200  $\mu\text{M}$ , a kao referentni lek korišćen je cisplatin. Svih šest jedinjenja izolovano je iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii*, a prisustvo jedinjenja **1** i **6** potvrđeno je i u metanolnom ekstraktu podzemnih organa iste vrste.

Jedinjenje **1** je pokazalo snažan citotoksični efekat samo prema ćelijskoj liniji K562 ( $IC_{50}=8,87\pm 0,56 \mu\text{M}$ ). Efekat prema HeLa ćelijskoj liniji je bio slab, dok prema linijama MCF7 i MRC5 ovo jedinjenje nije dostiglo 50% inhibicije ćelijskog rasta čak ni u najvećoj primenjenoj koncentraciji (200  $\mu\text{M}$ ). Jedinjenja **3** i **4** su ostvarila jak i međusobno gotovo identičan efekat prema linijama HeLa ( $IC_{50}=10,21\pm 0,31 \mu\text{M}$  i  $10,65\pm 0,98 \mu\text{M}$ , redom) i K562 ( $IC_{50}=8,01\pm 0,77 \mu\text{M}$  i  $9,56\pm 1,02 \mu\text{M}$ , redom). Jedinjenje **4** je ostvarilo i slab inhibitorski efekat prema liniji MCF7, za razliku od jedinjenja **3** koje u testiranom opsegu koncentracija nije dovelo do 50% inhibicije ćelijskog rasta. Bitno je istaći da oba jedinjenja nisu inhibirala rast linije MRC-5, pa bi se moglo zaključiti da je citotoksičan efekat koji ostvaruju ova dva metabolita selektivan prema tumorskim ćelijskim linijama. Jedinjenja **6** i **9** (koja predstavljaju stereoisomere), ostvarila su takođe snažan i međusobno uporediv citotoksični efekat

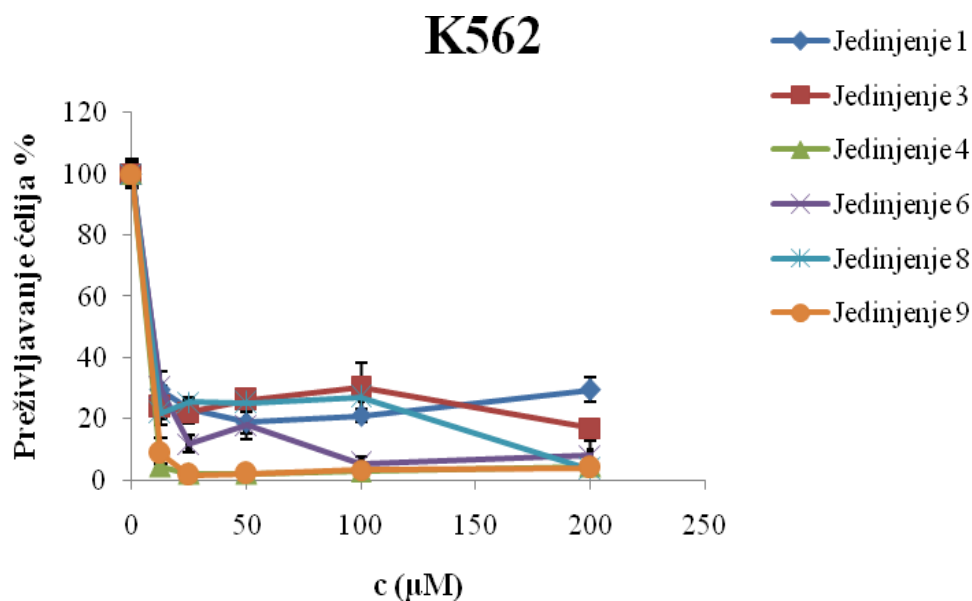
prema linijama HeLa i K562. Jedinjenje **6** je ostvarilo najjači efekat od svih testiranih metabolita prema liniji HeLa sa vrednošću  $IC_{50}$  od  $6,54 \pm 0,07 \mu M$ , dok je aktivnost jedinjenja **9** bila dva puta slabija ( $IC_{50} = 14,42 \pm 0,39 \mu M$ ). Jedinjenje **6** je takođe ostvarilo višestruko jači efekat prema liniji MCF7 ( $IC_{50} = 22,32 \pm 1,32 \mu M$ ) u poređenju sa njegovim stereoizomerom ( $IC_{50} = 169,23 \pm 2,04 \mu M$ ). Oba stereoizomera nisu u testiranom opsegu koncentracija inhibirala rast linije MRC-5, zbog čega se može zaključiti da i oni ostvaruju selektivan citotoksični efekat. Jedinjenje **8** je ostvarilo značajnu i selektivnu citotoksičnu aktivnost prema sve tri testirane tumorske ćelijske linije, a efekat je, slično ostalim testiranim metabolitima, bio jači prema linijama HeLa i K562 ( $IC_{50} = 10,54 \pm 1,61$  i  $8,49 \pm 0,21 \mu M$ , redom). Cisplatin je ostvario jači citotoksični efekat prema svim korišćenim ćelijskim linijama kancera, ali je koncentracija u kojoj je cisplatin inhibirao preživljavanje 50% ćelija linije K562 bila svega dva puta niža od koncentracije metabolita sa najslabijim delovanjem (jedinjenje **9**), te se može zaključiti da su testirani metaboliti ostvarili snažno citotoksično delovanje prema ovoj ćelijskoj liniji. Takođe, efekat jedinjenja **6**, najzastupljenijeg metabolita u hloroformskom ekstraktu, prema liniji MCF7 bio je uporediv sa efektom cisplatina ( $IC_{50} = 22,32 \pm 1,32 \mu M$  i  $18,67 \pm 0,75 \mu M$ , redom). Bitno je naglasiti da je cisplatin inhibirao rast i humanih fetalnih fibroblasta ćelijske linije MRC-5 ( $IC_{50} = 41,56 \pm 1,72 \mu M$ ), te da je selektivnost citotoksičnog delovanja cisplatina znatno manje izražena u poređenju sa metabolitima izolovanim iz podzemnih organa *F. heuffelii*.  $IC_{50}$  vrednosti citotoksičnog delovanja metabolita izolovanih iz podzemnih organa *F. heuffelii* dati su u Tabeli 27, dok su grafici preživaljavanja malignih ćelija i MRC-5 prikazani na Slikama 47, 48, 49 i 50. Iz prikazanih rezultata se može zaključiti da svi testirani metaboliti izolovani iz podzemnih organa *F. heuffelii* doprinose citostatskom delovanju hloroformskog ekstrakta prema liniji K562. Takođe, svi testirani metaboliti izuzev jedinjenja **1**, najverovatnije u značajnoj meri doprinose citostatskom efektu hloroformskog ekstrakta prema liniji HeLa. Nasuprot tome, efektu hloroformskog ekstrakta prema liniji MCF7 doprinose samo jedinjenja **4**, **8** i naročito jedinjenje **6**. Metanolni ekstrakt je, kao što je već napomenuto, ostvario znatno slabije delovanje od hloroformskog, a iz prikazanih rezultata se može zaključiti da jedinjenje **6** doprinosi delovanju ekstrakta prema sve tri ćelijske linije, dok jedinjenje **1** naverovatnije doprinosi samo efektu ostvarenom prema liniji K562.



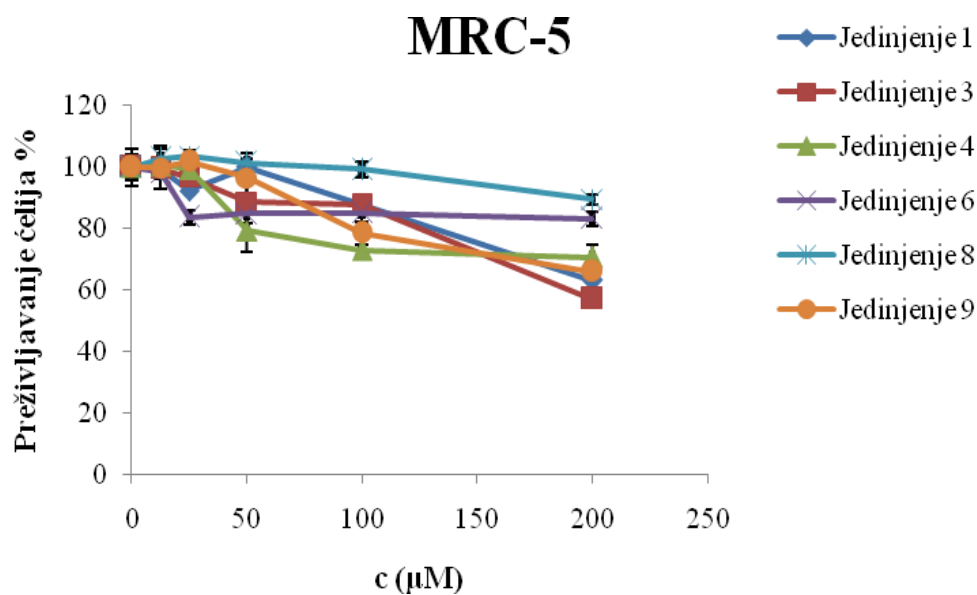
**Slika 47.** Grafik preživljavanja HeLa ćelija (%) u funkciji koncentracije testiranih metabolita ( $\mu\text{M}$ )



**Slika 48.** Grafik preživljavanja MCF7 ćelija (%) u funkciji koncentracije testiranih metabolita ( $\mu\text{M}$ )



**Slika 49.** Grafik preživljavanja K562 ćelija (%) u funkciji koncentracije testiranih metabolita ( $\mu\text{M}$ )



**Slika 50.** Grafik preživljavanja MRC-5 ćelija (%) u funkciji koncentracije testiranih metabolita ( $\mu\text{M}$ )

**Tabela 27.** Koncentracije testiranih metabolita **1**, **3**, **4**, **6**, **8** i **9** koje su dovodile do 50% inhibicije preživljavanja ćelijskih linija HeLa, K562, MCF7 i MRC-5 nakon inkubacije tokom 72 h

Jedinjenje	IC <sub>50</sub> (μM)			
	HeLa	K562	MCF7	MRC-5
Latifolon ( <b>1</b> )	86,81±1,21	8,87±0,56	>200	>200
(6 <i>E</i> )-1-(2,4-Dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on ( <b>3</b> )	10,21±0,31	8,01±0,77	>200	>200
Džamiron ( <b>4</b> )	10,65±0,98	9,56±1,02	62,52±1,23	>200
(2 <i>S</i> *,3 <i>R</i> *)-2-[(3 <i>E</i> )-4,8-Dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2- <i>c</i> ]kumarin ( <b>6</b> )	6,54±0,07	8,85±0,84	22,32±1,32	>200
Fukanedon B ( <b>8</b> )	10,54±1,61	8,49±0,21	49,61±0,56	>200
Bajgen C ( <b>9</b> )	14,42±0,39	10,56±1,19	169,23±2,04	>200
Cisplatin	2,1±0,20	5,54±1,03	18,67±0,75	41,56±1,72

IC<sub>50</sub> vrednosti su izražene kao srednja vrednost ± SD izračunate iz rezultata tri nezavisna eksperimenta MTT testa.

Motai i Kitanaka su 2005. god., u cilju proučavanja inhibitornog efekta jedinjenja **10** na produkciju NO, ispitivali njegov citotoksični efekat (0,3-10,0 μg/ml) na liniji ćelija sličnoj makrofagima miša (RAW264.7) tretiranim LPS/IFN-γ. Nakon inkubacije od 24 h jedinjenje **10** nije pokazalo značajan citotoksični efekat (Motai i Kitanaka, 2005a).

U poslednje dve decenije se veliki značaj pridaje citotoksičnim efektima koje ostvaruju hidrokiskumarini, a samim tim i seskviterpenski kumarini. U dve nezavisne studije iz 1997. god., Miglietta i saradnici su pokazali da pojedina jedinjenja kumarinske strukture (kao npr. geipraverin), interaguju sa sistemom mikrotubula u različitim ćelijskim linijama kancera i na taj način inhibiraju rast i proliferaciju ćelija. Nakon toga, u istraživanju koje su sproveli Saleem i saradnici pokazano je da ferulenol, prenilovani 4-hidroksikumarin, prisutan u vrsti *F. communis*, ostvaruje antikancerogeno delovanje i deluje protektivno protiv bolesti posredovanih slobodnim radikalima (Nazari i Iranshahi, 2011). Do sličnih zaključaka došli su Bocca i saradnici 2002. god.

identifikujući ferulenol kao citotoksični agens koji bi mogao imati farmakološki značaj. Njihova istraživanja su potvrdila citotoksično delovanje ovog kumarina prema nekoliko različitih ćelijskih linija kancera (MCF-7, SKOV-3, HL-60) u koncentraciji od 10 nM, 100 nM i 1  $\mu$ M i takođe potvrdila da ferulenol svoje delovanje ostvaruje interakcijom sa mikrotubulima tako što stimuliše polimerizaciju tubulina *in vitro*, inhibira vezivanje kolhicina za tubulin i dovodi do reorganizacije mikrotubula u kratka i tanka vlakna. Pored toga ferulenol je uticao na morfologiju ćelija linije MCF-7, dovodeći do oticanja jedra u kome su se uočavale zone nalik vezikulama (Bocca i sar., 2002). Nasuprot tome, rezultati istraživanja iz 2007. god. pokazali su da između ferulenola i sistema mikrotubula ne postoji značajna interakcija (Gertsch i sar., 2007). Iste godine Lahouel i saradnici su fokusirali svoje istraživanje na mitohondrijalne efekte ferulenola u cilju identifikovanja tačnog mehanizma njegovog citotoksičnog delovanja. Rezultati njihovih eksperimenata ukazali su na činjenicu da bi ovaj kumarin svoje delovanje mogao ostvariti inhibicijom procesa oksidativne fosforilacije u mitohondrijama. Utvrđeno je takođe da ferulenol u nižim koncentracijama inhibira sintezu ATP-a inhibirajući aktivnost adenin-nukleotid translokaze, a da u višim koncentracijama utiče na preuzimanje kiseonika (Lahouel i sar., 2007). Umbeliprenin, 7-preniloksikumarin, prisutan u nekoliko vrsta roda *Ferula* (*F. assa-foetida*, *F. persica*, *F. szowitsiana* i dr.), jedan je od najzanimljivijih bioaktivnih sastojaka ovog roda. Nekoliko studija je već pokazalo da ovaj kumarin ostvaruje značajno citotoksično delovanje. Antiproliferativni efekat umbeliprenina, kao i efekat na preživljavanje ćelija, ispitivan je resazurin redukcionim testom prema nekoliko ćelijskih linija kancera kolona (DLD1), dojke (MCF7), jajnika (PA1), prostate (PC3), pluća (A549), na primarnim fibroblastima i ćelijama metastaziranog malignog melanoma (M4Beu). Umbeliprenin je inhibirao proliferaciju svih pomenutih ćelijskih linija, a najsnažniji efekat (jači od cisplatina) ostvario je prema M4Beu ćelijskoj liniji (12,5  $\mu$ M), dok su ćelije linija MCF7 i DLD1 bile najmanje osetljive na delovanje umbeliprenina (Barthomeuf i sar., 2008). Valiahdi i saradnici su 2013. god. ispitivali citotoksični potencijal metabolita prisutnih u vrstama roda *Ferula* MTT testom i došli do nešto drugačijih rezultata. Naime, u ovoj studiji testirano je delovanje herniarina, prenilovanih kumarina (umbeliprenina, 7-izopenteniloksikumarina), monoterpenskih estara (stilozina i čimgina izolovanih iz *F. ovina*), i monoterpenskih i seskviterpenskih kumarina (galbanične kiseline,

farneziferola A, diverzina, konferona, i mogoltadona, izolovanih iz vrsta *F. szowitsiana*, *F. persica*, *F. diversivittata*, *F. flabelliloba*, *F. gummosa* i *F. persica*, redom) i akantrifozida E na ćelijske linije karcinoma ovarijuma (CH1), pluća (A549) i melanoma (SK-MEL-28). Rezultati ovog ispitivanja su dati u Tabeli 28 (Valiahdi i sar., 2013).

**Tabela 28.** Koncentracije testiranih metabolita izolovanih iz vrsta roda *Ferula* koje su dovodile do 50% inhibicije preživljavanja ćelijskih linija CH1, A549 i SK-MEL-28 (Valiahdi i sar., 2013)

Jedinjenje	IC <sub>50</sub> (µM)		
	CH1	A549	SK-MEL-28
Konferon	38,8±7,0	63,8±30,0	7,79±3,49
Farneziferol A	53,7±7,1	213±17	25,7±1,2
Stilozin	79,9±5,9	44,3±5,4	24,1±4,3
Diverzin	>250	>250	>62,5
Herniarin	>250	>250	>62,5
Galbanična kiselina	89,1±4,4	76,1±5,4	46,3±2,8
Mogoltadon	86,0±18,2	159±29	21,0±3,1
7-Izopenteniloksikumarin	>250	>250	>62,5
Čimgin	46,6±1,8	44,6±0,7	38,4±0,8
Akantrifozid E	>250	>250	>62,5
Umbeliprenin	133±6	58,1±15,2	37,2±2,7
Cisplatin	1,3±0,3	2,2±0,05	0,2±0,03

Autori su zaključili da testirani metaboliti (navedeni u Tabeli 28), prema izabranim ćelijskim linijama kancera ostvaruju osrednji citotoksični efekat i da bi ih možda trebalo posmatrati pre svega kroz prizmu hemopreventivnih agenasa, odnosno hemosenzitizera.

Nasprot tome, naša ispitivanja su pokazala da testirani metaboliti izolovani iz vrste *F. heuffelii* (koji do sada nisu ispitivani u pogledu citotoksične aktivnosti) ostvaruju snažno citotoksično delovanje prema linijama HeLa i K562, dok jedinjenje 6

ovaj efekat ostvaruje i prema liniji MCF7. Takođe, veoma snažan citotoksični efekat prema ovoj ćelijskoj liniji ( $IC_{50}=3,4 \mu\text{g/ml}$ , odnosno  $8,9 \mu\text{M}$ ), kao i prema još dve linije hepatocelularnog karcinoma (HepG2 i Hep3B), ostvario je i biciklični seskviterpenski kumarin konferol, strukturno sličan samarkandinacetatu prisutnom u vrsti *F. heuffelii*.



# ZAKLJUČCI

1. Srpska velestika, *F. heuffelii*, je endemska vrsta koja do sada nije farmakognosijski proučavana. U doktorskoj disertaciji ispitivani su podzemni organi ove biljke: hemijski sastav i farmakološka aktivnost izolata (etarskih ulja, ekstrakata i sekundarnih metabolita)
2. Etarska ulja, izolovana destilacijom vodenom parom iz podzemnih organa prikupljenih na tri različita lokaliteta u Republici Srbiji, hemijski su okarakterisana primenom metoda gasne hromatografije: GC-FID i GC-MS.
3. Analizirana etarska ulja kvalitativno su bila slična, ali su uočene značajne razlike u količini pojedinih sastojaka. Dok su u etarskim uljima uzoraka poreklom iz Đerdapske klisure i klisure reke Pek, najzastupljeniji bili fenilpropani, u ulju uzorka poreklom iz Sićevačke klisure dominirali su seskviterpenski ugljovodonici. Glavni sastojak sva tri ulja bio je elemicin (12,5-35,4%). Po količini je u uzorcima poreklom iz Đerdapske klisure i klisure reke Pek sledio miristicin (20,6 i 12,9%), a u ulju poreklom iz Sićevačke klisure  $\beta$ -kopaen (9,5%) i  $\beta$ -gurjunen (7,5%).
4. Hromatografijom na stubu silikagela i semipreparativnom HPLC, iz hloroformskog ekstrakta podzemnih organa *F. heuffelii* izolovano je deset jedinjenja: latifolon (**1**), elemicin (**2**), (6*E*)-1-(2,4-dihidroksfenil)-3,7,11-trimetil-3-vinildodeka-6,10-dien-1-on (**3**), džamiron (**4**), (3*S*\*,4*R*\*,5*R*\*)-3-(2,4-dihidroksibenzoil)-5-[(3*E*,7*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]tetrahydro-4,5-dimetilfuran-2-on (**5**), (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin (**6**), samarkandinacetat (**7**), fukanedon B (**8**), bajgen C (**9**) i (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[2,3-*b*]hromon (**10**). Struktura izolovanih jedinjenja određivana je NMR spektroskopijom i HR-MS ESI<sup>+</sup> masenom spektrometrijom.
5. U hloroformskom ekstraktu je HPLC metodom, korišćenjem izolovanih jedinjenja kao eksternih standarda, određen sadržaj jedinjenja **1** (6,84%), **3** (4,16%), **4** (1,74%) i **6** (10,92%).
6. HPLC analizom, uz korišćenje standardnih supstanci, u metanolnom ekstraktu utvrđeno je prisustvo hlorogenske kiseline (**11**), 3,5-dikafeoilhina kiseline (**12**),

- kao i jedinjenja **1** i **6**. Metodom eksternog standarda u ekstraktu je određen sadržaj jedinjenja **11**, **6** i **1** i iznosio je 3,46, 1,39 i 1,32%, redom.
7. Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu, određen spektrofotometrijskim postupkom korišćenjem FC reagensa, iznosio je 0,112 mg ekvivalenata galne kiseline/mg suvog ekstrakta.
  8. Antioksidantna aktivnost metanolnog i hloroformskog ekstrakta određena je različitim *in vitro* testovima: ispitivanjem njihove ukupne antioksidantne aktivnosti i sposobnosti neutralizacije DPPH i  $\cdot$ OH radikala. Ukupna antioksidantna aktivnost metanolnog ekstrakta bila je nekoliko puta veća od aktivnosti hloroformskog ekstrakta. Metanolni ekstrakt je takođe ostvario umeren antiradikalni efekat prema oba radikala, dok je hloroformski ekstrakt ostvario samo slab anti-DPPH efekat.
  9. Antiradikalna aktivnost etarskih ulja podzemnih organa *F. heuffelii* sakupljenih sa sva tri lokaliteta u Republici Srbiji, ispitivana je testom sposobnosti neutralizacije DPPH radikala. Etarska ulja poreklom iz Đerdapske klisure i klisure reke Pek ostvarila su skoro dvostruko jači efekat u poređenju sa uljem poreklom iz Sićevačke klisure.
  10. Spazmolitička aktivnost izolata podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii* (etarskog ulja uzorka poreklom iz Đerdapske klisure, ekstrakata i metabolita **1**, **4**, **6** i **11**), ispitivana je *in vitro* na izolovanom ileumu pacova u tri eksperimentalna modela (ispitivan je uticaj na spontane kontrakcije i kontrakcije izazvane ACh i KCl).
  11. Etarsko ulje je ostvarilo koncentraciono-zavisano i statistički značajan efekat u sva tri modela. Ekstrakti su takođe ostvarili koncentraciono-zavisnu spazmolitičku aktivnost u sva tri modela, pri čemu je spazmolitički efekat metanolnog ekstrakta bio i statistički značajan. Metanolni ekstrakt je, u odnosu na hloroformski, snažnije relaksirao spontane kontrakcije i kontrakcije izazvane KCl, dok je efekat ekstrakata na kontrakcije izazvane ACh bio međusobno uporediv.
  12. Jedinjenja **1** i **11** su snažno relaksirala spontane kontrakcije ileuma, dok je efekat jedinjenja **4** i **6** bio nešto slabiji. Sva četiri metabolita su inhibirala kontrakcije

izazvane ACh, dok su jedinjenja **1** i **6** značajno redukovala i spazmogeni efekat KCl.

13. U modelu edema šapice pacova izazvanog karageninom, ekstrakti su pokazali dozno-zavisani i statistički značajan antiedematozni efekat, pri čemu je metanolni ekstrakt bio nešto efikasniji u odnosu na hloroformski. Efekat metanolnog ekstrakta (50 mg/kg *p.o.*), bio je uporediv sa efektom indometacina (8 mg/kg *p.o.*), koji je korišćen kao referentni lek. Analizom histoloških preparata šapica pacova tretiranih metanolnim ekstraktom (100 mg/kg *p.o.*), potvrđen je antiinflamatorni efekat ispitivanog ekstrakta.
14. U eksperimentalnom modelu akutnog stres ulkusa na pacovima izazvanog oralnom primenom apsolutnog etanola, ekstrakti su pokazali dozno-zavisani i statistički značajan gastroprotektivni efekat, pri čemu je efekat hloroformskog ekstrakta bio izraženiji u odnosu na metanolni. Efekat hloroformskog (25 mg/kg *p.o.*) i metanolnog ekstrakta (100 mg/kg *p.o.*) bio je uporediv sa efektom ranitidina (20 mg/kg *p.o.*), koji je korišćen kao referentni lek.
15. Sva tri uzorka etarskog ulja ostvarila su snažan inhibitorni efekat prema Gram (+) bakterijama: *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus flavus* i *M. luteus*. Efekat prema Gram (-) bakterijama je bio slabiji, sa izuzetkom etarskog ulja podzemnih organa poreklom iz Sićevačke klisure, koje je snažno inhibiralo rast soja *Klebsiella pneumoniae*. Sva tri uzorka su takođe snažno inhibirala rast tri soja kvasnice *Candida albicans*.
16. Hloroformski i metanolni ekstrakt podzemnih organa *F. heuffelii* su snažnije inhibirali rast Gram (+) bakterija u odnosu na Gram (-) bakterije. Najjače dejstvo hloroformski ekstrakt ostvario je prema bakteriji *M. luteus*, dok je metanolni ekstrakt najsnažnije inhibirao rast bakterija *Staphylococcus aureus* i *M. luteus*.
17. Od 5 testiranih metabolita (jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6** i **11**), jedino su jedinjenja **3**, **4** i **6** ostvarila antimikrobnu aktivnost i to samo prema određenim sojevima Gram (+) bakterija. Jedinjenje **3** je najsnažnije inhibiralo rast bakterija *M. luteus*, *S. epidermidis* i *B. subtilis*, jedinjenje **6** rast bakterija *M. luteus* i *S. epidermidis*, a jedinjenje **4** rast bakterije *B. subtilis*.

18. Hloroformski i metanolni ekstrakt ostvarili su citotoksičan efekat prema tri tumorske ćelijske linije: HeLa, K562 i MCF7. Hloroformski ekstrakt je ispoljio višestruko jače citotoksično delovanje u odnosu na metanolni. Najbolju aktivnost oba ekstrakta pokazala su prema ćelijskoj liniji MCF7.
19. Ispitivanje citotoksične aktivnosti jedinjenja **1**, **3**, **4**, **6**, **8** i **9** pokazalo je da ona ostvaruju snažan efekat prema liniji K562, a da sva osim jedinjenja **1** ostvaruju snažan efekat i prema liniji HeLa. Ova aktivnost bila je 2-3 puta slabija od cisplatina. Jedinjenje **6** je ostvarilo najjači efekat prema liniji MCF7 koja je bila uporediva sa cisplatinom, 2-3 puta jača od jedinjenja **4** i **8**, i nekoliko puta jača od njegovog stereoizomera jedinjenja **9**. Jedinjenja **1** i **3** nisu pokazala aktivnost prema ovoj ćelijskoj liniji. Važno je naglasiti da, za razliku od cisplatina, nijedno od testiranih jedinjenja nije delovalo citotoksično prema liniji humanih fetalnih fibroblasta (MRC-5).
20. Jedinjenje **6**, (2*S*\*,3*R*\*)-2-[(3*E*)-4,8-dimetilnona-3,7-dien-1-il]-2,3-dihidro-7-hidroksi-2,3-dimetilfuro[3,2-*c*]kumarin, ostvarilo je snažan, statistički značajan i koncentraciono-zavisani spazmolitički efekat, selektivni citotoksični efekat koji je prema ćelijskoj liniji MCF-7 bio uporediv sa efektom cisplatina, kao i izraženo antimikrobno delovanje prema bakterijama *M. luteus* i *S. epidermidis*. Dobijeni rezultati predstavljaju dobru osnovu za dalja ispitivanja ovog metabolita, kako farmakološka, tako i hemijska (QSAR studije i strukturne modifikacije). S obzirom da je ovaj metabolit u hloroformskom ekstraktu prisutan u velikoj količini (109,16 mg/g suvog ekstrakta), podzemni organi srpske velestike se mogu posmatrati kao bogat izvor ovog potencijalno lekovitog jedinjenja.
21. Hemijskim ispitivanjem podzemnih organa srpske velestike, *F. heuffelii*, dobijene su informacije o strukturi i sadržaju sekundarnih metabolita, a poseban značaj ogleda se u izolovanju retkih jedinjenja. Rezultati ispitivanja farmakološke aktivnosti izolata ukazuju na značajan lekoviti potencijal ove biljke, a samim tim i na njen značaj kao potencijalno nove biljne lekovite sirovine.

# LITERATURA

- Abd El-Razek, M. H., Ohta, S., Ahmed, A. A., & Hirata, T. (2001). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry*, 58(8), 1289-1295.
- Abd El-Razek, M. H., Wub, Y., & Chang, F. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula foetida*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54(1), 235-238.
- Abedi, D. Jalali, M., Asghari, G., & Sadeghi, N. (2008). Composition and antimicrobial activity of oleogumresin of *Ferula gumosa* Bioss. essential oil using Alamar Blue™. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 3(1), 41-45.
- Abourashed, E. A., Galal, A. M., & Shibl, A. M. (2011). Antimycobacterial activity of ferutinin alone and in combination with antitubercular drugs against a rapidly growing surrogate of mycobacterium tuberculosis. *Natural Product Research*, 25(12), 1142-1149.
- Aburjai, T. & Al-Khalil, S. (2001). Phytochemical study of *Ferula ovina*. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), 43-46.
- Adami, E., Marazzi-Uberti, E., & Turba, C. (1964). Pharmacological research on gefarnate, a new synthetic isoprenoid with an anti-ulcer action. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Thérapie*, 147, 113-145.
- Adams, R. P. (2001). *Identification of essential oil components by gas chromatography and mass spectrometry*. Allured, Carol Stream, IL.
- Adhami, H., Scherer, U., Kaehlig, H., Hettich, T., Schlotterbeck, G., Reich, E., & Krenn, L. (2013). Combination of bioautography with HPTLC-MS/NMR: A fast identification of acetylcholinesterase inhibitors from galbanum. *Phytochemical Analysis*, 24(4), 395-400.
- Adinortey, M. B., Ansah, C., Galyuon, I., & Nyarko, A. (2013). *In vivo* models used for evaluation of potential antigastroduodenal ulcer agents. *Ulcers*.  
<http://dx.doi.org/10.1155/2013/796405>
- Ahmed, A. A. (1999). Sesquiterpene coumarins and sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, 50(1), 109-112.

- Ahmed, A. A., Hegazy, M. F., Zellagui, A., Rhouati, S., Mohamed, T. A., Sayed, A. A., Abdella, M. A., Ohta, S., & Hirata, T. (2007). Ferulsinaic acid, a sesquiterpene coumarin with a rare carbon skeleton from *Ferula* species. *Phytochemistry*, 68(5), 680-686.
- Al-Hazimi, H. M. G. (1986). Terpenoids and a coumarin from *Ferula sinaica*. *Phytochemistry*, 25(10), 2417-2419.
- Al-Ja'fari, A., Vila, R., Freixa, B., Costa, J., & Cañigüeral, S. (2013). Antifungal compounds from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, 27(6), 911-915.
- Al-Ja'fari, A., Vila, R., Freixa, B., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J., & Cañigüeral, S. (2011). Composition and antifungal activity of the essential oil from the rhizome and roots of *Ferula hermonis*. *Phytochemistry*, 72(11-12), 1406-1413.
- Alkhatib, R., Hennebelle, T., Joha, S., Idziorek, T., Preudhomme, C., Quesnel, B., Sahpaz, S., & Bailleul, F. (2008). Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines. *Phytochemistry*, 69(17), 2979-2983.
- Al-Mughrabi, K. I., & Aburjai, T. A. (2003). Fungitoxic activity of root extracts from *Ferula harmonis*. *Phytopathologia Mediterranea*, 42(2), 141-148.
- Alqasuomi, S. (2012). Anxiolytic effect of *Ferula assafoetida* L. in rodents. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 4(6), 86-90.
- Al-Yahya, M. A., Muhammad, I., Mirza, H. H., & El-Ferally, F. S. (1998). Antibacterial constituents from the rhizomes of *Ferula communis*. *Phytotherapy Research*, 12(5), 335-339.
- Andrews, R. E., Parks, L. W. & Spence, K. D. (1980). Some effects of Douglas fir terpenes on certain microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 40(2), 301-304.
- Andrianova, V. B., Sklyar, Y. E., Perelson, M. E., & Pimenov, M. G. (1973). Kellerin, a new coumarin of the roots of *Ferula kelleri* (russian). *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 9(6), 795-796.



- Appendino, G., Jakupovic, J., Alloatti, S., & Ballero, M. (1997). Daucane esters from *Ferula arrigonii*. *Phytochemistry*, 45(8), 1639-1643.
- Appendino, G., Spagliardi, P., Cravotto, G., Pocock, V., & Milligan, S. (2002). Daucane phytoestrogens: A structure-activity study. *Journal of Natural Products*, 65(11), 1612-1615.
- Appendino, G., Tagliapietra, S., Gariboldi, P., Mario Nano, G., & Picci, V. (1988).  $\omega$ -Oxygenated prenylated coumarins from *Ferula communis*. *Phytochemistry*, 27(11), 3619-3624.
- Appendino, G., Tagliapietra, S., Paglino, L., Nano, G. M., Monti, D., & Picci, V. (1990). Sesquiterpenoid esters from the fruits of *Ferula communis*. *Phytochemistry*, 29(5), 1481-1484.
- Arnoldi, L., Ballero, M., Fuzzati, N., Maxia, A., Mercalli, E., & Pagni, L. (2004). HPLC-DAD-MS identification of bioactive secondary metabolites from *Ferula communis* roots. *Fitoterapia*, 75(3-4), 342-354.
- Aqel, M. B., Al-Khalil, S., Afifi, F., & Al-Eisawi, D. (1991a). Effects of a *Ferula sinaica* root extract on the uterine smooth muscle of rat and guinea pig. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(3), 291-297.
- Aqel, M. B., Al-Khalil, S., Afifi, F., & Al-Eisawi, D. (1991b). Relaxant effects of *Ferula sinaica* root extract on rabbit and guinea pig smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 31(3), 373-381.
- Babekov, A. U., Saidkhodzhaev, A. I., & Keneshov, B. M. (1999). Terpenoids of *Ferula litwinowiana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 35(3), 365.
- Babekov, A. U., Saidkhodzhaev, A. I., & Keneshov, B. M. (2000). Terpenoid coumarins from *Ferula kokanica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 36(2), 220.
- Bagheri, S. M., Dashti-R, M. H., & Morshedi, A. (2014). Antinociceptive effect of *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin in mice. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(3), 207-212.
- Bagirov, V. Y., & Aliev, G. V. (1981). *Ferula stylosa* esters. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1, 99-100.

- Bagirov, V. Y., & Kir'yalov, N. P. (1974). A coumarin from the roots of *Ferula nevskii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 8(3), 379-380.
- Bagirov, V. Y., Gasanova, R. Y., Burma, O. I., & Ban'kovskii, A. I. (1977). Coumarins of *Ferula szovitsiana* and *F. persica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 13(2), 240-241.
- Barthomeuf, C., Demeule, M., Grassi, J., Saidkhodjaev, A., & Beliveau, R. (2006). Conferone from *Ferula schtschurowskiana* enhances vinblastine cytotoxicity in MDCK-MDR1 cells by competitively inhibiting P-glycoprotein transport. *Planta Medica*, 72(7), 634-639.
- Barthomeuf, C., Lim, S., Iranshahi, M., & Chollet, P. (2008). Umbelliprenin from *Ferula szovitsiana* inhibits the growth of human M4Beu metastatic pigmented malignant melanoma cells through cell-cycle arrest in G1 and induction of caspase-dependent apoptosis. *Phytomedicine*, 15(1-2), 103-111.
- Bashir, S., Alam, M., Ahmad, B., Aman, A., & Ali, J. (2013). Screening of *Ferula narthex* boiss crude methanolic extract for analgesic, gastrointestinal motility and insecticidal activity. *Middle East Journal of Scientific Research*, 14(4), 471-475.
- Ben Salem, S., Jabrane, A., Harzallah-Skhiri, F., & Ben Jannet, H. (2013). New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the tunisian *Ferula lutea* (Poir.) Maire. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(14), 4248-4252.
- Bizhanova, K., & Saidkhodzhaev, A. I. (1978). Coumarins of the roots of *Ferula iliensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(2), 222.
- Borisov, V. N., Ban'kovsky, A. I., Sheychenko, V. I., & Pimenov, M. G. (1974). Coumarins of *Ferula tuberifera* (russian). *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* No. 4, 515.
- Bocca, C., Gabriel, L., Bozzo, F., & Miglietta, A. (2002). Microtubule-interacting activity and cytotoxicity of the prenylated coumarin ferulenol. *Planta Medica*, 68(12), 1135-1137.
- Bukreeva, T. V. (1987). Components of the resin of the roots of *Ferula kirialovii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 23(5), 633-634.

- Bukreeva, T. V., & Pimenov, M. G. (1991). Coumarins from the roots of *Ferula badrakema*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(5), 634.
- Candan, F., Unlu, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sökmen, A., & Akpulat, H. A. (2003). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87(2-3), 215-220.
- Cannon, J. F. M. (1968). *Ferula* L. U: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine D.H., Walters, S.M., & Webb D.A. (Urednici), *Flora Europea 2* (pp. 358-359). Cambridge University Press, Cambridge.
- Casinovi, C. G., Tomassini, L., & Nicoletti, M. (1989). A new guaianolide from *Ferula arrigonii* Bocchieri. *Gazzetta Chimica Italiana*, 119(11), 563-546.
- Cha, M., Choi, Y. H., Choi, C. W., Kim, Y. S., Kim, Y., Ryu, S. Y., Kim, Y. H., & Choi, S. U. (2011). Galbanic acid, a cytotoxic sesquiterpene from the gum resin of *Ferula asafoetida*, blocks protein farnesyltransferase. *Planta Medica*, 77(1), 52-54.
- Chen, B., Teranishi, R., Kawazoe, K., Takaishi, Y., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., & Kodzhimatov, O. K. (2000). Sesquiterpenoids from *Ferula kuhistanica*. *Phytochemistry*, 54(7), 717-722.
- Choudhary, M. I., Baig, I., Nur-e-Alam, M., Shahzad-ul-Hussan, S., Öndognii, P., Bunderya, M., Oyun, Z., & Rahman, A. (2001). New  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from the mongolian medicinal plant *Ferula mongolica*. *Helvetica Chimica Acta*, 84(8), 2409-2416.
- Czygan F. C., & Hiller K. (2002). *Petroselinia radix*. In M. Wichtl (Ed.): *Teedrogen und Phytopharmaka. Ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage (4. Auflage)* (pp. 445-447). Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Dai, B. & Qiu, C. (1992). Comparison of constituents of essential oils from two species in Chinese traditional drugs by GC-MS. *Yaowu Fenxi Zazhi*, 12(5), 285-288.
- Dall'Acqua, S., Linardi, M. A., Maggi, F., Nicoletti, M., Petitto, V., Innocenti, G., Basso, G., & Viola, G. (2011). Natural daucane sesquiterpenes with antiproliferative and proapoptotic activity against human tumor cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 19(19), 5876-5885.

- Dall'Acqua, S., Maggi, F., Minesso, P., Salvagno, M., Papa, F., Vittori, S., & Innocenti, G. (2010). Identification of non-alkaloid acetylcholinesterase inhibitors from *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu (Apiaceae). *Fitoterapia*, 81(8), 1208-1212.
- Dastan, D., Salehi, P., Reza Gohari, A., Zimmermann, S., Kaiser, M., Hamburger, M., Reza Khavasi, H., & Ebrahimi, S. N. (2012). Disesquiterpene and sesquiterpene coumarins from *Ferula pseudalliacea*, and determination of their absolute configurations. *Phytochemistry*, 78, 170-178.
- Dehpour, A. A., Ebrahimzadeh, M. A., Fazel, N. S., & Mohhammad, N. S. (2009). Antioxidant activity of the methanol extract of *Ferula assafoetida* and its essential oil composition. *Grasas y Aceites*, 60(4), 405-412.
- De Pasqual Teresa, J., Sanchez, M. R., Reviejo, C., Hernandez, J. M., & Grande, M. (1986). Chemical components from the roots of *Ferula communis* L. *Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica* 82(2), 89-91.
- Dembitskii, A. D., Krotova, G. I., Sinitsin, G. S., Suyunshalieva, & U. Kh. (1985). Study of essential oil of *Ferula iliensis* Krasn roots. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi SSR, Seriya Khimicheskaya*, 2, 63-70.
- Deng, W., Xie, C., & Fu, J. (2007). Analysis of volatile oil from *Ferula sinkiangensis* by GC/MS. *Zhipu Xuebao*, 28(2), 114-116.
- Diaz, J. G., Fraga, B. M., González, A. G., González, P., & Hernández, M. G. (1984). Eight carotane sesquiterpenes from *Ferula linkii*. *Phytochemistry*, 23(11), 2541-2544.
- dos Santos, M. D., Chen, G., Almeida, M. C., Soares, D. M., De Souzaa, G. E. P., Lopes, N. P., & Lantz, R. C. (2010). Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro inflammatory mediator production. *Natural Product Communications*, 5(5), 733-740.
- Drude, O. (1898). *Ferula* L. U: A., Engler (Ed.), *Die natürlichen Pflanzenfamilien* 3(8) (pp. 228-232). Leipzig: Wilhelm Engelmann.
- Du, N., Qu, S., & Zhi, L. (1989). Composition of the essential oil of *Ferula songorica* in Xinjiang. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 20(3), 164-166.

- Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., Nabavi, S. F., & Dehpour, A. A. (2011). Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15(6), 658-664.
- Eftekhari, F., Yousefzadi, M., & Borhani, K. (2004). Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia* 75(7-8), 758-759.
- Ehlert, F. J., Sawyer, G. W., & Esqueda, E. E. (1999). Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. *Life Sciences*, 64(6-7), 387-394.
- El-Razek, M. H. A., Ohta, S., Ahmed, A. A., & Hirata, T. (2001). Monoterpene coumarins from *Ferula ferulago*. *Phytochemistry*, 57(8), 1201-1203.
- Evans, W. C. (2009). *Trease and Evans Pharmacognosy* (16. izdanje). Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Saunders Elsevier.
- Fatehi, M., Farifteh, F., & Fatehi-Hassanabad, Z. (2004). Antispasmodic and hypotensive effects of *Ferula asafoetida* gum extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 91(2-3), 321-324.
- Fazly Bazzaz, B. S., Iranshahi, M., Naderinasab, M., Hajian, S., Sabeti, Z., & Masumi, E. (2010). Evaluation of the effects of galbanic acid from *Ferula szowitsiana* and coniferol from *F. badrakema*, as modulators of multi-drug resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 5(1), 25-32.
- Fleer, H., & Verspohl, E. J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), 409-415.
- Fraga, B. M., González, A. G., González, P., Hernandez, M. G., & Larruga, C. L. (1985). Carotane sesquiterpenes from *Ferula lancerottensis*. *Phytochemistry*, 24(3), 501-504.
- Galal, A. M., Abourashed, E. A., Ross, S. A., ElSohly, M. A., Al-Said, M. S., & El-Feraly, F. S. (2001). Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products*, 64(3), 399-400.

- Gamal-Eldeen, A. M., & Hegazy, M. F. (2010). A crystal lapiferin derived from *Ferula vesceritensis* induces apoptosis pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Natural Product Research*, 24(3), 246-257.
- Garg, S. N., Misra, L. N., & Agarwal, S. K. (1989). Essential oil from rhizomes of *Ferula jaeschkeana*. *Phytochemistry*, 28(2), 634-636.
- Garg, S. N., Misra, L. N., Agarwal, S. K., Mahajan, V. P., & Rastogi, S. N. (1987). Carotane derivatives from *Ferula jaeschkeana*. *Phytochemistry*, 26(2), 449-450.
- Geroushi, A., Auzi, A. A., Elhwuegi, A. S., Elzawam, F., Elsherif, A., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2011). Antiinflammatory sesquiterpenes from the root oil of *Ferula hermonis*. *Phytotherapy Research*, 25(5), 774-777.
- Gertsch, J., Meier, S., Tschopp, N., & Altmann, K. -. (2007). New tubulin inhibitors from plants a critical assessment. *Chimia*, 61(6), 368-372.
- Ghanbari, M., Khorasani, M. Z., Vakili, A., Taherian, A. A., & Sameni, H. R. (2012a). Acute and chronic effects of aqueous *Ferula persica* extract on blood pressure of normotensive rats. *Koomesh*, 14(1), 104-108.
- Ghanbari, M., Zahedi Khorasani, M., & Vakili, A. (2012b). Acute and chronic effects of *Ferula persica* on blood pressure of hypertensive rats and its possible mechanism of action. *Journal of Medicinal Plants*, 11(43), 62-68.
- Gharaei, R., Akrami, H., Heidari, S., Asadi, M. H., & Jalili, A. (2013). The suppression effect of *Ferula gummosa* Boiss. extracts on cell proliferation through apoptosis induction in gastric cancer cell line. *European Journal of Integrative Medicine*, 5(3), 241-247.
- Ghisalberti, E. L. (1994). The daucane (carotane) class of sesquiterpenes. *Phytochemistry*, 37(3), 597-623.
- Gholamnezhad, Z., Byrami, G., Boskabady, M.H., & Iranshahi M. (2011). Possible mechanism(s) of the relaxant effect of asafetida (*Ferula assa-foetida*) oleo-gum-resin extract on guinea-pig tracheal smooth muscle. *Avicenna Journal of Phytomedicine* 2, 10-16.

- Ghosha, A., Banerjia, A., Mandalb, S., & Banerjia, J. (2009). A new sesquiterpenoid coumarin from *Ferula assafoetida*. *Natural Product Communications*, 4(8), 1023-1024.
- Gliszczynska, A., & Brodelius, P. E. (2012). Sesquiterpene coumarins. *Phytochemistry Reviews*, 11(1), 77-96.
- Gohar, A. A., & El-Bassuony, A. A. (2007). Two new sesquiterpene coumarins, ferusinol and samarcandin diastereomer from *Ferula sinaica*. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 15(1), 33-37.
- Golovina, L. A., Saidkhodzhaev, A. I., Malikov, V. M., & Pimenov, M. G. (1987). Esters of *Ferula soongarica* and *Ferula subtilis*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 5, 763-764.
- Gonzalez, A. G., Bermejo, J., Diaz, J. G., Arancibia, L., & Perez De Paz, P. (1988). Humulenes and other constituents of *Ferula latipinna*. *Journal of Natural Products*, 51(6), 1140-1147.
- González, A. G., Díaz, J. G., López, L. A., Valencia, E., De Paz, P. P., & Barrera, J. B. (1993). Sesquiterpene esters and sesquiterpene coumarin ethers from *Ferula linkii*-TF. *Phytochemistry*, 33(4), 863-866.
- Goryaev, M. I., Sharipova, F. S., Tikhonova, L. K., & El'chibekova, L. A. (1971). Substances present in essential oils. LIII. Comparative study of the chemical composition of essential oils of the above ground and root parts of *Ferula penninervis* plants. *Izvestiya Akademii Nauk Kazakhskoi SSR, Seriya Khimicheskaya*, 21(4), 49-53.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (1999). *Medicinska fiziologija*. Beograd: Savremena administracija.
- Hadidi, K. A., Aburjai, T., & Battah, A. K. A. (2003). comparative study of *Ferula hermonis* root extracts and sildenafil on copulatory behaviour of male rats. *Fitoterapia*, 74(3), 242-246.
- Hajimehdipoor, H., Esmaeili, S., Ramezani, A., Anaraki, M. J., & Mosaddegh, M. (2012). The cytotoxic effects of *Ferula persica* var. *persica* and *Ferula*

*hezarlalehzarica* against HepG2, A549, HT29, MCF7 and MDBK cell lines. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(2), 113-117.

- Hanafi-Bojd, M. Y., Iranshahi, M., Mosaffa, F., Tehrani, S. O., Kalalinia, F., & Behravan, J. (2011). Farnesiferol A from *Ferula persica* and galbanic acid from *Ferula szowitsiana* inhibit P-glycoprotein-mediated rhodamine efflux in breast cancer cell lines. *Planta Medica*, 77(14), 1590-1593.
- Hänsel R., Sticher, O., & Steinegger, E. (1999). *Pharmakognosie – Phytopharmazie* (6. izdanje). Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Hayase, M., Hashitani, H., Suzuki, H., Kohri, K., & Brading, A. F. (2007). Evolving mechanisms of action of alverine citrate on phasic smooth muscles. *British Journal of Pharmacology*, 152(8), 1228-1238.
- Hwang, S. J., Kim, Y. W., Park, Y., Lee, H. J., & Kim, K. W. (2013). Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *Inflammation Research*, DOI 10.1007/s00011-013-0674-4.
- Ibraheim, Z. Z., Abdel-Mageed, W. M., Dai, H., Guo, H., Zhang, L., & Jaspars, M. (2012). Antimicrobial antioxidant daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis* Boiss. *Phytotherapy Research*, 26(4), 579-586.
- Iranshahi, M., Amin, G., Amini, M., & Shafiee, A. (2003). Sulfur containing derivatives from *Ferula persica* var. *latisecta*. *Phytochemistry*, 63(8), 965-966.
- Iranshahi, M., Amin, G., & Shafiee, A. (2004b). A new coumarin from *Ferula persica*. *Pharmaceutical Biology*, 42(6), 440-442.
- Iranshahi, M., Arfa, P., Ramezani, M., Jaafari, M. R., Sadeghian, H., Bassarello, C., Piacente, S., & Pizza, C. (2007). Sesquiterpene coumarins from *Ferula szowitsiana* and in vitro antileishmanial activity of 7-prenyloxycoumarins against promastigotes. *Phytochemistry*, 68(4), 554-561.
- Iranshahi, M., Famili, A., Bassarello, C., Piacente, S., & Pizza, C. (2010d). Purification and structure elucidation of compounds from the roots of *Ferula ovina* Boiss. *Journal of Medicinal Plants*, 9(36), 72-80+210.



- Iranshahi, M., Fata, A., Emami, B., Shahri, B. M. J., & Bazzaz, B. S. F. (2008a). *In vitro* antifungal activity of polysulfides-rich essential oil of *Ferula latisecta* fruits against human pathogenic dermatophytes. *Natural Product Communications*, 3(9), 1543-1546.
- Iranshahi, M., Ghiadi, M., Sahebkar, A., Rahimi, A., Bassarello, C., Piacente, S., & Pizza, C. (2009). Badrakemonin, a new eremophilane-type sesquiterpene from the roots of *Ferula badrakema* kos.-pol. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 8(4), 275-279.
- Iranshahi, M., Hassanzadeh-Khayat, M., Bazzaz, B. S. F., Sabeti, Z., & Enayati, F. (2008c). High content of polysulphides in the volatile oil of *Ferula latisecta* Rech. F. et Aell. fruits and antimicrobial activity of the oil. *Journal of Essential Oil Research*, 20(2), 183-185.
- Iranshahi, M., Hosseini, S. T., Sahebkar, A. H., Suleman Khan, S., & Ahmad, V. U. (2010c). Diversivittatin, a new phenylpropanoid derivative from the roots of *Ferula diversivittata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46(2), 192-194.
- Iranshahi, M., Kalategi, F., Sahebkar, A., Sardashti, A., & Schneider, B. (2010a). New sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula flabelliloba*. *Pharmaceutical Biology*, 48(2), 217-220.
- Iranshahi, M., Masullo, M., Asili, A., Hamedzadeh, A., Jahanbin, B., Festa, M., Capasso, A., & Piacente, S. (2010b). Sesquiterpene coumarins from *Ferula gumosa*. *Journal of Natural Products*, 73(11), 1958-1962.
- Iranshahi, M., Mojarab, M., Sadeghian, H., Hanafi-Bojd, M. Y., & Schneider, B. (2008b). Polar secondary metabolites of *Ferula persica* roots. *Phytochemistry*, 69(2), 473-478.
- Iranshahi, M., Shahverdi, A. R., Mirjani, R., Amin, G., & Shafiee, A. (2004a). Umbelliprenin from *Ferula persica* roots inhibits the red pigment production in *Serratia marcescens*. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 59(7-8), 506-508.

- Iranshahi, M., Amin, G., Gholamreza, S., Mohammadhossein, S., Shafiee, A., & Hadjiakhoondi, A. (2006). Sulphur-containing compounds in the essential oil of the root of *Ferula persica* Willd. var. *persica*. *Flavour and fragrance*, 21(2), 260-261.
- Iranshahi, M., & Iranshahi, M. (2011). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (*Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin) - A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 134(1), 1-10.
- Isaka, K., Nagatsu, A., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., Kojima, K., & Ogihara, Y. (2001). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 49(9), 1072-1076.
- Jabrane, A., Jannet, H. B., Mighri, Z., Mirjolet, J., Duchamp, O., Harzallah-Skhiri, F., & Lacaille-Dubois, M. (2010). Two new sesquiterpene derivatives from the tunisian endemic *Ferula tunetana* POM. *Chemistry and Biodiversity*, 7(2), 392-399.
- Jahansooz, F., Ebrahimzadeh, H., Najafi, A. A., Naghavi, M. R., Kouyakh, E. T., & Farzaneh, H. (2008). Composition and antifungal activity of the oil of *Ferula gummosa* samples from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 11(3), 284-291.
- Javaid, R., Aslam, M., Javaid, R., Nizami, Q., Javed, K., & Azhar, M. U. (2012). Extract of ferula foetida regel reverses gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *EXCLI Journal*, 11, 760-766.
- Javidnia, K., Miri, R., Kamalinejad, M., & Edraki, N. (2005). Chemical composition of *Ferula persica* Wild. essential oil from Iran. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 605-606.
- Jazayeri, S. B., Amanlou, A., Ghanadian, N., Pasalar, P., & Amanlou, M. (2014). A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1)
- Kadyrov, A. S., & Nikonov, G. K. (1973). 3-methoxy-4,5-methylenedioxypropiofenone - A new component of the roots of *Ferula ugamica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(1), 95.

- Kadyrov, A. S., & Nikonov, G. K. (1974). Coumarins from *Ferula korshinskyi*. *Chemistry of Natural Compounds*, 10(3), 401.
- Kadyrov, A. S., Saidkhodzhaev, A. I., Malikov, V. M., & Rakhmankulov, U. (1980). Coumarins of *Ferula schtschurowskiana* and *Ferula equisetacea*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1, 122.
- Kadyrov, A. S., Saidkhodzhaev, A. I., Nikonov, G. K., & Rakhmankulov, U. (1977). Esters from *Ferula akitschkensis*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 284-285.
- Kajimoto, T., Yahiro, K., & Nohara, T. (1989). Sesquiterpenoid and disulphide derivatives from *Ferula assa-foetida*. *Phytochemistry*, 28(6), 1761-1763.
- Kanani, M. R., Rahiminejad, M. R., Sonboli, A., Mozaffarian, V., Osaloo, S. K., & Ebrahimi, S. N. (2011). Chemotaxonomic significance of the essential oils of 18 *Ferula* species (Apiaceae) from Iran. *Chemistry and Biodiversity*, 8(3), 503-517.
- Kapahi, B. K., Thappa, R. K., Aggarwal, S. G., & Sarin, Y. K. (1985). Essential oil of *Ferula jaesekheana* Vatke. *PAFAI Journal*, 7(19), 23-24.
- Karamenderes, C., & Apaydin, S. (2003). Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. schwarz) Bässler on the rat isolated duodenum. *Journal of Ethnopharmacology*, 84(2-3), 175-179.
- Karim, A., & Bhatti, M. K. (1978). Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbeliferae. Part XIX: *Ferula ovina* Boiss (Kamyān) oils distilled from the mature and the immature seeds and the roots of the plant. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 21(2), 75-77.
- Karim, A., Bhatti, M. K., & Muhammad, K. (1979). Studies on the essential oils of the Pakistani species of the family Umbeliferae. Part XXVI: *Ferula oopoda*, Boiss Buhse (chir) oil from the seeds, stalks and roots. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 22(4), 198-201.
- Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. *Food Chemistry*, 100(2), 584-589.

- Kavoosi, G., & Rowshan, V. (2013). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from *Ferula assa-foetida* oleo-gum-resin: Effect of collection time. *Food Chemistry*, 138(4), 2180-2187.
- Khalilova, É. K., & Saidkhodzhaev, A. I. (1998). Sesquiterpenoid esters of *Ferula jaeschkeana*. *Chemistry of Natural Compounds*, 34(4), 516.
- Khasanov, T. K., Saidkhodzhaev, A. I., & Nikonov, G. K. (1974). Structure and configuration of polyanthin and polyanthinin, new coumarins of the roots of *Ferula polyantha* (russian). *Khim. Prirodn. Soedin. An Uzbek. SSR, No. 4*, 517-518.
- Khasanov, T. K., Saidkhodzhaev, A. I., & Nikonov, G. K. (1976). Structure of mogoltacin. *Chemistry of Natural Compounds*, 12(1), 84.
- Kiasalari, Z., Khalili, M., Roghani, M., Heidari, H., & Azizi, Y. (2013). Antiepileptic and antioxidant effect of hydroalcoholic extract of *Ferula assa foetida* gum on pentylentetrazoleinduced kindling in male mice. *Basic and Clinical Neuroscience*, 4(4), 21-28.
- Kir'yalov, N. P. (1961). The structure of cocanikine and umbelliprenin, components of the neutral part of oil from *Ferula cocanica*. *Tr. Botan. Inst. Akad. Nauk SSSR* 5(8), 7-14.
- Kir'yalov, N. P., & Bukreeva, T. V. (1973). Coumarins from the roots of *Ferula pseudooreoselinum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(3), 395-396.
- Kir'yalov, N. P., & Bukreeva, T. V. (1972). Samarcandin acetate from *Ferula pseudooreoselinum* roots. *Chemistry of Natural Compounds* 8(6), 777-778.
- Kir'yalov, N. P., & Movchan, S. D. (1966). The structure of gummosin. *Chemistry of natural compounds*, 2(6), 313-315.
- Kir'yanova, I. A., Sklyar, Y. E., Pimenov, M. G., & Baranova, Y. V. (1979). Terpenoid coumarins of *Ferula violacea* and *F. eugenii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(4), 499.
- Kir'yanova, I. A., Sklyar, Y. E., Pimenov, M. G., & Baranova, Y. V. (1982). Terpenoid coumarins of *Ferula foetidissima* and *F. inciso-serrata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(4), 489.

- Kir'yanova, I. A., & Sklyar, Yu. E. (1980). Dihydroconferin from *Ferula foetidissima*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1, 122-123.
- Kiseleva, V. V., Nikonov, G. K., & Karryev, M. O. (1975). The structure of diversin and diversinin - coumarins of *Ferula diversivittata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 11(3), 358-361.
- Klein-Júnior, L. C., Santin, J. R., Niero, R., De Andrade, S. F., & Cechinel-Filho, V. (2012). The therapeutic lead potential of metabolites obtained from natural sources for the treatment of peptic ulcer. *Phytochemistry Reviews*, 11(4), 567-616.
- Kobilov, M. N., Saidkhodzhaev, A. I., & Abdullaev, N. D. (1995). Esters from *Ferula nuratavica*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 324-325.
- Kohno, S., Murata, T., Sugiura, A., Ito, C., Iranshahi, M., Hikita, K., & Kaneda, N. (2011). Methyl galbanate, a novel inhibitor of nitric oxide production in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Journal of Natural Medicines*, 65(2), 353-359.
- Kojima, K., & Isaka, K. (1999). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. III. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47(8), 1145-1147.
- Kojima, K., Isaka, K., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., Mizukami, H., & Ogihara, Y. (2000). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. IV. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 48(3), 353-356.
- Kojima, K., Isaka, K., Purev, O., Jargalsaikhan, G., Suran, D., Mizukami, H., & Ogihara, Y. (1998). Sesquiterpenoid derivatives from *Ferula feruloides*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 46(11), 1781-1784.
- Kovačević, N. (2004). Osnovi farmakognoziije. Beograd: Srpska školska knjiga.
- Kukić, J., Petrović, S., & Niketić, M. (2006). Antioxidant activity of four endemic stachys taxa. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 725-729.
- Kuliev, Z. A., Khasanov, T. K., & Malikov, V. M. (1979). Terpenoid coumarin glycosides of *Ferula conocaula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(4), 414-416.
- Kuliev, Z. A., Khasanov, T. K., & Malikov, V. M. (1982). Coumarins of *Ferula conocaula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(1), 114-115.

- Kurzyna-Młynik, R., Oskolski, A. A., Downie, S. R., Kopacz, R., Wojewódzka, A., & Spalik, K. (2008). Phylogenetic position of the genus *Ferula* (Apiaceae) and its placement in tribe Scandiceae as inferred from nrDNA ITS sequence variation. *Plant Systematics and Evolution*, 274(1-2), 47-66.
- Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P. & Morin, D. (2007). Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 252-257.
- Lahouel, M., Zini, R., Zellagui, A., Rhouati, S., Carrupt, P., & Morin, D. (2007). Ferulenol specifically inhibits succinate ubiquinone reductase at the level of the ubiquinone cycle. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 252-257.
- Lamnaouer, D., Bodo, B., Martin, M., & Molho, D. (1987). Ferulenol and  $\omega$ -hydroxyferulenol, toxic coumarins from *Ferula communis* var. *genuina*. *Phytochemistry*, 26(6), 1613-1615.
- Lee, C., Chiang, L., Cheng, L., Liaw, C., Abd El-Razek, M. H., Chang, F., & Wu, Y. (2009). Influenza A (H1N1) antiviral and cytotoxic agents from *Ferula assa-foetida*. *Journal of Natural Products*, 72(9), 1568-1572.
- Lee, J. C., & Lim, K. T. (2000). Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid levels. *Food Science and Biotechnology*, 9, 83-88.
- Lhuillier, A., Fabre, N., Cheble, E., Oueida, F., Maurel, S., Valentin, A., Fourasté, I., & Moulis, C. (2005). Daucane sesquiterpenes from *Ferula hermonis*. *Journal of Natural Products*, 68(3), 468-471.
- Li, X., Li, G., Wang, H., Wang, Y., & Wang, J. (2010). Chemical constituents from *Ferula lehmanii* Boiss. *Zhongguo Xiandai Zhongyao* 12(8), 17-20.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M. A., & Aruoma, O. I. (2002). Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(18), 5042-5047.

- Maggi, F., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M. M., Tirillini, B., Sagratini, G., & Papa, F. (2009). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (*F. communis* L. subsp. *glauca*) growing in Marche (central Italy). *Fitoterapia*, 80(1), 68-72.
- Mahmoudi, Z., Soleimani, M., Saidi, A., Iranshahi, M., & Azizsoltanli, A. (2013). Effect of *Ferula gummosa* ethanolic extract on osteogenesis in human mesenchymal stem cells. *Journal of Medicinal Plants*, 12(46), 50-59.
- Marston A., Hostettmann K., & Msonthi J. D. (1995). Isolation of antifungal and larvicidal constituents of *Diplolophium buchmanii* by centrifugal partition chromatography. *Journal of Natural Products*, 58(1), 128-130.
- Mazzio, E. A., & Soliman, K. F. A. (2010). In vitro screening of tumoricidal properties of international medicinal herbs: Part II. *Phytotherapy Research*, 24(12), 1813-1824.
- McKenna, A., Nordt, S. P., & Ryan, J. (2004). Acute nutmeg poisoning. *European Journal of Emergency Medicine : Official Journal of the European Society for Emergency Medicine*, 11(4), 240-241.
- Melibaev, S., Rakhmankulov, U., & Saidkhodzhaev, A. I. (1980). Intraspecies chemical variability in *Ferula tenuisecta* Korov. *Rastitel'nye Resursy*, 16(3), 431-435.
- Meng, H., Li, G., Huang, J., Zhang, K., Wang, H., & Wang, J. (2013). Sesquiterpene coumarin and sesquiterpene chromone derivatives from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korov. *Fitoterapia*, 86(1), 70-77.
- Meshkatsadat, M. H., Salhvarzi, S., & Aminirad, R. (2013). Chemical composition of volatile oil from *Ferula gummosa* using hydrodistillation profile. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(1), 167-169.
- Mirjani, R., Shahverdi, A., Iranshahi, M., Amin, G., & Shafiee, A. (2005). Identification of antifungal compounds from *Ferula persica* var. *persica*. *Pharmaceutical Biology*, 43(4), 293-295.
- Mirzaei, H. H., & Hasanloo, T. (2009). Essential oil composition of root of *Ferula assa-foetida* from two Iranian localities (Gonabad and Tabas). *Asian Journal of Chemistry*, 21(8), 6354-6358.

- Miski, M., & Jakupovic, J. (1990a). Cyclic farnesyl-coumarin and farnesyl-chromone derivatives from *Ferula communis* subsp. *communis*. *Phytochemistry*, 29(6), 1995-1998.
- Miski, M., & Jakupovic, J. (1990b). New daucane esters from *Ferula rigidula*. *Phytochemistry*, 29(1), 173-178
- Miski, M., & Mabry, T. (1986a). New daucane esters from *Ferula tingitana*. *Journal of Natural Products*, 49(4), 657-660.
- Miski, M., & Mabry, T. J. (1986b). Fercolide, a type of sesquiterpene lactone from *Ferula communis* subsp. *communis* and the correct structure of vaginatin. *Phytochemistry*, 25(7), 1673-1675.
- Miski, M., Ulubelen, A., & Mabry, T. J. (1983). Six sesquiterpene alcohol esters from *Ferula elaeochytris*. *Phytochemistry*, 22(10), 2231-2233.
- Miski, M., Ulubelen, A., Lee, E., & Mabry, T. J. (1985). Sesquiterpene-coumarin ethers of *Ferula tingitana*. *Journal of Natural Products*, 48(1), 326-327.
- Mollazadeh, S., Matin, M. M., Bahrami, A. R., Iranshahi, M., Behnam-Rassouli, M., Rassouli, F. B., & Neshati, V. (2011). Feselol enhances the cytotoxicity and DNA damage induced by cisplatin in 5637 cells. *Zeitschrift Fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences*, 66(11-12), 555-561.
- Morris, C. J. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 225, 115-121.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2004). Sesquiterpene coumarins from *Ferula fukanensis* and nitric oxide production inhibitory effects (2)1,2). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 52(10), 1215-1218.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2005a). Sesquiterpene chromones from *Ferula fukanensis* and their nitric oxide production inhibitory effects. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1732-1735.
- Motai, T., & Kitanaka, S. (2005b). Sesquiterpene phenylpropanoids from *Ferula fukanensis* and their nitric oxide production inhibitory effects. *Journal of Natural Products*, 68(3), 365-368.



- Motai, T., & Kitanaka, S. (2006). Sesquiterpenoids from *Ferula fukanensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 54-57.
- Motai, T., Daikonya, A., & Kitanaka, S. (2013). Sesquiterpene coumarins from *Ferula fukanensis* and their proinflammatory cytokine gene expression inhibitory effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(6), 618-623.
- Nabavi, S. F., Ebrahimzadeh, M. A., Nabavi, S. M., & Eslami, B. (2010). Antioxidant activity of flower, stem and leaf extracts of *Ferula gummosa* boiss. *Grasas y Aceites*, 61(3), 244-250.
- Nabiev, A. A., & Malikov, V. M. (1983a). Microlobidene - A terpenoid coumarin from *Ferula microloba* with a new type of terpenoid skeleton. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(6), 743-744.
- Nabiev, A. A., & Malikov, V. M. (1983b). Microlobin - A new coumarin from *Ferula microloba*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(6), 664-667.
- Nabiev, A. A., Khasanov, T. K., & Malikov, V. M. (1982a). A new terpenoid coumarin from *Ferula kopetdaghensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(1), 44-46.
- Nabiev, A. A., Khasanov, T. K., & Malikov, V. M. (1982b). Terpenoid coumarins of *Ferula kokanica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(5), 547-549.
- Nabiev, A. A., Khasanov, T. K., & Melibaev, S. (1978). Coumarins of *Ferula diversivittata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(4), 441.
- Nabiev, A. A., Malikov, V. M., & Khasanov, T. K. (1983). Karatavicin - A new coumarin from *Ferula karatavica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 19(4), 498.
- Nagatsu, A., Isaka, K., Kojima, K., Ondognii, P., Zevgeegiin, O., Gombosurengyin, P., Davgiin, K., Irfan, B., Iqbal, C. M., & Ogihara, Y. (2002). New sesquiterpenes from *Ferula ferulaeoides* (Steud.) Korovin. VI. isolation and identification of three new dihydrofuro[2,3-b]chromones. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(5), 675-677.
- Narasimhan B., & Dhake A. S. (2006). Antibacterial principles from *Myristica fragrans* seeds. *Journal of Medicinal Food* 9(3), 395-399.

- Nasirov, S. M., Saidkhodzhaev, A. I., Khasanov, T. K., Yagudaev, M. R., & Malikov, V. M. (1985). Stereochemistry of terpenoid coumarins. crystal and molecular structure of samarcandin. *Chemistry of Natural Compounds*, 21(2), 171-177.
- Nassar, M. I. (1994). Spectral study of farnesiferol B from *Ferula asa foetida* L. *Pharmazie*, 49(7), 542-543.
- Nassar, M. I., Abu-Mustafa, E. A., & Ahmed, A. A. (1995). Sesquiterpene coumarins from *Ferula assafoetida* L. *Pharmazie*, 50(11), 766-767.
- Nazari, Z. E., & Iranshahi, M. (2011). Biologically active sesquiterpene coumarins from *Ferula* species. *Phytotherapy Research*, 25(3), 315-323.
- Nazhimitdinova, N. N., & Saidkhodzhaev, A. I. (1993). Terpenoid esters of *Ferula soongarica*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 6, 900-901.
- Nazhimitdinova, N. N., Saidkhodzhaev, A. I., & Malikov, V. M. (1995). Esters of *Ferula tatarica*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 2, 316.
- Nikolić, V. (1973). *Ferula* L. u M. Josifović (Urednik), *Flora SR Srbije* 5 (pp. 274-276). Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti.
- Ohnishi, M., Morishita, H., Iwahashi, H., Toda, S., Shirataki, Y., Kimura, M., & Kido, R. (1994). Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry*, 36(3), 579-583.
- Ohno, M., & Abe, T. (1991). Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *Journal of Immunological Methods*, 145(1-2), 199-203.
- Olszewska, M. A., Presler, A., & Michel, P. (2012). Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected sorbus species. *Molecules*, 17(3), 3093-3113.
- Oughlissi-Dehak, K., Lawton, P., Michalet, S., Bayet, C., Darbour, N., Hadj-Mahammed, M., Badjah-Hadj-Ahmed, Y., Dijoux-Franca, M., & Guilet, D. (2008). Sesquiterpenes from aerial parts of *Ferula vesceritensis*. *Phytochemistry*, 69(9), 1933-1938.

- Paydar, M., Wong, Y. L., Abdulkarim Moharam, B., Movahed, E., Fen Wong, W., & Yeng Looi, C. (2013). Pharmacological activities and chemical constituents of *Ferula szowitsiana* DC. *Journal of Medical Sciences (Faisalabad)*, 13(4), 236-243.
- Petrović, S. D., Gorunović, M. S., Wray, V., & Merfort, I. (1999). A taraxasterol derivative and phenolic compounds from *Hieracium gymnocephalum*. *Phytochemistry*, 50(2), 293-296.
- Petrović, S., Maksimović, Z., & Kundaković, T. (2009). Analiza sastojaka biljnih droga. Beograd, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu.
- Pinar, M., & Fernandez, B. (1983). Laserine from *Ferula loscosii*. *Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica*, 79(3), 449-450.
- Pinar, M., & Rodríguez, B. (1977). A new coumarin from *Ferula loscosii* and the correct structure of coladonin. *Phytochemistry*, 16(12), 1987-1989.
- Poli, F., Appendino, G., Sacchetti, G., Ballero, M., Maggiano, N., & Ranelletti, F. O. (2005). Antiproliferative effects of daucane esters from *Ferula communis* and *F. arrigonii* on human colon cancer cell lines. *Phytotherapy Research*, 19(2), 152-157.
- Potapov, V. M., & Nikonov, G. K. (1976). Esters of the roots of *Ferula pallida*. *Chemistry of Natural Compounds*, 12(6), 739-740.
- Puangpraphant, S., Berhow, M. A., Vermillion, K., Potts, G., & Gonzalez de Mejia, E. (2011). Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- $\kappa$ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55(10), 1509-1522.
- Ramezani, M., Hosseinzadeh, H., & Mojtahedi, K. (2001). Effects of *Ferula gummosa* Boiss. fractions on morphine dependence in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 77(1), 71-75.
- Razdan, T. K., Qadri, B., Qurishi, M. A., Khuroo, M. A., & Kachroo, K. (1989). Sesquiterpene esters sesquiterpene-coumarin ethers from *Ferula jaeskeana*. *Phytochemistry*, 28(12), 3389-3393.

- Rollinger, J. M., Steindl, T. M., Schuster, D., Kirchmair, J., Anrain, K., Ellmerer, E. P., Langer, T., Stuppner, H., Wutzler, P., & Schmidtke, M. (2008). Structure-based virtual screening for the discovery of natural inhibitors for human rhinovirus coat protein. *Journal of Medicinal Chemistry*, *51*(4), 842-851.
- Rossi, P. G., Bao, L., Luciani, A., Panighi, J., Desjobert, J. M., Costa, J., Casanova, J., Bolla, J. M., & Berti, L. (2007). (*E*)-Methylisoeugenol and elemicin: antibacterial components of *Daucus carota* L. essential oil against *Campylobacter jejuni*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(18), 7332-7336.
- Rustaiyan, A., & Monfared, A. (2002). Essential oils of the stem and root of *Ferula galbaniflua* Boiss. et Buhse. from Iran. *Journal of Essential Oil Research*, *14*(4), 286-287.
- Sadraei, H., Asghari, G. R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., & Ebrahimi, M. (2001). Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine*, *8*(5), 370-376.
- Sadraei, H., Ghannadi, A., & Malekshahi, K. (2003). Composition of the essential oil of asa-foetida and its spasmolytic action. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *11*(3), 136-140.
- Sađirođlu, M., & Duman, H. (2007). *Ferula mervynii* (Apiaceae), a distinct new species from north-east Anatolia, Turkey. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *153*(3), 357-362.
- Sagitdinova, G. V., Saidkhodzhaev, A. I., & Malikov, V. M. (1983). Structure and stereochemistry of the coumarins of *Ferula lehmannii*. *Chemistry of Natural Compounds*, *19*(6), 672-675.
- Sahebkar, A., & Iranshahi, M. (2011). Volatile constituents of the genus *Ferula* (Apiaceae): A review. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *14*(5), 504-531.
- Sahebkar, A., Hassanzadeh-Khayyat, M., & Iranshahi, M. (2010). Qualitative analysis of the hydro-distilled essential oil of *Ferula latisecta* Rech. f. and Aell. roots from Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, *13*(3), 340-346.
- Saidkhodzhaev, A. I., & Nikonov, G. K. (1975). The structure of ferutinin. *Chemistry of Natural Compounds*, *9*(1), 25-26.

- Saidkhodzhaev, A. I., & Nikonov, G. K. (1976). Structure of teferidine, a new ester from *Ferula tenuisecta* fruit. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 1, 105-106.
- Saidkhodzhaev, A. I., Batsurén, D., & Malikov, V. M. (1985). Esters of *Ferula akitschkensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 21(5), 667.
- Saidkhodzhaev, A. I., Malikov, V. M., & Pimenov, M. G. (1993). Terpenoid coumarins from *Ferula kelifii*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 2, 297-298.
- Saidkhodzhaev, A. I., Malikov, V. M., Pimenov, M. G., & Melibaev, S. (1991a). Terpenoid coumarins of *Ferula lipskvi* and *F. vicaria*. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(2), 242-243.
- Saidkhodzhaev, A. I., Mukumova, D. U., Kamilov, Kh. M., Malikov, V. M., & Pimenov, M. G. (1991b). Terpenoid coumarins of *Ferula gummosa*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 2, 283-284.
- Savina, A. A., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1978). Terpenoid coumarins of *Ferula linczewskii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(3), 332.
- Savina, A. A., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1980). Stereoisomers of farnesiferol A in *Ferula linczewskii* roots. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1, 121.
- Sayed, A. A. R. (2011). Ferulsinaic acid attenuation of advanced glycation end products extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63(3), 423-428.
- Sayyah, M., Kamalinejad, M., Hidage, R. B., & Rustaiyan, A. (2001). Antiepileptic potential and composition of the fruit essential oil of *Ferula gummosa* Boiss. *Iranian Biomedical Journal*, 5(2-3), 15-16.
- Sayyah, M., Mandgary, A., Kamalinejad, M. (2002). Evaluation of anticonvulsant activity of the seed acetone extract of *Ferula gummosa* Boiss. against seizures induced by pentylenetetrazole and electroconvulsive shock in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 82(2-3), 105-109.
- Sayyah, M., & Mandgary, A. (2003). Anticonvulsant effect of *Ferula gummosa* root extract against experimental seizures. *Iranian Biomedical Journal*, 7(3), 139-143.

- Serkerov, S. V. (1975). An investigation of the resin of the roots of *Ferula rigidula*. *Chemistry of Natural Compounds*, 11(4), 577.
- Serkerov, S. V., Rasulov, F. A., Pimenov, M. G., & Belyi, M. G. (1985). 3,4-methylenedioxy-5-methoxypropiofenone and terpenoid coumarins of *Ferula caucasica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 21(4), 527-528.
- Shahverdi, A., Iranshahi, M., Mirjani, R., Jamalifar, H., Amin, G., & Shafiee, A. (2005). Bioassay-guided isolation and identification of an antibacterial compound from *Ferula persica* var. *persica* roots. *Daru*, 13(1), 17-19.
- Shahverdi, A. R., Saadat, F., Khorramizadeh, M. R., Iranshahi, M., & Khoshayand, M. R. (2006). Two matrix metalloproteinases inhibitors from *Ferula persica* var. *persica*. *Phytomedicine*, 13(9-10), 712-717.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Sharma, S. K., Kumar, S., Chand, K., Kathuria, A., Gupta, A., & Jain, R. (2011). An update on natural occurrence and biological activity of chromones. *Current Medicinal Chemistry*, 18(25), 3825-3852.
- Shi, H., Dong, L., Jiang, J., Zhao, J., Zhao, G., Dang, X., Lu, X., & Jia, M. (2013). Chlorogenic acid reduces liver inflammation and fibrosis through inhibition of toll-like receptor 4 signaling pathway. *Toxicology*, 303, 107-114.
- Shimoyama, A.T., Santin, J. R., Machado, I. R., De Oliveira e Silva, A. M., De Melo, I. L. P., Manchini-Filho, J., & Farsky, S. H. P. (2013). Antiulcerogenic activity of chlorogenic acid in different models of gastric ulcer. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386(1), 5-14.
- Shokoohinia, Y., Chianese, G., Appendino, G., Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Ghannadi, A., Taghvayi, R., Fattahian, K., Soltani, R., & Taglialatela-Scafati, O. (2013). Some like it pungent and vile. TRPA1 as a molecular target for the malodorous vinyl disulfides from asafoetida. *Fitoterapia*, 90, 247-251.
- Sinitsin, G. S., Suyunshalieva, U. Kh., Dembitskii, A. D., Krotova, G. I., Kovalenko, T. A., & Khvalibova, S. B. (1982). Study of bioecology, phytochemistry, and pharmacology of *Ferula iliensis*. *Vestnik Akademii Nauk Kazakhskoi SSR*, 4, 39-43.

- Sklyar, M. V., Pimenov, M. G., & Drozhzhina, L. B. (1982). Terpenoid coumarins of *Ferula kokanica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(6), 743.
- Sklyar, Y. E., Perel'son, M. E., & Pimenov, M. G. (1973). Moschatol - A new coumarin from the roots of *Ferula moschata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 9(3), 399.
- Sokolova, A. I., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1978). Terpenoid coumarins from *Ferula teterrima*. *Chemistry of Natural Compounds*, 14(1), 109-110.
- Su, B., Takaishi, Y., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O. K., & Ashurmetov, O. (2000). Sesquiterpene coumarins and related derivatives from *Ferula pallida*. *Journal of Natural Products*, 63(4), 436-440.
- Suzuki, K., Okasaka, M., Kashiwada, Y., Takaishi, Y., Honda, G., Ito, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O., Ashurmetov, O., Sekiya, M., & Ikeshiro, Y. (2007). Sesquiterpene lactones from the roots of *Ferula varia* and their cytotoxic activity. *Journal of Natural Products*, 70(12), 1915-1918.
- Syrov, V. N., Khushbaktova, Z. A., & Nabiyev, A. N. (1990). Effect of galbanic acid on the course of experimental hepatitis. *Farmakologiya i Toksikologiya*, 53(2), 41-43.
- Tawaha, K., Al-Muhtaseb, S., & Alkhalil, S. (2001). Sesquiterpenes from *Ferula sinaica*. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)*, 39(2), 165-169.
- Teng, L., Ma, G. Z., Li, L., Ma, L. Y., & Xu, X. Q. (2013). Karatavicinol a, a new anti-ulcer sesquiterpene coumarin from *Ferula sinkiangensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 49(4), 606-609.
- Teuscher E. (2006). *Medicinal spices. A handbook of culinary herbs, spices, spice mixtures and their essential oils*. Stuttgart: Medpharm GmbH Scientific Publishers.
- Trute, A., Gross, J., Mutschler, E., & Nahrstedt, A. (1997). *In vitro* antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta medica* 63(2), 125-129.
- Tsoukervanik, I. P., Bersoutski, V. P., Bourtseva, S. V., & Aizikovitch, B. I. (1935). Complex chemical study of the roots of *Ferula pseudoreoselinum* Lipsky. *Chimie et Industrie (Paris)*, 37, 532.

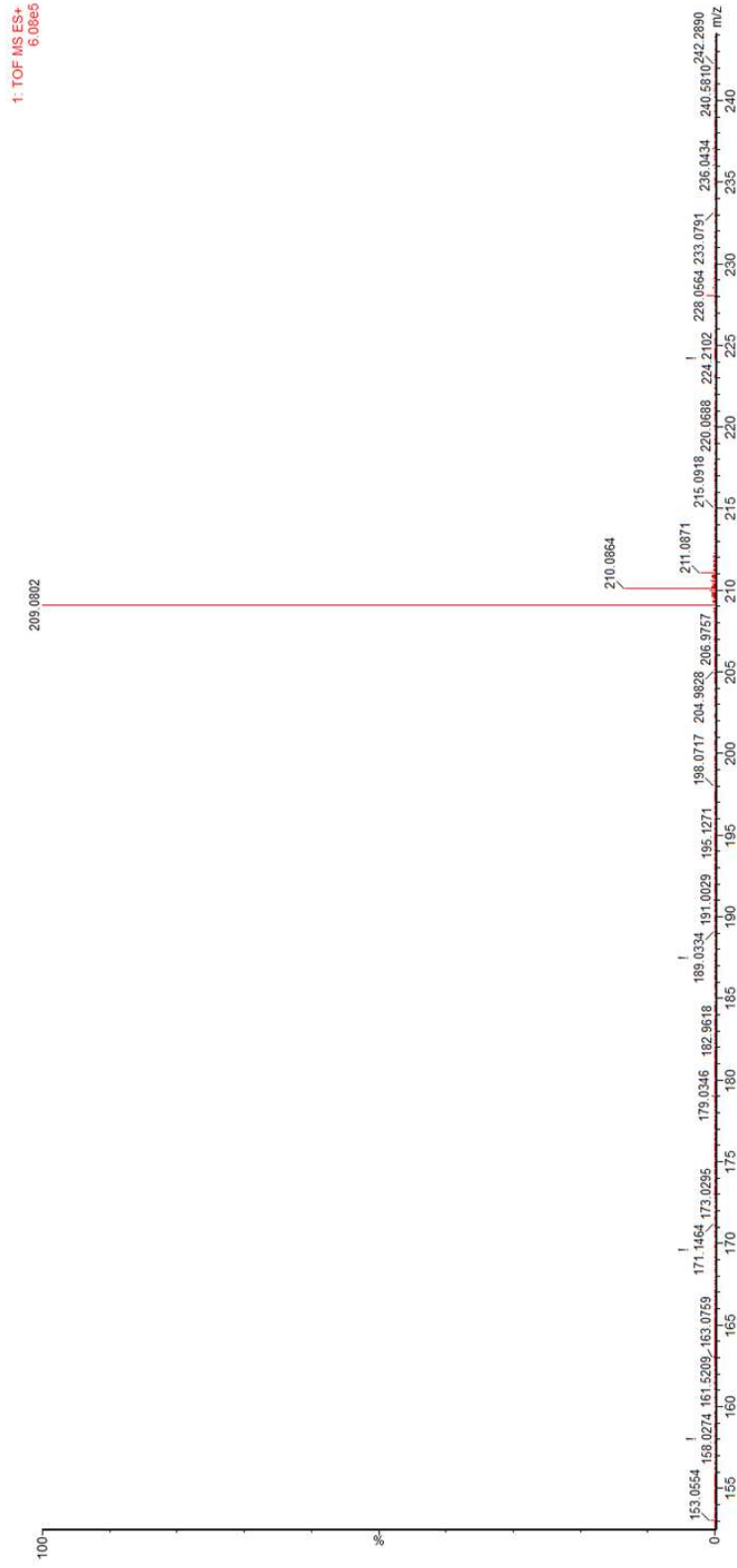
- Upadhyay, R., & Mohan Rao, L. J. (2013). An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(9), 968-984.
- Valiahdi, S. M., Iranshahi, M., & Sahebkar, A. (2013). Cytotoxic activities of phytochemicals from ferula species. *DARU, Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1)
- Valle, M. G., Appending, G., Nano, G. M., & Picci, V. (1986). Prenylated coumarins and sesquiterpenoids from ferula communis. *Phytochemistry*, 26(1), 253-256.
- Van den Dool, H., & Kratz, P. D. (1963). A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471.
- Vandyshev, V. V., Sklyar, Y. E., Perel'son, M. E., Moroz, M. D., & Pimenov, M. G. (1972a). Conferol, a new coumarin from *Ferula conocaula* and *F. moschata*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 5, 670-671.
- Vandyshev, V. V., Sklyar, Y. E., Perel'son, M. E., Moroz, M. D., & Pimenov, M. G. (1972b). Conferone, a new terpenoid coumarin from *Ferula conocaula* fruits. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 5, 669-670.
- Vandyshev, V. V., Sklyar, Y. E., Veselovskaya, N. V., & Pimenov, M. G. (1975). Coumarins of the roots of *Ferula foetidissima*. *Chemistry of Natural Compounds*, 11(3), 432.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., & Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4113-4117.
- Veselovskaya, N. V., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1979). Terpenoid coumarins of *Ferula iliensis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 15(4), 500.
- Veselovskaya, N. V., Sklyar, Y. E., & Pimenov, M. G. (1982). Terpenoid coumarins of *Ferula aitchisonii*. *Chemistry of Natural Compounds*, 18(3), 368.



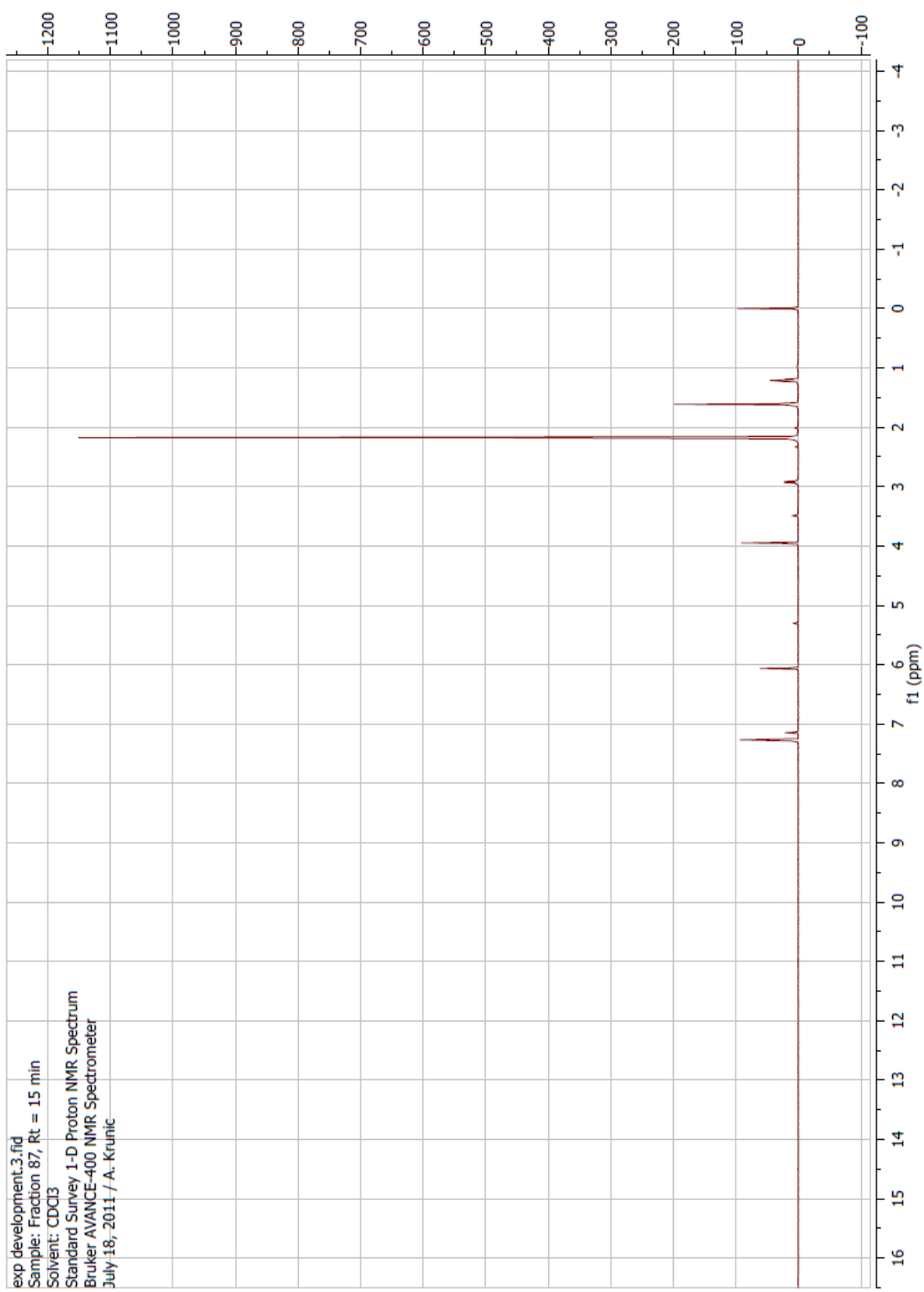
- Wang, Z. (2007). Application of *resina ferulae* and volatile oil thereof in preparation of anticancer medicament. *Faming Zhuanli Shenqing*, pp. 24, Patent No. CN101019903.
- Wang, Y., Si, J., Li, X., Jiang, L., & Zhu, J. (2011). Chemical constituents from the seeds of *Ferula sinkiangensis*. *Zhongguo Xiandai Zhongyao*, 13(1), 26-28.
- Xu, Q., Li, G., Liu, Y., Chen, S., Xu, L., & Yang, S. (2009). Study on sesquiterpenoid coumarins from the root of *Ferula fukanensis* K. M. Shen. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 44(4), 255-257.
- Yang, J., An, Z., Li, Z., Jing, S., & Qin, H. (2006b). Sesquiterpene coumarins from the roots of *Ferula sinkiangensis* and *Ferula teterrima*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54(11), 1595-1598.
- Yang, J., Li, G., Li, Z., & Qin, H. (2006a). Studies on chemical constituents from *Ferula teterrima*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa*, 18(2), 246-248.
- Zamaraeva, M. V., Hagelgans, A. I., Lubnina, L. V., Abramov, A. Y., Ahmedhodjaeva, H. S., Saidhodjaev, A. I., Glazyrina, N. G., & Salakhutdinov, B. A. (1999). Hormonal activity and membrane action of plant terpenoids. *Cellular & Molecular Biology Letters* 4(2), 189-201.
- Zarei, H., Rezaee, R., Behravan, E., Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., & Behravan, J. (2013). Diversin, from *Ferula diversivittata* protects human lymphocytes against oxidative stress induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Natural Product Research*, 27(11), 1016-1019.
- Zhang, Y., Kim, K., Zhang, W., Guo, Y., Kim, S., & Lü, J. (2012). Galbanic acid decreases androgen receptor abundance and signaling and induces G 1 arrest in prostate cancer cells. *International Journal of Cancer*, 130(1), 200-212.
- Zhou, P., Takaishi, Y., Duan, H., Chen, B., Honda, G., Itoh, M., Takeda, Y., Kodzhimatov, O.K., & Lee, K. (2000). Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: Anti-HIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry*, 53(6), 689-697.
- Zhu, G., & Zhang, H. (1996). Studies on the chemical constituents in the root of *Ferula tunshanica* Su. *Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao*, 27(10), 585-588.

- Zhukov, G. A., & Prokopenko, A. P. (1967). Coumarins of *Ferula caspica*. *Chemistry of Natural Compounds*, 3(3), 177-176.
- Zhukov, G. A., Prokopenko, A. P., & Kolesnikov, D. G. (1965). Chemical study of coumarins of *Ferula caspica* M. B. [Khimicheskoe izuchenie kumarinov korne i Feruly kaspisko I (Ferula)] *Meditinskaiia Promyshlennost' SSSR*, 73, 32-34.
- Znati, M., Jannet, H. B., Cazaux, S., & Bouajila, J. (2014). Chemical composition, biological and cytotoxic activities of plant extracts and compounds isolated from *Ferula lutea*. *Molecules*, 19(3), 2733-2747.

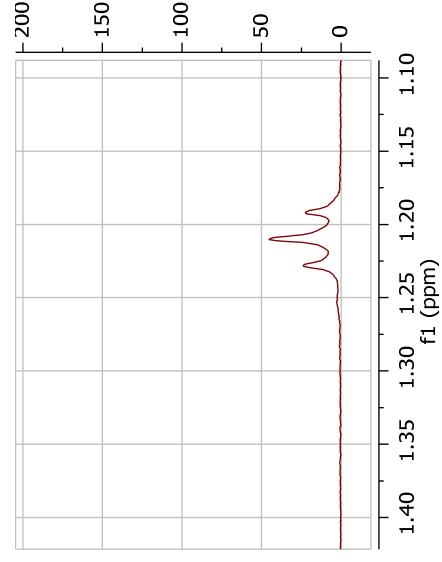
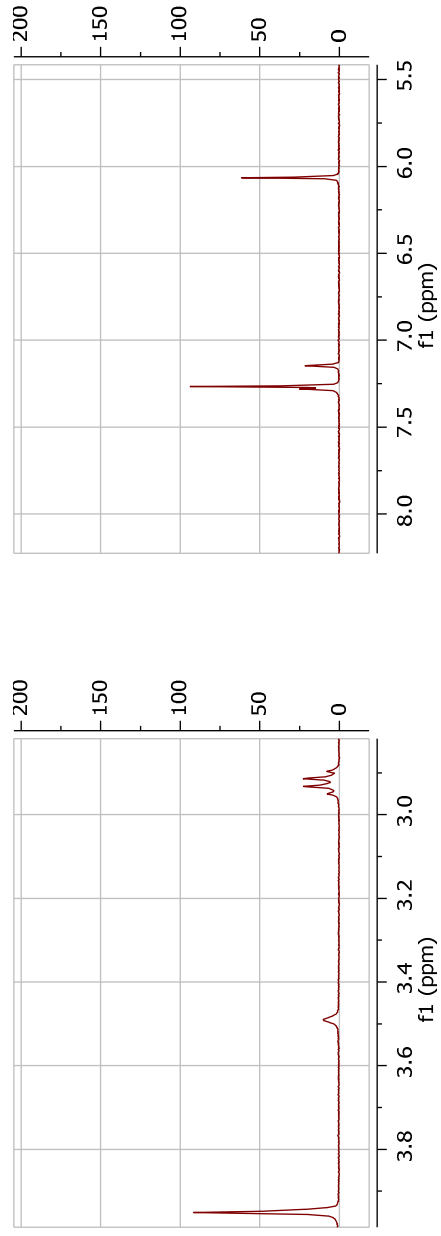
# **PRILOZI**



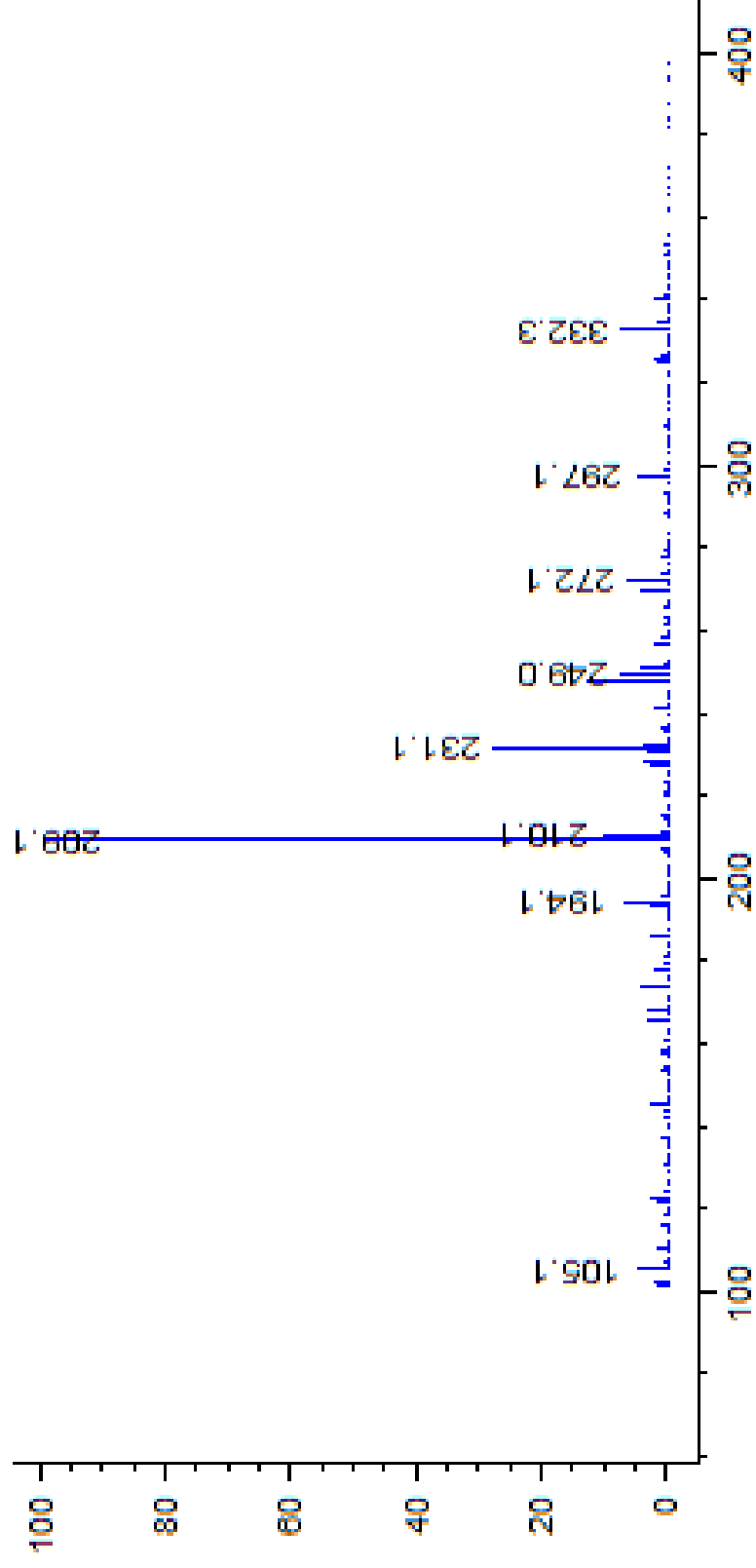
Slika 51. HR-MS spektar jedinjenja 1



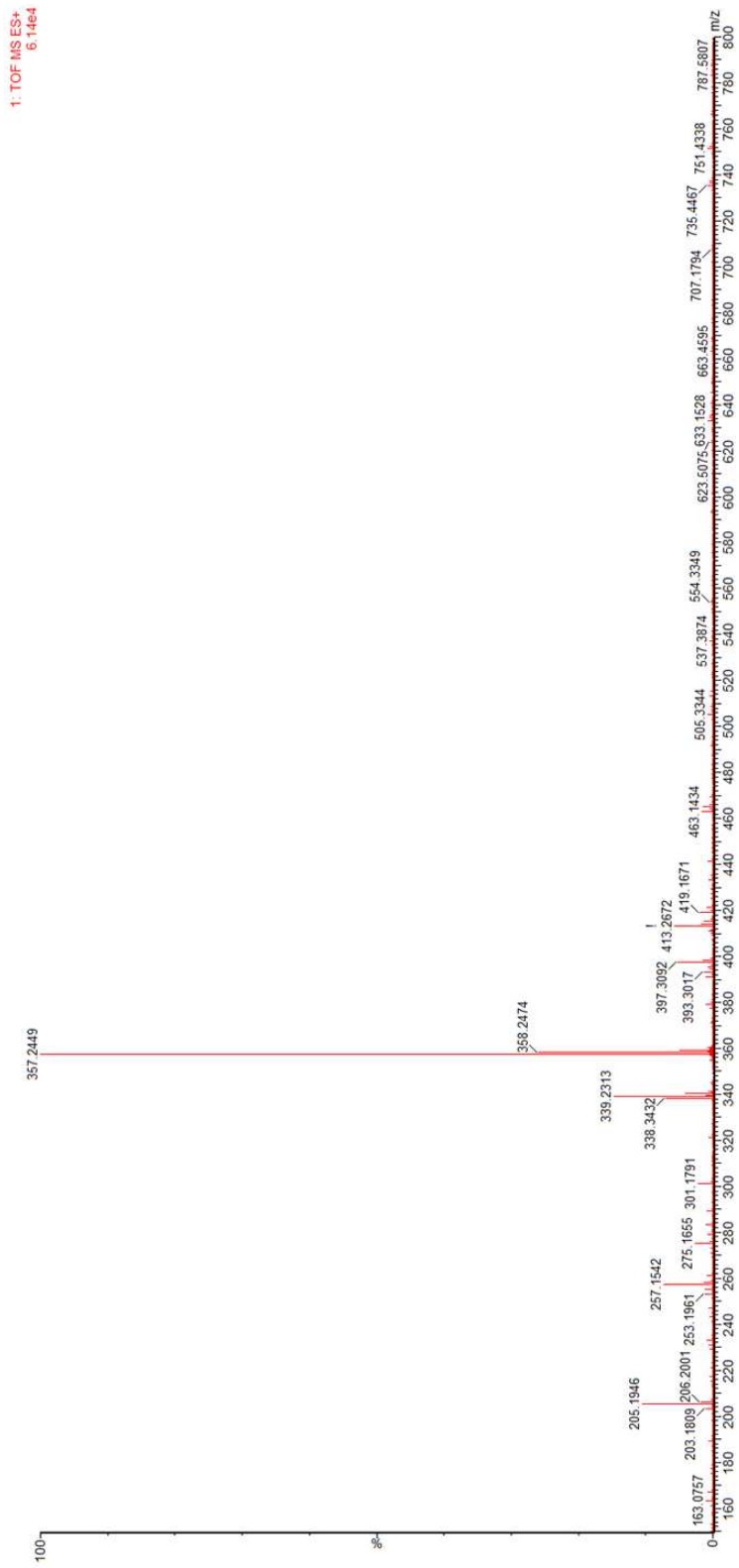
Slika 52. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 1



**Slika 53.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **1**

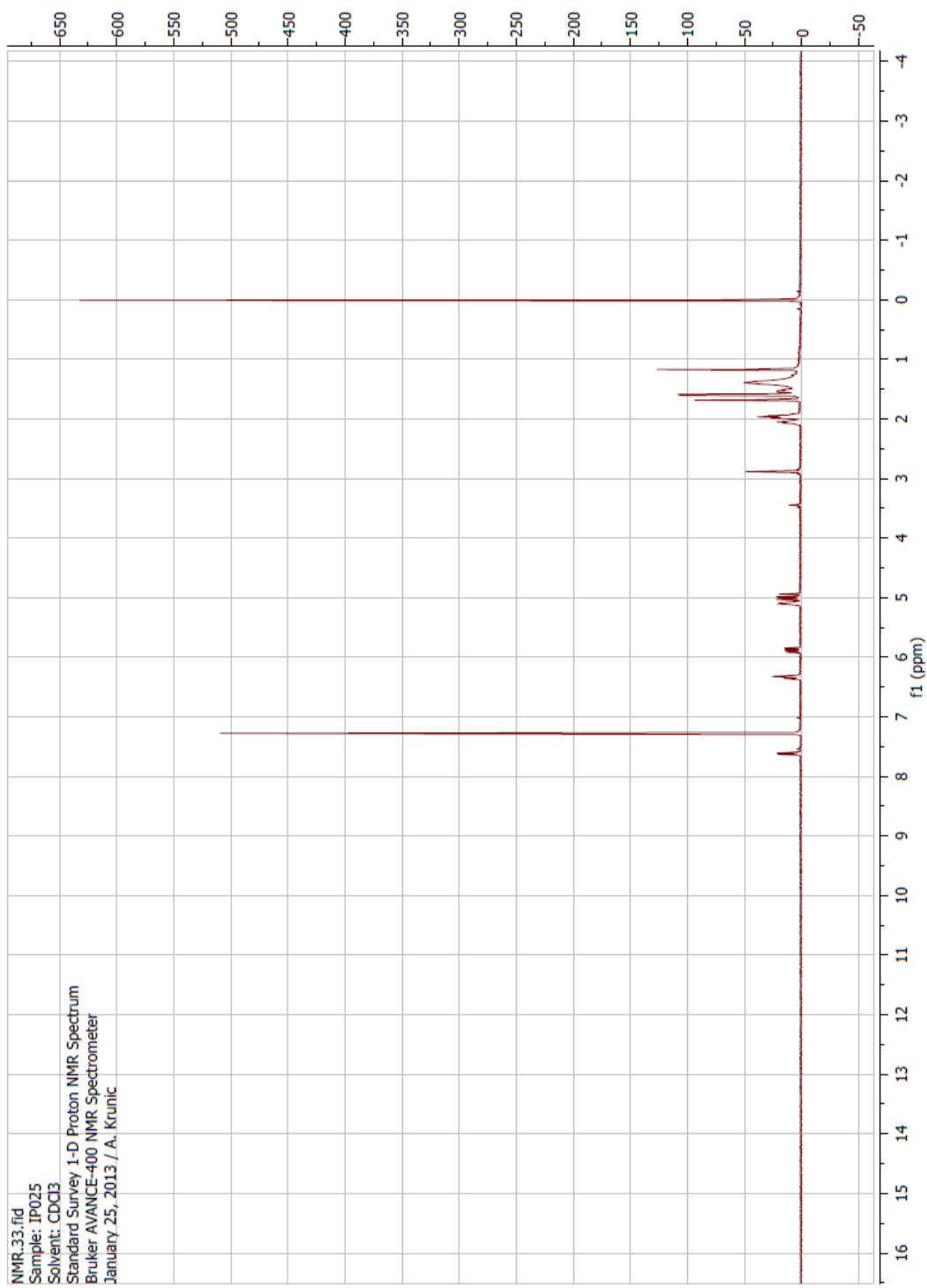


Slika 54. MS spektar jedinjenja 2

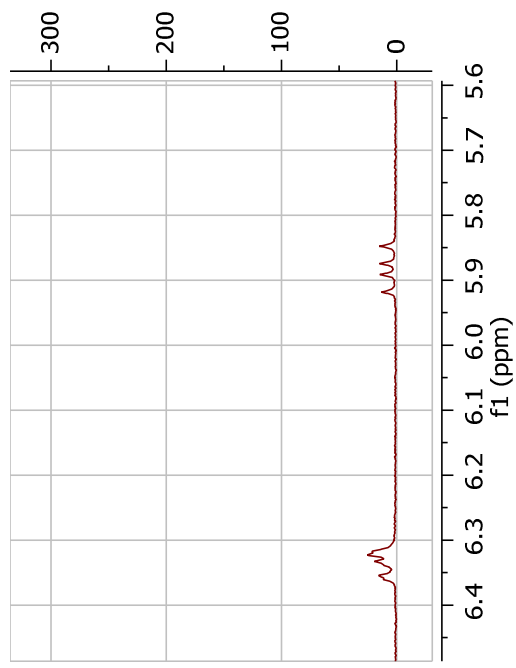
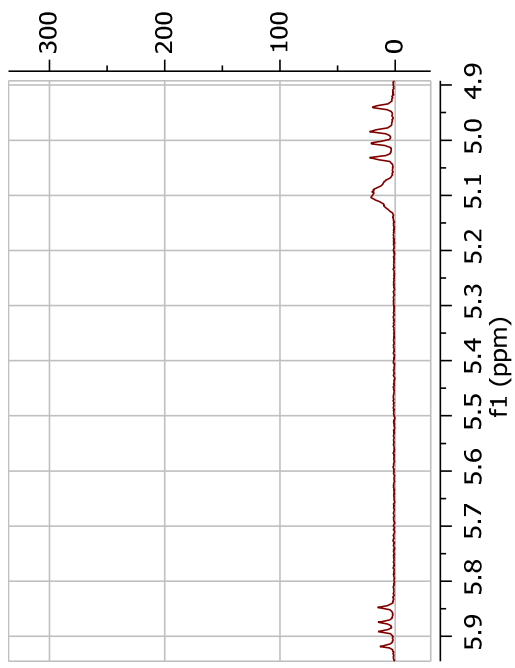
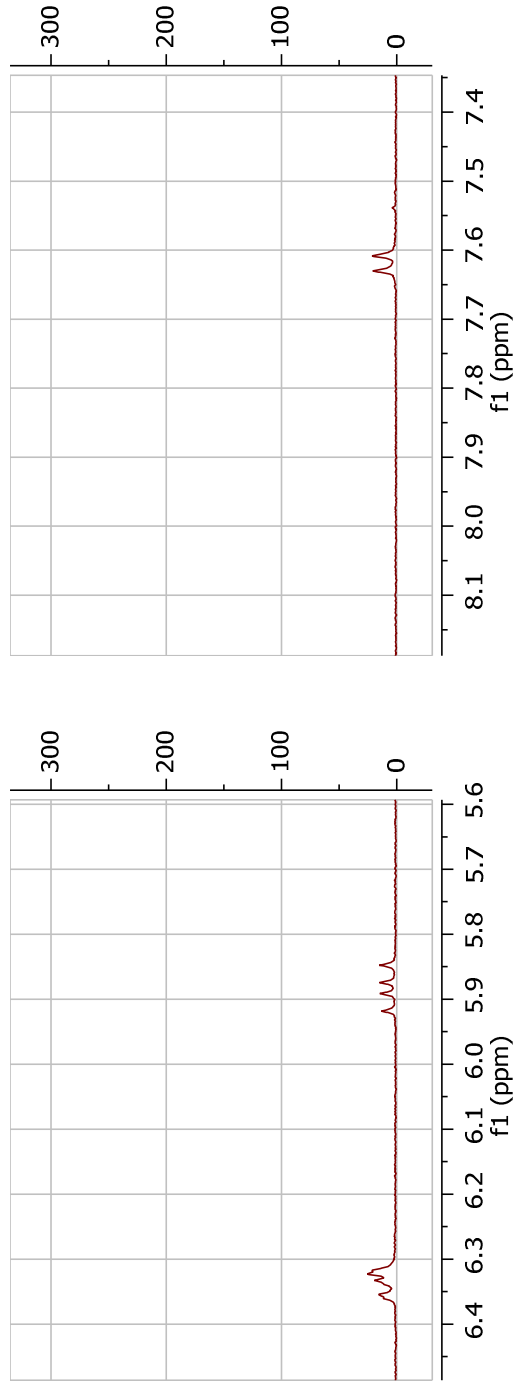
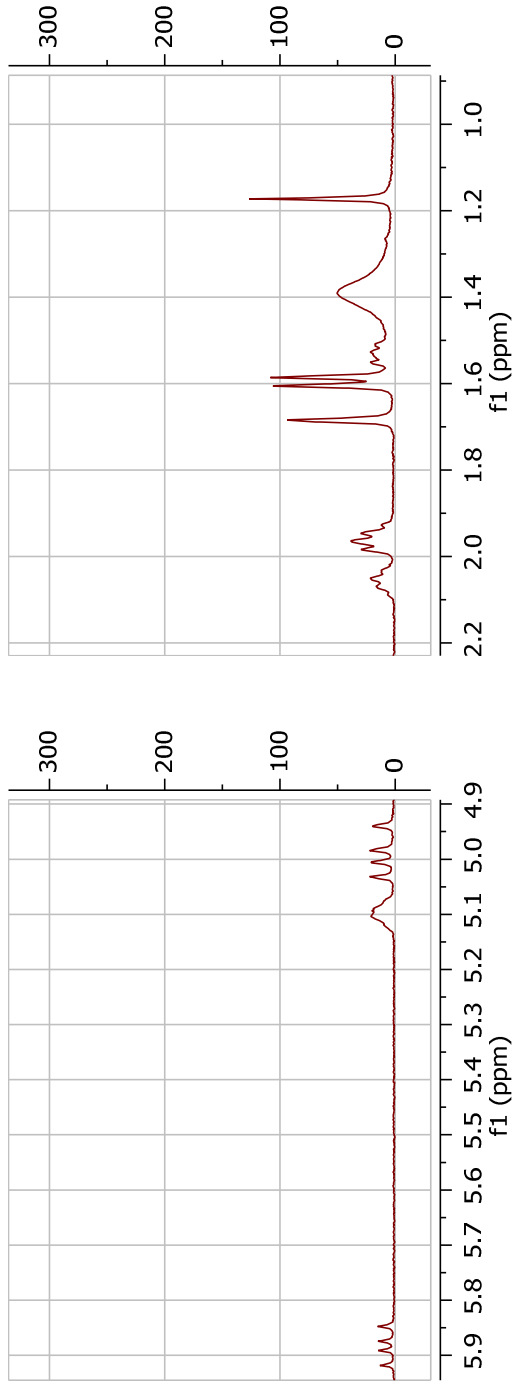


Slika 55. HR-MS spektar jedinjenja 3

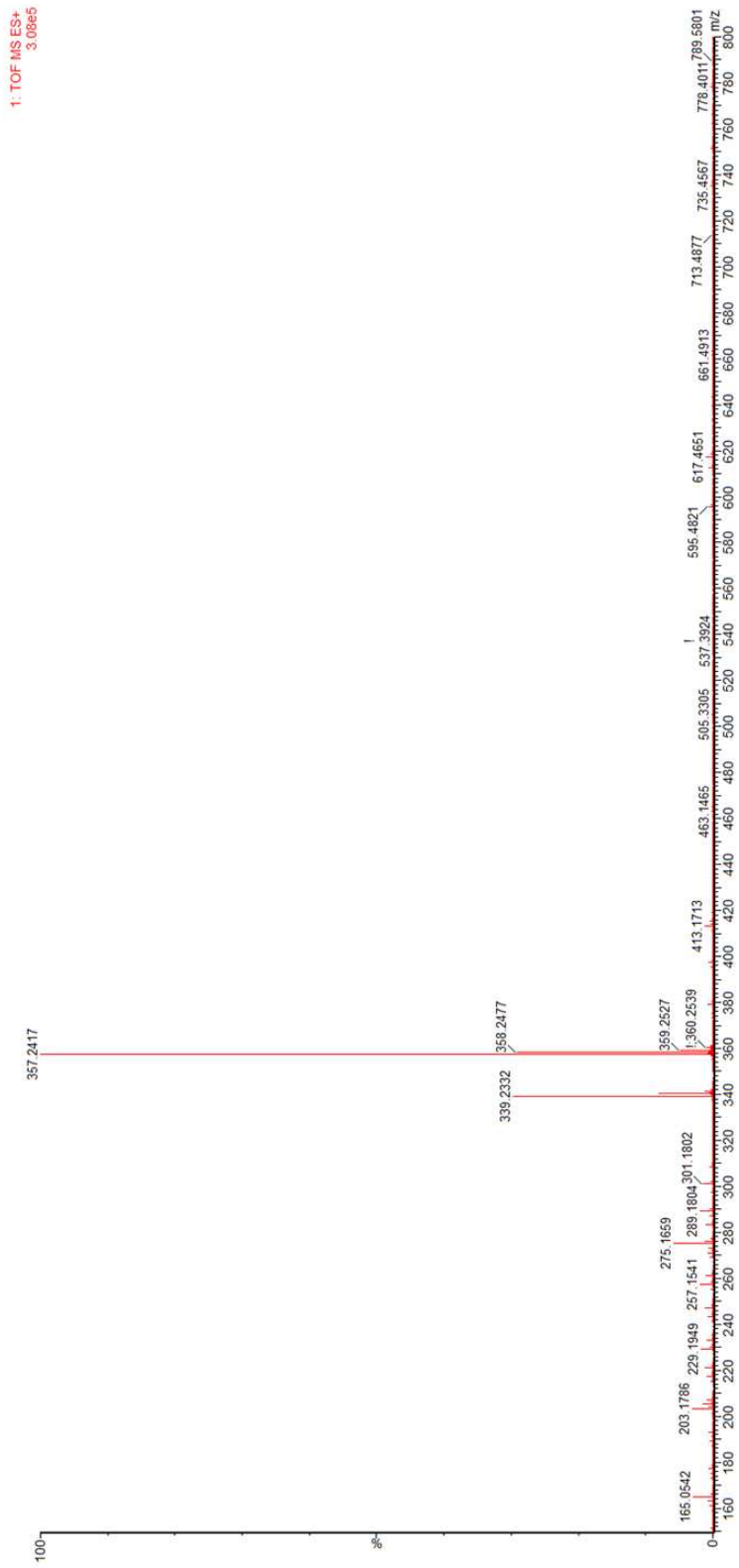




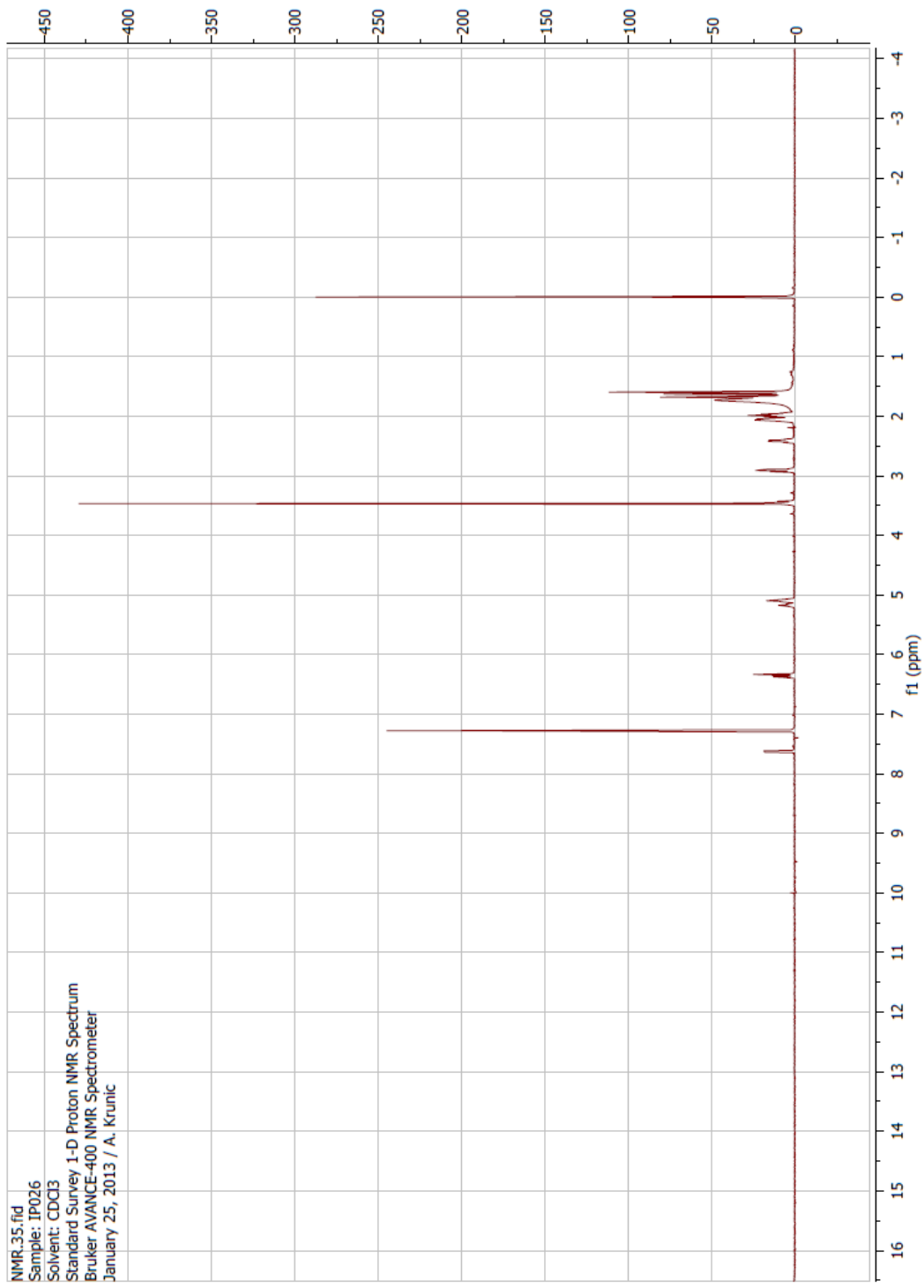
Slika 56.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja 3



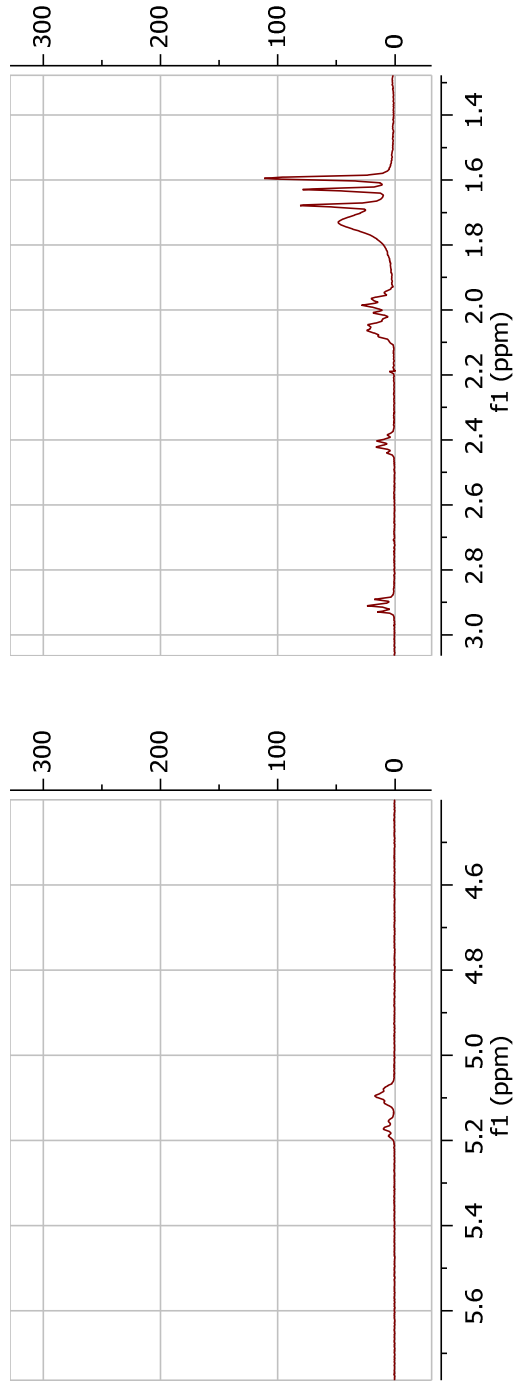
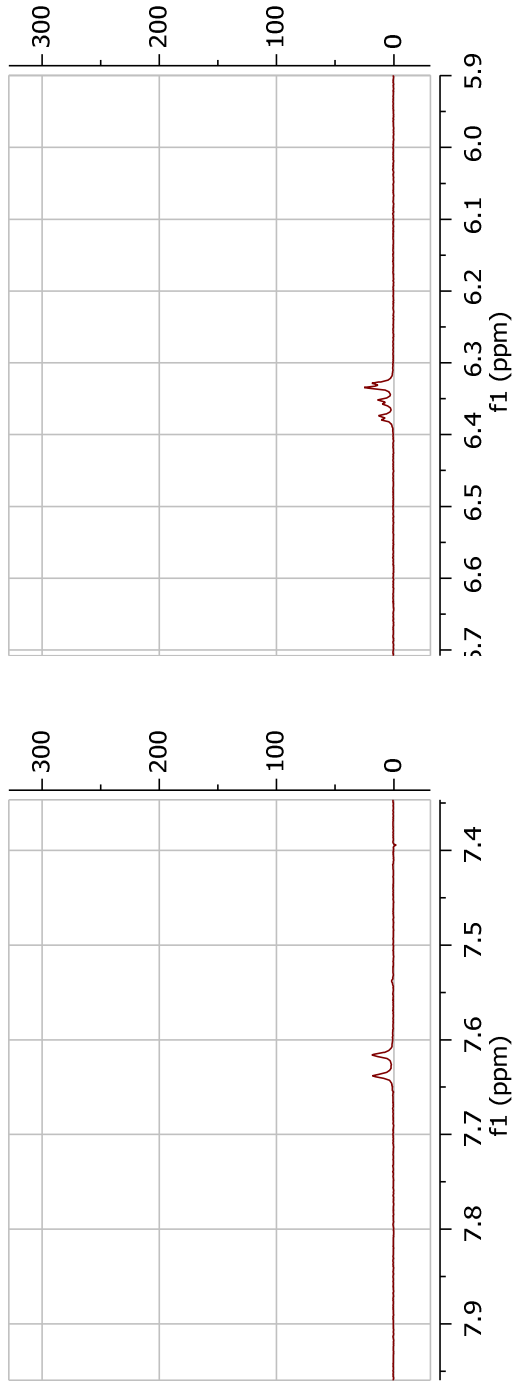
**Slika 57.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja 3



Slika 58. HR-MS spektar jedinjenja 4



**Slika 59.** <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 4

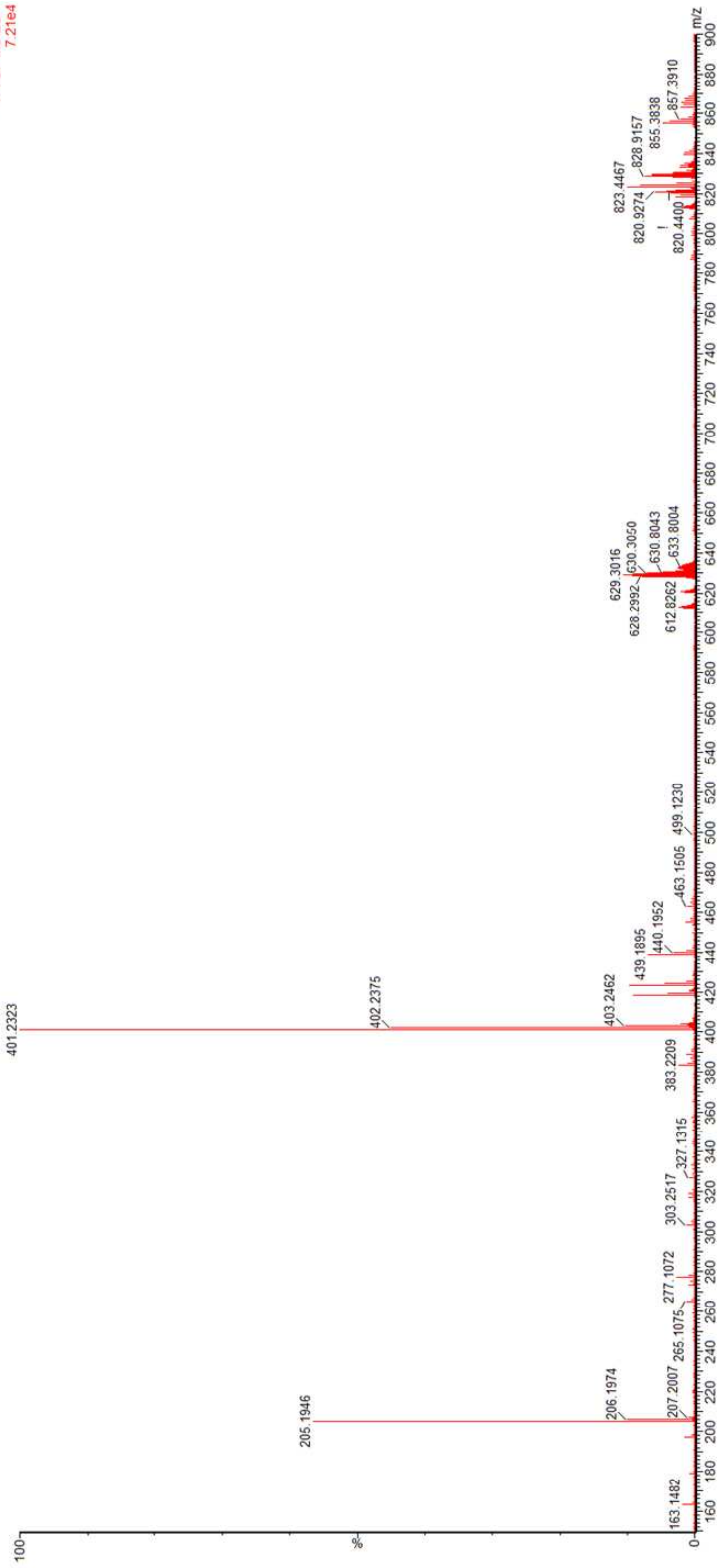


Slika 60. Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja 4

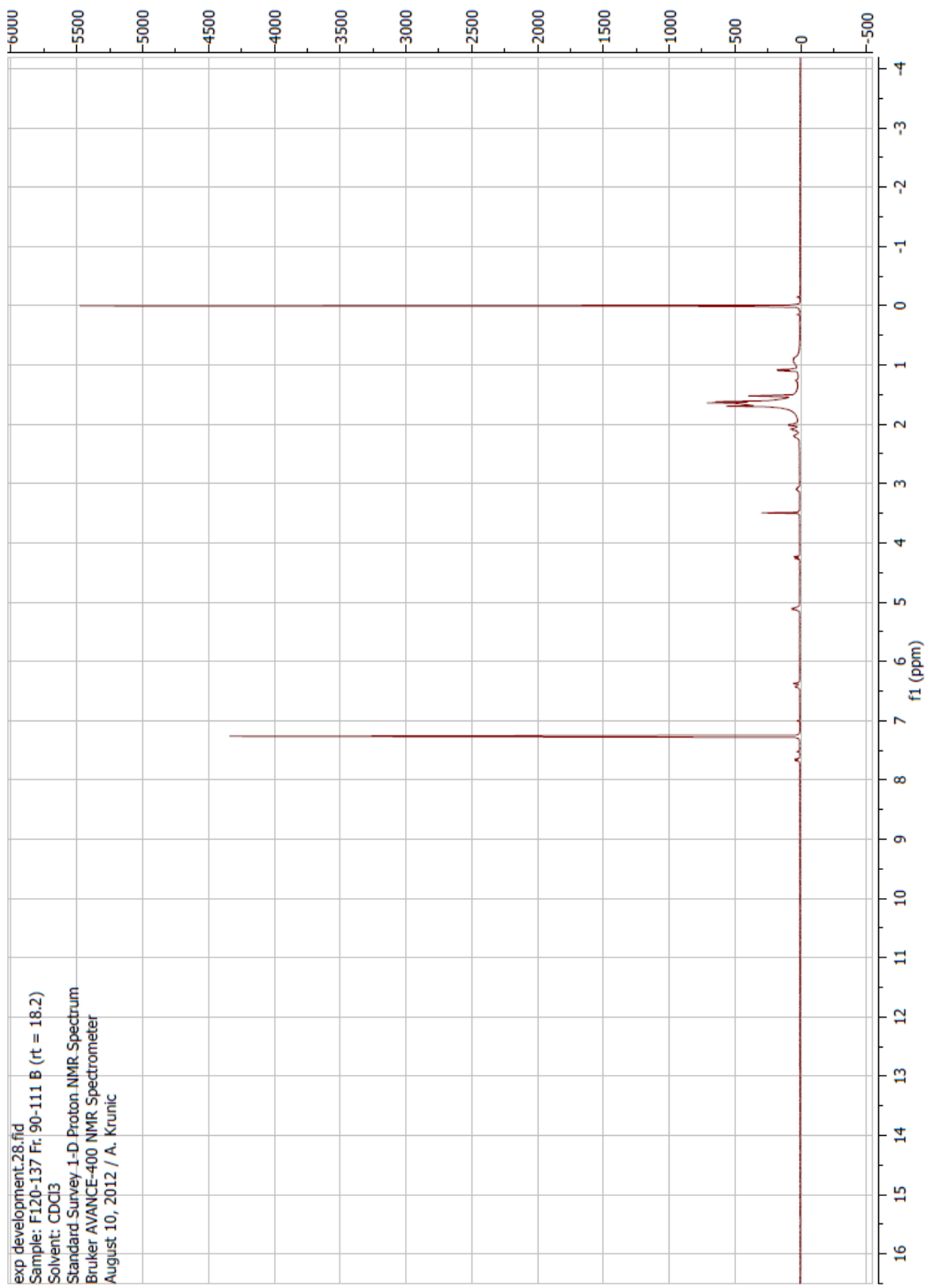


Slika 61. DEPT-Q spektar jedinjenja 4

1: TOF MS ES+  
7.21e4

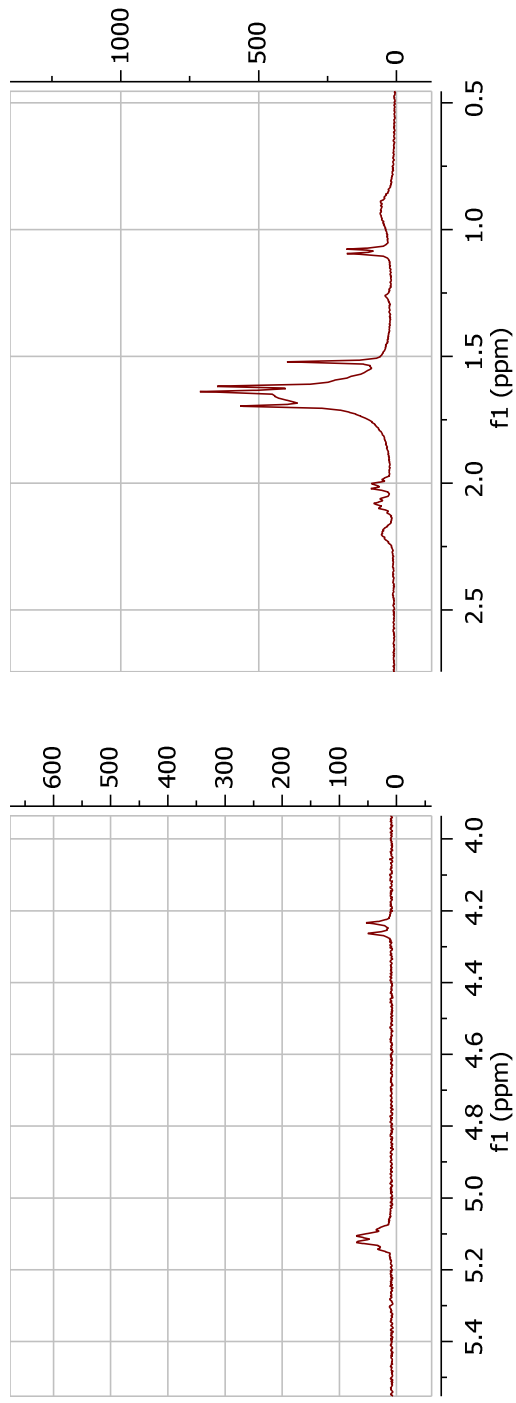
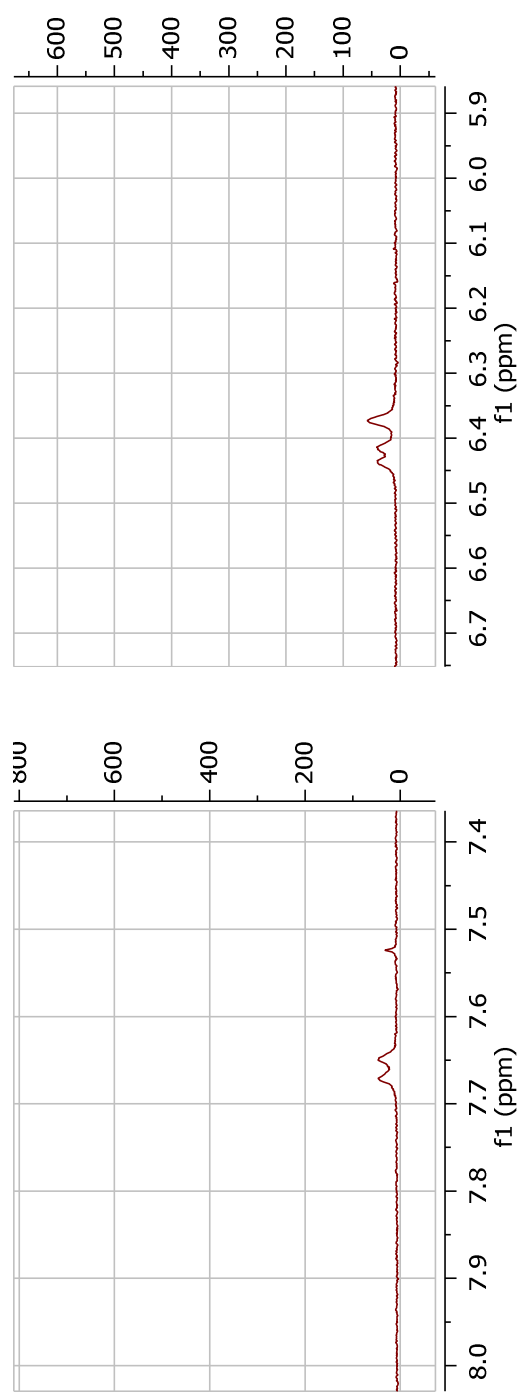


Slika 62. HR-MS spektar jedinjenja 5

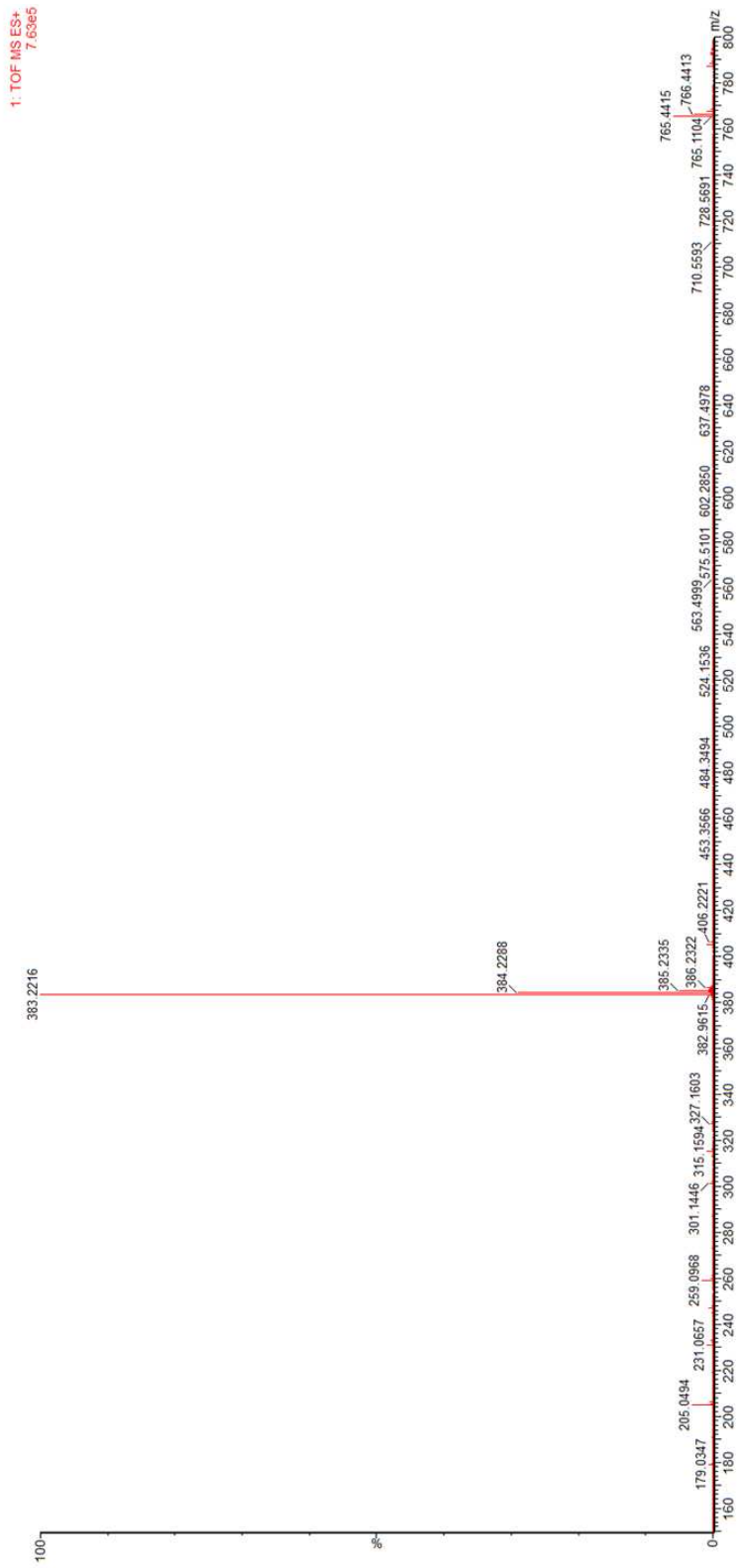


**Slika 63.** <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **5**

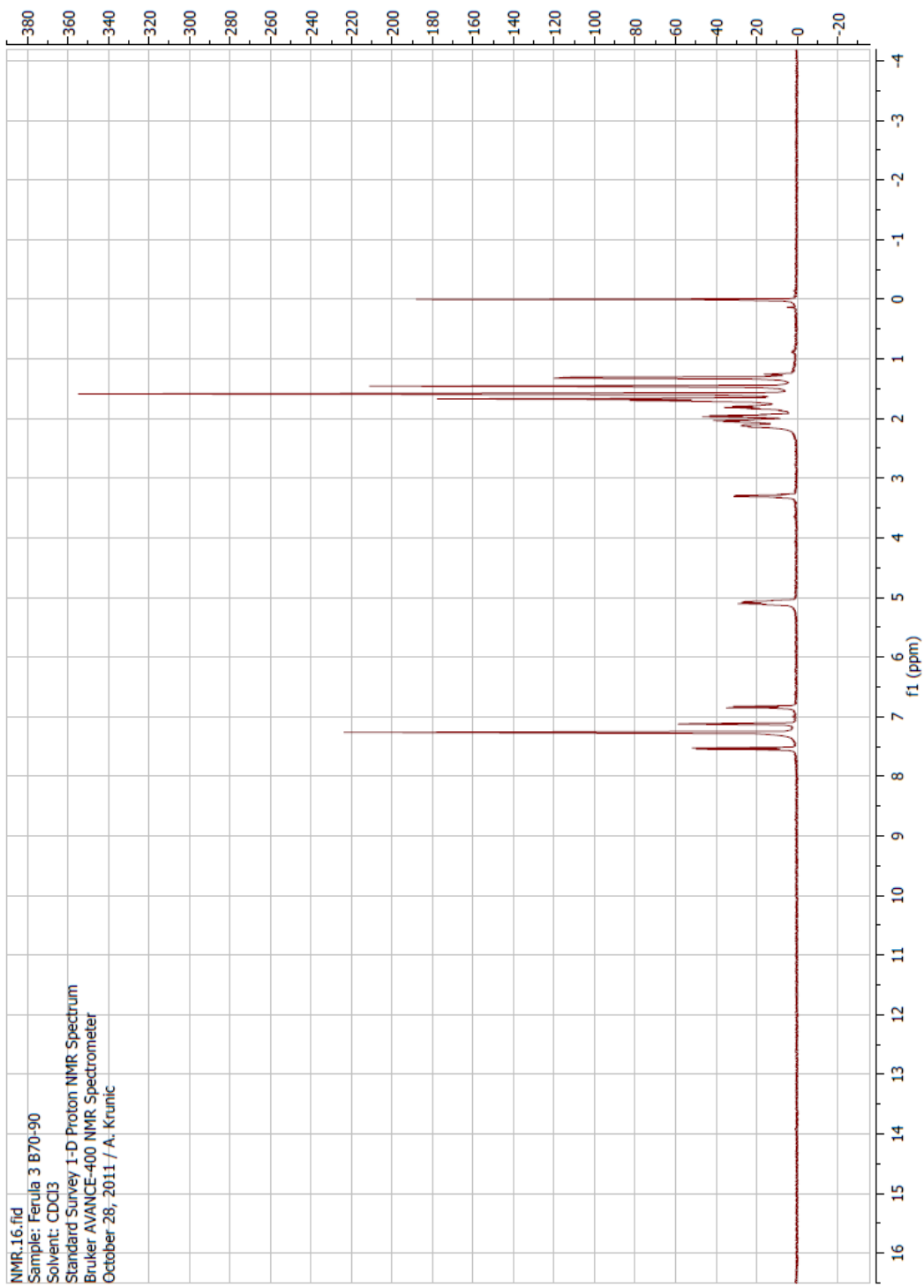




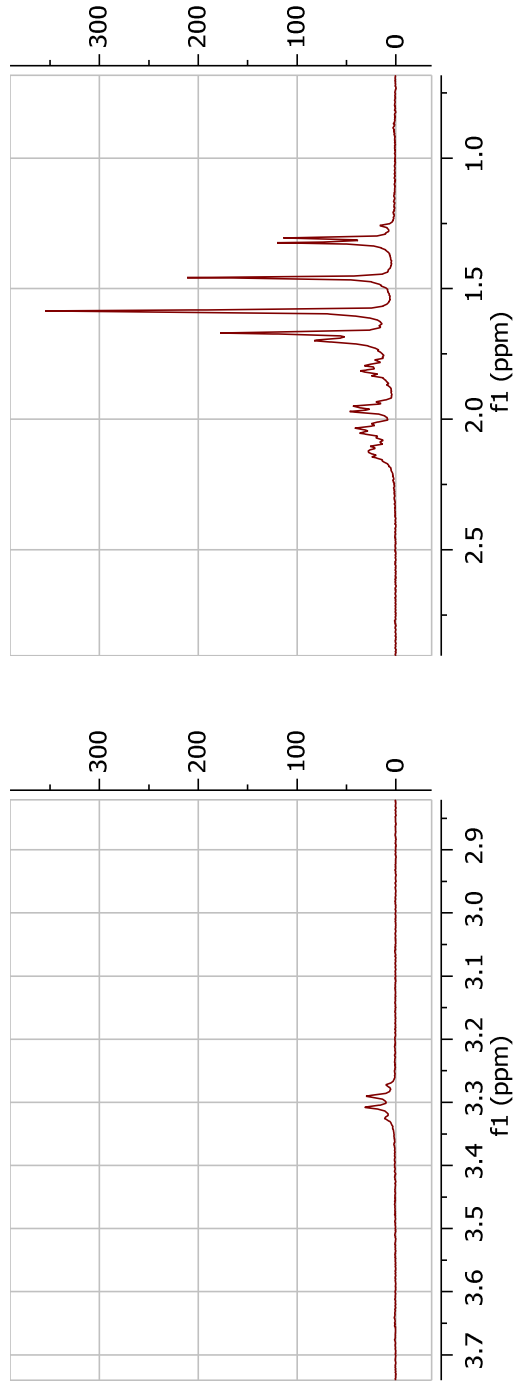
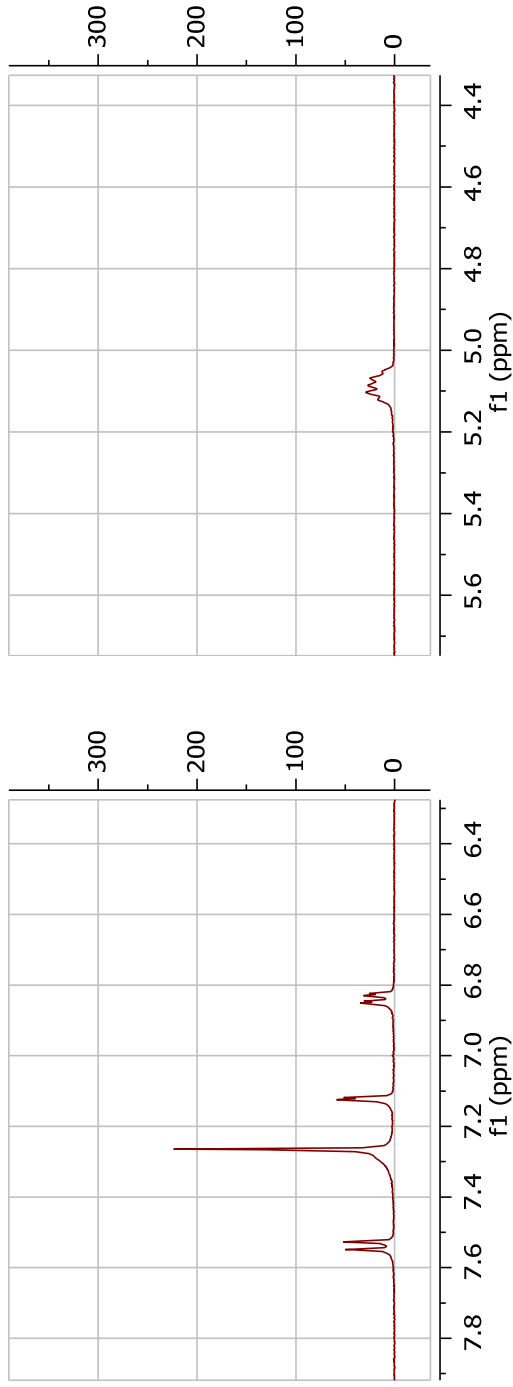
**Slika 64.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja 5



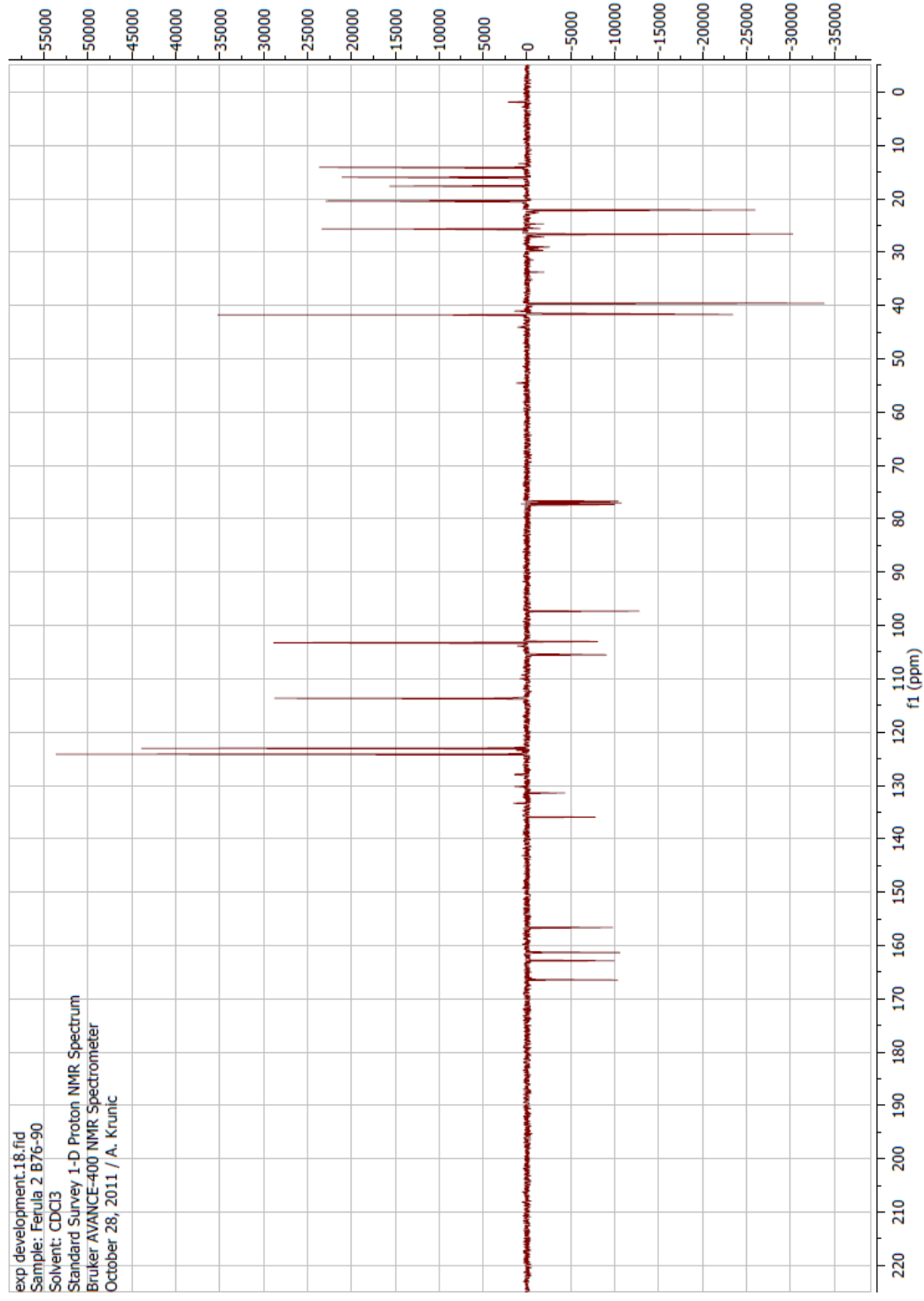
Slika 65. HR-MS spektar jedinjenja 6



**Slika 66.**  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja **6**

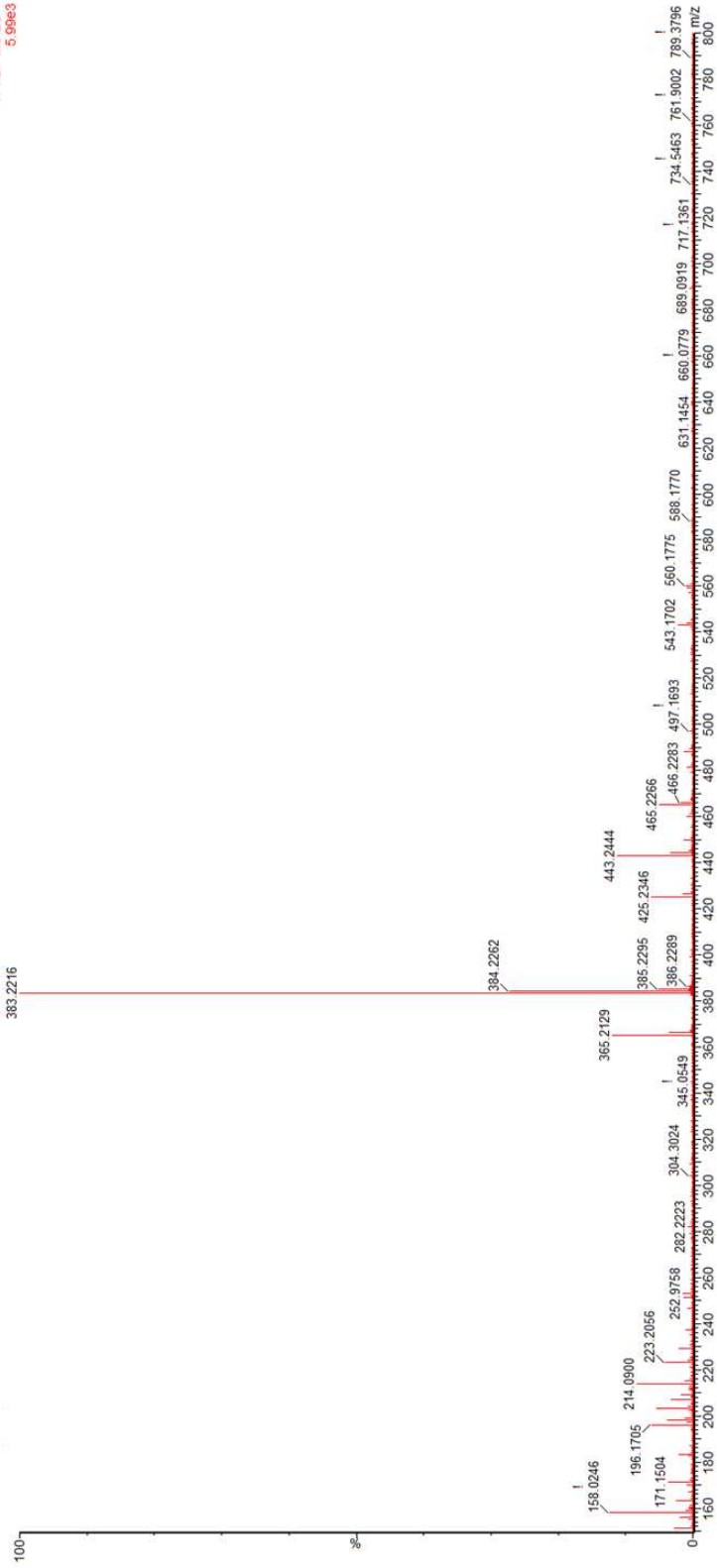


**Slika 67.** Prošireni detalji <sup>1</sup>H NMR spektra jedinjenja **6**

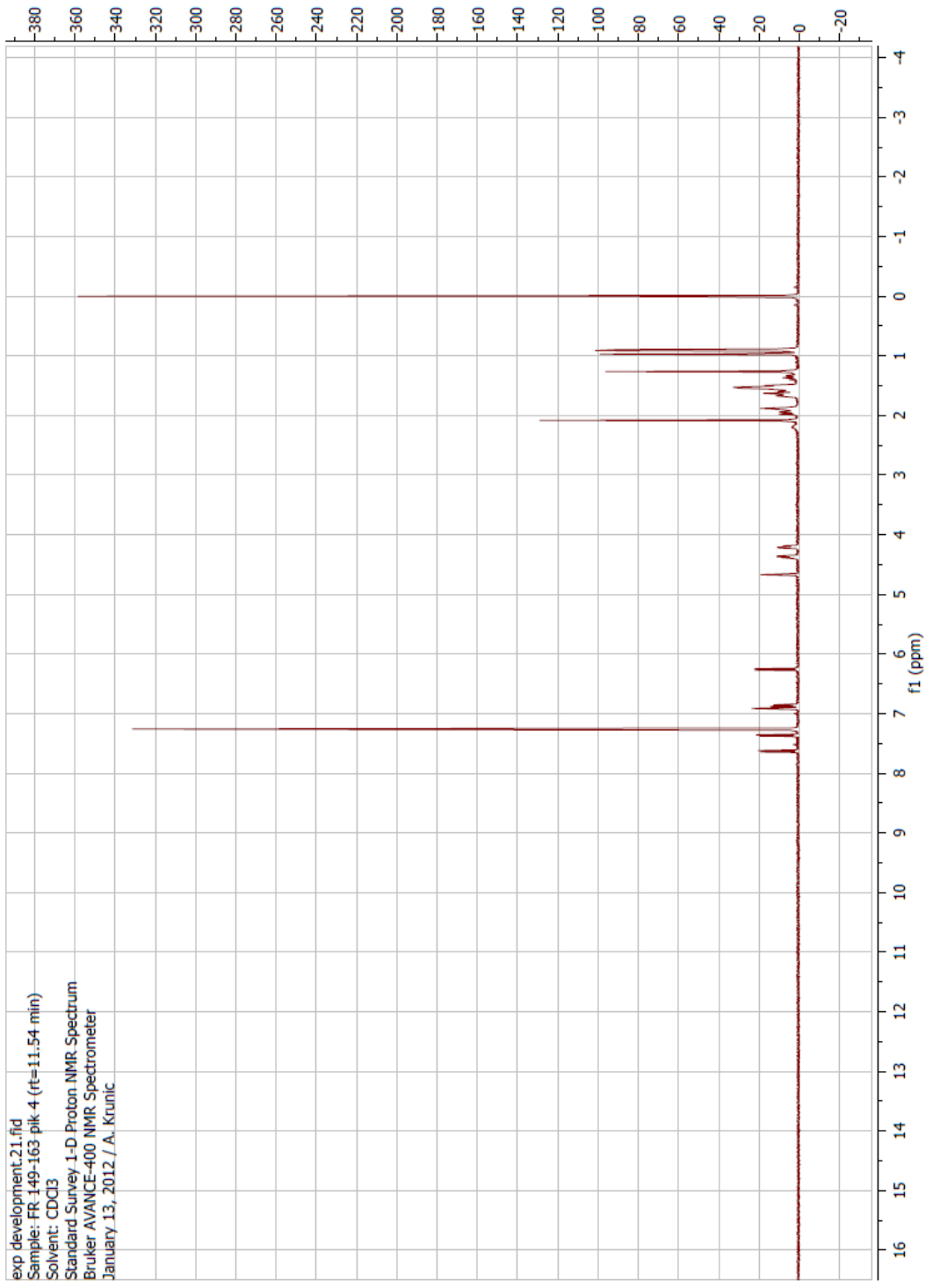


Slika 68. DEPT-Q spektar jedinjenja 6

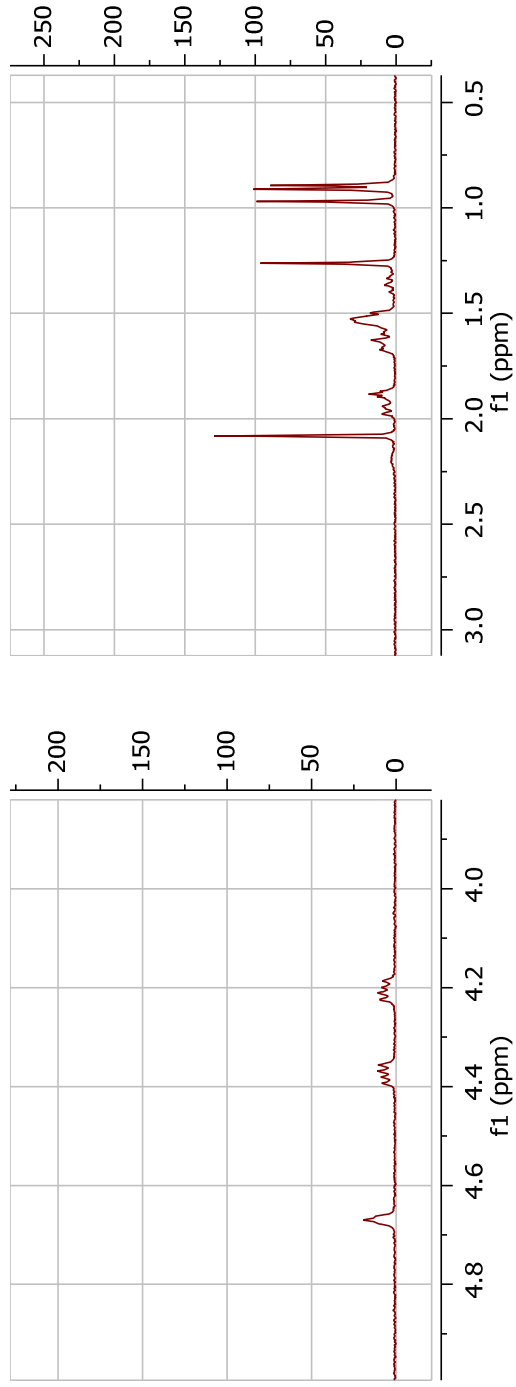
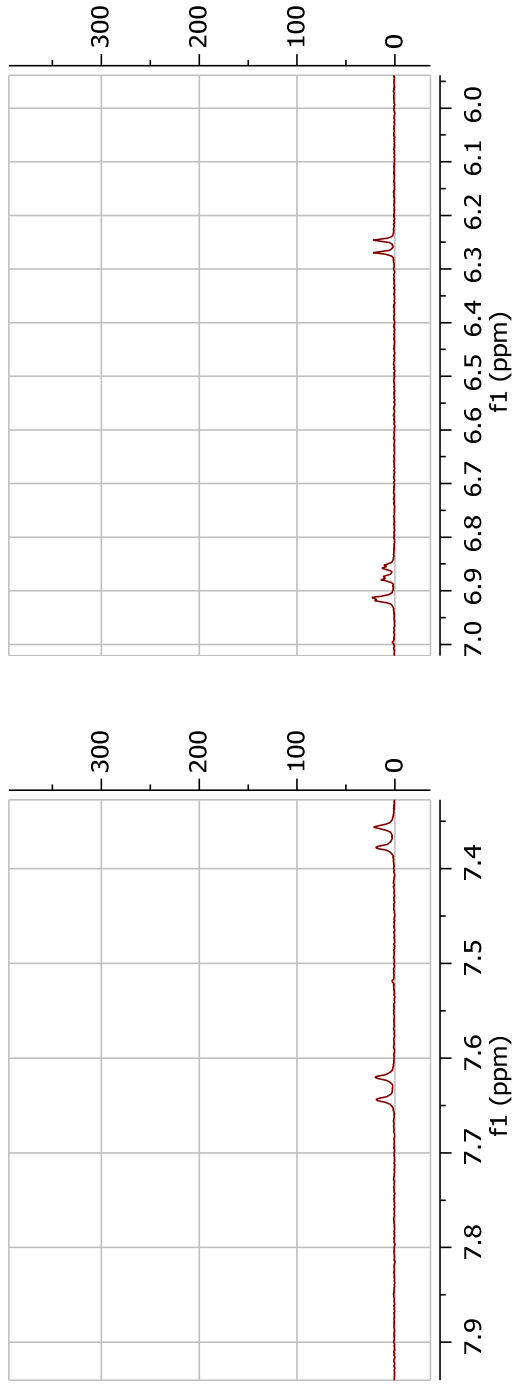
1: TOF MS ES+  
5.9983



Slika 69. HR-MS spektar jedinjenja 7

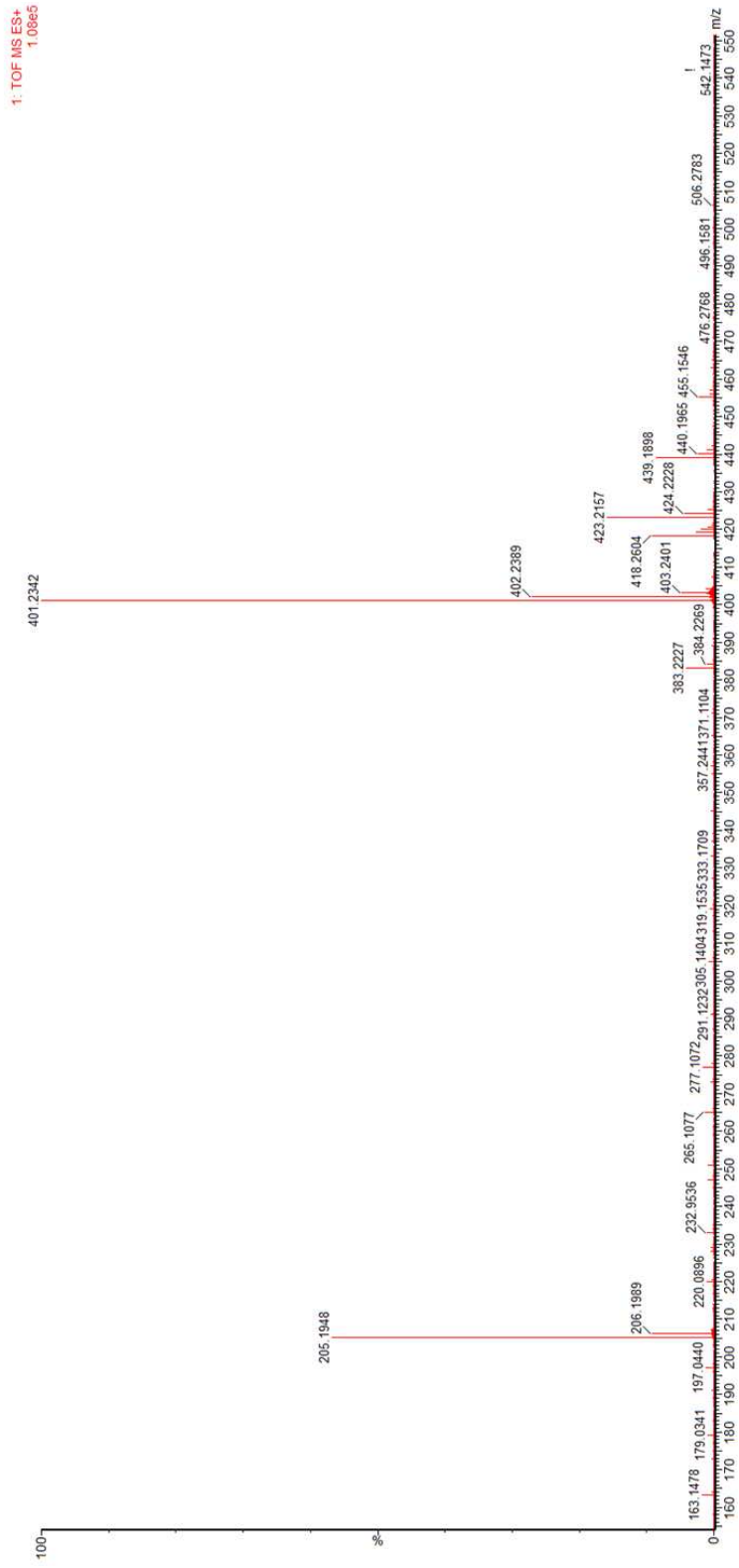


Slika 70. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 7

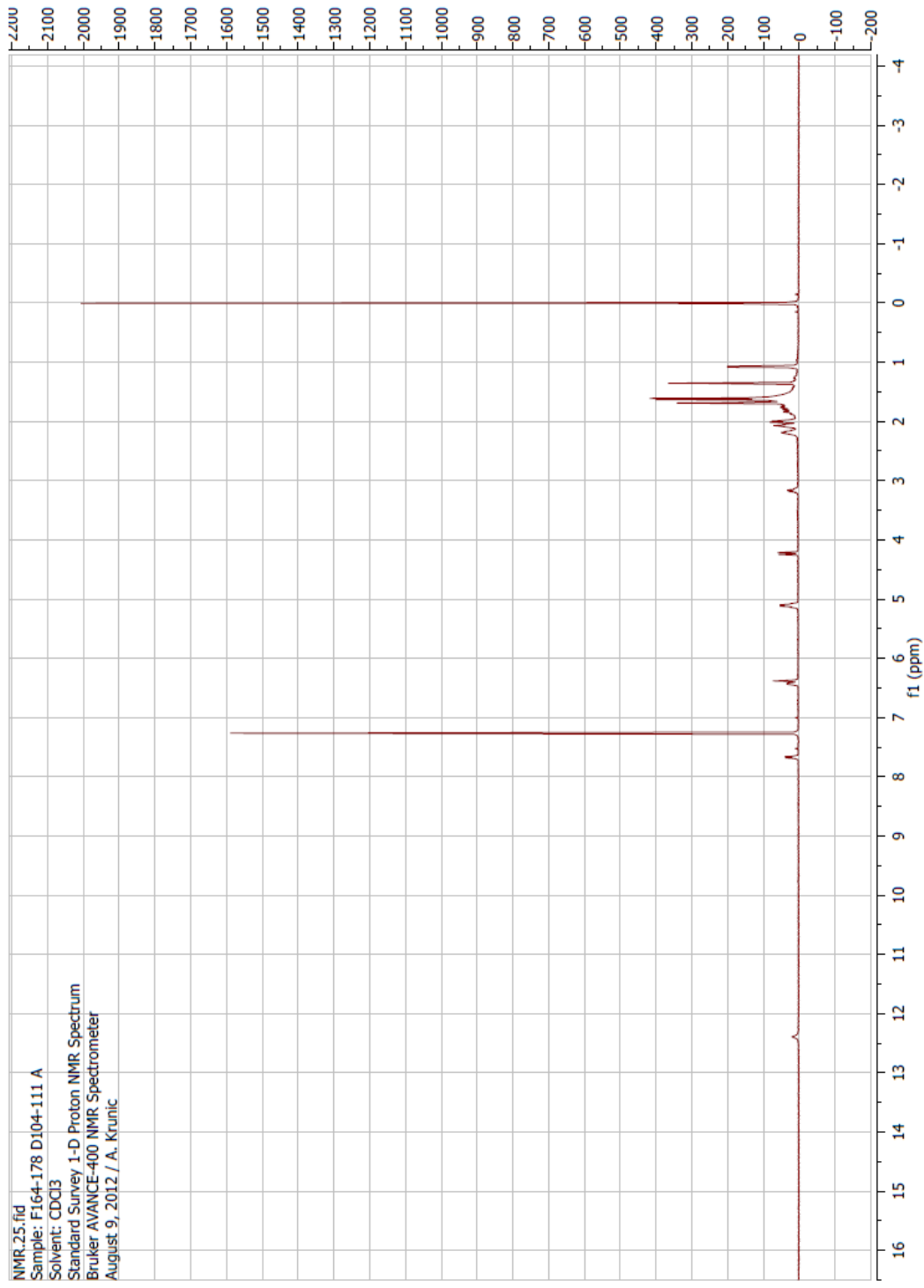


**Slika 71.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja 7

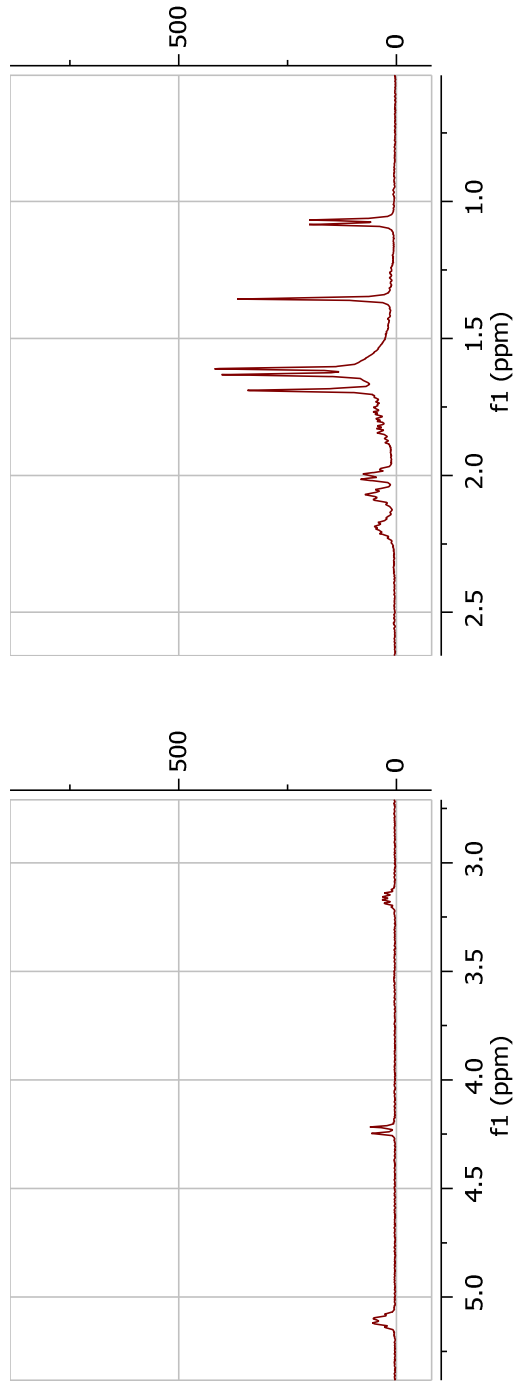
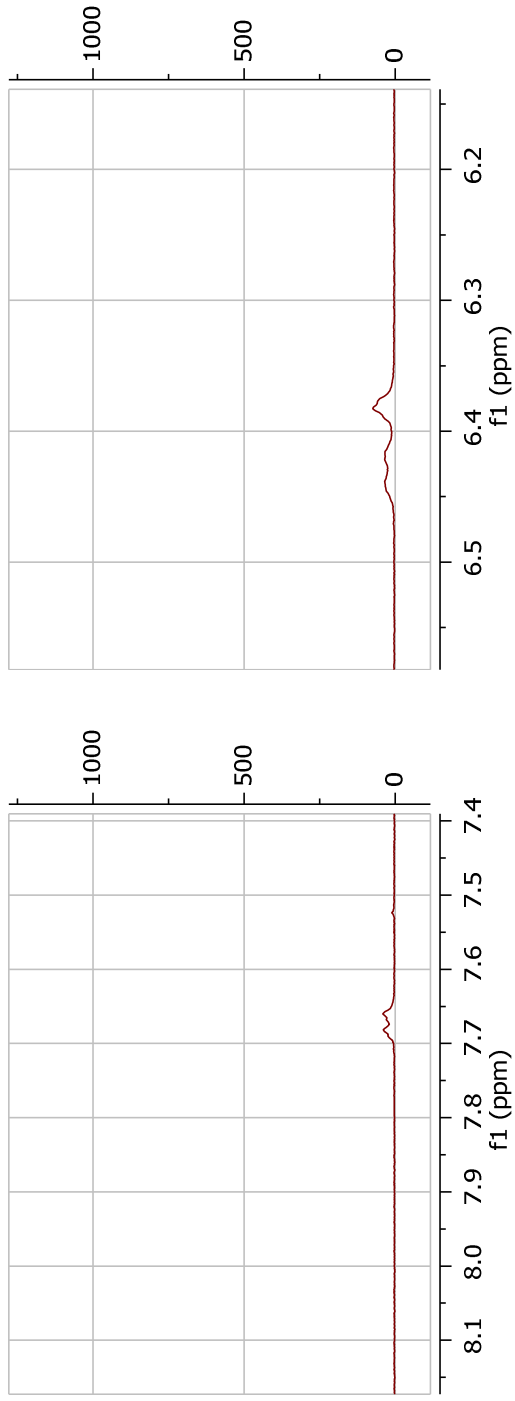




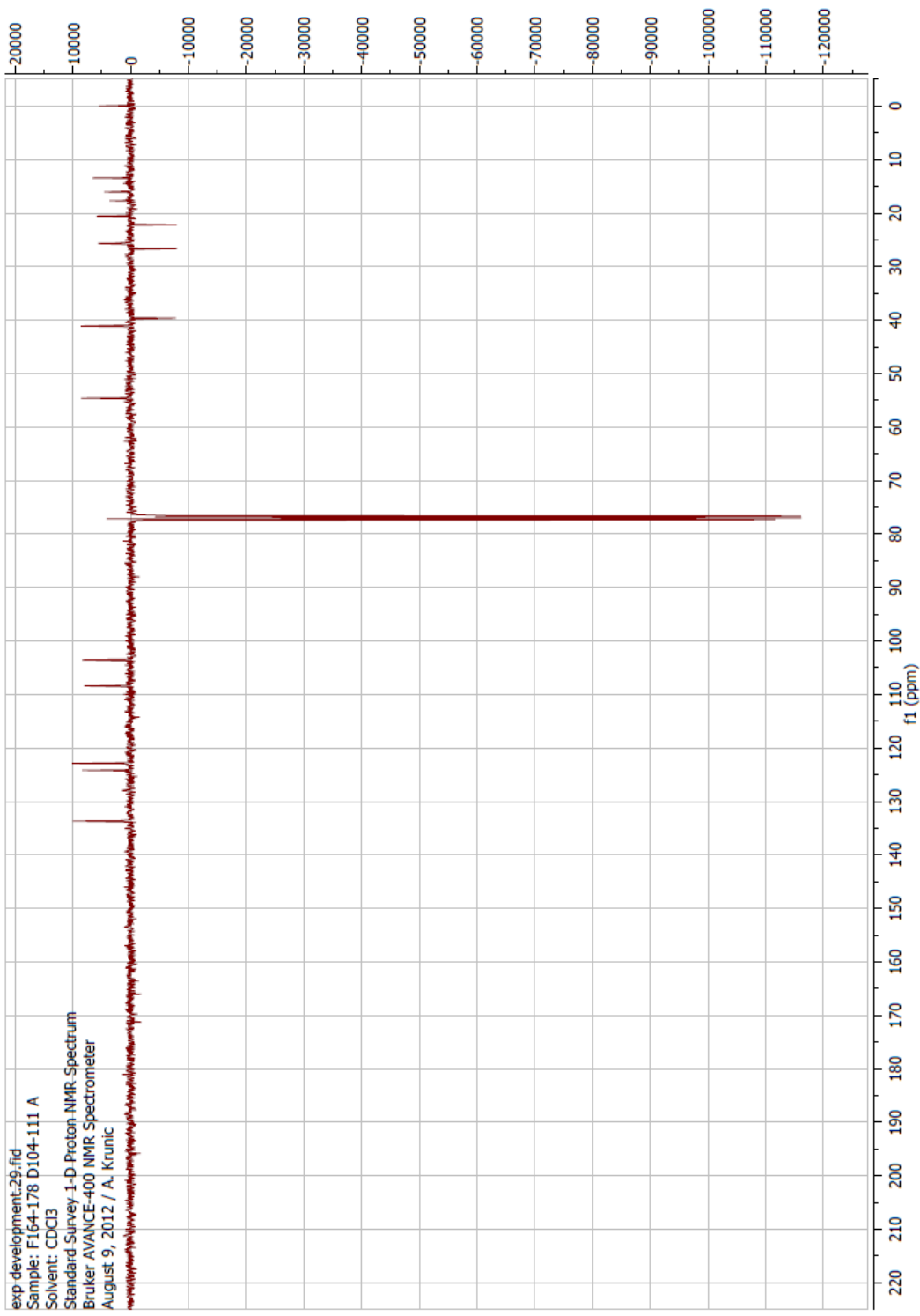
Slika 72. HR-MS spektar jedinjenja 8



Slika 73. <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja 8

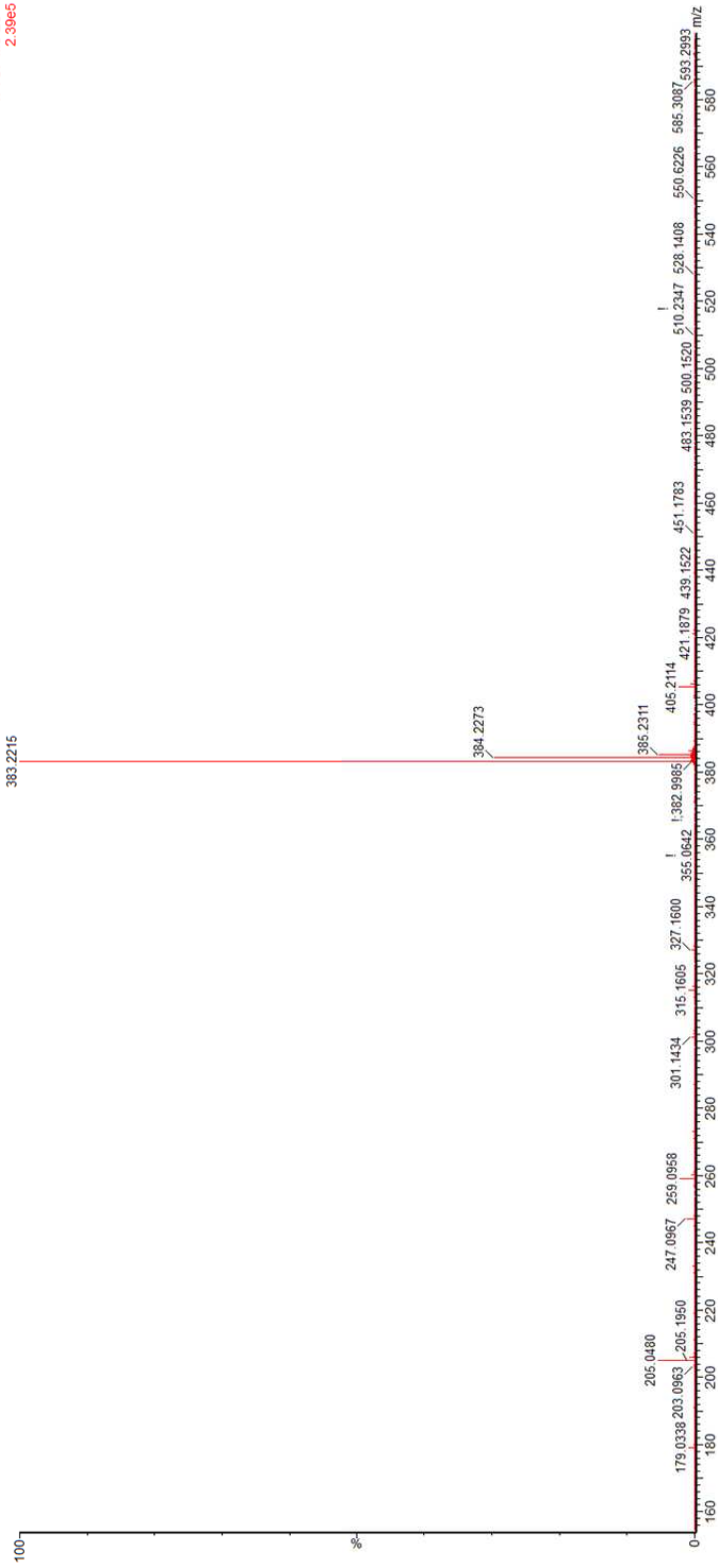


**Slika 74.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **8**

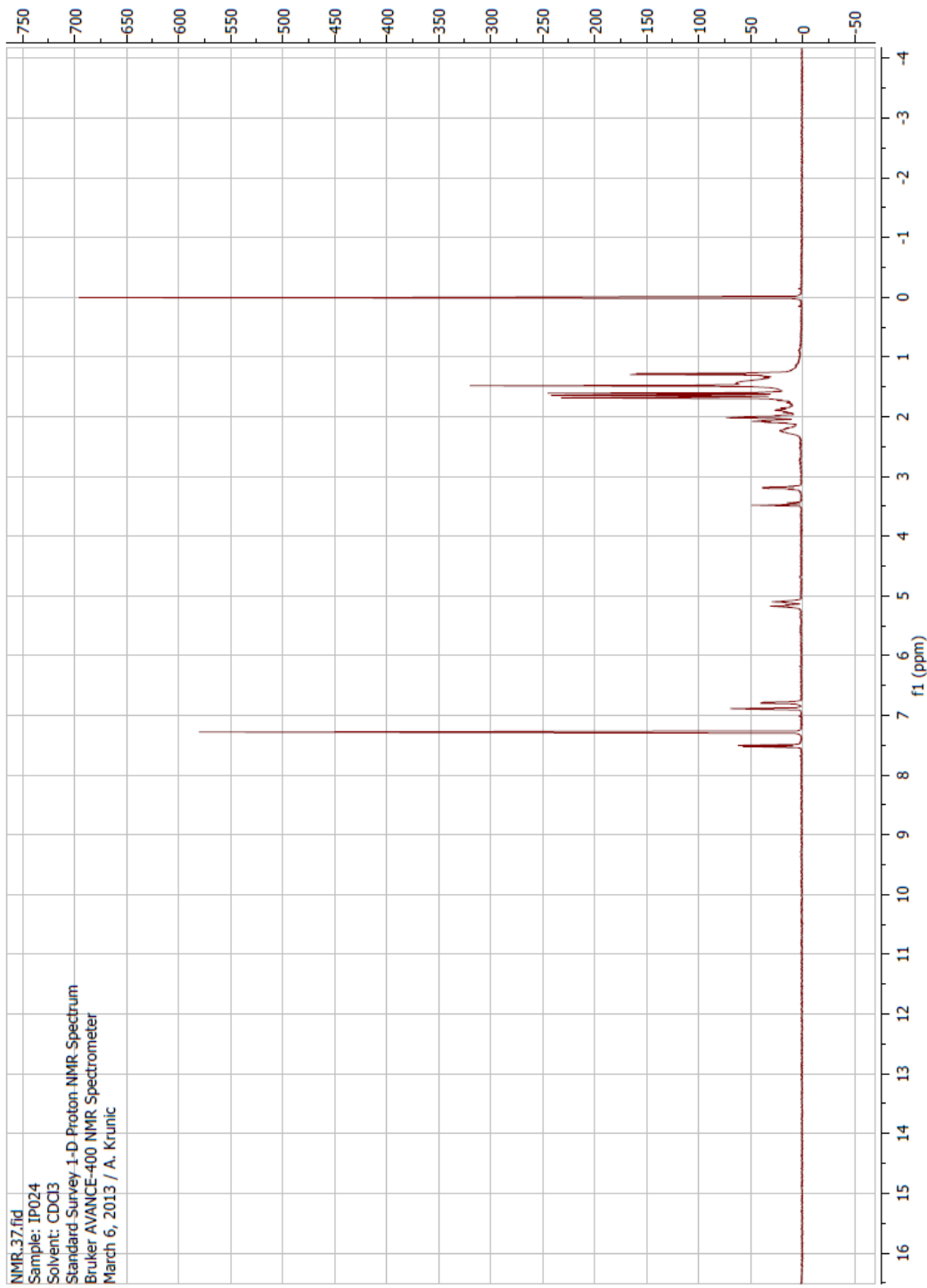


Slika 75. DEPT-Q spektar jedinjenja 8

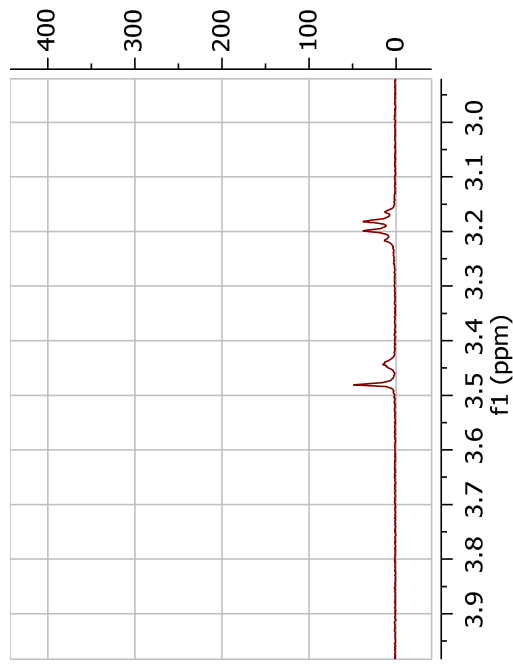
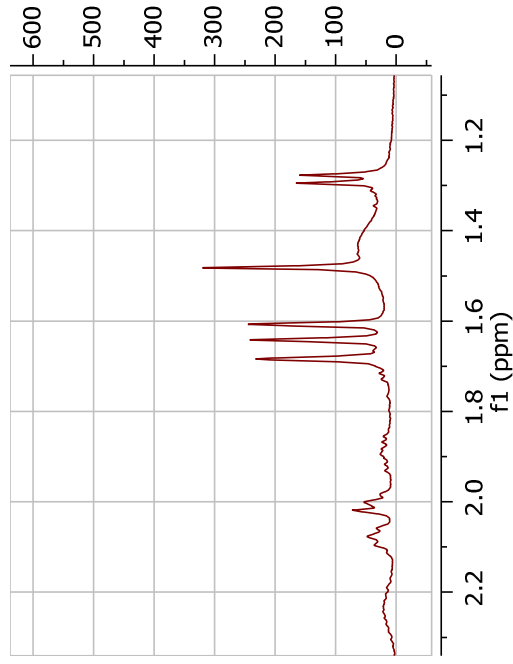
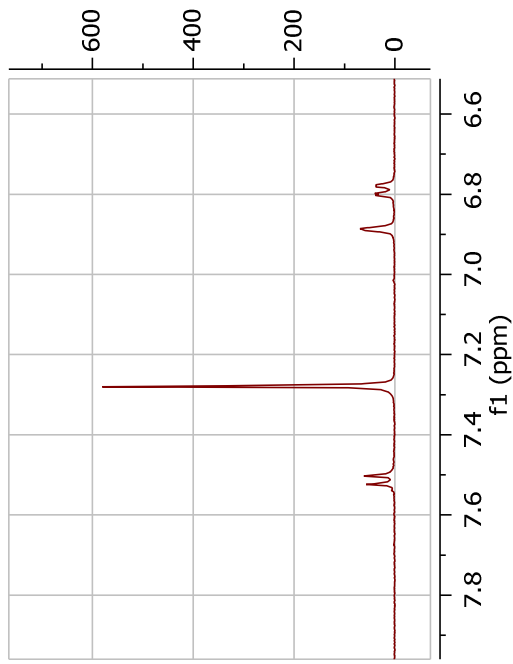
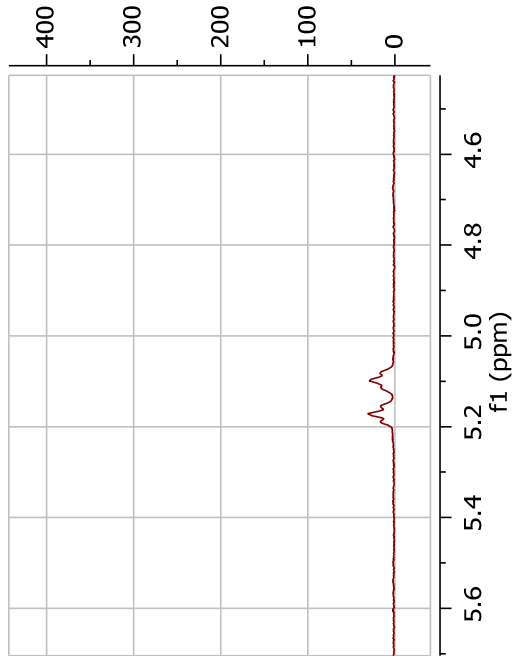
1: TOF MS ES+  
2.39e5



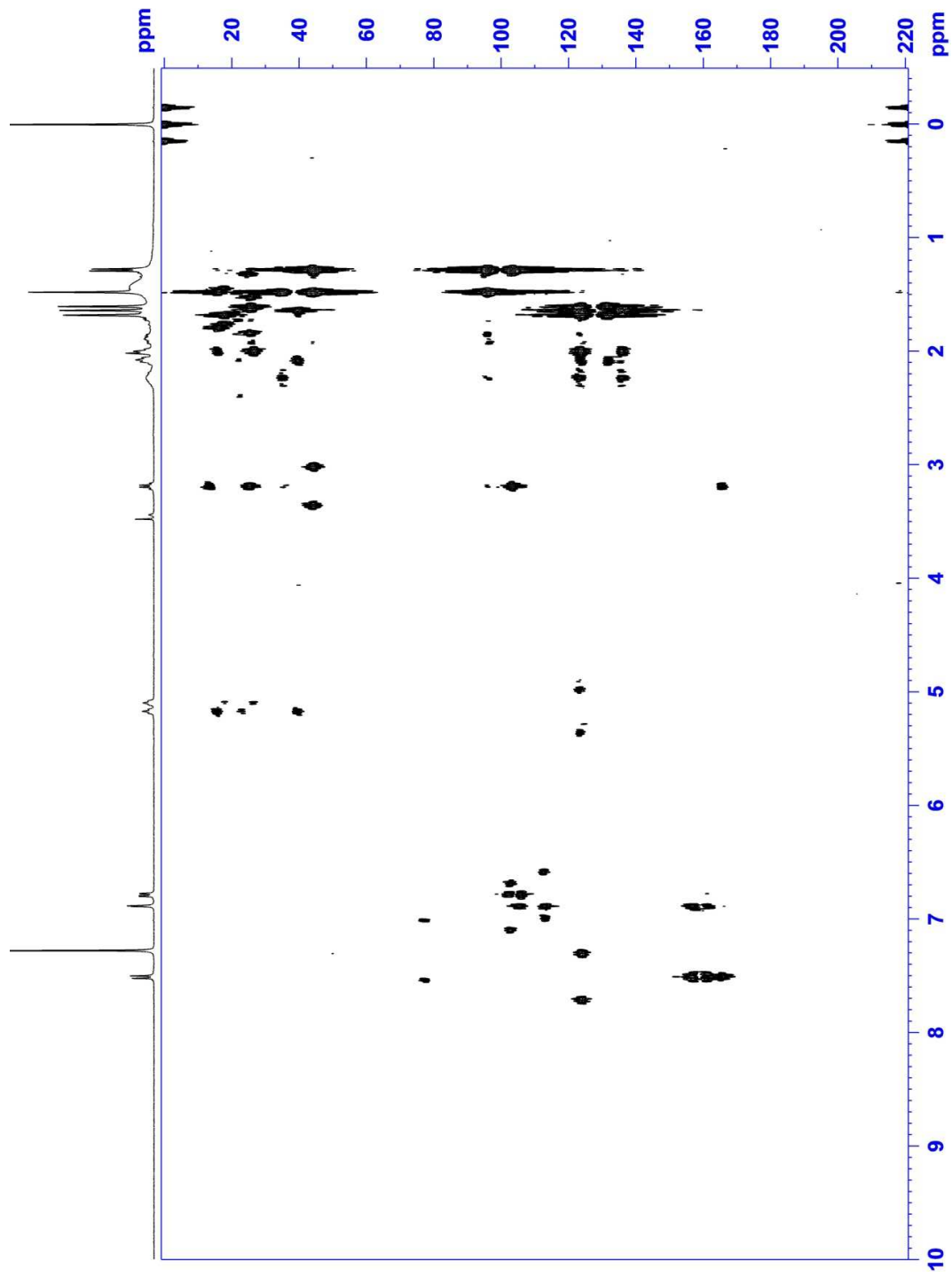
Slika 76. HR-MS spektar jedinjenja 9



Slika 77.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja **9**



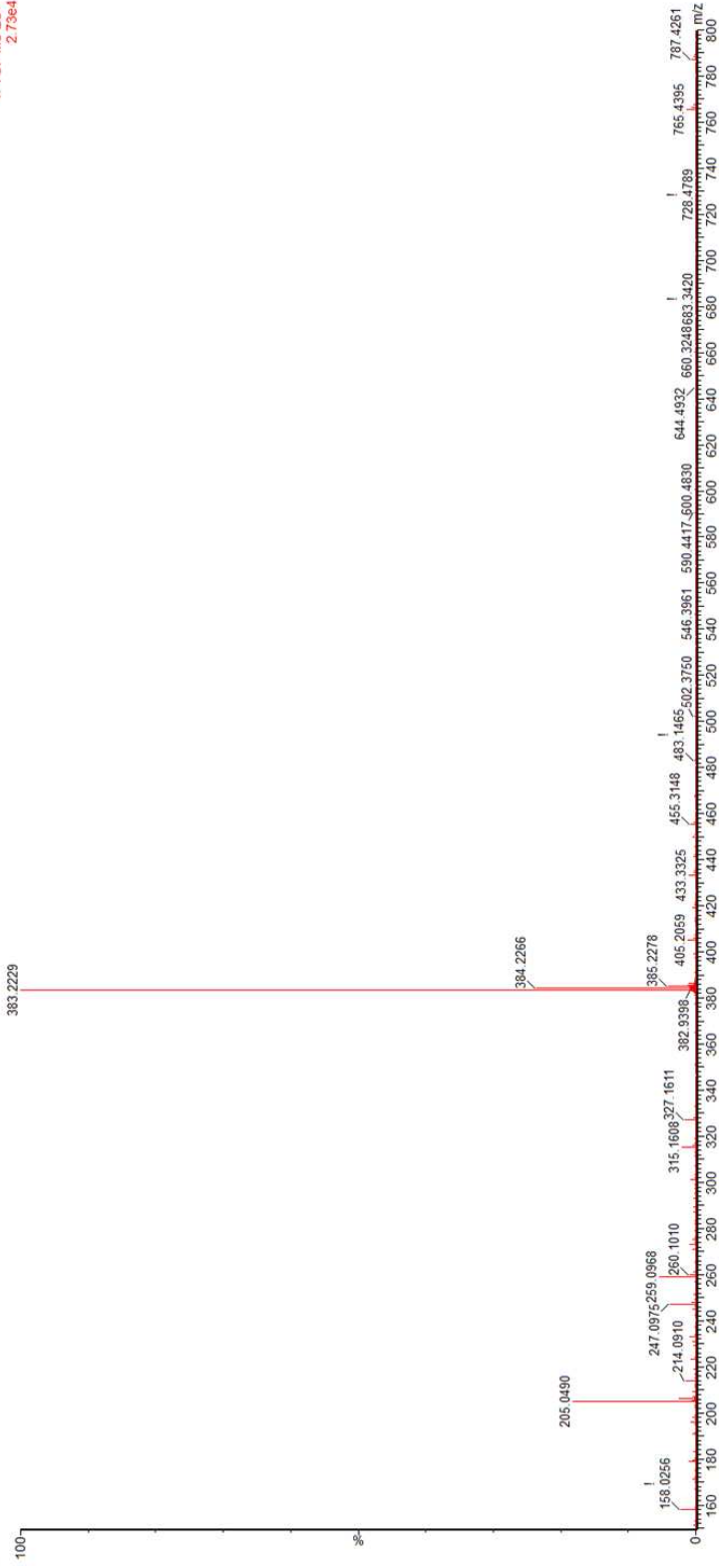
**Slika 78.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **9**



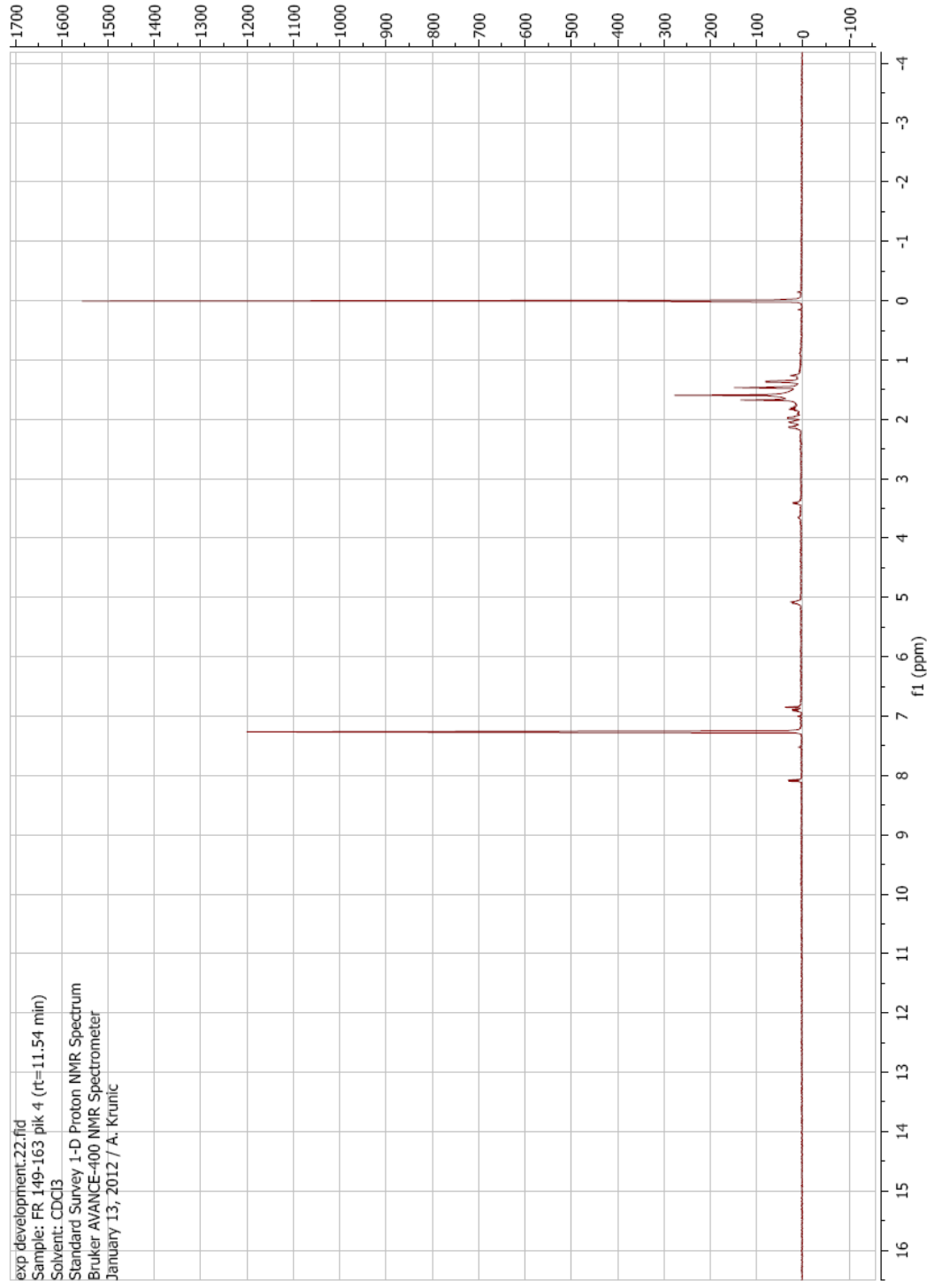
Slika 79. HMBC spektar jedinjenja 9



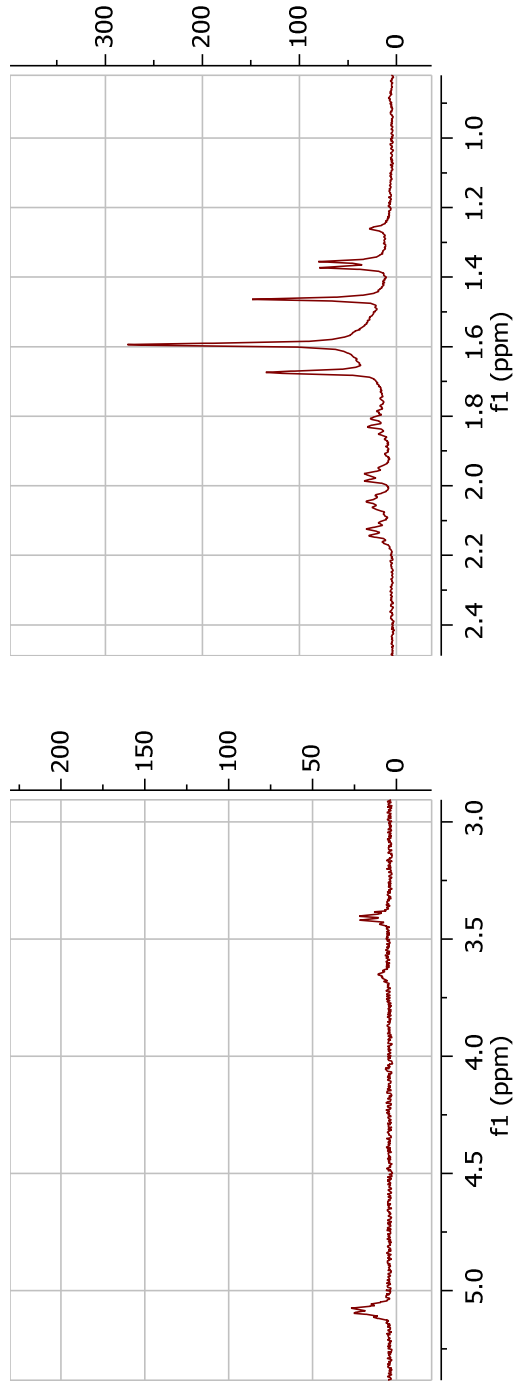
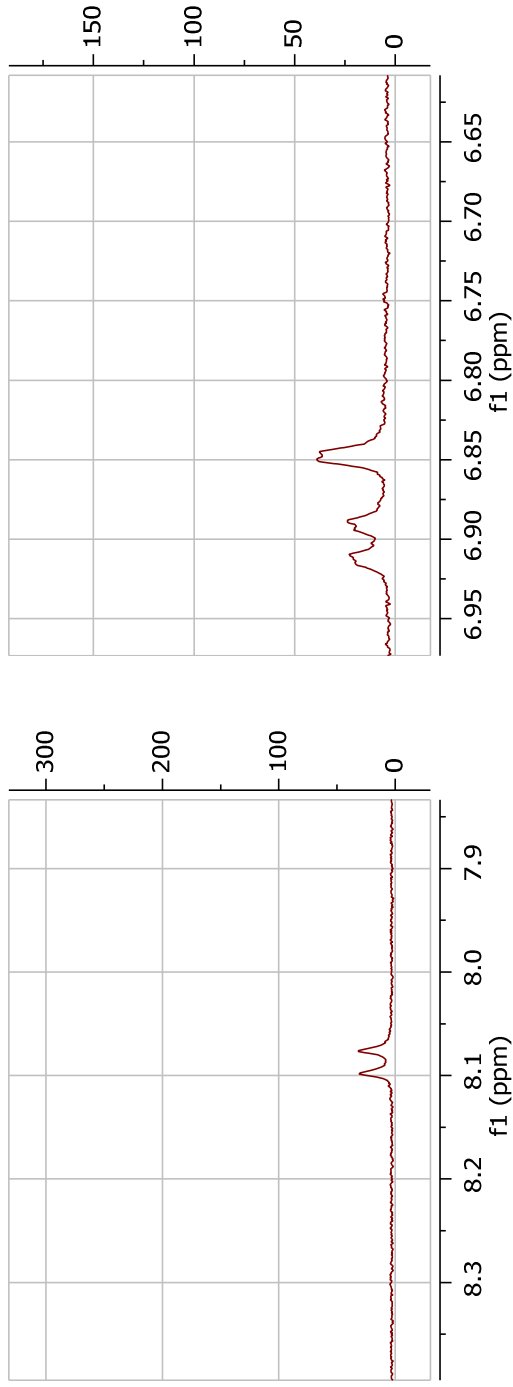
1: TOF MS ES+  
2.73e4



Slika 80. HR-MS jedinjenja 10



**Slika 81.** <sup>1</sup>H NMR spektar jedinjenja **10**



**Slika 82.** Prošireni detalji  $^1\text{H}$  NMR spektra jedinjenja **10**

# **DODATAK**

## OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

### Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

**1. Pavlović, I.,** Petrović, S., Radenković, M., Milenković, M., Couladis, M., Branković, S., Pavlović-Drobac, M., Niketić, M. (2012). Composition, antimicrobial, antiradical and spasmolytic activity of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae) essential oil. *Food Chemistry*, 130(2), 310-315. IF 2012 3,334; IF 2013 3,259 (9/71) **M21**

**2. Pavlović, I.,** Krunić, A., Nikolić, D., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M., Petrović, S. (2014). Chloroform extract of underground parts of *Ferula heuffelii*: secondary metabolites and spasmolytic activity. *Chemistry and Biodiversity*, 11(9), 1417-1427. IF 2013 1,795 (63/148) **M22**

**3. Pavlović, I.,** Petrović, S., Milenković, M., Stanojković T., Nikolić, D., Krunić, A., Niketić, M. Antimicrobial and cytotoxic activity of extracts of *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel and its metabolites. *Chemistry and Biodiversity* doi:10.1002/cbdv.201400400. IF 2013 1,795 (63/148) **M22**

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

**1. Pavlović, I.,** Petrović, S., Milenković, M., Nikolić, D., Niketić, D. Antimicrobial, anti-inflammatory and anti-ulcer activities of *Ferula heuffelii* root extracts. 57<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. Geneva, Switzerland, August 16-20, 2009. *Planta Medica* 75 (p. 1039).

**2. Pavlović, I.,** Petrović, S., Krunić, A., Nikolić, D., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M. Chemical composition and relaxant effect of chloroform extract of the underground parts of *Ferula heuffelii*. FIP Centennial Congress of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. Amsterdam, Netherlands, October 3-8, 2012.

**3. Pavlović, I.,** Petrović, S., Radenković, M., Branković, S., Niketić, M. Spasmolytic activity of methanol extract of underground parts of *Ferula heuffelii* (Apiaceae). International Conference on Natural Products Utilisation. Bansko, Bulgaria, November 3-6, 2013. Book of Abstracts, PP104.

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

**1. Pavlović, I.,** Petrović, S., Juranić, Z., Stanojković, T., Kukić-Marković, J., Niketić, M. Ispitivanje citotoksične i antioksidantne aktivnosti ekstrakata *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija. 13-17.10.2010. *Arhiv za farmaciju* 60(5), 1014-1015.

**2. Pavlović, I.,** Petrović, S., Milenković, M., Radenković, M., Branković, S., Couladis, M., Pavlović-Drobac, M. Hemijski sastav, antimikrobna, antiradikalska i spazmolitička aktivnost etarskih ulja *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). V Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, Srbija. 13-17.10.2010. *Arhiv za farmaciju*, 60(5), 995-998.

## Biografski podaci o kandidatu

Ivan N. Pavlović rođen je u Nišu 18. aprila 1980. god. Gimnaziju „Bora Stanković“ u Nišu završio je sa prosečnom ocenom 5,00 kao nosilac Vukove diplome. Srednju muzičku školu „Dr Vojislav Vučković“ u Nišu završio je sa odličnim uspehom. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1999/2000. god. 2004. god., kao jedan od 500 najboljih studenata u Srbiji, dobio je stipendiju Vlade Kraljevine Norveške. Diplomirao je 6. aprila 2006. god. sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,45. Diplomski rad pod nazivom: „Morfoanatomske karakteristike i osnovna hemijska ispitivanja dve podvrste *Athamanta turbith* (L.) Brot. (Apiaceae)“, čiji je mentor bila prof. dr Silvana Petrović, odbranio je na Katedri za farmakognoziju. Tokom studiranja bio je član Sportskog društva Farmaceutskog fakulteta i učestvovao je u IPSF programu studentske razmene.

Doktorske akademske studije iz Farmakognozije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu upisao je oktobra 2006. god. Tokom doktorskih studija dva puta je boravio na Institutu za farmaceutsku biologiju Univerziteta u Frajburgu, Nemačka, kao istraživač saradnik: 2006. god. (mesec dana) na projektu izolovanja prirodnih proizvoda iz vrste *Siparuna thecaphora* (Poepp. et Endl.) A. DC. i ispitivanju njihovog citotoksičnog potencijala i 2008. god. (5 meseci) na projektu pretkliničkog ispitivanja triterpena izolovanih iz kore breze. Odslužio je vojni rok u Vojski Republike Srbije 2007/08. god.

Od januara 2009. god. zaposlen je kao istraživač-pripravnik na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, najpre na Projektu br. 143012: „Ispitivanje lekovitog potencijala biljaka: morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija“, a od januara 2011. god. na Projektu br. 173021: „Ispitivanje lekovitog potencijala biljaka: morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija“. Januara 2014. god. izabran je u zvanje istraživač-saradnik.

Član je Međunarodnog društva za proučavanje lekovitih biljaka – Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung (GA). Govori engleski i nemački jezik.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Иван Н. Павловић

број уписа 23/06

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Фармакогнозијско испитивање подземних органа српске велестике,**  
***Ferula heuffelii* Griseb. ex Neuffel (Apiaceae)**

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

Потпис докторанда

У Београду, 23.01.2015. год.





## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Иван Н. Павловић

Број уписа 23/06

Студијски програм Фармација – Фармакогнозија

Фармакогнозијско испитивање подземних органа српске велестике,  
Наслов рада *Ferula heuffelii* Griseb. ex Neuffel (Apiaceae)

Ментор Проф. др Силвана Петровић

Потписани Иван Н. Павловић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 23.01.2015. год.



## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Фармакогнозијско испитивање подземних органа српске велестике,  
*Ferula heuffelii* Griseb. ex Neuffel (Apiaceae)

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 23.01.2015. год.

