

# НАСТАВНО - НАУЧНОМ ВЕЋУ УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ - ФАРМАЦЕУТСКОГ ФАКУЛТЕТА

## КОМИСИЈИ ЗА ПОСЛЕДИПЛОМСКУ НАСТАВУ – ДОКТОРСКЕ СТУДИЈЕ

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета бр. 1635/2, донетој на седници Већа одржаној 22.06.2023. год. именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације кандидата магистра фармације Милана Д. Илића, под насловом:

**„Упоредна анализа хемијског састава, антимикуробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium L.* из југоисточне Србије”**

Ментор:

Др сц. Милица Дробац, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

**Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације у саставу:**

1. Др сц. Нада Ковачевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет, председник Комисије
2. Др сц. Марина Миленковић, редовни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
3. Др сц. Мирјана Марчетић, ванредни професор, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет
4. Др сц. Бојан Златковић, редовни професор, Универзитет у Нишу - Природно математички факултет
5. Др сц. Стеван Самарцић, научни сарадник, Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет

прегледала је приложену дисертацију и подноси Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Фармацеутског факултета следећи:

## ИЗВЕШТАЈ

### 1. ПРИКАЗ САДРЖАЈА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Докторска дисертација маг. фарм. Милана Д. Илића под називом „Упоредна анализа хемијског састава, антимикуробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium L.* из југоисточне Србије”, састоји се из 6 поглавља: Увод, Циљ, Материјал и методе, Резултати и дискусија, Закључци и Литература. На почетку дисертације приложен је сажетак на српском и енглеском језику, а на крају кратка биографија кандидата и потписане изјаве кандидата о ауторству, истоветности штампане и електронске верзије и коришћењу докторске дисертације.

Докторска дисертација је написана на 115 страна са једноструким проредом: Увод (31 страна), Циљ (1 страна), Материјал и методе (17 страна), Резултати и дискусија (48 страна), Закључци (5 страна) и Литература (13 страна). Дисертација садржи 37 слика (18 у Уводу, 4 у Материјалу и методама и 15 у Резултатима и дискусији), 23 табеле (2 у Уводу, 12 у Материјалу и методама и 9 у Резултатима и дискусији) и 234 литературна навода.

У **Уводу** је најпре дат кратак осврт на потенцијал биљака као извора лековитих сировина, а затим су описане опште ботаничке карактеристике и распрострањење биљака фамилије Geraniaceae и рода *Geranium*, као и осам испитиваних врста: *Geranium macrorrhizum* L., *G. robertianum* L., *G. phaeum* L., *G. palustre* Torn., *G. sanguineum* L., *G. pyrenaicum* Burm., *G. columbinum* L. и *G. lucidum* L. У наставку је приказан преглед најзначајнијих секундарних метаболита полифенолне природе који се налазе у биљним врстама рода *Geranium*: танина, пре свега елагних, фенолкарбоксилних киселина и флавоноида. Такође, представљен је литературни преглед састава етарских уља. Описани су основни биосинтетски путеви којима у биљкама настају најважније групе секундарних метаболита. Приказани су подаци о, до сада, идентификованим фенолним једињењима у биљним врстама рода које су биле предмет испитивања у оквиру ове дисертације. У наредном поглављу Увод, дат је преглед етномедицинске примене испитиваних врста на Балканском полуострву. На крају увода описани су до сада утврђени фармаколошки ефекти различитих екстраката биљака овог рода.

**Циљеви истраживања** су јасно дефинисани и обухватају испитивање подземних и надземних делова осам самониклих врста рода *Geranium*, сакупљених на Власинској висоравни и околним регионима југоисточне Србије. Први циљ је испитивање њиховог хемијског састава и то квалитативног и квантитативног састава испарљивих фракција и метанолних екстраката, као и изоловање и одређивање структуре одређених секундарних метаболита. Други део истраживања за циљ је имао утврђивање фармаколошког потенцијала испитиваних врста кроз испитивање антиоксидантног потенцијала, антимикуробне и цитотоксичне активности екстраката.

Поглавље **Материјал и методе** обухвата детаљан опис коришћене методологије и подељено је у девет потпоглавља: 1) Биљни материјал; 2) Изоловање и анализа хемијског састава испарљивих фракција; 3) Припрема метанолних екстраката; 4) Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних полифенола и танина у метанолним екстрактима; 5) Изоловање и утврђивање структуре секундарних метаболита из метанолног екстракта надземног дела *G. palustre*; 6) Анализа хемијског састава метанолних екстраката; 7) Испитивање антиоксидантне активности метанолних екстраката; 8) Испитивање антимикуробне активности метанолних екстраката и 9) Испитивање цитотоксичне активности метанолних екстраката.

Биљни материјал, подземни и надземни органи (херба) осам врста рода *Geranium*, сакупљени су у периоду цветања на природним стаништима на Власинској висоравни и околини (југоисточна Србија), на локалитетима који су детаљно описани.

Затим је приказан поступак изоловања испарљивих фракција дестилацијом воденом паром, и дати су експериментални услови њихове анализе гасном хроматографијом са пламено-јонизационим и масеним детектором (*GC-FID/MS*).

Хемијска анализа метанолних екстраката подземних и надземних делова, припремљених поступком мацерације, обухватила је спектрофотометријско одређивање

садржаја укупних полифенола и танина, као и испитивање њиховог састава применом течне хроматографије са масеном спектрометријом (*LC-MS*), за које су детаљно описани услови извођења. У поступку квантитативне *LC-MS* анализе дате су једначине калибрационих крива, коефицијенти корелације, лимити детекције и квантификације за девет поредбених супстанци преко којих је изражен садржај једињења у метанолним екстрактима.

Детаљно је описан поступак изоловања секундарних метаболита из метанолног екстракта надземног дела *G. palustre*, применом хроматографије у колони са различитим адсорбенсима, као и поступак утврђивања структуре изолованих једињења на основу *UV-Vis*, *ESI-MS* и *NMR* спектра. Описана је и мултиваријантна статистичка кластер *UPGMA* метода којом су анализирани резултати добијени анализом испарљивих фракција, као и *LC-MS* анализом метанолних екстраката.

Испитивање антиоксидантног потенцијала екстраката детаљно је представљено кроз опис примењених *in vitro* метода: *FRAP* теста, теста неутрализације *DPPH* радикала, као и поступака којима су одређивани параметри оксидативног стреса у хуманом серуму и то: тоталног антиоксидантног капацитета (ТАК), тоталног оксидатног потенцијала (ТОП), прооксидантно-антиоксидантног баланса (ПАБ) и укупних сулфхидрилних група (СХГ), а након индуковања оксидативног стреса терц-бутилхидропероксидом.

У оквиру методологије за испитивања антимикробне активности екстраката наведени су тестирани микроорганизми (седам стандардних сојева Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија, десет клиничких изолата *Escherichia coli*, седам клиничких изолата *Klebsiella pneumoniae*, и стандардни сој гљивице *Candida albicans*) и описан је поступак микродилуционе методе којом су одређене минималне инхибиторне концентрације (МИК). Добијени резултати упоређивани су са референтним антибиотицима, који су коришћени као позитивна контрола: ампицилин, амикацин и ванкомицин и антимикотик нистатин.

Цитотоксична активност метанолних екстраката, као и гераниина и елагне киселине тестирана је спектрофотометријски *MTT* тестом (енгл. *Microculture tetrazolium test*) на ћелијским линијама хуманог карцинома простате (*PC-3*), колоне (*HT-29*), грлића материце (*HeLa*) и меланома (*Hs 294T*). Селективност цитотоксичног деловања утврђена је испитивањем на здравим ћелијама – хуманим фибробластима плућа (*MRC-5*). Добијени резултати поређени су са цитостатиком доксорубицином.

Поглавље **Резултати и дискусија** обухвата 48 страна текста докторске дисертације; садржи 33 графичка приказа и 25 табела. Резултати истраживања приказани су на јасан и прегледан начин, а у дискусији су добијени резултати анализирани, упоређени са релевантним литературним подацима, дата су одговарајућа објашњења и изнета запажања и тумачења кандидата.

У поглављу **Закључци** наведени су најзначајнији закључци који произилазе из добијених резултата истраживања, као и њихове анализе и међусобног поређења, а који су у складу са постављеним циљевима дисертације.

У поглављу **Литература** дате су 234 референце које су коришћене у докторској дисертацији.

## 2. ОПИС ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА

У оквиру ове докторске дисертације испитивано је осам врста рода *Geranium*: *G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum*, *G. columbinum* и *G. lucidum*, сакупљених у периоду цветања на природним стаништима на Власинској висоравни (југоисточна Србија). Испитивање је обухватило хемијску анализу испарљивих фракција и метанолних екстраката подземних и надземних органа, као и фармаколошку карактеризацију екстраката у погледу антиоксидантне, антимикробне и цитотоксичне активности.

Испарљиве фракције надземних и подземних делова изоловане су дестилацијом воденом паром и анализирани гасном хроматографијом са пламено-јонизационим и масеним детектором (*GC-FID/MS*). Сесквитерпени су били доминантна група једињења (29,0-94,6%) у испарљивим фракцијама подземног дела *G. macrorrhizum* и надземних делова свих испитиваних врста, осим *G. phaeum* и *G. columbinum*, где су најзаступљенији били дитерпени (41,1-43,0%). Највећи део испарљивих фракција подземних делова осталих врста чиниле су масне киселине и њихови деривати (70,3-95,7%). Главни састојак испарљиве фракције надземног дела *G. macrorrhizum* био је гермакрон (73,3%), док је  $\delta$ -гвајен преовладао у испарљивој фракцији подземног дела ове врсте (76,8%). Хексадеканска киселина (6,6-21,1%) и фитол (9,9-41,5%) били су доминантна или међу најзаступљенијим једињењима у испарљивим фракцијама надземних делова свих врста, осим *G. macrorrhizum*. Присуство  $\beta$ -селинена (18,6%) као доминантног састојка у испарљивој фракцији надземног дела разликује *G. palustre* од осталих врста. У испарљивим фракцијама подземних органа свих врста, осим *G. macrorrhizum*, главно једињење била је хексадеканска киселина (35,1-79,2%).

Мултиваријантна статистичка кластер анализа (*UPGMA*) састава испарљивих фракција показала је одвајање *G. macrorrhizum* од осталих врста. У оквиру осталих врста, посебно су се одвојиле испарљиве фракције подземних од фракција надземних делова. Уочена сличност између фракција подземних делова потиче пре свега од присуства хексадеканске киселине као доминантног једињења. Разлике између врста последица су пре свега разлика у саставу испарљивих фракција надземних делова.

Хемијска карактеризација метанолних екстраката извршена је применом спектрофотометријских и хроматографских метода. Спектрофотометријска анализа је показала да су испитивани екстракти богати полифенолним једињењима (170,64 до 636,321 mg *GAE/g* сувог екстракта), као и да су танини доминантни полифеноли (161,14-414,02 mg *GAE/g*) у свим екстрактима, изузев у екстракту надземног дела *G. phaeum*.

Применом хроматографије у колони, из метанолног екстракта надземног дела *G. palustre* изолована су два једињења чија је структура утврђена интерпретацијом њихових *UV-Vis*, *ESI-MS* и *NMR* спектра, као и поређењем са литературним подацима. Изолован је један елагни танин, идентификован као корилагин и један галоиловани флавонолни хетерозид идентификован као астрагалин-2''-О-галат.

Квалитативна и квантитативна анализа хемијског састава метанолних екстраката извршена је применом течне хроматографије са масеном спектрометријом (*LC-MS*). У екстрактима је идентификовано и одређен је садржај укупно седам фенолкарбоксилних киселина (елагне, галне, галоилхина, галоилшикиминске, протокатехинске,

хлорогенске и бревифолин карбоксилне киселине), 12 флавоноидних једињења (кверцетина, кверцетин-галоил-хексозида, два пентозида кверцетина, кверцетин-деоксихексозида, хиперозида, изокверцитрина, кемферола, астрагалина, астрагалин-2''-О-галата, кемферол-метилетра и кемферол-диметилетра) и 14 једињења танинске структуре (гераниина и његовог изомера, корилагина, два аномера телимаграндина I и три једињења изомерне структуре, телимаграндина II, хебулагинске киселине, галоилглукозе, дигалоилглукозе, тригалоилглукозе и пентагалоилглукозе).

Екстракти надземних органа били су богатији фенолкарбоксилним киселинама у односу на екстракте подземних органа, а највећи укупан садржај одређен је у екстрактима надземних делова *G. palustre* и *G. macrorrhizum* (35,24 mg/g и 35,01 mg/g, редом). Елагна, гална, и галоилхина киселина биле су присутне у највећем броју екстраката, при чему је најзаступљенија углавном била елагна киселина (3,91-21,25 mg/g). У екстрактима надземних делова *G. palustre* и *G. macrorrhizum* била је доминантна хлорогенска киселина (22,14 mg/g и 16,27 mg/g, редом).

У екстрактима надземних делова свих врста, осим *G. phaeum*, утврђено је присуство и одређен садржај флавоноидних једињења, док у екстрактима подземних органа нису били присутни флавоноиди. Генерално, садржај појединачних флавоноидних једињења (<LOQ-8,71 mg/g) био је нижи у односу на садржај танинских једињења и фенолкарбоксилних киселина. Изузетак је био екстракт *G. palustre* са значајном количином астрагалин-2''-О-галата (28,75 mg/g). У надземном делу *G. macrorrhizum* утврђено је присуство највећег броја различитих флавоноидних једињења, док су се по највишем садржају флавоноида издвојили надземни делови *G. macrorrhizum*, *G. palustre* и *G. pyrenaicum*.

Хидролизујући танини били су доминанта група полифенолних једињења у већини анализираних екстраката, а међу њима најзаступљенији елагни танини. У већини екстраката доминантно једињење био је гераниин (20,16-160,84 mg/g), а поред њега у надземним деловима свих испитиваних врста, осим *G. phaeum*, у значајној количини налазио се и корилагин (17,20-76,76 mg/g). Екстракт надземног дела *G. palustre* разликовао се по присуству и високом садржају изомера гераниина (175,81 mg/g).

У свим екстрактима били су присутни и различити гални танини у концентрацијама знатно нижим (<LOQ-9,63 mg/g) у односу на елагне танине. Мултиваријантна статистичка кластер анализа (UPGMA) полифенолних састојака екстраката указала је на извесну међусобну хемијску сличност екстраката надземних делова *G. robertianum*, *G. sanguineum* и *G. columbinum*, као и екстраката подземних органа *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* и надземног дела *G. lucidum*, док се екстракт подземног дела *G. lucidum* одвојио од свих осталих испитиваних узорака.

Антиоксидантна активност екстраката утврђена је *in vitro*, испитивањем редукционе и антирадикалске способности, као и испитивањем утицаја на параметре оксидативног стреса у хуманом серуму.

У погледу укупне антиоксидантне, односно редукционе способности екстраката одређене у FRAP тесту, није уочена статистички значајна разлика између испитиваних екстраката и L-аскорбинске киселине, као познатог антиоксиданса, што указује на изражен антиоксидантни потенцијал екстраката. Екстракти подземних делова *G. palustre* и *G. phaeum* који су били најбогатији полифенолним једињењима, показали

су најјачу редукциону способност са *FRAP* вредностима (8,80 и 7,02 mmol Fe<sup>2+</sup>/g сувог екстракта) већим од оне за L-аскорбинску киселину (6,55 mmol Fe<sup>2+</sup>/g). Изражена редукциона способност утврђена је и за екстракте надземних делова *G. palustre* (6,64 mmol Fe<sup>2+</sup>/g) и *G. sanguineum* (6,32 mmol Fe<sup>2+</sup>/g), као и екстракт подземног дела *G. macrorrhizum* (6,33 mmol Fe<sup>2+</sup>/g).

Најјачу способност неутрализације *DPPH* радикала показали су екстракти подземних и надземних делова *G. palustre* ( $IC_{50}=4,24 \mu\text{g/mL}$  и  $IC_{50}=4,34 \mu\text{g/mL}$ , редом) и *G. macrorrhizum* ( $IC_{50}=5,34 \mu\text{g/mL}$  и  $IC_{50}=4,92 \mu\text{g/mL}$ , редом), екстракт подземног дела *G. phaeum* ( $IC_{50}=5,18 \mu\text{g/mL}$ ) и екстракт надземног дела *G. sanguineum* ( $IC_{50}=5,18 \mu\text{g/mL}$ ), што је у корелацији са садржајем укупних полифенола и резултатима *FRAP* теста.

Антиоксидантни потенцијал екстраката процењен је и испитивањем њиховог утицаја на параметре оксидативног стреса у серуму, индукованог терц-бутилхидропероксидом и то на: тотални антиоксидантни капацитет (ТАК), тотални оксидантни потенцијал (ТОП), прооксидантно-антиоксидантни баланс (ПАБ) и садржај сулфхидрилних група (СХГ). Екстракти подземних органа *G. macrorrhizum*, *G. phaeum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* и *G. lucidum* испољили су јачи антиоксидантни потенцијал у поређењу са познатим антиоксидансом Тролоксом.

На основу спроведених испитивања антиоксидантне активности издвојили су се екстракти подземних и надземних делова *G. palustre*, *G. macrorrhizum* и *G. sanguineum* и екстракт подземног дела *G. phaeum*, код којих је забележена најизраженија редукциона и антирадикалска активност, а екстракти подземних делова *G. macrorrhizum*, *G. phaeum*, *G. robertianum*, *G. pyrenaicum* и *G. lucidum* испољили су најјачи антиоксидантни потенцијал у хуманом серуму.

Антимикробна активност испитиваних екстраката тестирана је микродилуционом методом на седам стандардних сојева Грам позитивних и Грам негативних бактерија, стандардном соју гљивице *Candida albicans*, десет клиничких изолата *Escherichia coli* и седам клиничких изолата *Klebsiella pneumoniae*. Екстракти *G. phaeum* и *G. columbinum* нису до сада испитивани у погледу антимикробне активности.

Већина екстраката показала је ефекат према свим стандардним сојевима микроорганизама са МИК вредностима у опсегу 12,5-200  $\mu\text{g/mL}$ . Сви екстракти испољили су значајну антимикробну активност према стандардним сојевима Грам позитивне бактерије *Enterococcus faecalis* (МИК=12,5-50  $\mu\text{g/mL}$ ) и Грам негативних бактерија *E. coli* (МИК=25-100  $\mu\text{g/mL}$ ) и *Pseudomonas aeruginosa* (МИК=100  $\mu\text{g/mL}$ ). Најбољи ефекат (МИК=12,5  $\mu\text{g/mL}$ ) показали су екстракти *G. phaeum* и *G. columbinum* и екстракт подземног дела *G. pyrenaicum* према *E. faecalis*, док су према *E. coli* најактивнији (МИК=25  $\mu\text{g/mL}$ ) били екстракти надземног дела *G. robertianum* и подземног дела *G. palustre*.

За екстракте надземних делова *G. robertianum* и *G. columbinum* утврђена је значајна активност према свим клиничким изолатима *E. coli* (МИК=25-100  $\mu\text{g/mL}$ ). Са друге стране, активност екстраката према клиничким изолатима *K. pneumoniae* била је слабија или није утврђена (МИК $\geq$ 200  $\mu\text{g/mL}$ ).

Веома значајан резултат представља уочена антимикуробна активност екстраката према стандардном соју и клиничким изолатима Грам негативне бактерије *E. coli*, због њене изражене резистенције према антибиотицима.

Цитотоксична активност метанолних екстраката, као и гераниина и елагне киселина, испитана је *in vitro* MTT тестом на ћелијским линијама хуманог карцинома простате (PC-3), колона (HT-29), грлића материце (HeLa) и меланома (Hs 294T) уз употребу доксорубицина као позитивне контроле. Селективност теста утврђена је испитивањем на здравим ћелијама – хуманим фибробластима плућа (MRC-5).

По први пут је испитана цитотоксичност екстраката *G. phaeum*, *G. sanguineum*, *G. palustre*, *G. lucidum* и *G. columbinum*. Сви испитивани екстракти испољили су активност према ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), а најефикаснији су били екстракти подземних делова *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum* и *G. columbinum* ( $IC_{50}=2,52-28,98 \mu\text{g/mL}$ ). Са друге стране, највећи број испитиваних екстраката није испољио значајну цитотоксичност према ћелијама хуманог карцинома простате (PC-3), колона (HT-29) и меланома (Hs 294T) са изузетком екстракта надземног дела *G. lucidum* који је деловао на HT-29 ћелијску линију ( $IC_{50}=22,54 \mu\text{g/mL}$ ). Готово сви екстракти су у знатно мањој мери узроковали смрт здравих ћелија фибробласта плућа што указује на њихову селективност у деловању. Слабију селективност испољили су екстракти *G. lucidum* и екстракт надземног дела *G. palustre*.

Гераниин, елагни танин присутан у већини испитиваних екстраката, такође је испољио најбоље деловање према ћелијама карцинома грлића материце ( $IC_{50}=12,88 \mu\text{g/mL}$ ), уз одређену активност и према осталим ћелијским линијама ( $IC_{50}=44,41-80,94 \mu\text{g/mL}$ ) и веома изражену селективност ( $IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$ ). Слабија активност ( $IC_{50}=65,62-221,51 \mu\text{g/mL}$ ) и ниска селективност ( $IC_{50}=44,75 \mu\text{g/mL}$ ) утврђена је за елагну киселину.

### 3. УПОРЕДНА АНАЛИЗА ПОСТИГНУТИХ РЕЗУЛТАТА СА ПОДАЦИМА ИЗ ЛИТЕРАТУРЕ

Род *Geranium* L. обухвата преко 350 врста (*Aedo u Pando, 2017*) које насељавају умерену зону претежно северне хемисфере, од којих су у флори Србије заступљене 23 врсте (*Janković, 1973; Diklić, 1977*).

Биљке овог рода имају значајну примену и веома су цењене у традиционалној медицини. *Geranium macrorrhizum* и *G. robertianum* су врсте чија је примена највише документована (*Tucakov, 1997; Grača u cap., 2016a*).

За врсте рода *Geranium* карактеристично је присуство фенолних једињења: танина (пре свега елагних), флавоноида и фенолкарбоксилних киселина. Врсте овог рода садрже и мале количине етарског уља (*Harborne u Williams, 2002*).

Досадашња испитивања хемијског састава испарљивих фракција/етарских уља углавном су била усмерена на анализу надземних делова, док су испарљиви састојци подземних органа ређе били предмет проучавања. Хемијски састав испарљивих фракција *G. palustre* и испарљиве фракције подземног дела *G. pyrenaicum* испитан је по први пут у оквиру овог рада. Такође, за врсте *G. sanguineum* и *G. columbinum* не постоје подаци о хемијском саставу фракција добијених посебно из надземних и подземних делова.

Највећи део испарљиве фракције надземног дела *G. macrorrhizum* чинио је гермакрон (73,3%), што је у складу са претходним испитивањима испарљивих фракција ове врсте (*Chalchat u cap.*, 2002; *Radulović u cap.*, 2010). У испитивању *Radulović u cap.* (2012) у испарљивој фракцији целе биљке *G. sanguineum* као главно једињења наводи се хексадеканска киселина која је такође била главни састојак испарљивих фракција подземних и надземних делова *G. sanguineum* испитиваних у овом раду. Испарљива фракција надземног дела *G. robertianum* разликовала се пре свега у квантитативном саставу у поређењу са резултатима претходних испитивања (*Gębarowska u cap.*, 2017; *Pedro u cap.*, 1992; *Radulović u cap.*, 2012). У етарским уљима надземног дела ове биљке пореклом из Пољске и Холандије као доминантно једињење идентификован је линалол (13,4% и 22,9%, редом), док је садржај линалола у узорку испитиваном у овом раду био нижи (5,0%), а доминирали су фитол (19,3%) и хексадеканска киселина (12,5%). *Radulović u cap.* (2012) наводе масне киселине и њихове деривате као доминантне састојке (49,2%), а хексадеканску киселину (16,6%) као главно једињење у испарљивој фракцији добијеној из надземног дела *G. robertianum* са Суве Планине. Са друге стране, садржај фитола у претходним студијама био је знатно нижи (0,3-3,8%) (*Gębarowska u cap.*, 2017; *Pedro u cap.*, 1992; *Radulović u cap.*, 2012). Састав испарљиве фракције надземног дела *G. pyrenaicum* био је сличан резултатима које су објавили *Renda u cap.* (2016), док је у претходном испитивању *G. lucidum* пореклом са Суве планине састав испарљиве фракције добијене дестилацијом целе биљке био другачији (*Radulović u cap.*, 2011). Уочене разлике у саставу могу се објаснити различитим географским пореклом биљака, али и разликама у деловима биљака из којих су добијене испарљиве фракције. Најзаступљенија група једињења у испарљивим фракцијама надземних делова *G. phaeum* и *G. columbinum* били су дитерпени са фитолом као доминантним састојком (41,5% и 29,5%, редом). У литератури постоје подаци о хемијском саставу етарских уља *G. phaeum* различитог порекла (*Radulović u cap.*, 2013; *Chalchat u cap.*, 2002); у етарским уљима надземних делова са Суве Планине сакупљених током две узастопне године уочена је разлика у садржају фитола. У једном, фитол је био доминантан (25,9%), слично као у узорку испитиваном у овом раду, док у другом није ни детектован. Даље, *Chalchat u cap.* (2002) као доминанти састојак уља надземног дела *G. phaeum* наводе пиперитон, једињење из групе монотерпена које у узорку испитиваном у овом раду није било присутно. Поређењем са саставом етарског уља надземног дела *G. columbinum* са Суве Планине (*Radulović u cap.*, 2011), уочавају се извесне сличности, али и разлике. Главна једињења у претходно испитаном етарском уљу била су хексадеканска киселина (17,6%) и хексахидрофарнезиллацетон (11,6%), која су присутна и у испарљивој фракцији испитаној у овом раду (14,5% и 4,1%, редом). Са друге стране, фитол је у узорку са Суве Планине био присутан само у траговима, док је у испитиваној фракцији представљао доминантно једињење (29,5%).

Што се тиче испарљивих једињења у подземним органима испитиваних врста, масне киселине и њихови деривати чинили су највећи део испарљивих фракција подземних делова свих испитиваних биљака (70,3-95,7%), осим *G. macrorrhizum*. Хексадеканска киселина била је најзаступљеније једињење у овим фракцијама (35,1-79,2%) што је у складу са претходним наводима (*Radulović u cap.*, 2011; *Radulović u cap.*, 2012; *Radulović u cap.*, 2013).



Садржај укупних полифенола и танина у метанолним екстрактима испитиваних врста у складу је са претходним истраживањима, која показују да су врсте рода *Geranium* богате фенолним састојцима, пре свега танинима (*Grača u cap., 2016b*). У поређењу са добијеним резултатима, претходно је утврђен нижи садржај укупних фенола у екстрактима листа и ризома *G. macrorrhizum* (*Radulović u cap., 2012*) и у екстракту надземног дела *G. lucidum* (*Wafa u cap., 2017*).

Што се тиче фенолкарбоксилних киселина, претходна истраживања показала су да је елагна киселина заступљена, као и у овом раду, у *G. macrorrhizum* (*Miliauskas u cap., 2004; Fodorea u cap., 2004*), *G. pyrenaicum* (*Fodorea u cap., 2005a; Świątek u cap., 2021*), *G. robertianum* (*Fodorea u cap., 2005b; Grača u cap., 2016b; Catarino u cap., 2017*), и *G. sanguineum* (*Abarova u cap., 2020*), док је присуство овог једињења у врстама *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. lucidum* и *G. columbinum* по први пут утврђено у овом раду. Хлорогенска киселина била је присутна у екстрактима надземних делова четири испитиване врсте (*G. palustre*, *G. macrorrhizum*, *G. phaeum* и *G. lucidum*), док се у литератури наводи да се налази у *G. robertianum* (*Grača u cap., 2016b; Grača u cap., 2017; Nastić u cap., 2018*), *G. sanguineum* (*Leucuta u cap., 2005; Abarova u cap., 2020*) и *G. lucidum* (*Salih, 2019*), што није потврђено у овој дисертацији. Гална киселина налазила се у свим испитиваним узорцима, осим у екстракту подземног дела *G. palustre*. У литератури постоје подаци о присуству галне киселине у *G. macrorrhizum* (*Miliauskas u cap., 2004*), *G. robertianum* (*Catarino u cap., 2017*) и *G. pyrenaicum* (*Świątek u cap., 2021*). Иако *Świątek u cap. (2021)* наводе присуство галоилшикиминске киселине у метанолном екстракту надземног дела *G. pyrenaicum*, поменуто једињење се у овом испитивању налазило једино у екстракту надземног дела *G. sanguineum*. Протокатехинска киселина била је присутна у екстрактима већег броја врста испитиваних у овој дисертацији, а претходно је присуство овог једињења утврђено само у *G. macrorrhizum* (*Grigoraviciute u cap., 2018*) и *G. robertianum* (*Grača u cap., 2017; Nastić u cap., 2018*). До сада је било познато да је бревифолин карбоксилна киселина присутна у врстама *G. robertianum* и *G. pyrenaicum* (*Catarino u cap., 2017; Świątek u cap., 2021*), што је потврђено и у овом истраживању, али је у овом раду по први пут идентификована и одређен је њен садржај у врстама *G. lucidum* и *G. columbinum*.

У екстрактима надземних делова испитиваних врста, осим *G. phaeum*, утврђено је присуство и одређен садржај флавонолних агликона кверцетина, кемферола и метилованих деривата кемферола, хетерозида кверцетина и кемферола као и галоилованих деривата хетерозида кверцетина и кемферола.

У претходним истраживањима, кверцетин је идентификован у *G. macrorrhizum* (*Grigoraviciute u cap., 2018; Miliauskas u cap., 2004;*), *G. robertianum* (*Paun u cap., 2011*) *G. sanguineum* (*Leucuta u cap., 2005; Abarova u cap., 2020; Ivancheva u Petrova, 2000*), *G. pyrenaicum* (*Świątek u cap., 2021*) и *G. columbinum* (*Ivancheva u Petrova, 2000*). У овом раду није детектован кверцетин у екстракту надземног дела *G. pyrenaicum*, али је по први пут утврђено присуство и одређен садржај овог једињења у екстракту надземног дела *G. lucidum*. Литературни подаци наводе да је кемферол заступљен у врстама *G. macrorrhizum* (*Grigoraviciute u cap., 2018; Fodorea u cap., 2004*), *G. robertianum* (*Paun u cap., 2014; Ivancheva u Petrova, 2000*), *G. sanguineum* (*Leucuta u cap., 2005; Ivancheva u Petrova, 2000*), *G. pyrenaicum* и

*G. columbinum* (Ivancheva u Petrova, 2000). У овом истраживању, кемферол није пронађен у екстрактима *G. pyrenaicum*, али је са друге стране по први пут детектован и одређен је његов садржај у надземном делу *G. lucidum*. У литератури постоје подаци о заступљености хиперозида и изокверцитрина у врстама *G. macrorrhizum* (Miliauskas u cap., 2004; Fodorea u cap., 2004), *G. robertianum* (Fodorea u cap., 2005b; Ivancheva u Petrova, 2000), *G. sanguineum* (Leucuta u cap., 2005; Ivancheva u Petrova, 2000; Abarova u cap., 2020) i *G. pyrenaicum* (Fodorea u cap., 2005a), што је у складу са резултатима добијеним у овом раду. Иако се хиперозид наводи као флавонолни хетерозид присутан у *G. robertianum*, у нашем истраживању то није потврђено, али је по први пут утврђено присуство овог једињења у надземном делу *G. palustre*. За разлику од истраживања Kartnig u Bucar-Stachel (1991), астрагалин није детектован у екстракту надземног дела *G. robertianum*. Са друге стране, добијени резултати о присуству астрагалина у екстрактима надземних делова *G. palustre* и *G. pyrenaicum* су у складу са литературним подацима (Ivancheva u Petrova, 2000; Świątek u cap., 2021). Присуство галоилованих глукозида кемферола и кверцетина у надземном делу *G. pyrenaicum* у складу је са литературом (Świątek u cap., 2021), а садржај ових једињења у надземном делу *G. palustre* по први пут је одређен у овом истраживању.

LC-MS анализом у испитиваним екстрактима утврђено је присуство и одређен садржај елагних танина: гераниина и његовог изомера, корилагина, телимаграндина I и једињења изомерне структуре, телимаграндина II и хебулагинске киселине. Поред елагних, идентификовани су и одређен је садржај галних танина и то: галоилглукозе, дигалоилглукозе, тригалоилглукозе и пентагалоилглукозе. У већини анализираних узорка као доминантни међу полифенолним састојцима издвојили су се елагни танини гераниин и корилагин. Од испитиваних врста, једино за *G. robertianum* и *G. pyrenaicum* постоје подаци о садржају гераниина и његових изомера (Graça u cap., 2016b; Graça u cap., 2017; Catarino u cap., 2017; Świątek u cap., 2021). Catarino u cap. (2017) наводе присуство корилагина и телимаграндина у надземном делу *G. robertianum*. У свим анализираним узорцима утврђено је присуство галоил деривата глукозе. Литературни подаци показују да су галоиловани деривати хексоза заступљени у врстама *G. macrorrhizum*, *G. robertianum* i *G. pyrenaicum* (Grigoraviciute u cap., 2018; Catarino u cap., 2017; Graça u cap., 2016b; Graça u cap., 2017; Świątek u cap., 2021).

Добијени резултати испитивања редукционе и антирадикалске активности екстраката у складу су са претходним испитивањима антиоксидантног деловања одабраних врста у различитим тестовима (Radulović u cap., 2012; Sharopov u cap., 2017; Neagu u cap., 2010; Paun u cap., 2011; Graça u cap., 2016a; Ben Jemia u cap., 2013; Sokmen u cap., 2005; Świątek u cap., 2021; Wafa u cap., 2017; Nikolova u cap., 2010).

Антиоксидантна активност екстраката испитана је и у хуманом серуму, након индуковања оксидативног стреса терц-бутилхидропероксидом. Испитивање антиоксидантне активности екстраката *Geranium* врста на овај начин је по први пут урађено у овој докторској дисертацији.

У литератури постоје подаци о претходним испитивањима антимицробне активност екстраката појединих врста рода *Geranium* према различитим Грам позитивним, Грам негативним бактеријама и гљивицама. У поређењу са резултатима добијеним у овом раду, Radulović u cap. (2012) наводе слабију антимицробну активност екстраката листа и ризома *G. macrorrhizum* према стандардним сојевима *B. subtilis*,

*K. pneumoniae*, *E. coli* и *C. albicans*. Са друге стране, активност екстракта листа према *S. aureus* је била боља (МИК=15,6 µg/mL) у поређењу са резултатима овог испитивања где је утврђена вредност МИК екстракта надземног дела *G. macrorrhizum* износила 100 µg/mL.

Значајна антимикробна активност показана је за етанолне екстракте надземног и подземног дела *G. pyrenaicum*, пореклом из Турске, према различитим стандардним сојевима бактерија, клиничким изолатима и гљивици *C. albicans* (МИК=8-128 µg/mL) при чему су се, као и у овом испитивању, сојеви *S. aureus* и *E. faecalis* показали најосетљивијим (Özçelik и сар., 2010). Wafa и сар. (2017) су у диск дифузионом тесту испитали антибактеријску активност метанолног екстракта надземног дела *G. lucidum* према *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* и *E. coli*, при чему је екстракт био неактиван према *E. coli* и *P. aeruginosa*, што је у супротности са резултатима добијеним у овом раду где је уочена значајна активност екстракта према наведеним сојевима (МИК=50 µg/mL и МИК=100 µg/mL, редом). Ипак, треба нагласити да су испитивања вршена применом различитих метода. Водени екстракт надземног дела *G. palustre*, пореклом из Украјине, показао се активним у диск дифузионом тесту према *E. coli*, *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* и *S. aureus* (зона инхибиције 12-18 мм) (Khavrana и сар., 2018). Активност према наведеним сојевима потврђена је и у испитивањима у оквиру ове докторске дисертације (МИК=50-100 µg/mL).

Етанолни екстракт цвета *G. sanguineum*, пореклом из Туниса, испољио је значајно слабију антибактеријску активност према Грам позитивним и Грам негативним сојевима (МИК=1-6 mg/mL) у поређењу са екстрактом надземног дела *G. sanguineum* испитиваним у овом раду (Hammani и сар., 2011).

Резултати испитивања цитотоксичне активности метанолних екстраката у складу су са претходним запажањима о *in vitro* цитотоксичном деловању екстраката одређених врста рода *Geranium*. У претходним испитивањима, *MTT* тестом показано је да водени екстракти листова *G. robertianum* испољавају цитотоксично деловање према ћелијама карцинома ларинкса (*Hep-2*), (Neagu и сар., 2017). Даље, Graca и сар. (2016b) су у сулфородамин Б тесту утврдили цитотоксично деловање различитих водених и неполарних екстраката целе биљке *G. robertianum* према ћелијама карцинома дојке (*MCF-7*) ( $IC_{50}$ =60-179 µg/mL), плућа (*NCI-H460*) ( $IC_{50}$ =66-190 µg/mL), грлића материце (*HeLa*) ( $IC_{50}$ =57-380 µg/mL) и хепатоцелуларног карцинома (*HepG2*) ( $IC_{50}$ =45,68-177 µg/mL). Ацетонски екстракт испољио је уједначено цитотоксично деловање према свим ћелијама карцинома ( $IC_{50}$ =59-71 µg/mL) при чему су ћелије карцинома грлића материце биле најосетљивије, као и у случају испитиваних метанолних екстраката *G. robertianum* у оквиру ове докторске дисертације ( $IC_{50}$ =11,49 µg/mL за екстракт надземног и  $IC_{50}$ =8,85 µg/mL за екстракт подземног дела). Świątek и сар., (2021) су истим тестом испитали цитотоксичност различитих екстраката надземног дела *G. pyrenaicum* према ћелијама карцинома хипофаринкса *FaDu* ( $IC_{50}$ =39,49-75,46 µg/mL), карцинома грлића материце (*HeLa*) ( $IC_{50}$ =32,34-132,44 µg/mL) и карцинома колоне (*RKO*) ( $IC_{50}$ =35,27-124,77 µg/mL). Етилацетатни екстракт испољио је најјачу активност према *HeLa* ћелијској линији. Са друге стране, за метанолни екстракт утврђена је знатно виша  $IC_{50}$  вредност ( $IC_{50}$ =132,44 µg/mL) што је у супротности са резултатима добијеним у овом раду где је уочена значајна цитотоксична активност екстракта надземних делова *G. pyrenaicum* према ћелијама карцинома грлића материце ( $IC_{50}$ =19,21 µg/mL).

У овом раду гераниин је испољио значајну цитотоксичну активност према испитиваним ћелијским линијама ( $IC_{50}=12,88-80,94 \mu\text{g/mL}$ ), при чему су се *HeLa* ћелије показале најосетљивијим ( $IC_{50}=12,88 \mu\text{g/mL}$ ). Такође, утврђена је висока селективност овог једињења према ћелијама карцинома, с обзиром на то да није деловао на здраве ћелије фибробласта плућа ( $IC_{50}>1000 \mu\text{g/mL}$ ). Утврђено цитотоксично деловање гераниина је у складу са досадашњим запажањима. У претходним испитивањима показано је да гераниин индукује апоптозу ћелија колоректалног аденокарцинома (*Colo205* и *Colo320*) (*Guo u cap., 2018*), карцинома дојке (*MCF-7*) (*Zhai u cap., 2016*), (*OVCAR3* и *SKOV3*) (*Wang u cap., 2017*) и плућа (*A549*) (*Li u cap., 2013*). Такође, уочена висока селективност гераниина је у складу са претходним истраживањима (*Zhai u cap., 2016; Wang u cap., 2017*).

Показана активност елагне киселине ( $IC_{50}=65,62-221,51 \mu\text{g/mL}$ ) била је слабија у поређењу са гераниином. Претходна истраживања указују на цитотоксични потенцијал ове киселине. Утврђено је селективно цитотоксично и антипролиферативно деловање елагне киселине према ћелијама тумора колона (*Caco-2*, *SW480*, *HCT-15* и *HCT-116*) (*Losso u cap., 2004; Larrosa u cap., 2006; Zho u cap., 2017*), дојке (*MCF-7* и *Hs 578T*) (*Losso u cap., 2004; Larrosa u cap., 2006*), грлића материце (*HeLa*, *SiHa* и *C33A*) (*Li u cap., 2018*), простате (*DU 145* и *PC-3*) (*Losso u cap., 2004; Malik u cap., 2011*), бешике (*T24* и *TSGH8301*) (*Li u cap., 2005; Lin u cap., 2001*) и меланома (*1205Lu*, *WM852c* и *A375*) (*Jensen u cap., 2011*).

## Цитирана литература

1. Abarova S, Tancheva L, Nikolov R, Serkedjieva J, Pavlova E, Bramanti A, Nicoletti F, Tzvetkov NT. Preventive effect of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. on hepatic drug metabolism in influenza infected mice. *Sci Pharm* 2020;88(4):45.
2. Aedo C, Pando F. A distribution and taxonomic reference dataset of *Geranium* in the New World. *Sci Data* 2017;4(1):1-9.
3. Ben Jemia M, Aidi Wannes W, Ouchikh O, Bruno M, Kchouk ME. Antioxidant activity of Tunisian *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Nat Prod Res* 2013;27(22):2076-2083.
4. Catarino MD, Silva AM, Cruz MT, Cardoso SM. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Funct* 2017;8(9):3355-3365.
5. Chalchat J, Petrović S, Maksimović Z, Gorunovic M. A comparative study on essential oils of *Geranium macrorrhizum* L. and *Geranium phaeum* L., Geraniaceae from Serbia. *J Essent Oil Res* 2002;14:333-335.
6. Diklić N. Fam. Geraniaceae U: Flora SR Srbije IX, Uredio: Josifović M. Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), Beograd, 1977, str. 140.
7. Fodorea CŞ, Vlase L, Suci S, Tămaş M, Leucuţa SE, Bersan L. HPLC Study on some Polyphenols of *Geranium macrorrhizum* L. Geraniaceae). *Analele Universităţii Ovidius, seria Ştiinţe Medicale-Farmacie* 2004;2:70-73.
8. Fodorea CS, Vlase L, Leucuta SE, Tamas M. Phytochemical study on some polyphenols of *Geranium pyrenaicum*. *Chem Nat Compd* 2005a;41:400-403.
9. Fodorea CS, Vlase L, Suci S, Tamas M, Leucuta SE. Preliminary HPLC study on some polyphenols of *Geranium robertianum* L. (Geraniaceae). *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2005b;109:174-178.

10. Gębarowska E, Politowicz J, Szumny A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Geranium robertianum* L. essential oil. *Acta Pol. Pharm* 2017;75:699 - 705.
11. Graça VC, Ferreira IC, Santos PF. Phytochemical composition and biological activities of *Geranium robertianum* L.: A review. *Ind Crops Prod* 2016a;87:363-378.
12. Graça VC, Barros L, Calhella RC, Dias MI, Carvalho AM, Santos-Buelga C, Santos PF, Ferreira IC. Chemical characterization and bioactive properties of aqueous and organic extracts of *Geranium robertianum* L. *Food Funct* 2016b;7(9):3807-3814.
13. Graça VC, Barros L, Calhella RC, Dias MI, Ferreira IC, Santos PF. Bio-guided fractionation of extracts of *Geranium robertianum* L.: Relationship between phenolic profile and biological activity. *Ind Crops Prod* 2017;108:543-552.
14. Grigoraviciute G, Venskutonis PR, Cifuentes A, Ibáñez E, Álvarez-Rivera G. Pressurized liquid extraction for *Geranium macrorrhizum* leaves residue valorization and phytochemical characterization by HPLC-UV-MS/MS.
15. Guo X, Wang H, Ni J, Liang Z, Wu X, Xue J, Wang X. Geraniin selectively promotes cytostasis and apoptosis in human colorectal cancer cells by inducing catastrophic chromosomal instability. *Mutagenesis* 2018;33(4):271-281.
16. Hammami I, Triki MA, Rebai A. Chemical compositions, antibacterial and antioxidant activities of essential oil and various extracts of *Geranium sanguineum* L. flowers. *Arch Appl Sci Res* 2011; 3:135-144.
17. Harborne J, Williams C. *Phytochemistry of genus Geranium*. U: *Geranium and Pelargonium*. Uredio Lis-Balchin M. Taylor and Francis, London and New York, 2002, str. 20-29.
18. Ivancheva S, Petrova A. A chemosystematic study of eleven *Geranium* species. *Biochem Syst Ecol* 2000;28(3):255-260.
19. Janković MM. *Fam. Geraniaceae J. St. Hill*. U: *Flora SR Srbije V, Uredio: Josifović M. Srpska akademija nauka i umetnosti (SANU), Beograd, 1973, str. 134-157.*
20. Jensen JD, Dunn JH, Luo Y, Liu W, Fujita M, Dellavalle RP. Ellagic acid inhibits melanoma growth in vitro. *Dermatol Reports* 2011;12;3(3):e36.doi: 10.4081/dr.2011.e36.
21. Kartnig T, Bucar-Stachel, J. Flavonoide aus den oberirdischen Teilen von *Geranium robertianum* (Flavonoids from the aerial parts of *Geranium robertianum*). *Planta Med* 1991;57:292-293.
22. Khavrona M, Benzel I, Fedin R, Pinyazhko O. Application of extract of *Geranium palustre* herb as a dental film in the treatment of oral mucosa diseases. *Int J Pharm Sci Res* 2018;9:4849-4853.
23. Larrosa M, Tomás-Barberán FA, Espín JC. The dietary hydrolysable tannin punicalagin releases ellagic acid that induces apoptosis in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells by using the mitochondrial pathway. *J Nutr Biochem* 2006;17:611–625.
24. Leucuta S, Vlase L, Gocan S, Radu L, Fodorea C. Determination of phenolic compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 2005;28(19):3109-3117.
25. Li TM, Chen GW, Su CC, Lin JG, Yeh CC, Cheng KC, Chung JG. Ellagic acid induced p53/p21 expression, G1 arrest and apoptosis in human bladder cancer T24 cells. *Anticancer Res* 2005;25:971-979.
26. Lin SS, Hung CF, Tyan YS, Yang CC, Hsia TC, Yang MD, Chung JG. Ellagic acid inhibits arylamine N-acetyltransferase activity and DNA adduct formation in human bladder tumor cell lines (T24 and TSGH 8301). *Urol Res* 2001;29:371-376.

27. Losso JN, Bansode RR, Trappey II A, Bawadi HA, Truax R. In vitro anti-proliferative activities of ellagic acid. *J Nutr Biochem* 2004;15(11):672-678.
28. Malik A, Afaq S, Shahid M, Akhtar K, Assiri A. Influence of ellagic acid on prostate cancer cell proliferation: A caspase-dependent pathway. *Asian Pac J Trop Med* 2011;4:550-555.
29. Miliauskas G, van Beek TA, Venskutonis PR, Linssen JP, de Waard P. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *Eur Food Res Technol* 2004;218(3):253-261.
30. Nastić N, Švarc-Gajić J, Delerue-Matos C, Barroso MF, Soares C, Moreira MM, Morais S, Mašković P, Srček VG, Slivac I, Radošević K. Subcritical water extraction as an environmentally-friendly technique to recover bioactive compounds from traditional Serbian medicinal plants. *Ind Crops Prod* 2018;111:579-589.
31. Neagu E, Paun G, Constantin D, Radu GL. Cytostatic activity of *Geranium robertianum* L. extracts processed by membrane procedures. *Arab J Chem* 2017;10:S2547-2553.
32. Nikolova M, Tsvetkova R, Ivancheva S. Evaluation of antioxidant activity in some Geraniacean species. *Bot Serbica* 2010;34(2):123-125.
33. Özçelik B, Özgen S, Öztürk S, Küsmenoğlu Ş. Evaluation of antibacterial and antifungal activities of *Geranium pyrenaicum* L. *Turk J Pharm Sci* 2010;7(2):111-117.
34. Paun G, Neagu E, Tache A, Radu GL, Parvulescu V. Application of the nanofiltration process for concentration of polyphenolic compounds from *Geranium robertianum* and *Salvia officinalis* extracts. *Chem Biochem Eng Q* 2011;25(4):453-460.
35. Pedro L, Pais M, Schefer J. Composition of the essential oil of *geranium robertianum* L. *Flavour Fragrance J* 1992;7:223-226.
36. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z, Zoranić S. *Geranium macrorrhizum* L. (Geraniaceae) essential oil: A potent agent against *Bacillus subtilis*. *Chem Biodivers* 2010;7:2783-2799.
37. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z, Palić R. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Geranium columbinum* L. and *G. lucidum* L. (Geraniaceae). *Turk J Chem* 2011;35:499-512.
38. Radulović N, Dekić M, Stojanović-Radić Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Geranium sanguineum* L. and *G. robertianum* L. (Geraniaceae). *Med Chem Res* 2012;21:601-615.
39. Radulović N, Dekić M. Volatiles of *Geranium purpureum* Vill. and *Geranium phaeum* L.: Chemotaxonomy of Balkan *Geranium* and *Erodium* species (Geraniaceae). *Chem Biodivers* 2013;10:2042-2052.
40. Renda G, Celik G, Korkmaz B, Karaoglu SA, Yayli N. Antimicrobial activity and analyses of six *Geranium* L. species with headspace spme and hydrodistillation. *J Essent Oil-Bear Plants* 2016;19(8):2003-2016.
41. Salih SH. Phytochemical Study of the *Geranium* L. in Kurdistan Region-Iraq. *Passer J Basic Appl Sci* 2019;1(1):1-3.
42. Sharopov F, Ahmed M, Satyal P, Setzer WN, Wink M. Antioxidant activity and cytotoxicity of methanol extracts of *Geranium macrorrhizum* and chemical composition of its essential oil. *J Med Act Plants* 2017;5(2):53-58.
43. Sokmen, M., Angelova, M., Krumova, E., Pashova, S., Ivancheva, S., Sokmen, A. and Serkedjieva, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguineum* L. *Life Sci* 2005;76(25):2981-2993.

44. Świątek Ł, Sieniawska E, Sinan KI, Maciejewska-Turska M, Boguszewska A, Polz-Dacewicz M, Senkardes I, Guler GO, Bibi Sadeer N, Mahomoodally MF, Zengin G. LC-ESI-QTOF-MS/MS Analysis, Cytotoxic, Antiviral, Antioxidant, and Enzyme Inhibitory Properties of Four Extracts of *Geranium pyrenaicum* Burm. f.: A Good Gift from the Natural Treasure. *Int J Mol Sci* 2021;22(14):7621.
45. Tucakov J. Lečenje biljem. Rad, Beograd, 1997.
46. Wafa N, Sofiane G, Ouarda D. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities valorisation of methanol extract of two *Geranium* species growth in Setif Algeria. *Int J Pharma Res Health Sci* 2017;5(3):1698-1702.
47. Wang X, Chen Z, Li X, Jiang ZK, Zhao YQ, Ping FF. Geraniin suppresses ovarian cancer growth through inhibition of NF-κB activation and downregulation of Mcl-1 expression. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;31(9):e21929.
48. Zhai JW, Gao C, Ma WD, Wang W, Yao LP, Xia XX, Luo M, Zu YG, Fu YJ. Geraniin induces apoptosis of human breast cancer cells MCF-7 via ROS-mediated stimulation of p38 MAPK. *Toxicol Mech Methods* 2016;26(5):311-318.
49. Zho J, Li G, Bo W, Zhou Y, Dang S, Wei J, Li X, Liu M. Multiple effects of ellagic acid on human colorectal carcinoma cells identified by gene expression profile analysis. *Int J Oncol* 2017;50:613-621.

#### **4. ОБЈАВЉЕНИ И САОПШТЕНИ РЕЗУЛТАТИ КОЈИ ЧИНЕ ДЕО ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

##### **Радови публиковани у истакнутим међународним часописима (M22)**

1. **Пић М**, Marčetić M, Zlatković B, Lakušić B, Kovačević N, Drobac M. Chemical Composition of volatiles of eight *Geranium* L. species from Vlasina Plateau (South Eastern Serbia). *Chem Biodivers.* 2020; 17(2): e1900544. DOI: 10.1002/cbdv.201900544. IF (2021): 2,745; Chemistry, Multidisciplinary: 104/180, M22.
2. **Пић М**, Samardžić S, Kotur-Stevuljević J, Ušjak D, Milenković M, Kovačević N, Drobac M. Polyphenol rich extracts of *Geranium* L. species as potential natural antioxidant and antimicrobial agents. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2021; 25(20): 6283-6294. DOI: 10.26355/eurrev\_202110\_26998. IF (2021): 3,748; Pharmacology&Pharmacy: 125/279, M22.

##### **Саопштење са међународног скупа штампано у изводу (M34)**

1. **Пић М**, Marčetić M, Zlatković B, Lakušić B, Drobac M, Kovačević N. Chemical composition of volatile compounds of eight *Geranium* L. species from Vlasina plateau. 7th Balkan Botanical Congress (7BBC 2018), Novi Sad, Serbia, 10-14. 09. 2018. *Botanica Serbica* 2018; 42 (supplement 1) 7BBC Book of abstracts, 141.

##### **Саопштење са скупа националног значаја штампано у изводу (M64)**

1. **Пић М**, Drobac M, Marčetić M, Milenković M, Zlatković B, Kovačević N. Antimicrobial activity of eight *Geranium* L. species extracts. 13th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions (13th SFSES), Stara planina, Srbija, 20-23. 06. 2019. Book of abstracts, p. 171.

## 5. ЗАКЉУЧАК - ОБРАЗЛОЖЕЊЕ НАУЧНОГ ДОПРИНОСА ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

У оквиру ове докторске дисертације испитано је осам врста рода *Geranium*: *G. macrorrhizum*, *G. robertianum*, *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. pyrenaicum*, *G. columbinum* и *G. lucidum*, пореклом из југоисточне Србије, у погледу хемијског састава подземних и надземних органа и њихове антиоксидантне, антимицробне и цитотоксичне активности.

Имајући у виду да поједине врсте, које су предмет проучавања ове докторске дисертације, до сада нису испитиване или су само делимично испитане, упоредна хемијска анализа испарљивих фракција и метанолних екстраката надземних и подземних органа омогућила је упознавање њиховог хемијског састава и унапређење знања о секундарним метаболитима врста овог рода.

Хемијски састав испарљивих фракција *G. palustre* и испарљиве фракције подземног дела *G. pyrenaicum*, као и састав испарљивих фракција добијених посебно из надземних и подземних делова *G. sanguineum* и *G. columbinum* испитан је по први пут у оквиру овог рада.

Такође, испитиване врсте, осим *G. robertianum* и *G. pyrenaicum*, до сада нису детаљно проучаване у погледу полифенолних састојака, а посебно танина. Присуство појединих фенолних једињења и одређивање њиховог садржаја по први пут је урађено у појединим врстама: гераниина и његовог изомера у свим врстама, осим *G. robertianum* и *G. pyrenaicum*, корилагина у надземним деловима *G. palustre*, *G. sanguineum*, *G. columbinum*, *G. macrorrhizum* и *G. lucidum* као и у подземним деловима *G. robertianum*, *G. lucidum* и *G. pyrenaicum*, телимаграндина II у *G. lucidum* и *G. phaeum*, елагне киселине у *G. phaeum*, *G. palustre*, *G. lucidum* и *G. columbinum*, хлорогенске киселине у *G. palustre*, *G. macrorrhizum* и *G. phaeum*, брeвифолин карбоксилне киселине у *G. lucidum* и *G. columbinum*.

Значајан допринос ове дисертације представља и процена антиоксидантног потенцијала екстраката испитивањем њиховог утицаја на параметре оксидативног стреса у хуманом серуму, као биолошки релевантној средини. Употреба хуманог серума као медијума за испитивање антиоксидантне активности обезбеђује услове сличне физиолошким условима у системској циркулацији, а такође узима у обзир и потенцијалне утицаје физиолошки релевантне средине на испитиване узорке, чиме се добијају веродостојније информације о потенцијалној терапијској примени. Испитивање антиоксидантне активности екстраката *Geranium* врста на овај начин је по први пут урађено у овој докторској дисертацији.

Научни допринос ове дисертације огледа се и у испитивању антимицробне активности екстраката према стандардним сојевима бактерија, а нарочито према клиничким изолатима *E. coli* и *K. pneumoniae*, при чему екстракти *G. phaeum* и *G. columbinum* нису до сада испитивани у погледу антимицробног деловања. Наглашена активност екстраката према стандардном соју, али и клиничким изолатима *E. coli* је од посебног значаја имајући у виду да је ова Грам негативна бактерија један од најчешћих узрочника бактеријских инфекција и често резистентна на антимицробне лекове.



Поред тога, у оквиру ове дисертације по први пут је испитан цитотоксични потенцијал екстракта *G. phaeum*, *G. sanguineum*, *G. palustre*, *G. lucidum* и *G. columbinum*. Испитивани екстракти и гераниин селективно су деловали на ћелије карцинома грлића материце (*HeLa*), у знатно мањој мери узрокујући смрт здравих ћелија, што указује на њихов повољан безбедносни профил и чини их добрим кандидатима за даља испитивања.

Генерално, може се закључити да су резултати хемијске и фармаколошке карактеризације испитиваних *Geranium* врста дали значајан научни допринос у области фармакогнозије и указали на терапијски потенцијал испитиваних врста и оправданост даљих истраживања.

## 6. ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу *Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду* и налаза у извештају из програма *iThenticate* којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Упоредна анализа хемијског састава, антимикуробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium* L. из југоисточне Србије”**, аутора Милана Д. Илића, констатујем да утврђено подударарење текста износи 10% (укупно 361 подударарење са 94 извора).

Овај степен подударности последица је подударарења општих појмова, терминологије карактеристичне за област истраживања, назива коришћених методологија, библиографских података о коришћеној литератури, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације, што је у складу са чланом 9. Правилника.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. *Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду*, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Београд, 28.06.2023.

Ментор



Др сц. Милица Дробац, редовни професор  
Универзитет у Београду – Фармацеутски факултет

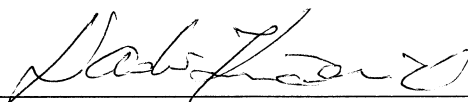
## 7. МИШЉЕЊЕ И ПРЕДЛОГ КОМИСИЈЕ

Увидом у докторску дисертацију маг. фарм. Милана Д. Илића под називом "Упоредна анализа хемијског састава, антимикробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности биљних врста рода *Geranium L.* из југоисточне Србије" може се закључити да је кандидат успешно реализовао постављене циљеве истраживања и да резултати приказани у овој дисертацији представљају оригинално и самостално научно дело са значајним научним доприносом у области фармакогнозије. Резултати ове дисертације публиковани су у два рада у истакнутим међународним часописима (M22), једном саопштењу на међународном скупу (M34) и једном саопштењу на скупу националног значаја (M64), штампана у изводу.

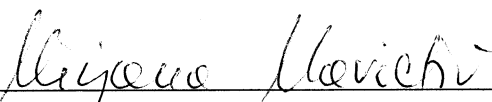
На основу свега изложеног, Комисија предлаже Наставно-научном већу Универзитета у Београду - Фармацеутског факултета да прихвати овај позитиван Извештај о завршеној докторској дисертацији и упути га Већу научних области медицинских наука, ради добијања сагласности за јавну одбрану докторске дисертације.

Београд, 06.07.2023. год.

**Чланови Комисије:**



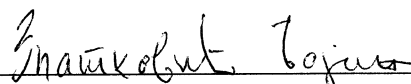
Др сц. Нада Ковачевић, редовни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет




Др сц. Мирјана Марчетић, ванредни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет



Др сц. Марина Миленковић, редовни професор  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет



Др сц. Бојан Златковић, редовни професор  
Универзитет у Нишу - Природно математички факултет



Др сц. Стеван Самарџић, научни сарадник  
Универзитет у Београду - Фармацеутски факултет