



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Мирослав М. Соврић

**ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ И
АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА
ТРИ ОДАБРАНЕ БИЉНЕ ВРСТЕ РОДА *DAPHNE***

Докторска дисертација

Ментор: проф. др Недељко Т. Манојловић

Крагујевац, 2016.

Ова докторска дисертација урађена је у лабораторијама Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, биохемијској лабораторији Агрономског факултета у Чачку и лабораторијама Департмана за биологију и екологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу. Ово истраживање урађено је у оквиру пројекта бр. 172015, Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије и Јуниор пројекта бр. 06/11, Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Желим да изразим своју искрену и неизмерну захвалност особама које су биле уз мене током израде ове докторске дисертације, и својим делима дале велики допринос да се она и заврши:

За указано поверење, несебичну, отворену и драгоцену помоћ од првог познанства, пренешене идеје, знање, бројне савете и сугестије, разумевање и подршку током израде докторске дисертације и мог свеобухватног научноистраживачког и професионалног усавршавања, захвалност дугујем свом ментору, проф. др. Недељку Манојловићу, ванредном професору Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу.

Захваљујем др. Марини Јушковић, доценту Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, на помоћи у прикупљању и детерминацији биљног материјала.

Велико хвала проф. др. Перици Васиљевићу, ванредном професору Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу, на помоћи у реализацији HPLC анализа узорака и бројним стручним саветима и сугестијама.

Др. Павлу Машиковићу, доценту Агрономског факултета у Чачку, захваљујем на помоћи у извођењу спектрофотометријских анализа и одређивању антимицробне активности испитиваних екстраката, али и на несебичној подршци, добронамерним саветима, позитивној енергији и пријатељству током читавог нашег познанства.

Хвала колегама и многобројним пријатељима, који су били уз мене и на различите начине помогли од самог почетка израде ове докторске дисертације да се она и заврши.

Хвала мојој породици на подршци, разумевању и свему што су учинили за мене.

Ваши Мирослав

САДРЖАЈ:

1. УВОД.....	1
1.1. Биљке традиционалне медицине као извор нових лекова.....	2
1.2. Тенденција и употреба биљака у данашње време.....	3
2. ЦИЉЕВИ РАДА И ХИПОТЕЗЕ.....	5
2.1. Циљеви истраживања.....	6
2.2. Хипотезе истраживања.....	6
3. ОПШТИ ДЕО.....	8
3.1. СЕКУНДАРНИ МЕТАБОЛИТИ БИЉАКА.....	9
3.1.2. Биосинтетички путеви секундарних метаболита.....	9
3.2. Полифенолни секундарни метаболити.....	12
3.2.1. Класификација фенола.....	12
3.3. Кумарини.....	14
3.3.1. Кумарини као антиоксиданси.....	16
3.4. ОКСИДАТИВНИ СТРЕС И ПЕРОКСИДАЦИЈА ЛИПИДА.....	18
3.4.1. Феноли као инхибитори липидне пероксидације.....	19
3.5. Секундарни метаболити биљака као извор нових антимикуробних агенаса.....	21
3.6. ТАКСОНОМИЈА, ДИСТРИБУЦИЈА И ОПИС РОДА <i>DAPHNE</i>	22
3.6.1. Таксономија и дистрибуција.....	22
3.6.2. Опис биљних врста рода <i>Daphne</i>	22
3.6.2.1. <i>Daphne blagayana</i> L.	23
3.6.2.2. <i>Daphne sneorum</i> L.	23
3.6.2.3. <i>Daphne alpina</i> L.	24
3.7. БИЉНЕ ВРСТЕ РОДА <i>DAPHNE</i> : ФАРМАКОЛОШКИ СКРИНИНГ И УПОТРЕБА У ТРАДИЦИОНАЛНОЈ МЕДИЦИНИ.....	25
3.7.1. Токсични ефекти врста рода <i>Daphne</i>	28
3.8. ХЕМИЈСКИ КОНСТИТУЕНТИ ВРСТА РОДА <i>DAPHNE</i> И ЊИХОВЕ БИОЛОШКЕ И ФАРМАКОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ.....	29
3.8.1. Кумарини.....	29
3.8.2. Флавоноиди.....	32
3.8.3. Бифлавоноиди (спиробифлавоноиди).....	33

3.8.4. Терпени.....	35
3.8.5. Сесквитерпеноиди.....	35
3.8.6. Дитерпени дафнанског типа.....	35
3.8.7. Тритерпени.....	38
3.8.8. Стероидни молекули.....	39
3.8.9. Лигнананска једињења.....	39
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА.....	41
4.1. Прикупљање и припрема биљног материјала за екстракцију.....	42
4.2. Хемикалије и реагенси.....	42
4.3. Добијање екстраката.....	42
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ХЕМИЈСКОГ САСТАВА ЕКСТРАКАТА.....	43
4.4.1. UV/Vis спектрофотометријска анализа екстраката.....	43
4.4.2. Одређивање укупног фенолног садржаја.....	43
4.4.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја.....	44
4.4.4. HPLC-UV анализа екстраката.....	45
4.5. ИСПИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА.....	46
4.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета.....	46
4.5.2. Одређивање DPPH „скевинцер” активности.....	46
4.5.3. Метода инхибиције липидне пероксидације.....	48
4.5.4. Fe ²⁺ хелатациона активност.....	48
4.5.5. Одређивање способности неутралисања OH [•] радикала.....	50
4.6. ИСПИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА.....	52
4.6.1. Бактеријски и гљивични сојеви.....	52
4.6.2. Микродилуциона метода.....	52
4.7. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	54
5. РЕЗУЛТАТИ	55
5.1. Екстракција метанолом и хлороформом.....	56
5.2. ХЕМИЈСКИ САСТАВ ЕКСТРАКАТА <i>D. BLAGAYANA</i> , <i>D. CNEORUM</i> И <i>D. ALPINA</i> ..	57
5.2.1. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима.....	57

5.2.1.1. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте <i>D. blagayana</i>	58
5.2.1.2. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте <i>D. sneorum</i>	59
5.2.1.3. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте <i>D. alpina</i>	60
5.3. АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВОСТИ ЕКСТРАКАТА <i>D.BLAGAYANA</i> , <i>D.CNEORUM</i> <i>И D. ALPINA</i>	61
5.3.1. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката.....	61
5.3.2. Капацитет неутралисања DPPH и OH радикала испитиваних екстраката.....	63
5.3.3. Инхибиција липидне пероксидације и Fe ²⁺ хелатациона активност испитиваних екстраката.....	66
5.4. HPLC-UV АНАЛИЗА ЕКСТРАКАТА <i>D.BLAGAYANA</i> , <i>D.CNEORUM</i> И <i>D. ALPINA</i>	69
5.4.1. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте <i>D. blagayana</i>	69
5.4.2. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте <i>D. alpina</i>	76
5.4.3. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте <i>D. sneorum</i>	82
5.5. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА <i>D.BLAGAYANA</i> , <i>D.CNEORUM</i> И <i>D. ALPINA</i>	88
5.5.1. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте <i>D. blagayana</i>	88
5.5.2. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте <i>D. sneorum</i>	90
5.5.3. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте <i>D. alpina</i>	92
5.6. КОМПАРАТИВНА СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА.....	94
5.6.1. Једнофакторска анализа варијансе укупних фенола, флавоноида и антоиоксидативних активности.....	94
5.6.2. Tukey's HSD тестирање укупног фенолног садржаја испитиваних екстраката.....	94

5.6.3. Tukey's HSD тестирање укупног флавоноидног садржаја испитиваних екстраката.....	97
5.6.4. Tukey's HSD тестирање укупног укупног антиоксидативног капацитета испитиваних екстраката.....	99
5.6.5. Tukey's HSD тестирање DPPH „скевинџер” активности испитиваних екстраката.....	101
5.6.6. Tukey's HSD тестирање инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката.....	103
5.6.7. Tukey's HSD тестирање Fe ²⁺ хелатациона активности испитиваних екстраката.....	105
5.6.8. Tukey's HSD тестирање способности неутралисања OH [•] радикала испитиваних екстраката.....	107
6. ДИСКУСИЈА	110
7. ЗАКЉУЧЦИ	119
8. ЛИТЕРАТУРА	123

1. УВОД

Коришћење биљака у лековите сврхе и проналажење биоактивних молекула у биљкама датира од давнина. На свим континентима, употреба великог броја различитих припремака добијених од аутохтоних биљних врста датира од праисторије. Постоје подаци да су Неандерталци, који су живели пре око 60.000 година на просторима данашњег Ирана користили биљке у различите сврхе (на пример високи слез) [1]. Ове биљке и даље налазе велику примену у традиционалној медицини широм света. Историјски гледано, терапеутски резултати коришћења лековитог биља су били различити, од излечења и ублажавања симптома болести, до испољавања токсичних ефеката па и смрти. Процењује се да на Земљи постоји 250 000 до 350 000 различитих биљних врста. Релативно мали број (до 10%) биљака је до сада коришћен у исхрани људи или животиња, али је вероватно много већи број коришћен у медицинске сврхе [2]. Хипократ (крајем V века пре н.е.) описује 300-400 медицинских биљака. У првом веку нове ере, Диоскорид је написао дело *De Materia Medica*, медицински биљни каталог који представља прототип модерне фармакогнозије [3]. У Библији је описано тридесетак лековитих биљака. Међу описаним биљкама се налазе и тамјан и смирна, које су биле веома цењене због свог лековитог дејства [4]. Падом древних цивилизација велики број докумената о биљним лековима је уништен или изгубљен, што је утицало на напредак Западне медицине. Током Ренесансе, на Западу долази до „оживљавања“ древне медицине, која је углавном била базирана на биљним лековима [5].

1.1. Биљке традиционалне медицине као извор нових лекова

Изоловање појединих алкалоида из опијума почетком деветнаестог века представља кључни догађај у развоју модерне фармације. Изолована једињења су имала исту, или много јачу активност од биљног материјала који је коришћен, што је отворило пут у коришћењу чистих молекула у лечењу различитих болести. Од тада су уложена велика средства у синтези нових лекова, али и у изоловању молекула из природних ресурса и њихов развој у лекове. Једињења изолована из биљног материјала који се користио у традиционалној медицини, су послужила у дизајну нових, синтетских лекова, увођењем активних хромофора у постојећи природни молекул. Тако је на пример из листа јаборандуса (*Pilocarpus jaborandi*), који се користио у Бразилској традиционалној медицини за изазивање знојења, изолован пилокарпин који се користи у конвенционалној

медицини као миотик у лечењу глаукома [6]. Натријум хромогликат, атракуријум и остали миорелаксанти, етопозид, неостигмин и многи други су конвенционални лекови који су развијени из молекула пронађених у биљкама традиционалне медицине [7]. Иако се генерално под „открићем лекова“ сматра изоловање активних молекула, треба имати на уму да лечење болести неким „леком“ може подразумевати и употребу смеше једињења. Такав случај се јавља код употребе биљних екстраката и осталих природних супстанци које садрже више активних супстанци. Такви екстракти, углавном на основу традиционалне употребе у одређеном делу света, се све више користе као комплементарни приступ лечења у Западној медицини. Примери таквих препарата су екстракти гинка (у третману деменције), ђаволје канџе (у терапији реуматизма), тестирасте палме (*Saw palmetto*, у терапији бенигне хиперплазије простате) и многи други [8,9]. Научни значај етнофармакологије је велики што се огледа у формирању Интернационалног удружења етнофармаколога као и Европског удружења за етнофармакологију [10].

Откриће нових лекова из природних ресурса се састоји из неколико фаза. У првој фази се углавном разматрају подаци о традиционалној употреби биљног материјала који из неког разлога може бити повезан са медицинском употребом. Разматрање традиционалне употребе неке биљке представља основ за могућу претпоставку да биљка испољава неку биолошку и фармаколошку активност. Уколико постоје индикације у испољавању неке активности, потребно је биљну врсту идентификовати и окарактерисати према научној номенклатури. Након спровођења релевантних тестова биолошких активности, одлучује се о спровођењу изоловања и структурне идентификације присутних молекула, који могу бити одговорни за испољене активности. „Активни“ молекули се откривају кроз неколико циклуса фракционисања екстраката повезано са тестирањем активности сваке фракције, до изоловања чистих молекула из активних фракција. Ови молекули, по утврђивању њихове активности и структуре, служе за развој клинички корисних производа [11].

1.2. Тенденција и употреба биљака у данашње време

Биљке имају битну улогу одржавању здравља људи и побољшању квалитета људског живота. Оне су битна компонента исхране људи, али се користе и у осталим сферама људског живота налазећи примену као лековита средства, конзерванси, састојци козметичких препарата, боја и остало. Употреба лековитог биља одувек је била део људске

културе. Светска здравствена организација процењује да се 80% људске популације ослања на неку од традиционалних метода лечења у примарној здравственој нези [12]. У неким земљама, све је веће залагање за коришћење аутохтоних метода лечења него за употребу скувих увозних лекова. У протеклих сто година масовна производња и употреба хемијски синтетисаних лекова су саставни део система здравствене заштите. Међутим, велики део становништва, нарочито у земљама у развоју, се и даље ослања на традиционалне методе лечења и употребу биљних лекова у спровођењу здравствене заштите. На пример, у Африци се 90% становништва ослања на традиционалне методе лечења, у Индији 70%, док у Кини традиционална медицина чини 40% свих система здравствене заштите а више од 90% општих болница имају јединице за традиционалну медицину [13, 14, 15]. Међутим, употреба традиционалне медицине није ограничена само на земље у развоју. У протекле две деценије, интересовање за традиционалне методе лечења, са посебним акцентом на фитотерапију, је у знатном порасту и у високо развијеним земљама. Истраживање спроведено у Сједињеним америчким државама током 2007. године показало је да је неку од традиционалних метода лечења користило око 38% одраслих и 12% деце [16, 17]. Према истраживању Националног центра комплементарне и алтернативне медицине биљна терапија, са изузетком витамина и минерала, је најчешће коришћена метода алтернативне медицине [18].

2. ЦИЉЕВИ РАДА И ХИПОТЕЗЕ

2.1. Циљеви истраживања

Имајући у виду да је у до сада испитаним *Daphne* врстама потврђено присуство различитих класа секундарних метаболита које испољавају широк спектар биолошких активности, за циљеве ове докторске дисертације постављено је испитивање хемијског састава, антимикуробне и антиоксидативне активности три биљне врсте овог рода које расту на подручју Србије: *Daphne blagayana* L., *Daphne sneorum* L. и *Daphne alpina* L. Циљеви истраживања су следећи:

- Прикупљање самониклих биљних врста *D. blagayana*, *D. sneorum* и *D. alpina* са различитих локалитета у Србији;
- Припрема хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листова методом екстракције по *Soxhlet*-у;
- Фитохемијска анализа добијених екстраката која је обухватала спектрофотометријско одређивање укупних фенола и флавоноида у испитиваним узорцима;
- HPLC-UV (*High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Spectroscopy*) анализа екстраката у циљу идентификације најзаступљенијих метаболита;
- Испитивање антиоксидативне активности екстраката (*in vitro*) које је обухватало: одређивање укупног антиоксидативног капацитета, способност екстраката у неутралисању слободних радикалских врста (DPPH[•] и OH[•]), Fe²⁺ хелатациона активност екстраката и утицај екстраката на инхибицију липидне пероксидације;
- Испитивање антибактеријске и антифунгалне активности добијених екстраката на одабраним АТСС микробиолошким сојевима (*in vitro*).

2.2. Хипотезе истраживања:

1. Метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* имају различит садржај фенола и флавоноида.
2. Испитивани екстракти различитих делова исте врсте и делова различитих *Daphne* врста садрже различите најзаступљеније секундарне метаболите.

3. Испитивани метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* испољавају специфичне антимикуробне активности.
4. Испитивани метанолски и хлороформски екстракти гранчица и листова врста *D. sneorum*, *D. alpina* и *D. blagayana* испољавају специфичне антиоксидативне активности.
5. Метанолски и хлороформски екстракти испитиваних *Daphne* врста могу наћи своју потенцијалну примену као антиоксидативни и антимикуробни агенси.

3. ОПШТИ ДЕО

3.1. Секундарни метаболити биљака

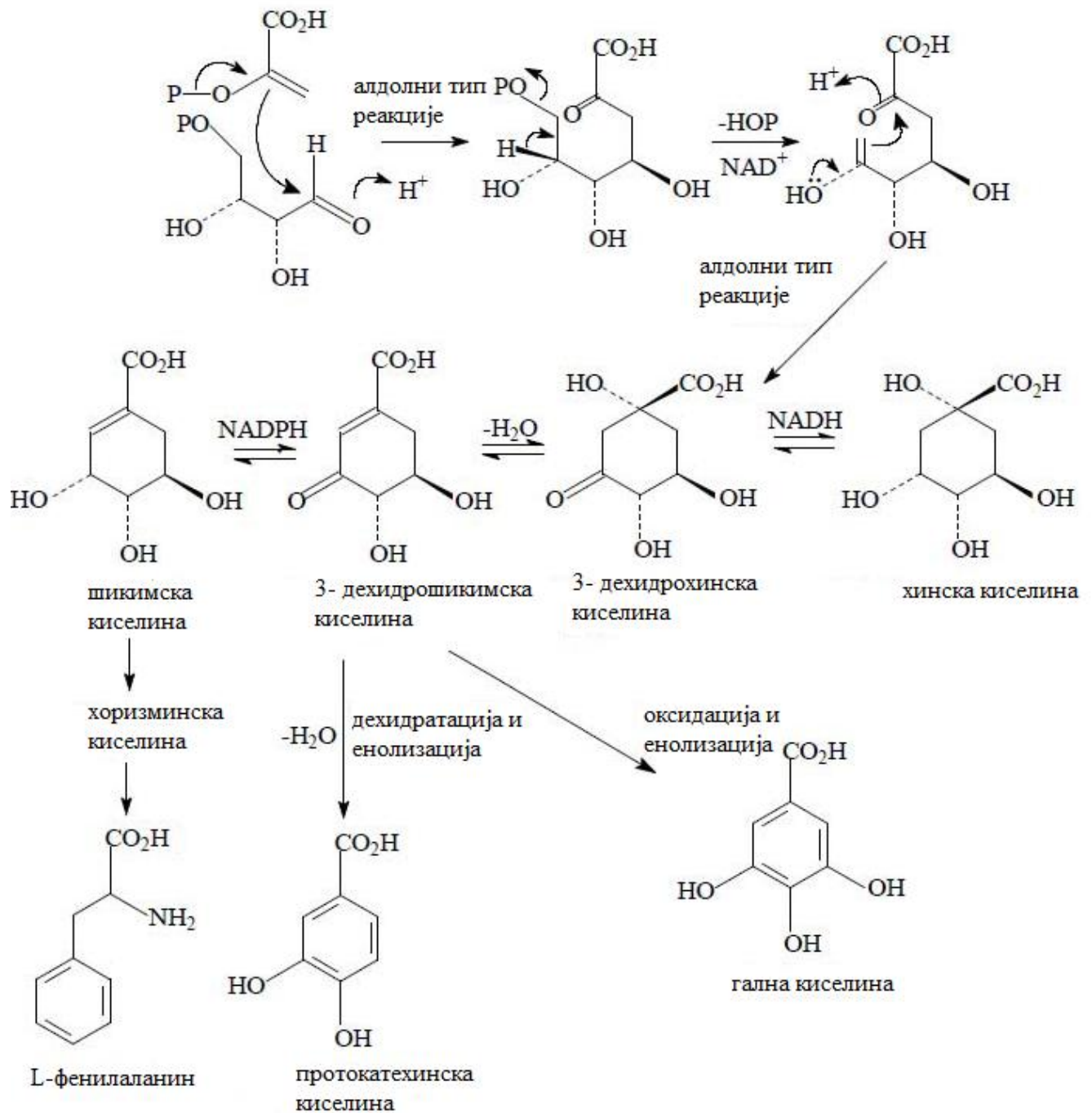
Поред биомолекула који се синтетишу у свим биљкама и чине примарни метаболизам (угљени хидрати, нуклеинске и масне киселине, аминокиселине и протеини), лековите биљке продукују и друге молекуле, који су ограничене дистрибуције, а називају се секундарним метаболитима. Неке групе секундарних метаболита се синтетишу само у одређеном биљном роду или биљној врсти, док су неке друге групе секундарних метаболита широко распрострањене у различитим биљним фамилијама (нпр. феноли, флавоноиди, антоцијани итд.). Није потпуно јасно зашто биљке продукују специфичне секундарне метаболите и која је њихова улога, али се за неке од њих зна да имају одређену функцију у самој биљци. На пример, неки секундарни метаболити су токсични и штите биљку од предатора, док су неки привлачни за инсекте и помажу опрашивање биљака [19]. Значајна фармаколошка дејства секундарних метаболита допринела су употреби лековитих биљака за различите третмане, као и за изоловање биоактивних супстанци које су нашле широку примену у модерној медицини (нпр. кодеин, дигоксин, ефедрин итд.) [20]. Најчешће присутни секундарни метаболити у биљкама су алкалоиди, фенолни хетерозиди и њихови деривати и терпени.

3.1.2. Биосинтетички путеви секундарних метаболита

Биосинтеза секундарних метаболита је процес који укључује ензимски каталисане биохемијске реакције [21]. Главни биосинтетички путеви секундарних метаболита у биљкама су:

- Пут мевалонске киселине, којим настају изопреноиди (стероиди и терпеноиди);
- Пут шикимске киселине, којим настају фенолна једињења и ароматичне аминокиселине;
- Ацетогенински пут, којим настају масне киселине, воскови, фосфолипиди, поликетиди (антрахинони, афлатоксини, макролиди) и поликетиди мешовитог порекла (флавоноиди).

Метаболички пут шикимске киселине представља главни пут биосинтезе фенолних једињења у биљкама, при чему поред настајања ароматичних аминокиселина настаје гална, протокатехинска и циметна киселина (слика 1) [22].



Слика 1. Биосинтеза фенолних једињења циклусом шикимске киселине

3.2. Полифенолни секундарни метаболити

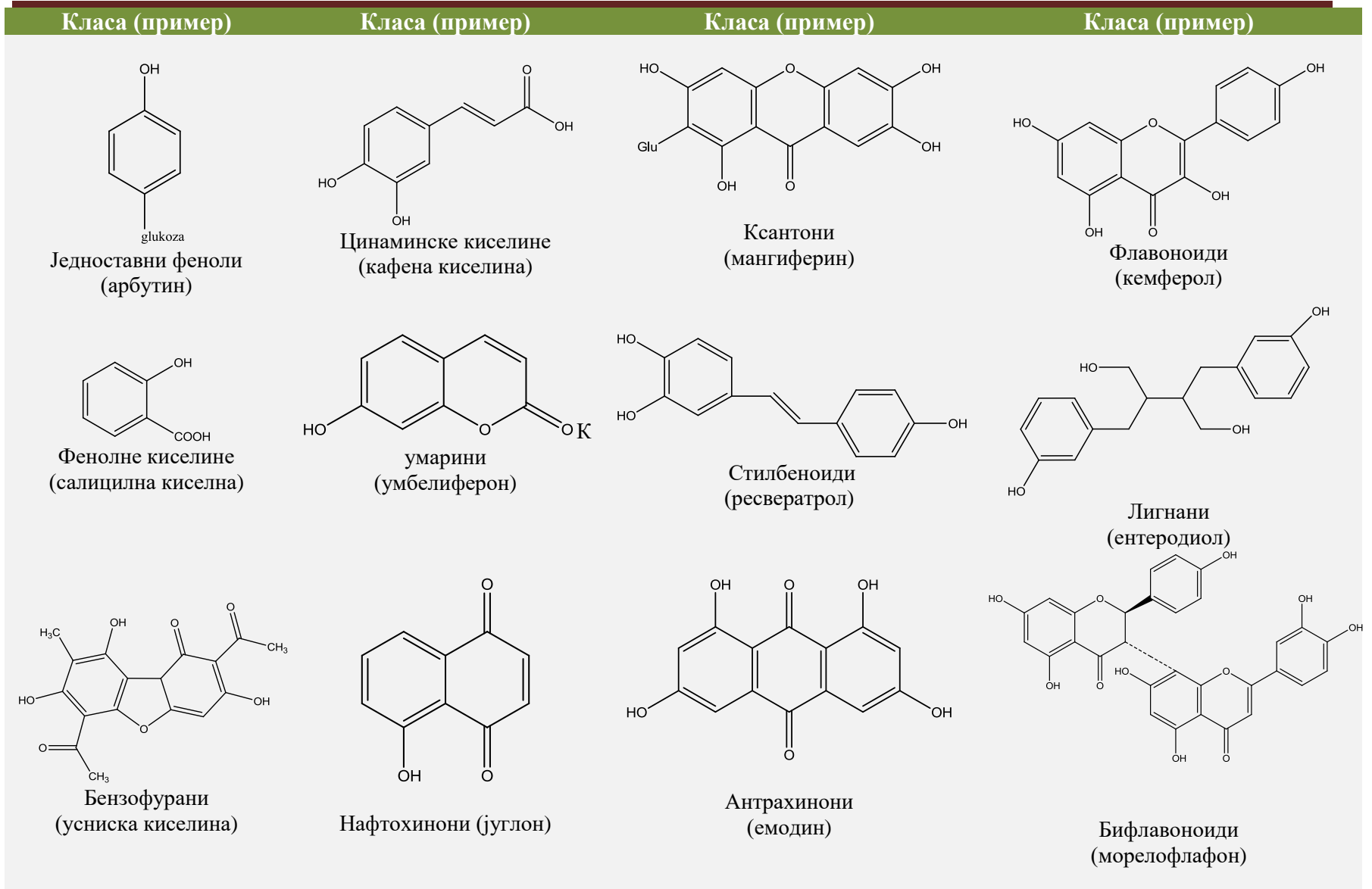
До сада је откривено око 8000 полифенолних једињења која су пореклом из биљака, а половину тих молекула чине флавоноиди [24]. Биљни феноли могу бити једноставних структура, као што су фенолне киселине, фенолпропаноиди и фенолни хинони. Важни полимерни фенолни секундарни метаболити су лигнини, танини и меланини. Такође, фенолне групе се могу наћи и у структурама алкалоида и терпена.

Фенолни молекули су одговорни за боју, мирис и укус биљака, хране и пића. Испољавају бројне биолошке активности. На пример, флавоноид кверцетин испољава антиинфламаторну активност а силибин антихепатотоксичну активност [25, 26]. Одређени изофлавоноиди, као што су генистеин и даидзеин, су фитоестрогени док остали делују као инсектициди и пестициди [27, 28]. Антоцијани су одговорни за јарке боје цветова биљака и имају јасно дефинисану функцију у привлачењу и опрашивању биљака [29]. Многа фенолна једињења су антиоксиданси и ефикасни сакупљачи слободних радикала [30].

3.2.1. Класификација фенола

Природни феноли у својој структури имају бензенов прстен и једну или више хидроксилних група. На основу растворљивости, могу се поделити на хидрофилне и липофилне. Већина полифенола су хидросолубилни молекули који се налазе у вакуалама биљне ћелије. Липофилни полифеноли се налазе у ћелијској цитоплазми, у саставу биљних воскова и екскудата [31].

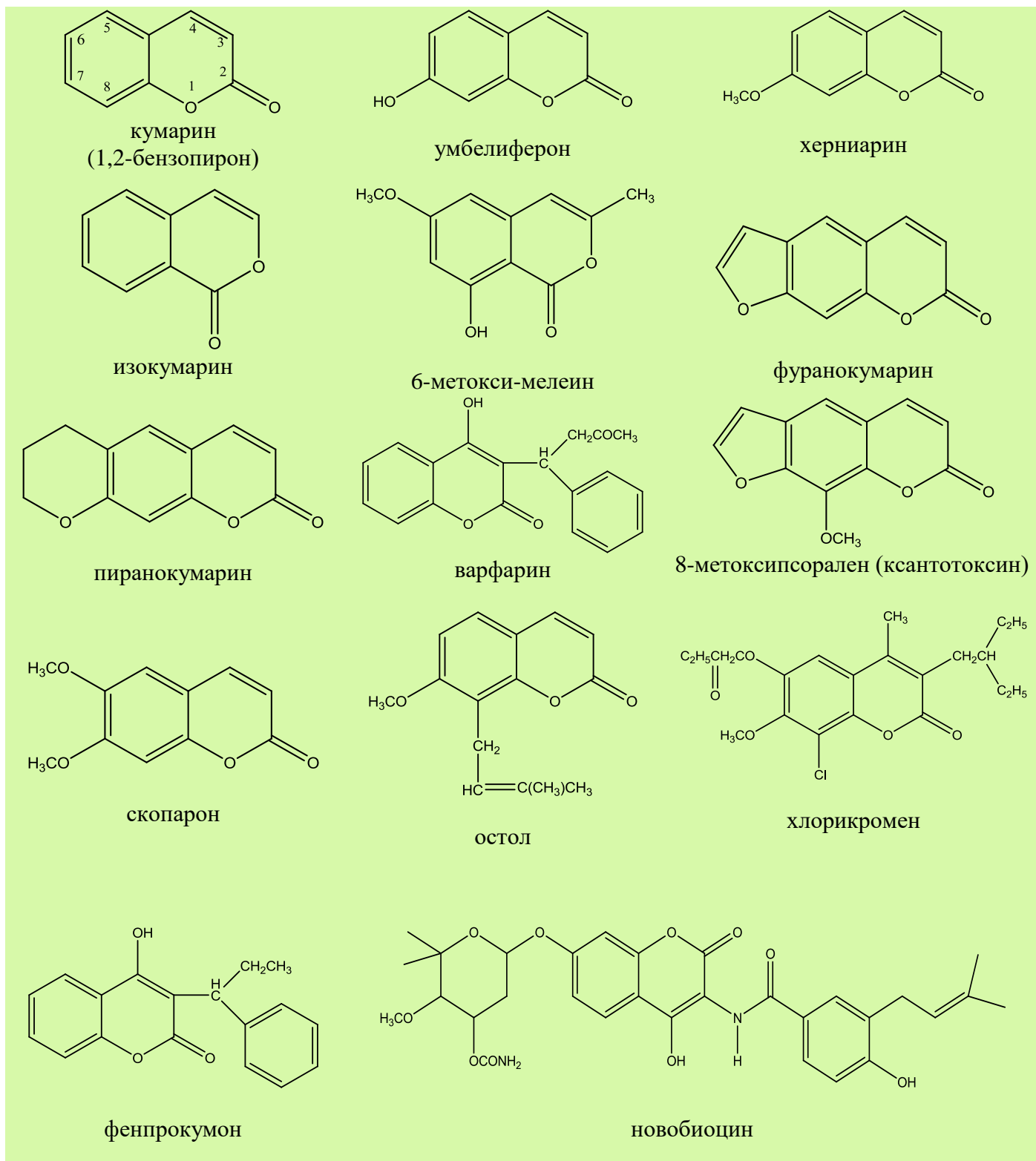
Једноставна класификација биљних фенолних једињења је веома компликована, пре свега због њиховог великог броја и разноликости. Могу се класификовати према својој структури или биосинтетичком пореклу, али ни један од ова два система није идеалан. На слици 3 су приказане основне класе природних фенола и њихови представници.



Слика 3. Основне класе и примери природних фенола

3.3. Кумарини

Кумарини су аналози бензопирона који су широко распрострањени у природи [32]. Представљају велику групу фенолних секундарних метаболита биљака који садрже бензенов и α -пиронов прстен (слика 4). До данас је откривено преко 1300 кумаринских деривата, који су углавном биљног порекла, али неке од њих могу синтетисати и бактерије и гљиве [33]. Кумарин (1,2-бензопирон) је најједноставнији кумарински молекул чијом супституцијом у различитим положајима настаје велики број кумаринских деривата. Спојени хетероциклични прстен кумарина је послужио за синтезу широког спектра аналога у циљу испитивања њихових биолошких активности. Једноставни кумарини који се најчешће срећу у природи су супституисани на положају C_7 , као што су умбелиферон и херниарин (слика 4), али до супституције може доћи и на другим положајима (најчешће на C_6 и C_8) [34]. Једноставни кумарини имају карактеристичан пријатан мирис. Тако, кумарин има карактеристичан мирис покошеног сена, а неки од осталих једноставних кумарина се могу користити у производњи парфема. Међутим, пријатан мирис се губи уколико дође до коњугације са шећерима и киселинама. Кумарин се користи као фиксатор и појачивач мириса у производњи парфема, тоалетних сапуна и детерџената, пасти за зубе, дуванским производима и неким алкохолним пићима [35, 36]. Такође, налазе примену у индустрији гума, пластичних материјала и боја као неутрализатори непријатних мириса [37, 38]. Изокумарини имају сличну структуру кумаринима (слика 4). Њихове особине и дејства нису детаљно истражени, али неки од њих показују биолошке активности. На пример, фитоалексин, 6-метокси-8-хидрокси-3-метил-3,4-дихидроксикумарин (познат и као 6-метокси-мелеин) који настаје инфекцијом корена шаргарепе, поседује добре антибиотске особине [39]. Такви молекули могу имати комерцијалну примену нарочито у погледу њихове очигледно ниске токсичности [40]. Постоје и друге супстанце које су сличне кумаринима, а поседују изражена биолошка дејства. То су фуранокумарини и пиранокумарини [41]. Биљни деривати кумарина су и псоралени, као што је 8-метоксипсорален или ксантотоксин, који има примену у лечењу инфламаторних обољења коже (у третману псоријазе) [42]. Афлатоксини су сличне структуре као и кумарини. То су фунгални метаболити из *Aspergillus* врста, који настају кварењем хране и испољавају изузетну хепатотоксичност [43].



Слика 4. Структуре једноставних кумарина и кумаринских деривата

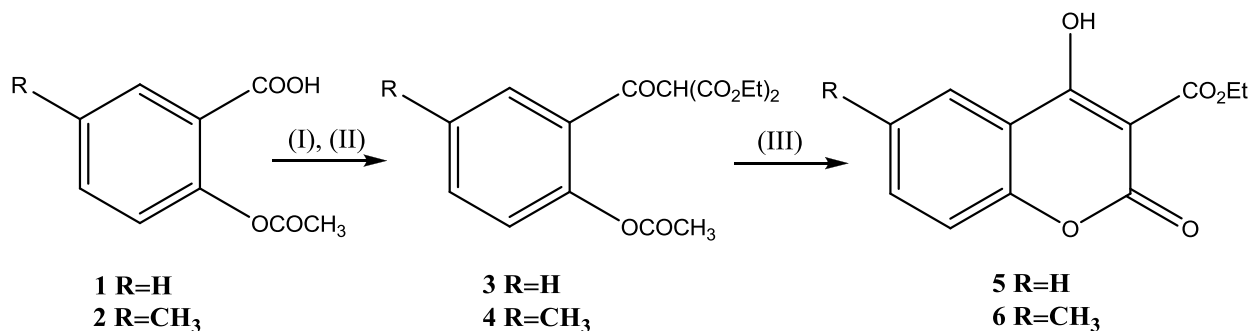
4-хидроксикумарин је „молекулски шаблон“ који је послужио за синтезу неколико фармаколошки активних кумаринских аналога. Карактеристични примери су варфарин, синтетско једињење које се користи као антикоагуланс и родентицид и фенпрокумон једињење које поседује антивирусно и анти-ХИВ дејство [44, 45]. Аминокумарински аналози, као што су новобиоцин, хлоробиоцин, кумермицин и симоциклинон, у положају С₃ имају амидну везу и моћни су антибиотици [46]. Новосинтетисани кумарински дериват, 4-хидроксикумарин-3-карбоксамид представља потенцијални лек за третман инсулин зависног *diabetes mellitus*-а [47]. Такође, синтетисана је серија нових кумаринских аналога, деривата 4-хидрокси-хинолина, који су 3-карбоксамид функционализовани и испољавају комбиноване антиоксидативне и антиинфламаторне активности [47].

Најчешће проучавани и највише испитани су једноставни кумарини, за које је показано да поседују бројна биолошка и фармаколошка дејства. Тако је потврђено да кумарини смањују отицање ткива настало услед разних болести и траума и смањењем количине протеина у ткивима, па се користе за редукцију едема и ексудације код инфламаторних процеса [48]. Скопарон (6,7-диметоксикумарин), који је изолован из кинеске биљке *Artemisia scoparia*, испољава имуносупресивно и хиполипидемијско дејство и опушта крвне судове венске циркулације [49, 50]. Кумарински дериват остол је метаболит изолован из биљке *Angelica pubescens*, која се користи у кинеској традиционалној медицини за лечење тромбозе, артритиса, лумбага и главобоље [51]. Остол инхибира агрегацију тромбоцита смањењем стварања тромбоксана, чиме је потврђено његово дејство антитромботика. Такође је утврђено да инхибира сАМР и сGMP фосфодиестеразу и редукује инфлукс калцијума у зидове крвних судова, чиме се објашњава вазорелаксантно дејство [52]. Слично дејство (антитромботско/вазорелаксантно) испољава и синтетски кумарински дериват, хлорикромен [53].

3.3.1. Кумарини као антиоксиданси

Слободни радикали и реактивне врсте кисеоника индукују оштећења биомолекула, као што су угљени хидрати, протеини, липиди и ДНК [54]. Деградација биомолекула са покретањем оксидативне ланчане реакције изазива убрзано старење и настанак бројних хроничних болести, укључујући неуродегенеративне и кардиоваскуларне болести, туморе

и инфламаторне болести [55]. Нека истраживања указују да антиоксидативна једињења спречавају неуродегенеративне поремећаје неутралисањем слободних радикала и одлажу или превенирају оксидацију наведених биомолекула [56]. Биљке су потенцијални извор природних антиоксиданаса јер садрже фенолна једињења, као што су фенолне киселине, флавоноиди и танини [57]. До сада су спроведена бројна истраживања антиоксидативних активности изолованих кумаринских деривата како би се окарактерисао антиоксидативни профил ових молекула. Утврђено је да неки природни кумарини утичу на продукцију реактивних врста кисеоника и њихово прикупљање и смањују оксидативна оштећења настала дејством слободних радикала [48]. Више студија је показало да ови природни антиоксиданси испољавају вишеструке фармаколошке активности, укључујући антитуморске, неуропротективне и антиинфламаторне активности које могу бити у вези са њиховим антиоксидантним својствима [58, 59]. Коришћењем комерцијално и лако доступних материјала, уз једноставну методологију, могуће је синтетисати нове кумаринске аналоге са потенцијалном антиоксидативном активношћу [60]. На пример, функционализацијом, а потом кондензацијом ацетил салицилне киселине, уз одговарајуће услове реакције могу се синтетисати кумарински деривати (3-етоксикарбонил-4-хидроксикумарин) који имају изражену антиоксидативну активност (слика 5) [47].



Слика 5. Синтеза 3-етоксикарбонил 4- хидроксикумарина.

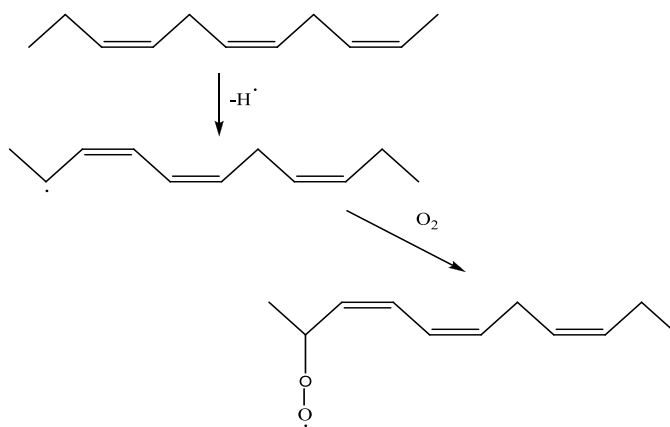
(Реагенси: (I) *N*-хидроксизототриазол, *N,N*- дициклохексилкарбодиаמיד, (II) NaH, диетил малонат, (III) HCl/MeOH 10%.)

Сви ови подаци илуструју широк спектар фармаколошких и биолошких активности које се могу приписати кумаринима. Евидентно је да једноставни кумарини испољавају различите фармаколошке и биолошке особине, од којих неке могу бити од потенцијалног

фармацеутског значаја. Низак степен токичности, широко присуство у исхрани и биљним препаратим као и релативно јефтино добијање су чињенице које указују на значај даљег испитивања кумаринских деривата и њихове даље примене у фармацији. Може се закључити да је од великог значаја подизање свести о корисним ефектима природних антиоксиданаса и њиховој заштитној улози.

3.4. Оксидативни стрес и пероксидација липида

Пероксидација липида се сматра главним механизмом који је укључен у оксидативна оштећења ћелијских структура која доводе до токсичних ефеката и смрти ћелија. Пероксидација липида је сложен процес који укључује продукцију слободних радикала са разарањем мембранских липида и ослобађањем разних деградационих производа (алкохоли, алдехиди, кетони, алкани и естарски радикали) [61]. Ћелијске мембране и органеле садрже незасићене масне киселине и стално су изложене разним врстама оштећења, пре свега од стране реактивних кисеоничних и азотних врста. Оксидативни стрес подразумева стање у ком постоји дисбаланс повећане продукције оксиданаса или смањене продукције антиоксиданаса [62]. Пероксидација липида је ланчана реакција иницирана издвајањем водоника. Молекулски кисеоник се брзо адира на угљеник радикал настао у овом процесу, при чему настаје пероксирадикал (слика 6).



Слика 6. Почетна фаза липидне пероксидације

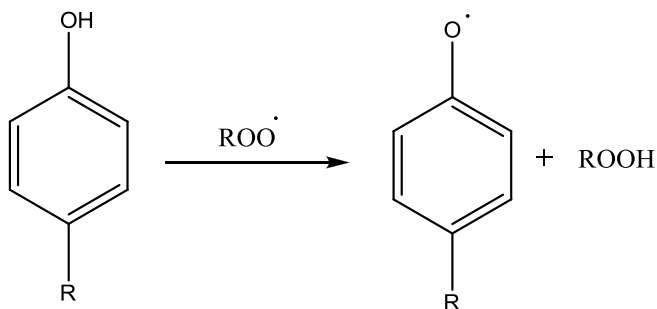
Формирање пероксирадикала доводи до производње органских хидропероксида који пропацијом, могу одузимати водоник из следеће полинезасићене масне киселине. Слободнорадикалска ланчана реакција се може прекинути коњуговањем два слободна

радикала или је може прекинути антиоксиданс (на пример, витамин Е) [63]. Пероксидацијом липида долази до смањења флуидности мембране, а производи који настају пероксидацијом инхибирају синтезу протеина, хемотактичких сигнала и активност ензима. Појава липидне пероксидације унутар биолошких мембрана је повезана са променама у физичко-хемијском саставу и изменама биолошких функција липида и протеина. Полинезасићене масне киселине имају улогу у снабдевању ћелије енергијом, улазе у структуру мембрана, регулишу њихову флексибилност и пропустљивост, учествују у сигналним ћелијским путевима и учествују у експресији гена [64]. Самим тим, њиховом пероксидацијом долази до оштећења на готово свим нивоима ћелије. Истраживања су показала да пероксидација липида има битну улогу у патогенези различитих болести, укључујући неуродегенеративне, инфламаторне, инфективне, кардиоваскуларне и болести бубрега [65-68].

3.4.1. Феноли као инхибитори липидне пероксидације

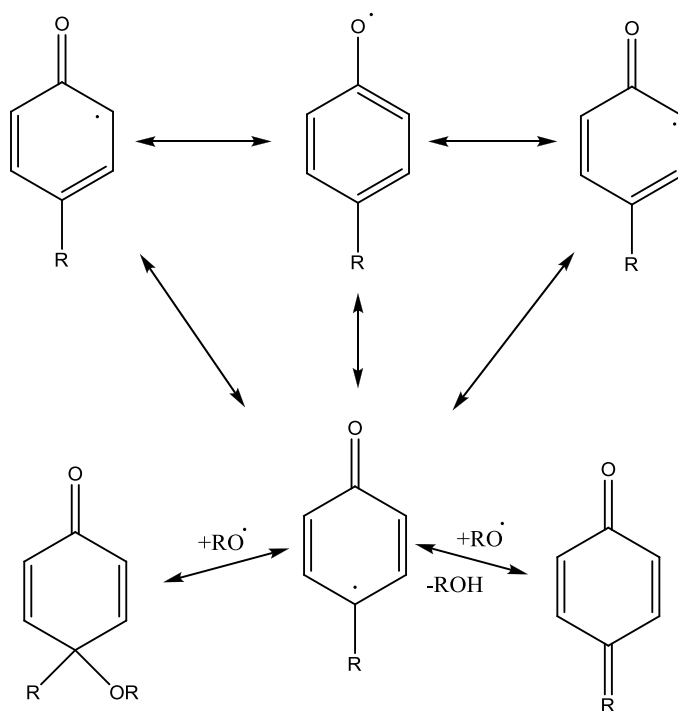
Оксидовани липопротеини мале густине (LDL) имају атерогена својства преко формирања липидних пероксида и њихових продуката. Оксидативно модификовани LDL могу лако фагоцитовати макрофаги при чему долази до формирања пенстих ћелија које су рани маркер развоја атеросклероматозних лезија. Антиоксидативни статус плазме и LDL-а су важне детерминанте у осетљивости LDL-а према пероксидацији [69]. Витамин Е (α -токоферол) је фенолни молекул који се уноси у организам преко хране или дијететских суплемената, а игра значајну улогу у отпорности LDL-а према пероксидацији [70]. Поред α -токоферола и остала биљна једињења, нарочито из група фенола и флавоноида, имају значајну улогу у заштити липидних компоненти од оксидације, па самим тим испољавају и кардиопротективно дејство.

Феноли су антиоксиданси који делују као донори водоника [71]. Они реагују са пероксирадикалима формирајући хидропероксиде прекидајући ланчану реакцију. $ROO\cdot$ радикали се неутралишу следећом реакцијом:



Слика 7. Реакција пероксирадикала и фенола

Генерисани фенокси радикал је веома стабилан због способности грађења више мезомерних облика:



Слика 8. Различити стабилни мезомерни облици феноксирадикала

Одређене студије су показале позитиван однос кардиопротекције са повећаним уносом флавоноида и фенола из хране (лук, јабуке, чај, црвено вино) [72-74]. Састојци црвеног вина су посебно интересантни због „Француског парадокса“, којим је показано да је смртност од коронарних болести код особа из јужних делова Француске ниска упркос исхрани са повећаним уносом масти [74]. Са друге стране, у овој популацији се редовно и умерено конзумира црвено вино што указује на повољне ефекте конституената вина

(садржи велику количину полифенола, од 1,0 до 1,8 $\mu\text{g/ml}$) на крвне судове. Липопротеини мале густине у свом спољашњем омотачу садрже α -токоферол, главни липофилни антиоксиданс, док се у унутрашности налазе каротиноиди [75]. Слободни радикали, преко пероксидације полинезасићених масних киселина доводе до формирања липидних пероксида. Фенолни антиоксиданси смањују количину слободних алкокси и перокси радикала редукујући их до алкоксида и пероксида. Самим тим, имају битну улогу у процесу пероксидације липида. Истраживања су показала да одређени полифенолни конституенти биљака су *in vitro* снажнији од антиоксиданаса као што су витамини С и Е, што наводи на закључак да могу имати изузетне заштитне ефекте *in vivo* [76]. Самим тим, од великог значаја су даља испитивања антиоксидативних дејстава биљака и њихових конституената, нарочито оних недовољно истражених.

3.5. Секундарни метаболити биљака као извор нових антимикуробних агенаса

Инфективне болести су још увек водећи узрок морбидитета и морталитета широм света, упркос великом напретку медицинске технологије и научних сазнања о инфективним агенсима и механизмима настанка инфективних болести [77]. Након открића првог антибиотика, пеницилина 1929. године, дошло је до револуције развоја антибиотика у модерној медицини. Међутим, у протеклих неколико деценија дошло је до пораста глобалне инциденце резистенције микроорганизама на антимикуробне агенсе [78, 79]. Резистенција микроорганизама на агенсе који се тренутно налазе у употреби је све већа па се намеће потреба за континуираним проналаском нових, антимикуробних једињења [80]. Природни биљни производи су се вековима користили у лечењу различитих болести, укључујући и инфективне [81-84]. Поред синтетских молекула, природни производи се још увек сматрају главним извором нових и иновативних терапијских агенаса са широким спектром дејства, укључујући и заразне болести [85]. Међу савременим антифунгалним агенсима, који се данас налазе у употреби, око 40% су пореклом из природе [86]. Проналазак нових антибиотика укључује скрининг секундарних биљних метаболита и испољавање њихове фармаколошке активности према патогенима. Природни производи представљају обећавајући извор средстава широког антимикуробног дејства која се могу искорисити у дизајну нових антибиотика, као суплементи

антибиотицима или као средства за дезинфекцију и спречавање ширења отпорних микробиолошких сојева [87-89].

3.6. ТАКСОНОМИЈА, ДИСТРИБУЦИЈА И ОПИС РОДА *DAPHNE*

3.6.1. Таксономија и дистрибуција

Таксономија рода *Daphne* је врло сложена и компликована због постојања великог броја врста и подврста. Род *Daphne* припада фамилији *Thymeleaceae* која обухвата 44 родова са приближно 500 биљних врста [90]. Примарни центар еволуције овог рода била је Кина [91]. Род обухвата 95 врста које су углавном дистрибуиране у Европи, субтропском делу Азије, Северној Африци и Аустралији [92, 93]. Поједине *Daphne* врсте су ендемичне и јављају се само на одређеним локалитетима. У флори Европе, до сада је евидентирано присуство 17 врста овог рода [94]. Таксономија рода *Daphne* се огледа у следећој подели:

Табела 1. Филогенетско стабло рода *Daphne*

Таксономска категорија	Таксон
Царство	<i>Plantae</i>
Раздео	<i>Magnoliophyta</i>
Класа	<i>Magnoliopsida</i>
Ред	<i>Malvales</i>
Фамилија	<i>Thymelaeaceae</i>
Род	<i>Daphne</i>

3.6.2. Опис биљних врста рода *Daphne*

Биљке из рода *Daphne* су мали жбунови или ниско дрвеће са ретким гранама [91].

Предмет истраживања ове докторске дисертације су три врсте овог рода са стаништем на територији Србије: *Daphne blagayana* L., *Daphne sneorum* L. и *Daphne alpina* L.

3.6.2.1. *Daphne blagayana* L.

Daphne blagayana L. (ременик, ликовац, опутник, јеремичак) је први пут описана од стране словеначког ботаничара Хенрик Фреуер-а 1837. године [95]. То је зимзелени вишегодишњи полегли грм, жутобелих миришљавих цветова, висине до 30 центиметара (слика 9) [96].



Слика 9. *Daphne blagayana* L.

D. blagayana је распрострањена у западним деловима Србије и просторима бивших југословенских република, простору Албаније, Бугарске, Румуније, Грчке и Италије [97-99].

3.6.2.2. *Daphne sneorum* L.

Daphne sneorum L. (црвени усколисни ликовац, црвени јеремичак) је зимзелени грм висине 10–40 центиметара, дугих, танких и глатких грана. Листови су јајасте, наизменични, седећи, кожасте и крути, са горње стране тамнозелени, глатки и сјајни, док

су са доње стране зеленкастоплави. Цветови су ружичасто-беле боје и пријатног мириса (слика 10).



Слика 10. *Daphne sneorum* L.

Ова врста је распрострањена у западној, централној и источној Европи, Средоземљу, Малој Азији, а у нашој земљи се може наћи на планинама Ртањ и Сувој планини као и региону Рашке [100, 101].

3.6.2.3. *Daphne alpina* L.

Daphne alpina L. је усправан, листопадни жбун висине од 20 до 50 центиметара. Цветови су зеленкасто бели, груписани у цвасти (слика 11). Јавља се у пределу јужне и централне Европе. На нашим просторима се може наћи на високим планинама централне и југозападне Србије [101, 102].



Слика 11. *Daphne alpina* L.

3.7. БИЉНЕ ВРСТЕ РОДА ДАРНЕ: ФАРМАКОЛОШКИ СКРИНИНГ И УПОТРЕБА У ТРАДИЦИОНАЛНОЈ МЕДИЦИНИ

Биљне врсте рода *Daphne* налазе примену у традиционалним методама лечења, а нарочито су заступљене у кинеској традиционалној медицини као и традиционалној медицини тропског дела африке [103]. Такође, спроведено је доста истраживања која указују на биопотенцијал ових врста као извор фармаколошки активних једињења и која указују на велики значај овог рода због испољавања медицинских дејстава и биолошких активности. До сада је истражено близу половине биљака овог рода али и даље постоји велики потенцијал истраживања у циљу проналажења нових природних биоактивних молекула [104].

Daphne oleoides. Корен *D. oleoides* се користи као пургатив, а кора и листови у третману оштећења коже и чирева. Инфуз листова ове биљке се користи у лечењу гонореје и абсцеса [105]. Надземни делови *D. oleoides* се користе у турској традиционалној

медицини за лечење реуматских болова, лумбага и повишене температуре. Екстракти *D. oleoides* показују антиинфламаторна и антитуморска дејства [106]. Истраживањем које су спровели Yeşilada и сар. (2001) показано је да активне једињења изолована из ове биљке, генквадафнин и 1,2-дехидродафнетоксин су примарне биоактивне компоненте које снажно инхибирају цитокине од којих зависи активност макрофага [107].

Daphne genkwa. Цветови *D. genkwa* се користе као диуретик, антитусик, експекторанс, антиканцерогено и антиинфламаторно средство у кинеској и кореанској традиционалној медицини [108]. У кинеској традиционалној медицини, цветови *D. genkwa* се користи за ублажавање симптома реуме. Новија истраживања су показала да цветови *D. genkwa*, који углавном садрже флавоноидна једињења, испољавају антиинфламаторну, аналгетску и имуномодулаторну активност [109]. Цветови *D. genkwa* су богати флавоноидима. Флавоноидна фракција изолована из цветова ове биљке, коју чине лутеолин, апигенин, хидроксигенкванин и генкванин, показује значајне терапијске ефекте код индукованог артритиса на мишевима, без очигледних нежељених ефеката. Овај антиреуматоидни ефекат се може приписати антиоксидативној и имуномодулаторној активности као и модулацији вискозитета крви. Овакав ефекат ове групе флавоноида може наћи потенцијалну терапијску примену код пацијаната са реуматоидним артритисом [110]. Метанолски екстракт цветних пупољака *D. genkwa* показује инхибиторни ефекат на продукцију азот монооксида (NO) који има битну улогу у неуротрансмисији, регулацији крвног притиска и одбрамбених механизма ћелије. Међутим, његова неконтролисана продукција доводи до настанка инфламаторних болести. Смањењем продукције NO се објашњава антиинфламаторно дејство метанолског екстракта цветних пупољака *D. genkwa*, односно конституената које садржи [111].

Daphne odora. У традиционалној кинеској медицини, корен врсте *D. odora* је коришћен за лечење болова у стомаку, модрица и уједа змија отровница, док су листови коришћени за лечење абсцеса и неуралгија [112].

Daphne acutiloba. Корен и кора врсте *D. acutiloba* се у кинеској традиционалној медицини, под именом „jin yao dai“ користе за лечење модрица и скрофуле (лимфаденитис цервикалних чворова повезан са туберкулозом) [113].

D. feddei, која садржи полифункционалне дитерпене дафнан типа, поред иритирајућег дејства на кожу, показује и корисна дејства, као што су имуностимулативно и антинеопластично [114].

Daphne gnidium. У народној медицини, инфуз листова врсте *D. gnidium* се користи као хипогликемични препарат и за лечење болести коже. Ова биљка се традиционално користи као средство за бојење у текстилној индустрији. Међутим, употреба ове врсте се сматра опасном, због испољавања токсичности. Њена употреба може да доведе до главобоље, бледила, дрхтавице, отока уста и усана, конвулзије па и смрти [115]. Анализом метанолског екстракта гранчица *D. gnidium*, показано је да екстракт испољава веома добру антимикробну активност, нарочито према бактеријама *Bacillus lentus* и *Escherichia coli*, док екстракт није показао антигљивичну активност. Дафнетин, генкванин и 2,5,7,4'-тетрахидрокси флаванол су једињења из екстракта која су показала најјачу активност [116].

Daphne retusa. Ова врста је део “*Zhu Shi Ma*” кинеске традиционалне медицине и користи се за лечење реуматизма, смањивање отока и бола код пријапизма, док њен етанолски екстракт показује антиинфламаторну и антианалгетску активност. Резултати испитивања токсичности етанолских екстракта *D. retusa* на мишевима су показали ниску токсичност што обезбеђује фармаколошку оправданост традиционалне употребе ове биљке у третману инфламаторних и болних стања [117].

Daphne mucronata. Користи се у традиционалној медицини за лечење тумора и обољења коже [118]. Водено-етанолски екстракт ове врсте показује цитотоксичну активност, посебно на ћелијским линијама рака дојке. Екстракт такође показује и антилеукемијну активност нарочито на U937 ћелијским линијама. Етанолски екстракти добијени из врсте *D. mucronata* показују антимикробну активност према грам позитивним бактеријама (*E. coli* и *S. aureus*) [119].

Daphne pontica. Екстракти различитих делова врсте *D. pontica* испољавају антиинфламаторну и антиноцицептивну активност [120].

Водено алкохолни екстракт *D. mezereum* је показао антилеукемијну активност на P-388 лимфоцитним ћелијама мишева. Активно једињење, мезереин, које је изоловано из

ове биљке, показало је значајан инхибиторни ефекат против *P-388* и *L-1210* типа ћелија код мишева оболелих од леукемије у дози од 50 µg [121, 122].

D. giraldii испољава фармаколошко дејство хемостатика [123].

Daphne altaica. Користи се у кинеској традиционалној медицини користи у лечењу канцера једњака и желуца, трахеитиса, грознице, упале грла, уједа змије, а користи се и као антитусик и диафоретик [124]. Екстракти коре *D. altaica* испољавају антипролиферативни ефекат па се могу сматрати потенцијалним извором антиканцерогених супстанци [125].

D. papuracea, односно флавоноидна једињења која се налазе у њој, испољавају седативни и хипотензивни ефекат [126]. Њени етанолски екстракти показују јако цитотоксично дејство [127].

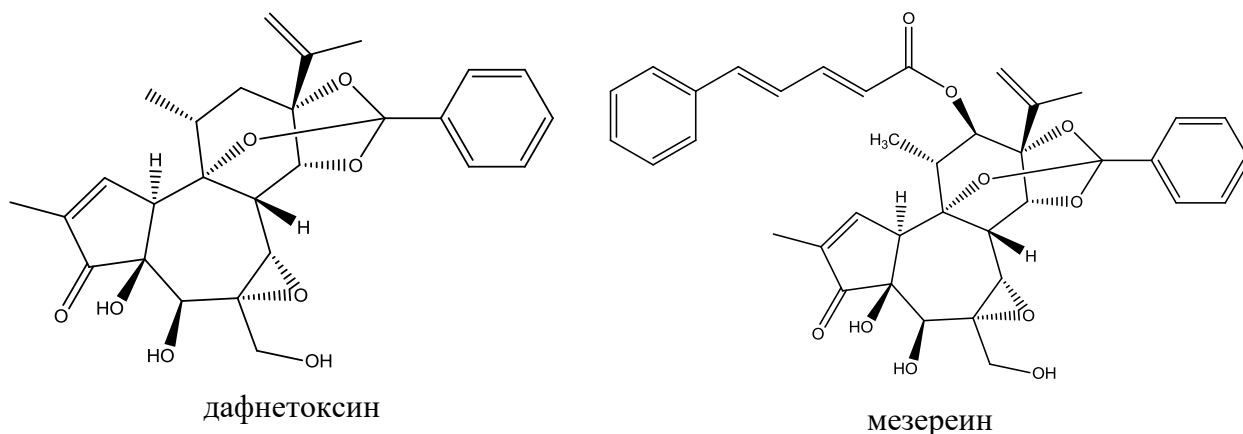
Daphne acutiloba се у традиционалној медицини користи за лечење рана и модрица [113].

Метанолски екстракт *D. acuminata* испољава хипотензивно и кардиотоксично дејство [128].

Екстракти *D. papuracea*, односно флавоноиди као главни конституенти, испољавају седативни и хипотензивни ефекат [129]. Етанолски екстракти ове биљке су показали значајну антитуморску активост [127].

3.7.1. Токсични ефекти врста рода *Daphne*

Поједине врсте из рода *Daphne*, као што су *D. laureola*, *D. mezereum* и *D. gnidium* су изузетно отровне, уколико се унесу *per os* [130]. Токсична једињења се налазе у свим деловима биљке, кори, стаблу, листовима, а нарочито у бобицама. Симптоми тровања приликом интерног уношења су бројни а укључују: главобољу, повраћање, пролив, дрхтавицу а у тежим случајевима тровања може доћи до коме и смрти. (131) Нарочито су опасна тровања деце, уколико дође до ингестије свежих бобица ових биљака. Отровност ових биљака потиче од једињења комплексне структуре- мезереина и дафнетоксина [132, 133] (слика 12).



Слика 12. Структуре токсичних метаболита у *Daphne* врстама

Специфични антидот за лечење тровања овим врстама не постоји, већ се користе опште методе детоксикације.

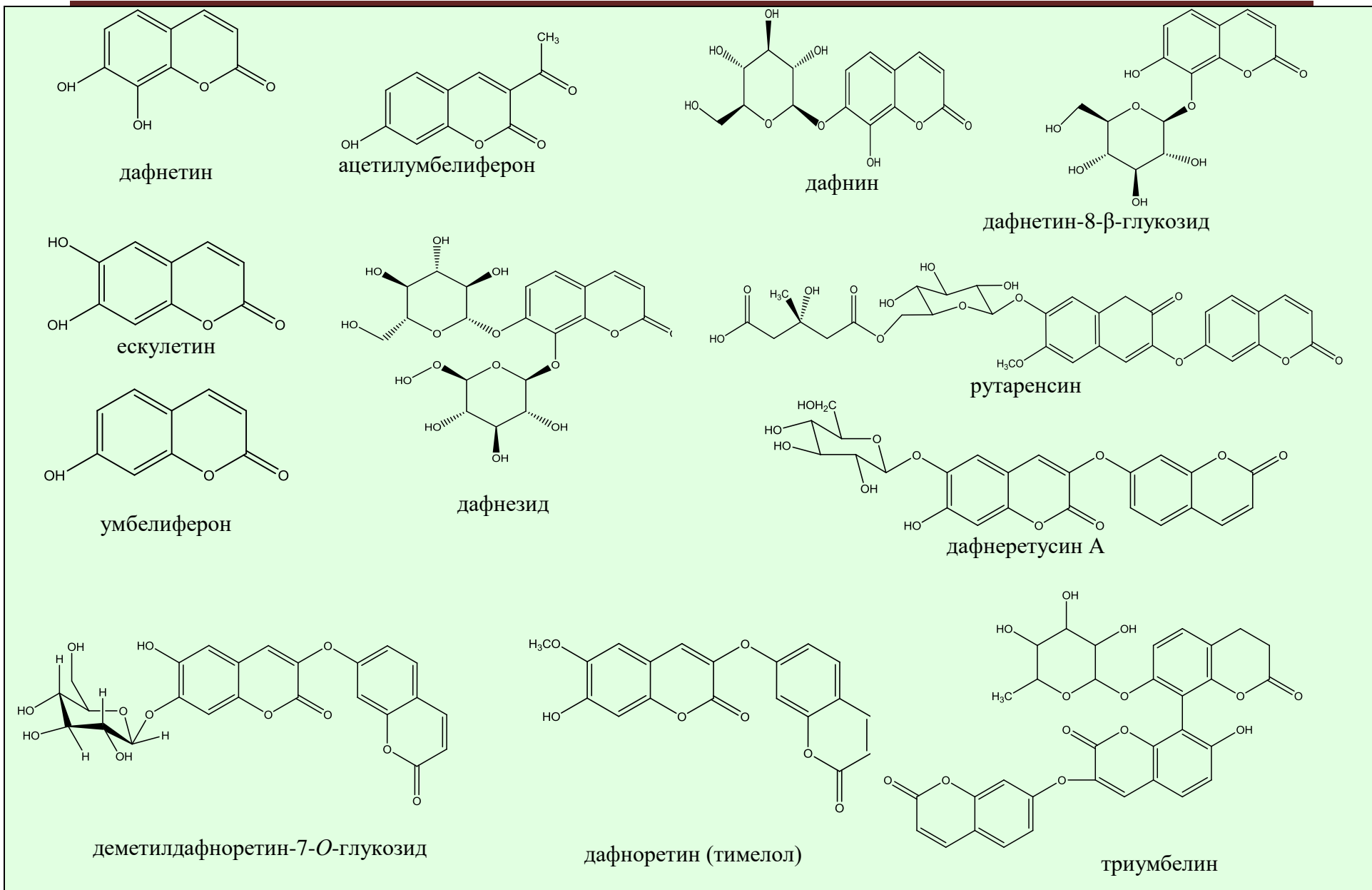
3.8. ХЕМИЈСКИ КОНСТИТУЕНТИ ВРСТА РОДА *DAPHNE* И ЊИХОВЕ БИОЛОШКЕ И ФАРМАКОЛОШКЕ АКТИВНОСТИ

Истраживања спроведена у последњем периоду указују на значајан потенцијални фармаколошки значај појединих врста из рода *Daphne* [106, 108, 110, 115, 120]. Досадашњим истраживањима је утврђено присуство молекула и деривата који припадају различитим класама секундарних метаболита. Присутни су кумарини и кумарински деривати, различита фенолна једињења, флавоноиди и флавоноидни деривати, терпени (сесквитерпени, дитерпени и тритерпени), лигнани и лигнини. Значај и интересовање за врсте рода *Daphne* је све већи због информација које указују на бројна корисна медицинска дејства која могу бити од потенцијалног клиничког значаја.

3.8.1. Кумарини

Један од првих изолованих метаболита (тридесете године XX века) је кумарински хетерозид дафнин, чије је присуство потврђено у неколико врста рода *Daphne* [134]. Од тада је откривено присуство већег броја кумаринских деривата у овим врстама, који се налазе како у облику агликона, тако и у облику хетерозидно везаних метаболита. У врстама рода *Daphne* је до сада откривено око 50 кумаринских метаболита. Присутни су једноставни кумарини као и димерни и тримерни кумарински деривати. Од једноставних

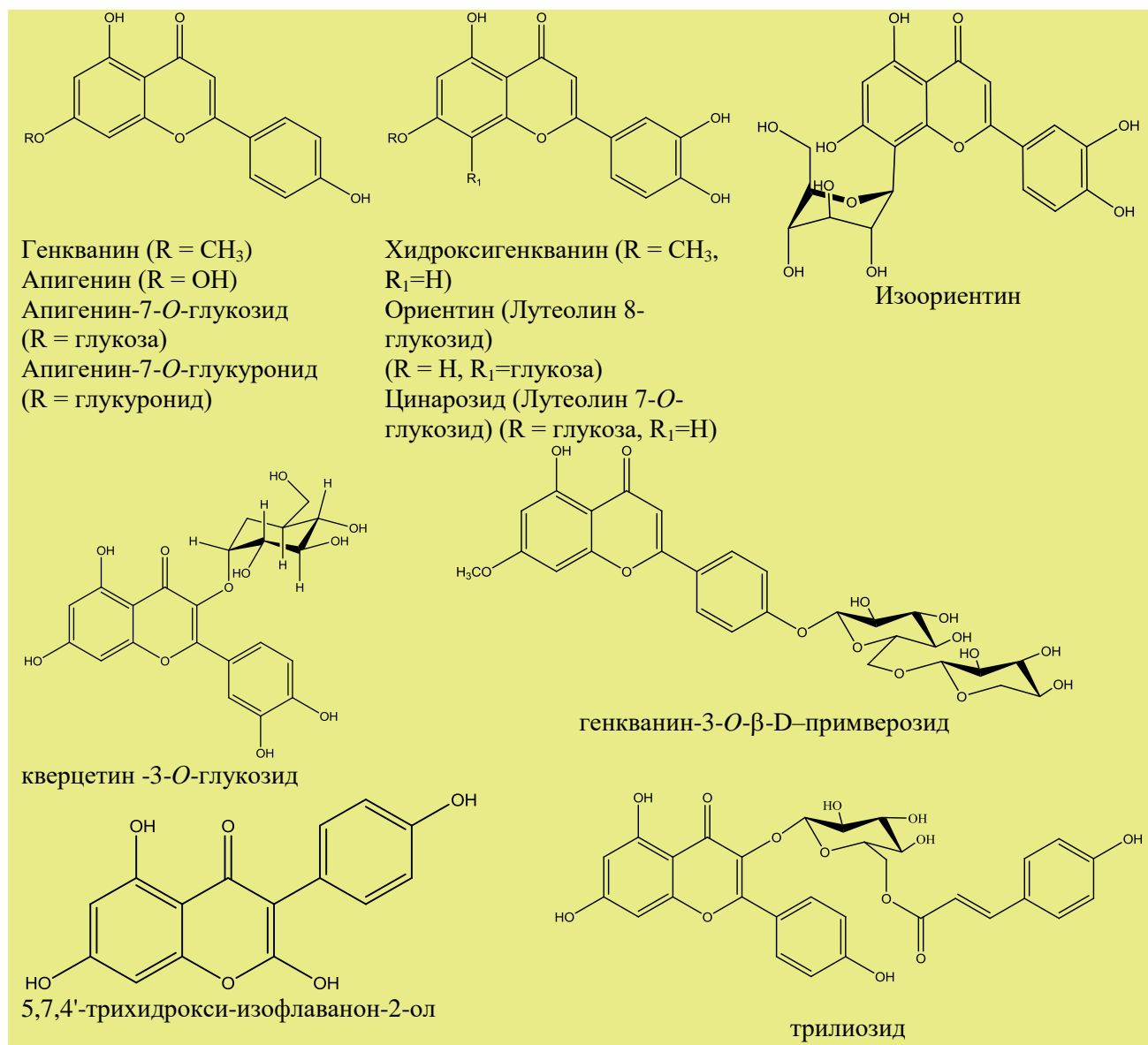
кумарина у *Daphne* врстама јављају се: дафнетин и његови гликозидно везани облици (дафнетин-8- β -глукозид, дафнин и дафнезид), умбелиферон и ацетилумбелиферон [116, 134-136]. Примери димерних (*bis*) кумарина присутних у овим биљкама су: рутаренсин, деметилдафноретин-7-*O*-глукозид, дафноретин (тимелол) и дафнеретусин А [104, 109]. Дафноретин показује добру антитуморску активност. Испољава ефекат на заустављање ћелијског циклуса људског остеосаркома у Г2 фази и покреће апоптозу преко каспаза-3 зависног пута [137]. Дафнеретусин Б (изолован из *D. retusa*) и триумбелин су тримерни кумарински метаболити присутни код врста *D. mezereum* и *D. oleoides*. Дафнеретусини А и Б показују антиоксидативно дејство [104]. Структуре најчешће присутних једињења кумаринске природе у *Daphne* врстама приказане су на слици 13.



Слика 13. Кумарини и кумарински деривати присутни у *Daphne* врстама

3.8.2. Флавоноиди

Досадашњим истраживањима је потврђено присуство флавоноида и флавоноидних деривата у различитим деловима врста из рода *Daphne*. Присутни су агликони једноставних флавоноида, флавоноидни хетерозиди, изофлавоноиди као и дафнодорини и њима слични спиробифлавоноиди. Од једноставних флавоноида идентификована су следећа једињења: апигенин и његови хетерозиди (апигенин-7-*O*-глукозид и апигенин-7-*O*-глукуронид), генкванин и хидроксигенкванин, ориентин и изоориентин, лутеолин 7-*O*-глукозид (цинарозид), кверцетин-3-*O*-глукозид и генкванин-3-*O*- β -*D*-примверозид. Од изофлавоноидних метаболита у *Daphne* врстама јавља се 5,7,4'-трихидрокси-изофлаванон-2-ол [109, 110, 112, 116, 138]. Њихове структуре су приказане на слици 14.

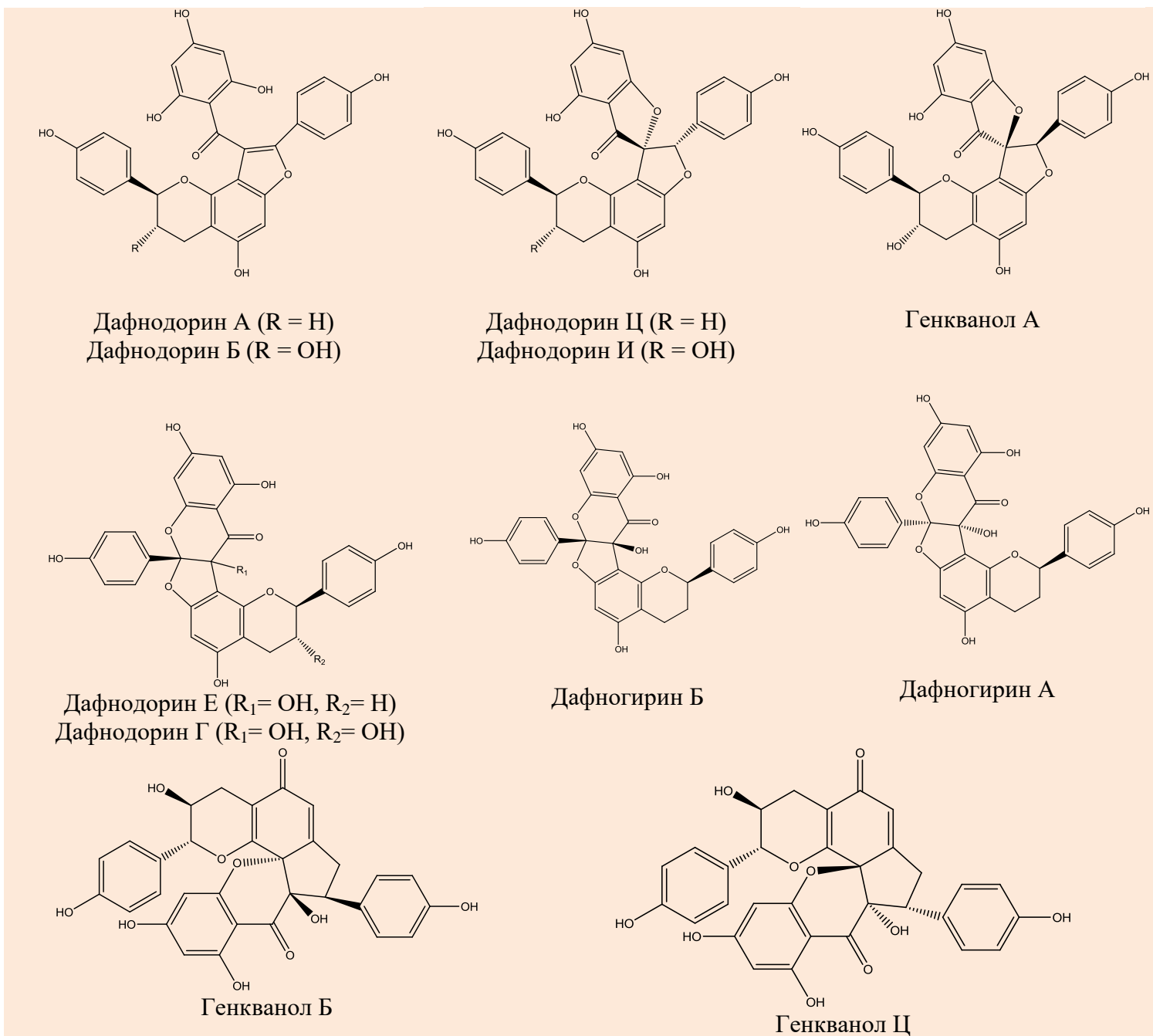


Слика 14. Најчешће заступљена флавоноидна и изофлавоноидна једињења у *Daphne* врстама

3.8.3. Бифлавоноиди (спиробифлавоноиди)

Дафнодорини и њима слични бифлавоноиди, генкваноли и дафноригини, су специфични секундарни метаболити присутни у фамилији *Thymelaesae* који садрже 2,3-функционализовану бензофуранску групу (слика 15). Дафнодорин А је први пут изолован из врте *D. odora* и утврђено је да испољава бројне биолошке активности, укључујући инхибицију α- глукозидазе, K⁺-АТФ инхибицију, анти-ХИВ активност, антифунгалну и инсектицидну активност, 12- липооксигеназа и циклооксигеназа инхибиторну активност и

антитуморску активност [139, 140]. Поред дафнодорина А из екстракта врте *D. odora* изоловани су и дафнодорини Б, Ц, Е, Ф, Г, Х, И, Ј, К, Л [141]. Метанолски екстракт *D. acutiloba* садржи дафнодорине М и Н [113]. Спиробифлавоноиди, генкванол Б и Ц као и јуанхуанин (3'-хидроксигенкванин-5-О-глукозид су изоловани из *D. genkwa* и испољавају цитотоксично дејство [142].



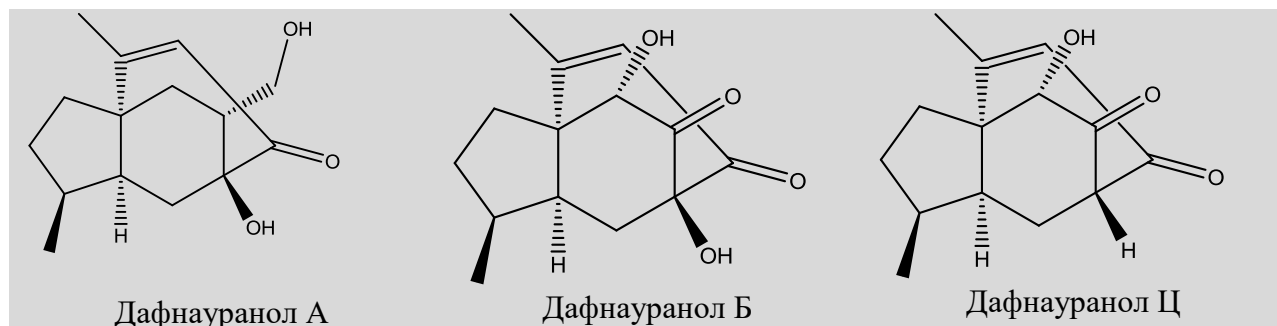
Слика 15. Бифлавоноидни секундарни метаболити у у *Daphne* врстама

3.8.4. Терпени

Поред флавоноида и кумарина, терпенски секундарни метаболити се врло често јављају као конституенти различитих делова врста из рода *Daphne*. Моно и сескви терпенска једињења најчешће улазе у састав етеричних уља добијених из цветова ових врста дајући им карактеристичан мирис [143]. Као терпенски конституенти екстраката добијених из осталих делова ових врста јављају дитерпени и тритерпени.

3.8.5. Сесквитерпеноиди

Дафнаураноли (А-Ц) су биоактивни трициклични сесквитерпени који су 2014. године изоловани из *D. aurantiaca* (слика 16). За сада је испитана њихова инсектицидна активност, која је на значајном нивоу, па могу наћи примену у заштити биљака од штетних инсеката као нетоксична, безбедна и биоразградива алтернатива синтетским пестицидима [144].

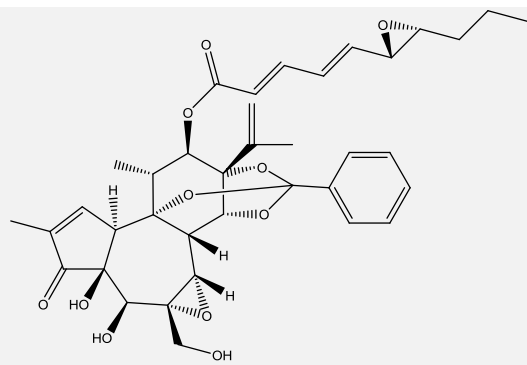


Слика 16. Структуре дафнауранола

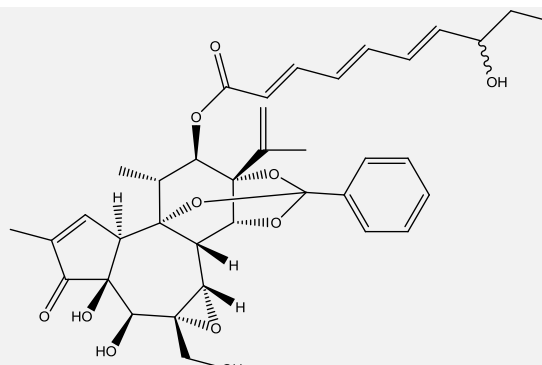
3.8.6. Дитерпени дафнанског типа

Дитерпенски естри дафнан типа су првенствено изоловани из врста које припадају фамилији *Thymeleaceae* а само неколико њих је откривено у врстама из фамилије *Euphorbiaceae*. Представљају главни тип познатих биљних ортоестара и испољавају бројне биолошке активности: цитотоксичну, неуротрофну, контрацептивну, инсектицидну, антихипогликемичну и антиХИВ [145-147]. У ову групу молекула спадају и акутилобини

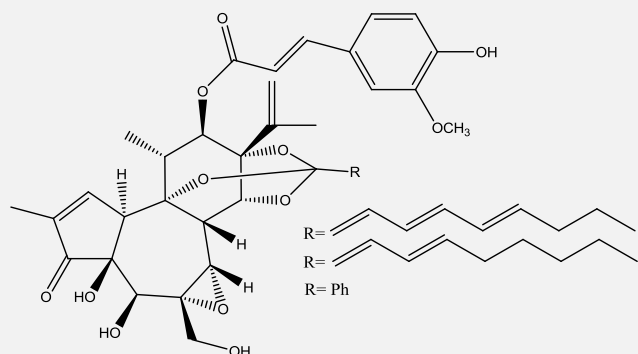
(укупно 12 откривених), који се налазе у неким *Daphne* врстама, као што је *D. acutiloba*. Акутилобини испољавају значајну антиХИВ активност, при чему најјачу активност испољава акутилобин Г. Такође, испољавају и значајну цитотоксичну активност испитану на 5 хуманих туморских ћелијских линија (HL-60, SMMC-7721, А-549, MCF-7 и SW480) [148]. Јуанхуадин (дафнански дитерпен) је бели аморфни прах изолован из цветова *D. genkwa* [142]. Показује антитуморску активност тако што инхибира раст ћелија рака плућа и може наћи потенцијалну употребу као хемотерапеутик [149]. Генквадафнин је дафнански дитерпенски естар који је изолован из *D. genkwa*. Испољава антинеопластично дејство према линијама леукемијских ћелија и индикује апоптозу туморских ћелија коже [150]. На слици 17. приказане су структуре дитерпенских естара дафнанског типа који се најчешће јављају у врстама рода *Daphne*.



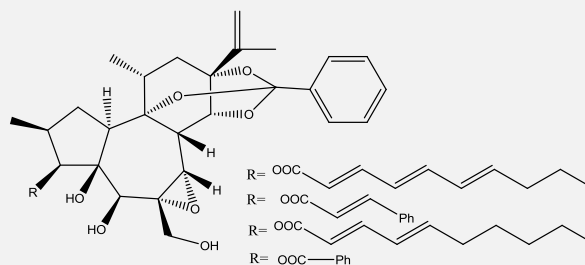
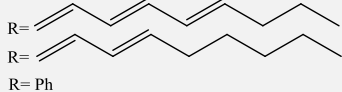
акутилобин 1



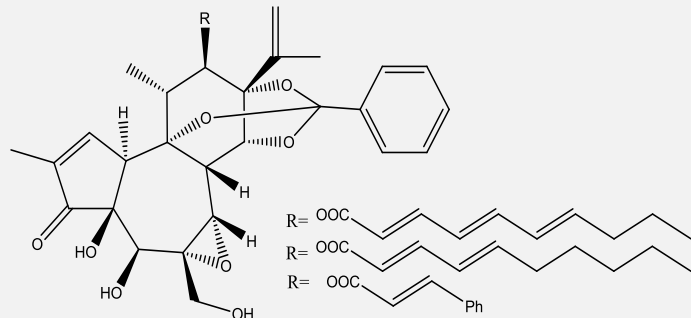
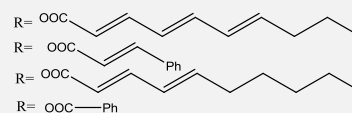
акутилобин 2



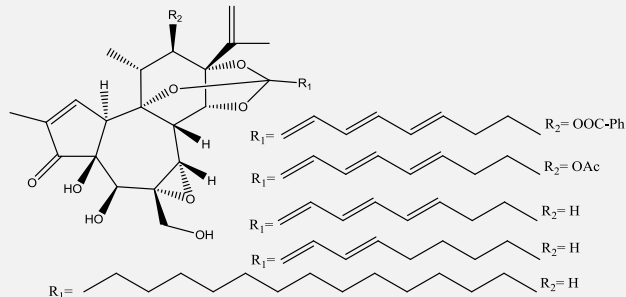
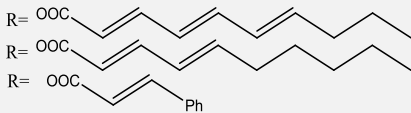
акутилобини 3, 4 и 5



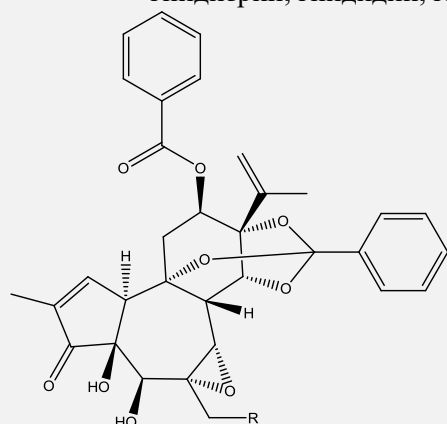
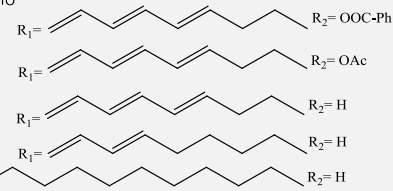
акутилобини 6 и 7, викстроемиа фактор М1 и генкванин 8



гнидитрин, гнидидин, гнидицин

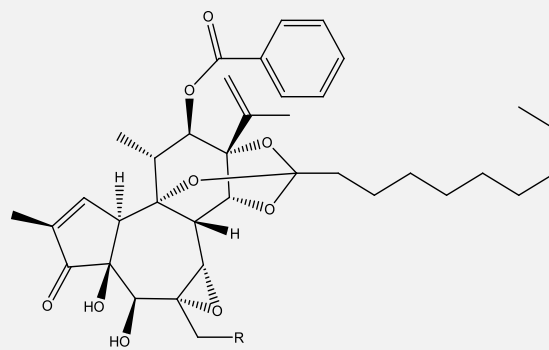


јуанхуадин, киркинин, егзоекариа фактор О₁, егзоекариатоксин, 14'-тетрахидрохуратоксин



генквадафин

генквадафин-20-палмитат (R=OCO(CH₂)₁₄CH₃)



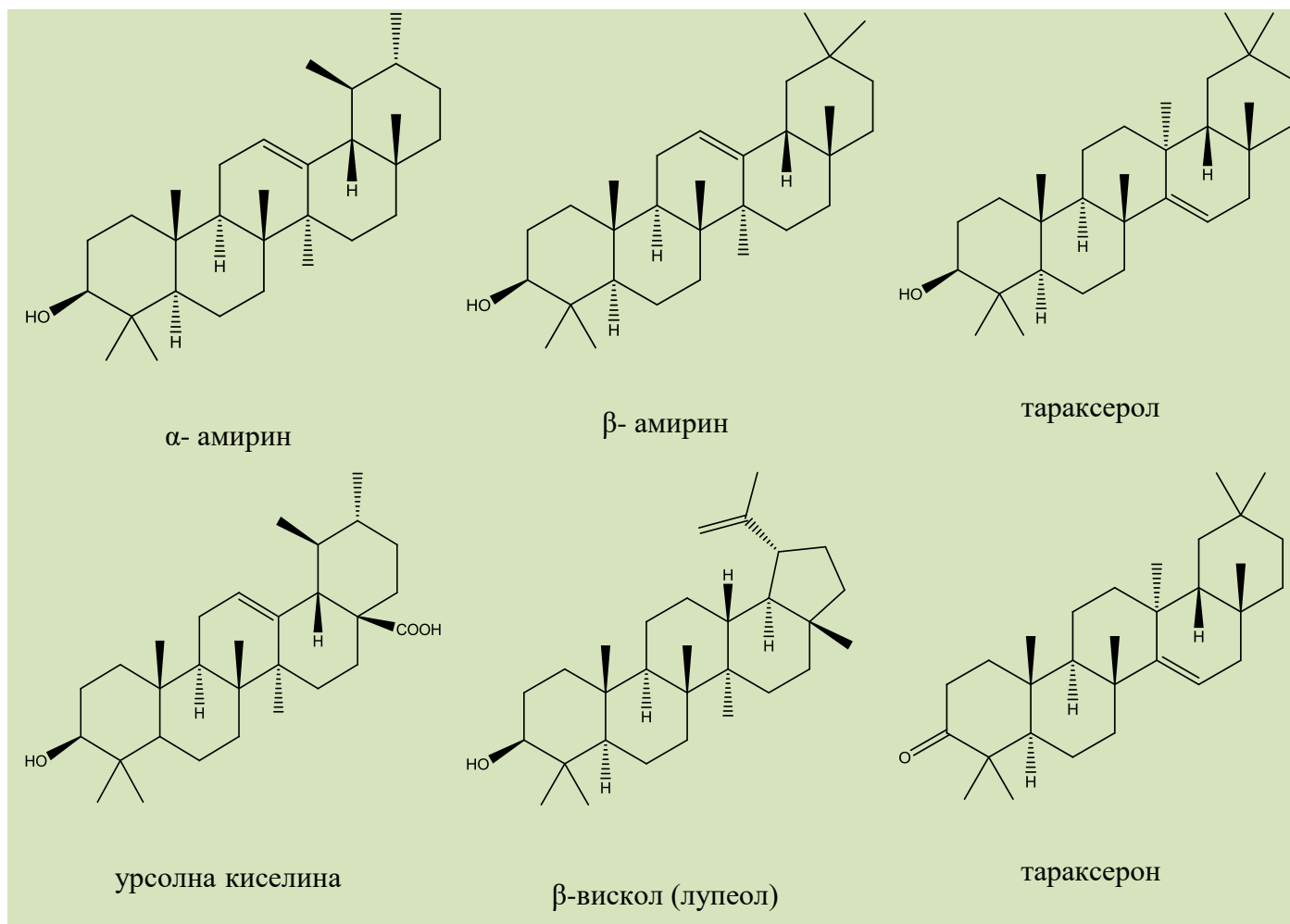
гнидилатин (R=OH)

гнидилатин-20-палмитат (R=OCO(CH₂)₁₄CH₃)

Слика 17. Структуре дитерпена дафнанског типа

3.8.7. Тритерпени

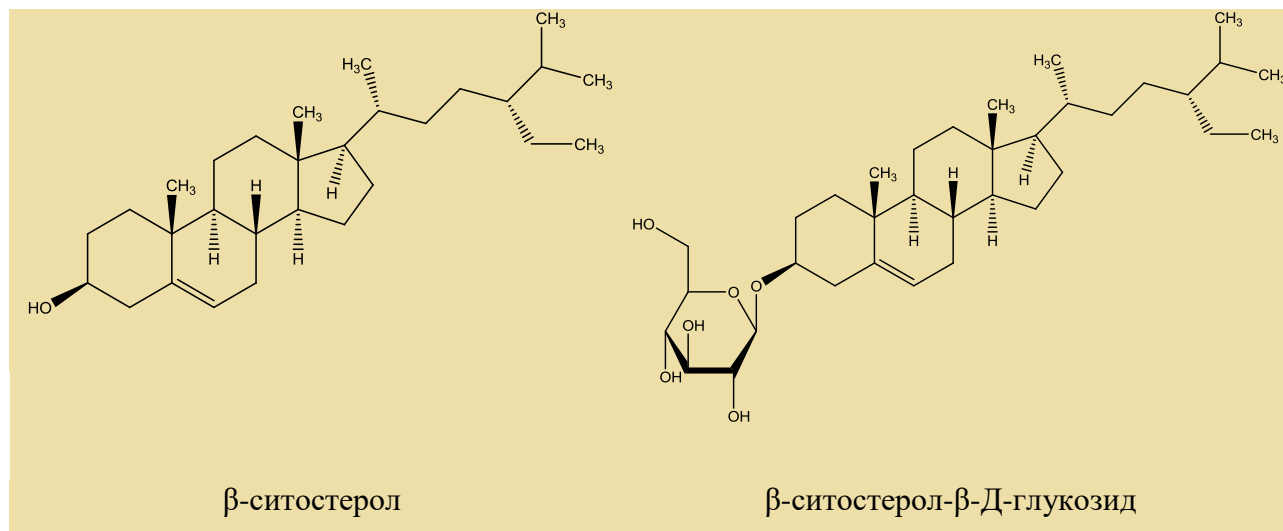
Пентациклични тритерпеноиди, тараксерол, тараксерон и таракселол ацетат су изоловани из *D. rapiracea* [127]. Поред ових једињења, код неких врста из рода *Daphne* потврђено је присуство и следећих тритерпенских деривата: урсолна киселина, β -вискол (лупеол), као и α и β амирин [126,]. Њихове структуре приказане су на слици 18.



Слика 18. Тритерпенски секундарни метаболити присутни у *Daphne* врстама

3.8.8. Стероидни молекули у *Daphne* врстама

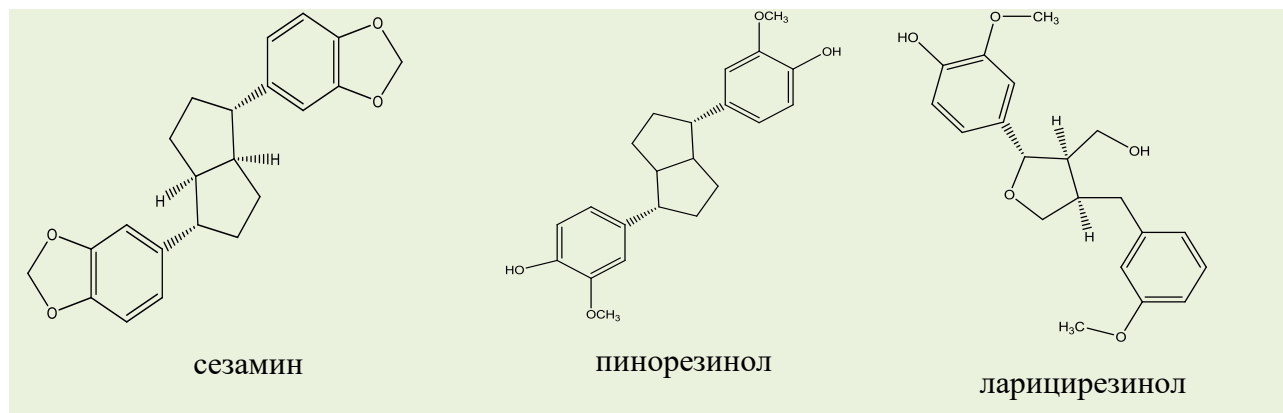
Од молекула стероидне природне у *Daphne* врстама (слика 19) најчешће се срећу биљни фитостероли: β -ситостерол (*D. acuminata* и *D. giraldii*) и β -ситостерол- β -D-глукозид (*D. gnidioides* и *D. papiracea*) [126].



Слика 19. Стероидна једињења присутна код врста рода *Daphne*

3.8.9. Лигнанска једињења

Досадашњим испитивањем хемијског састава врста рода *Daphne* показано је и присуство једињења лигнанске структуре. Од лигнана су присутни дихидроксисезамин, сезамин, ларицирезинол, пинорезинол и сирингарезинол (слика 20). Ова једињења су идентификована у више врста овог рода (*D. mezereum*, *D. odora*, *D. oleoides* и *D. tangutica*) [151-153].



Слика 20. Структуре неких лигнана који се могу наћи у *Daphne* врстама

Сви ови подаци илуструју широк спектар једињења различитих група секундарних метаболита, врло специфичних структура, која су присутни у проучаваним *Daphne* врстама. Садржај различитих класа секундарних метаболита које испољавају специфична дејства указује на значај проучавања до сада недовољно истражених врста овог рода. Проучавањем три врсте које су обухваћене овом докторском дисертацијом ће се добити интересантни и веома значајни подаци о њиховом хемијском саставу и испољавању биолошких активности.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. Прикупљање и припрема биљног материјала за екстракцију

Биљни материјал је сакупљен са више локалитета на територији Републике Србије током маја 2011. године. Узорци биљних врста *Daphne blagayana* и *Daphne sneorum* су сакупљени са подручја Суве Планине, док су узорци *Daphne alpina* сакупљени са подручја планине Копаоник. Сакупљање и детерминацију биљних узорака урадила је др. Марина Јушковић, доцент Департмана за биологију и екологију, Природно математичког факултета, Универзитета у Нишу. Узорци су депоновани под следећим бројевима ваучера: 5497 (*D. blagayana*), 5496 (*D. sneorum*) и 5506 (*D. alpina*). Биљни материјал је осушен на ваздуху, на промајном месту заштићеном од светлости.

4.2. Хемикалије и реагенси

1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал (DPPH[•]), натријумова со 5,6-дифенил-3-(2-пиридил)-1,2,4-триазин-4,4-дисулфонске киселине (*Ferrozine*), *Folin-Ciocalteu's* реагенс, бутиловани хидрокситолуен (ВНТ), ресазурин, гална киселина, рутин и α -токоферол су производи компаније Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany. Растварачи коришћени у високоефикасној течно хроматографској анализи су били HPLC чистоће (*gradient grade*). Стандарди (дафнетин, умбелиферон и 4-хидроксибензоева киселина) коришћени у експериментима прибављени су из компаније Merck, Darmstadt, Немачка. Сви остали реагенси и хемикалије употребљене у експерименталном раду били су аналитичке чистоће, пореклом од различитих произвођача.

4.3. Добијање екстракта

На ваздуху осушене гранчице и листови биљака су уситњени до грубог прашка (2–6 mm), помоћу млина, а потом одвојено екстраховани (4 часа) хлороформом и метанолом. Екстракција је извршена коришћењем апаратуре по *Soxhlet*-у. Након екстракције, добијени течни екстракти су профильтрирани преко филтер папира (Whatman, No.1). Упаривање растварача коришћених за екстракцију вршено је под сниженим притиском помоћу ротационог вакуум упаривача. На тај начин су добијени суви екстракти, који су чувани су у тамним бочицама и коришћени за даља испитивања.

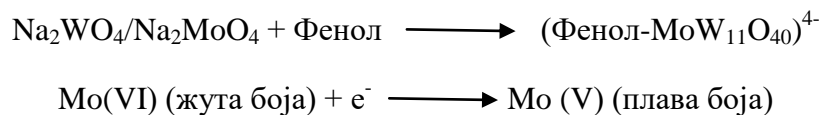
4.4. ИСПРИТИВАЊЕ ХЕМИЈСКОГ САСТАВА ЕКСТРАКТА

4.4.1. UV/Vis спектрофотометријска анализа екстракта

За одређивање укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима коришћена је UV/Vis спектрофотометрија. Све спектрофотометријске анализе су извршене на спектрофотометру MA9523-Spekol 211 (Iskra, Horjul, Slovenia).

4.4.2. Одређивање укупног фенолног садржаја

Укупни фенолни садржај у испитиваним екстрактима одређен је спектрофотометријском методом, употребом *Folin-Ciocalteu* реагенса [154]. *Folin-Ciocalteu* реагенс садржи смешу фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине и представља оксидационо средство. При реакцији, полифенолна једињења се оксидују до феноксидних анјона а сам реагенс редукује до волфрам-оксида и молибден оксида који је плаве боје [155]:



Интензитет плаве боје, која потиче од редуковане форме реагенса је пропорционалан количини фенолних једињења у узорку и одређује се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на $\lambda=760 \text{ nm}$.

Раствори и реагенси

Раствор Na_2CO_3 (20%);

Folin-Ciocalteu реагенс;

Стандардни раствор галне киселине (гална киселина се раствори у метанолу а потом разблажи дестилованом водом до финалне концентрације $0,05 \text{ mg/cm}^3$).

Поступак

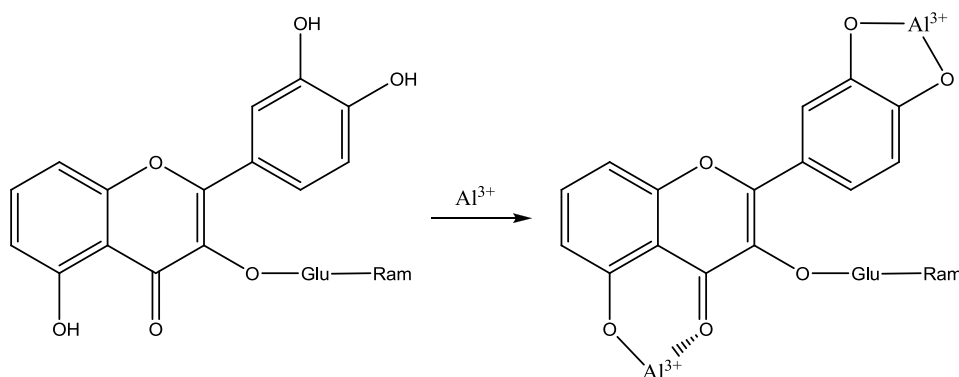
1 g екстракта се раствори у 10 ml дестиловане воде и профилира. Филтрат (0,5 ml) се пренесе у нормални суд и дода се 2,5 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса (претходно

десетоструко разблажен). Након мућкања (5 минута) у смешу се додаје 2 ml свеже припремљеног раствора Na_2CO_3 и инкубира на собној температури 2 часа. Након инкубације, читава се апсорбанца на 765 nm, у односу на дестиловану воду, која се користи као слепа проба. Сва мерења су понављана три пута.

Стандардна крива галне киселине, конструисана на основу серије разблажења стандардног раствора галне киселине (0-1000 $\mu\text{mol/L}$) је коришћена за одређивање садржаја укупних фенола. Укупни фенолни садржај је изражен у mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта \pm стандардна девијација три мерења (mg GA/g \pm SD).

4.4.3. Одређивање укупног флавоноидног садржаја

Флавоноиди имају особину да са металима дају одговарајуће металне комплексе на чему се заснива одређивање флавоноида методом по *Markham*-у [156]. Укупни садржај флавоноида је одређен спектрофотометријски преко реакције флавоноида са AlCl_3 при чему се гради комплекс флавоноида са алуминијумом:



Слика 21. Настајање обојеног комплекса рутина и Al^{3+} јона

Интензитет обојеног комплекса је пропорционалан количини флавоноидних едињења у узорку и одређује се спектрофотометријски, мерењем апсорбанце на $\lambda=510$ nm.

Раствори и реагенси

Раствор NaOH у дестилованој води (1 mol/dm³);

Раствор AlCl_3 у метанолу (2%);

Стандардни раствор рутина (рутин се раствори у етанолу а потом разблажи дестилованом водом до финалне концентрације 0,05 mg/cm³).

Поступак

1 g екстракта се раствори у 10 ml метанола и профилира. Запремина од 0,5 ml раствора екстракта се помеша са 0,5 ml 2% раствора AlCl₃. Након 60 минута инкубације на собној температури, апсорбанце узорака су мерене на 415 nm на спектрофотометру у односу на слепу пробу. Сва мерења су поновљена три пута.

Стандардна крива рутина, конструисана на основу серије разблажења стандардног раствора рутина (0-1000 μmol/L) је коришћена за одређивање садржаја укупних флавоноида. Укупни флавоноидни садржај је изражен у mg еквивалената рутина по g сувог екстракта ± стандардна девијација три мерења (mg RU/g±SD).

4.4.4. HPLC-UV анализа екстракта

Високоефикасна течна хроматографска анализа (енг. *HPLC*) са UV детекцијом примењена је за раздвајање и идентификацију појединих конституената екстракта. Анализе су вршене на апарату *Agilent 1200 Series* коришћењем C18 колоне (*ZORBAX Eclipse XDB-C18*; 25cm×4.6mm; 5 μm). Детекција раздвојених пикова извршена је применом детектора са серијом диода (*Diode Array Detector, DAD*) на 280, 330 и 350 nm, а апсорпциони спектри компонената су снимљени у опсегу од 200 до 400 nm.

Растворени узорци екстракта су профилирани кроз филтере са порама величине 0,45 μm. Хроматографско раздвајање извршено је употребом система растварача ацетонитрил-вода-фосфорна киселина (90:10:0,1, v/v/v). Брзина протока мобилне фазе је износила 1 ml/min. У колону је аутоматски, помоћу аутосемплера ињектовано 10 μl раствора узорка. Колона је термостатирана на температури од 30 °C.

Идентификација појединих конституената екстракта је извршена компарацијом ретенционих времена и UV спектра конституената са стандардима (λ=200–400nm).

4.5. ИСРИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА

Антиоксидативни потенцијал метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова биљака *D. blagayana*, *D. sneorum* и *D. alpina* процењен је преко више *in vitro* модела.

4.5.1. Одређивање укупног антиоксидативног капацитета

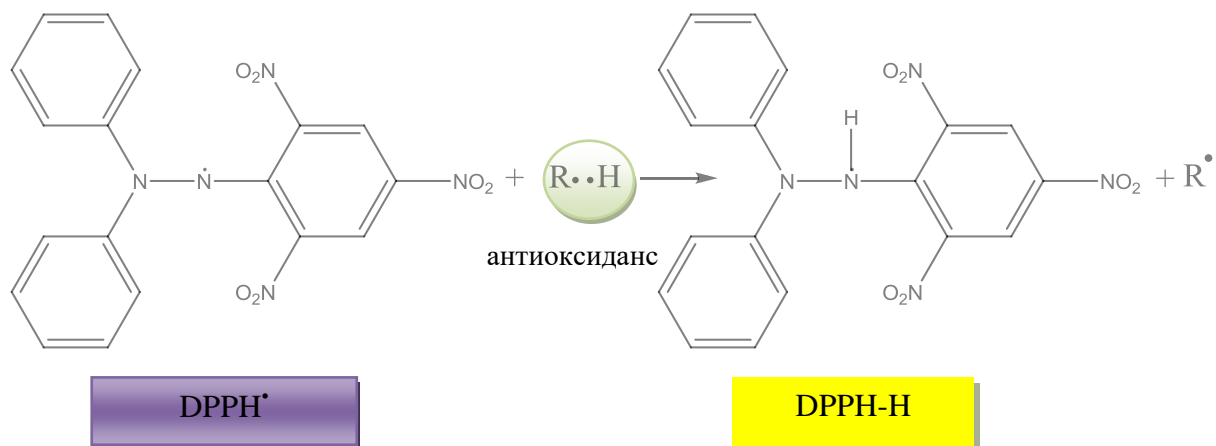
Укупни антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката одређен је спектрофотометријски фосфомолибденском методом [157]. Метода се заснива на редукцији молибден-фосфата (VI) до зеленог молибден-фосфата (V) у киселој средини од стране антиоксиданса. Као стандард коришћена је аскорбинска киселина, а растварач (метанол) без узорка је коришћен као слепа проба. Укупан антиоксидативни капацитет изражен је кроз милиграме аскорбинске киселине по граму сувог екстракта (mg AA/g).

Поступак

Запремина од 0,3 ml узорка екстракта (1 mg/ml) помеша се са 3 ml раствора реагенса (0,6 M сумпорна киселина, 28 mM натријум фосфата и 4 mM амонијум молибдата). Добијене смеше инкубирају се на 95 °C у току 90 минута. Након хлађења узорака до собне температуре, мери се апсорбанца на 695 nm на спектрофотометру у односу на слепу пробу. Све анализе су поновљење три пута а резултати приказани као средње вредности ± стандардна девијација три мерења.

4.5.2. Одређивање DPPH „скевинџер” активности

1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH[•]) је стабилан, синтетски слободни радикал који се често користи за процену способности једињења да „хватају“ слободне радикале (*free radical scavengers*) односно да делују као донори протона и електрона [158]. Способност биомолекула да DPPH[•] радикал преведе у неутрални облик (DPPH-H) је прелиминарни показатељ испољавања антиоксидативне активности испитиваних молекула. У реакцији са редукционим средствима (антиоксидансима) долази до трансформације љубичасто обојеног, азот-центрираног DPPH[•] радикала у редуковани, жуто обојени облик DPPH-H.



Слика 22. Реакција DPPH• радикала и антиоксиданаса

Поступак

DPPH• (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил радикал) растворен је у метанолу у концентрацији 80 $\mu\text{g/ml}$. Направљене су серије двоструких разблажења узорака од основног раствора концентрације 1 mg/ml . Раствори узорака и DPPH• су затим помешани у једнаком односу (по 2 ml од сваког) и таква смеша остављена је 30 минута на собној температури, у мраку, након чега је мерена апсорбанца на 517 nm. Аскорбинска киселина и ВНТ су коришћени као референтни стандарди. Припремљена је и контрола која, уместо раствора узорка, садржи 2 ml метанола.

Израчунавање

DPPH „скевинцер” активност израчуната је по једначини:

$$(\% \text{ инхибиције}) = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

при чему су:

A_k – концентрација контроле;

A_u -концентрација узорка.

Вредност IC_{50} , која се дефинише као концентрација испитиваног узорка која редукује концентрацију DPPH радикала за 50%, изражена као $\mu\text{g/mL}$ екстракта, израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*” криве поступком нелинеарне регресије, коришћењем софтвера за анализу података *Origine 8*. Све анализе су поновљење три пута а резултати приказани као средње вредности \pm стандардна девијација три мерења.

4.5.3. Метода инхибиције липидне пероксидације

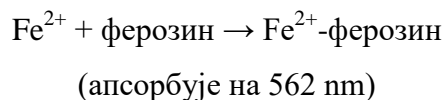
Метода инхибиција липидне пероксидације се заснива на гвожђе катализованој реакцији разлагања хидропероксида, при којој се Fe^{2+} оксидује до Fe^{3+} , чија се концентрација може одредити мерењем апсорбанце на 500 nm уз додатак NH_4SCN [159]. Направи се серија двоструких разблажења узорка. У 0.5 ml узорка се дода 2,5 ml емулзије линолеинске киселине (0,2804 g линолеинске киселине и 0,2804 g Tween 40 у 50 ml фосфатног пуфера, рН=7,0) и смеша инкубира у мраку на температури од 50 °C у току 72 часа. Након тога се 0,1 ml смеше помеша са 4,7 ml етанола (75%), 0,1 ml NH_4SCN (30%) и 0,1 ml FeSO_4 (20mM), меша 3 минута и мери апсорбанца на 500 nm (у односу на слепу пробу која уместо узорка и емулзије линолеинске киселине садржи исте запремине етанола). Инхибиција липидне пероксидације се израчунава према једначини:

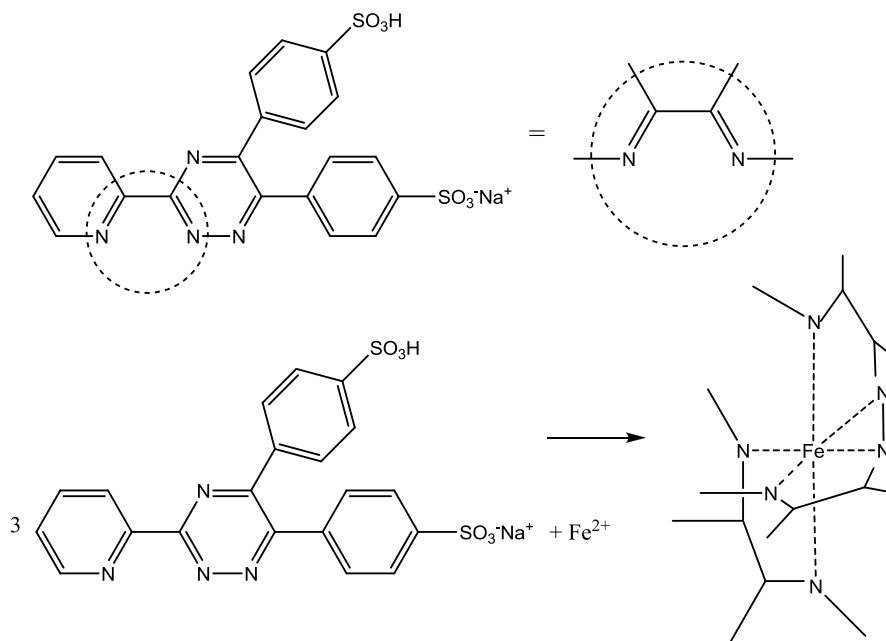
$$(\% \text{ инхибиције}) = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

при чему је A_k апсорбанца контроле, која се припрема као и узорци, само што се уместо испитиваног раствора додаје иста запремина етанола, а A_u представља апсорбанцу узорка. Вредност IC_{50} , која се дефинише као концентрација испитиваног узорка која липидну пероксидацију инхибира за 50%, изражена као $\mu\text{g}/\text{mL}$ екстракта, израчуната је преко сигмоидне „*dose-response*” криве поступком нелинеарне регресије, коришћем софтвера за анализу података *Origine* 8. Сви резултати су дати као средња вредност три мерења \pm стандардна девијација.

4.5.4. Fe^{2+} хелатациона активност

Одређивање хелатационе активности се заснива на способности антиоксиданта да врши инхибицију стварања комплекса Fe^{2+} -ферозин [160].





Слика 23. Стварање Fe^{2+} -ферозин комплекса

Нижа апсорбанца на 562 nm одговара већој хелатационој активности екстракта.

Поступак

Припреми се серија раствора екстракта, стандарда аскорбинске киселине и бутил хидроксилтолуена концентрације 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ у метанолу. У 1 mL испитиваног узорка додаје се 1 mL 0,125 mM раствора FeSO_4 и 1 mL 0,3125 mM раствора ферозина. Смеша се остави да одстоји 10 минута након чега се врши мерење апсорбанце узорка на 562 nm (у односу на метанол као бланко пробу, тј. стандард).

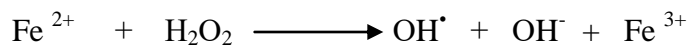
Способност испитиваних етанолских екстраката да се у наведеним експерименталним условима хелатизују рачуна се према једначини:

$$\text{IC} (\%) = [(A_{\text{бланко раствор}} - A_{\text{узорак}}) / A_{\text{бланко раствор}}] \times 100$$

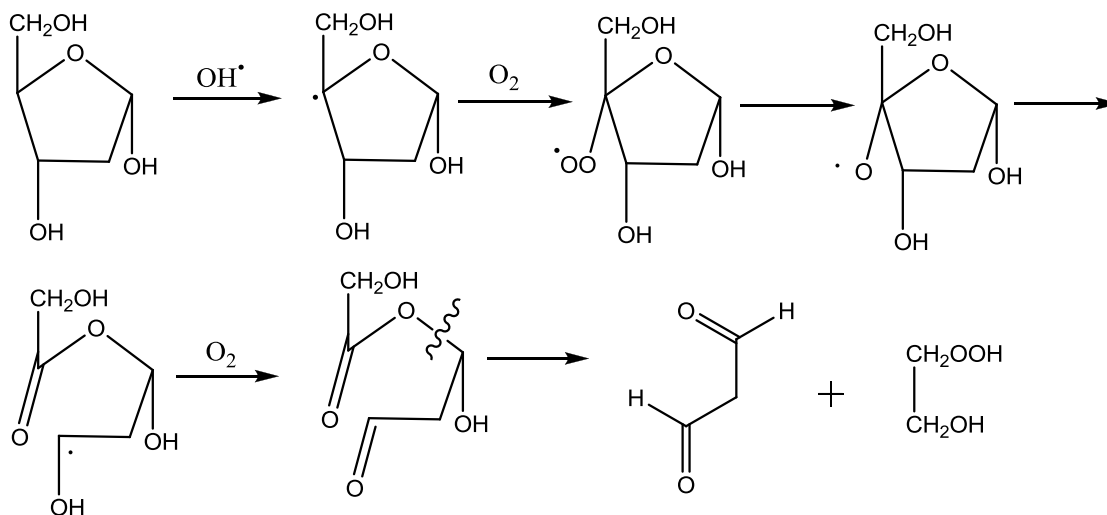
На основу добијених вредности за четири концентрације, за сваки испитани узорак се конструише зависност $A_{562 \text{ nm}}$ од концентрације. IC_{50} вредност је дефинисана као масена концентрација која одговара хелатационој активности од 50%, а добијена је рачунски из једначине линеарне регресије.

4.5.5. Одређивање способности неутралисања OH^\bullet радикала

Да би се одредила способност екстракта за неутралисање генерисаних OH^\bullet радикала примењена је метода описана од стране *Hinneberg*-а са одређеним модификацијама [161]. OH^\bullet радикали настају у реакцији Fe^{2+} јона са H_2O_2 :

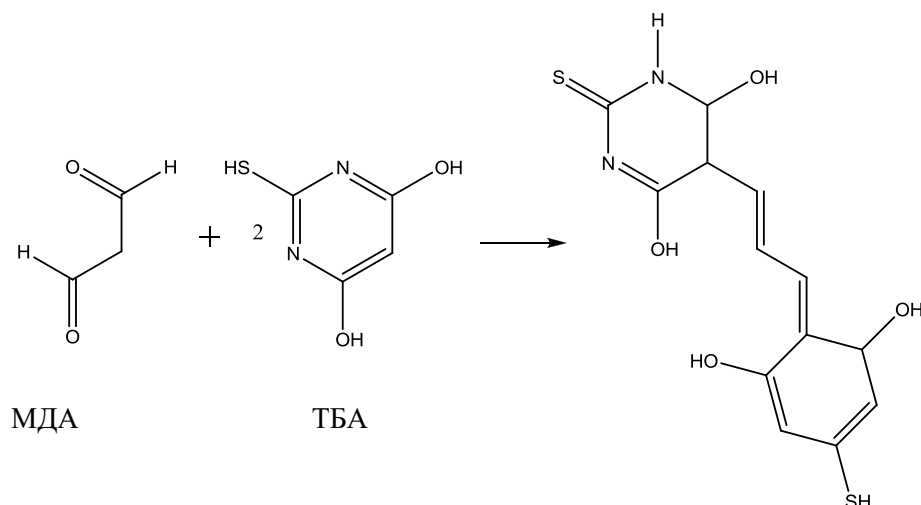


Генерисани OH^\bullet радикали покрећу разградњу 2-дезоксирибозе до крајњих производа реакције од којих је најважнији малонилдиалдехид (MDA):



Слика 24. Деградација 2-дезоксирибозе и настајање малонилдиалдехида (MDA).

MDA се потом одређује одређује ТВА (тиобарбитурна киселина) тестом. ТВА тест заснован је на спектрофотометријском одређивању ружичасто обојеног комплекса који настаје након реакције малонилдиалдехида са два молекула ТВА.



Слика 25. Грађење обојеног комплекса у реакцији МДА са два молекула ТБА

Поступак

Направи се серија двоструких разблажења екстраката. У 100 μl узорка дода се 500 μl раствора деоксирибозе, 200 μl смеше FeCl_3 и EDTA (1:1 v/v), 100 μl раствора H_2O_2 , и 100 μl аскорбинске киселине. Ова смеша се инкубира 30 минута на температури од 50 $^\circ\text{C}$ уз повремено мешање. Након тога се смеси дода 1 ml TCA и 1 ml TBA, при чему се поново инкубира 30 минута на температури од 50 $^\circ\text{C}$. Степен оксидације деоксирибозе се одређује мерењем апсорбанце узорака помоћу спектрофотометра на 532 nm (у односу на дестиловану воду као контролу). Процент инхибиције се израчунава према једначини:

$$(\% \text{ инхибиције}) = \frac{A_k - A_u}{A_k} \times 100$$

при чему су:

A_k – концентрација контроле;

A_u -концентрација узорка.

Спектрофотометријско мерење се врши на 532 nm. Вредности процента инхибиције израчуната је из апсорбанце контроле и апсорбанце узорака, при чему контрола садржи све реагенсе реакције сем узорка или стандардне супстанце. Из једначине линеарне регресије су израчунате IC_{50} вредности као средње вредности три мерења ($\mu\text{g/ml}$).

4.6. ИСПРИТИВАЊЕ АНТИМИКРОБНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКАТА

4.6.1. Бактеријски и гљивични сојеви

Антимикробна активност екстраката истраживаних врста испитана је у *in vitro* условима на 6 бактеријских и 2 гљивична соја. Сојеви на којима је испитивана активност припадају колекцији *American Type Culture Collection Maryland* (АТСС). Листа сојева на којима су испиване антибактеријске и антифунгалне активности приказана је у табели 2.

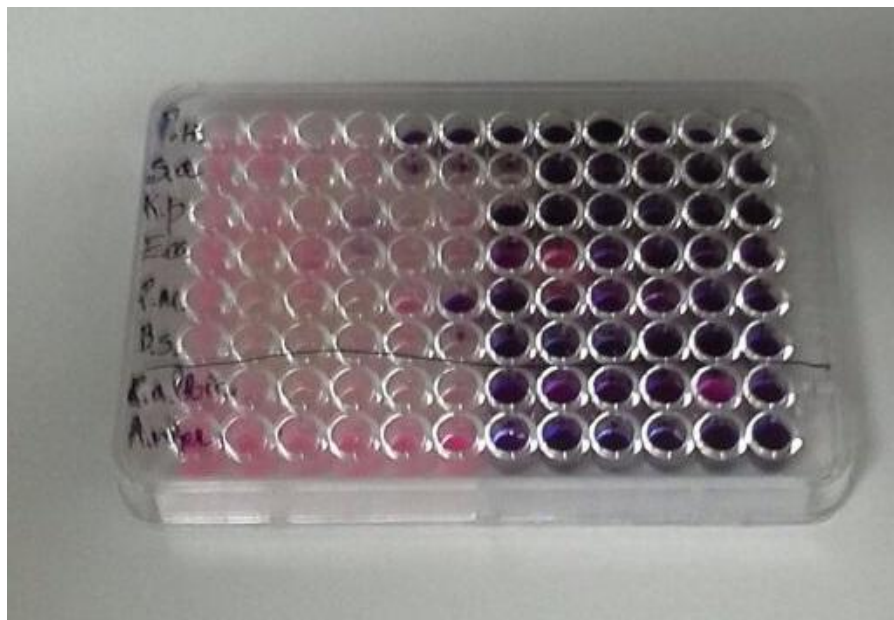
Табела 2. Микробиолошки сојеви коришћени у испитавању антимикробне активности

Микробиолошки сојеви	
Ознака	Микроорганизам
АТСС 25923	<i>Staphylococcus aureus</i>
АТСС 13883	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
АТСС 25922	<i>Escherichia coli</i>
АТСС 13315	<i>Proteus vulgaris</i>
АТСС 14153	<i>Proteus mirabilis</i>
АТСС 6633	<i>Bacillus subtilis</i>
АТСС 10231	<i>Candida albicans</i>
АТСС 16404	<i>Aspergillus niger</i>

Култивација гљивица вршена је на кромпир-глукозном агру током 7 дана на температури од 20 °С под наизменично светлим и тамним условима. Након 7 дана извршена је рекултивација на новом кромпир-глукозном агру током наредних 7 дана. Бактерије су култивисане на агру током 7 дана на собној температури од 25 °С под наизменично светлим и тамним условима. Рекултивација бактеријских сојева вршена је на новом агар субстрату током 5 дана. Поступак култивације је извођен 4 пута док није добијена чиста култура. Идентификација тестираних микроорганизама урађена је у Департману за микробиологију, Института Торлак, Београд, Србија.

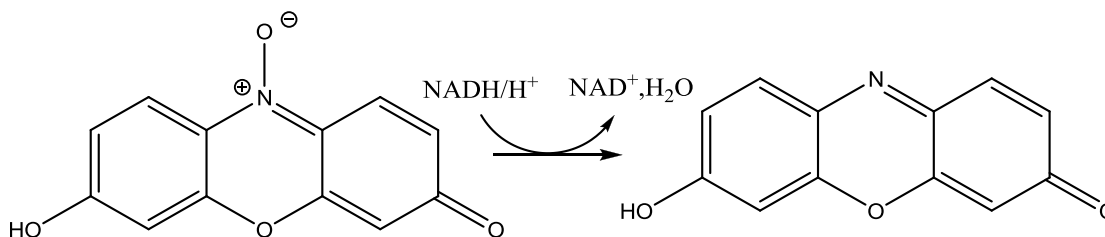
4.6.2. Микродилуциона метода

Антимикробне активности испитиване су микродилуционом методом при чему су одређиване минималне инхибиторне концентрације (МИС) екстраката [162]. Анализе су вршене у микротитар плочама са 96 удубљења уз употребу ресазурина као индикатора (слика 26).



Слика 26. Микротитар плоча за одређивање минималних инхибиторних концентрација узорака

Ресазурин је оксидо-редукциони индикатор који мења боју редуковањем до ресорфина помоћу оксидоредуктаза унутар виталних ћелија (слика 27).



Слика 27. Редуција ресазурина до ресорфина

Најмања концентрација која доводи до промене боје узета као МИС вредност.

Поступак

У први ред микротитар плоче пипетирано је 100 μl раствора екстраката растворених у метанолу (200 $\mu\text{l/ml}$) и цирсимарин (растворен у 10 % диметил сулфоксиду, 2 mg/ml). У остала удубљења плоче додато је по 50 μl *Müller–Hinton* odnosno *Sabouraud* декстрозног бујона (са додатком Tween 80 до финалне концентрације од 0,5% (v/v) за анализу екстраката). Запремина од 50 μl из првог реда удубљења пипетирана је у други

ред за сваку микротитарску линију, а затим је 50 μl разблажења скаларно пренешено из другог до дванаестог реда удубљења. У свако удубљење је додато по 10 μl индикатора (раствор ресазурина припремљен растварањем 270 mg таблета у 40 ml стерилне дестиловане воде) и 30 μl хранљивог бујона. На крају, у свако удубљење је додато 10 μl суспензије бактерија (10^6 CFU/ml) односно суспензија спора гљивица (3×10^4 CFU/ml). Плоче су потом умотане у фолију, како би се спречила дехидратација и инкубиране 24 часа на температури од 37 $^{\circ}\text{C}$ за бактерије и 48 часа на температури од 28 $^{\circ}\text{C}$ у току 48 часа за гљивице. Промена боје у удубљенима праћена је визуелно. Сви експерименти су урађени у три понављања.

4.7. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистички софтвер SPSS (верзија 20) коришћен је за анализу добијених података. Резултати су приказани као средње вредности \pm стандардна девијација три аналитичка мерења. Једнофакторска анализе варијансе (АНОВА) коришћена је за утврђивање постојања статистичке значајности средњих вредности мерења. Накнадним *Tukey* HSD тестом је утврђивано између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика. У свим статистичким анализама, интервал поверења је 95% са статистичком значајношћу од $\alpha < 0,05$. IC_{50} вредности су израчунате регресионом анализом. Израчуната је једначина регресионе праве ($y=a+bx$), при чему вредности x представљају различите концентрације екстраката, а y вредности представља проценат инхибиције.

5. РЕЗУЛТАТИ

Испитивања екстраката различитих делова биљака обухватила су припрему биљног материјала, екстракцију помоћу два растварача (хлороформа и метанола), испитивање хемијског састава добијених екстраката, као и испитивање деловања екстраката. Испитивање хемијског састава екстраката гранчица и листова обухватало је одређивање укупног садржаја фенола и флавоноида као и *HPLC-UV* анализу екстраката. Испитивање деловања екстраката обухватило је одређивање антиоксидативне и антимикуробне активности. Антиоксидативна активност је процењена на основу укупног антиоксидативног капацитета, способности неутрализације слободних радикала, инхибиције липидне пероксидације и Fe^{2+} хелатационе активности. Такође, испитано је антимикуробно дејство екстраката *Daphne* врста на шест бактеријских и два гљивична соја.

5.1. Екстракција метанолом и хлороформом

Екстракција гранчица и листова три *Daphne* врсте (*D. blagayana*, *D. sneorum* и *D. alpina*) извршена је употребом метанола и хлороформа као растварача и резултати приноса сувих екстраката дати су у табели 3. У зависности од материјала и коришћених растварача за екстракцију садржај сувог екстракта у испитиваним узорцима се кретао у опсегу од 2,12% до 25,47%.

Табела 3. Приноси екстракције различитих делова три *Daphne* врсте употребом растварача различите поларности.

Материјал за екстракцију		Принос екстракта (g/100g дроге) %	
		Хлороформ	Метанол
<i>D. blagayana</i>	Гранчице	2,12	24,37
<i>D. sneorum</i>		2,20	19,38
<i>D. alpina</i>		2,08	23,03
<i>D. blagayana</i>	Листови	7,02	27,46
<i>D. sneorum</i>		3,71	19,78
<i>D. alpina</i>		5,92	25,47

Разлика у приносу екстракције уочава се код екстраката добијених употребом метанола као растварача (19,78-27,46 g/100g дроге) у односу на екстракте добијене екстракцијом помоћу хлороформа (2,08-7,02 g/100g дроге). Знатно већи принос метанолних екстраката у односу на хлороформске екстракте резултат је веће поларности метанола као растварача.

5.2. ХЕМИЈСКИ САСТАВ ЕКСТРАКАТА *D.BLAGAYANA*, *D.CNEORUM* И *D. ALPINA*

5.2.1. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима

Квантитативни садржај флавоноида и биљних полифенолних једињења у испитиваним екстрактима одређен је спектрофотометријским методама које су детаљно описане у експерименталном делу рада. Као стандарди су коришћени гална киселина (за укупне феноле) и рутин (за флавоноиде). Добијени резултати су изражени преко mg еквивалената галне киселине по g сувог екстракта, односно mg еквивалената рутина по g сувог екстракта. Резултати одређивања укупног фенолног и флавоноидног садржаја у испитиваним екстрактима и однос флавоноида према фенолима дат је у табели 4.

Табела 4. Садржај укупних фенола, флавоноида и однос УФЛ/УФ у метанолским и хлороформским екстрактима гранчица и листова три *Daphne* врсте.

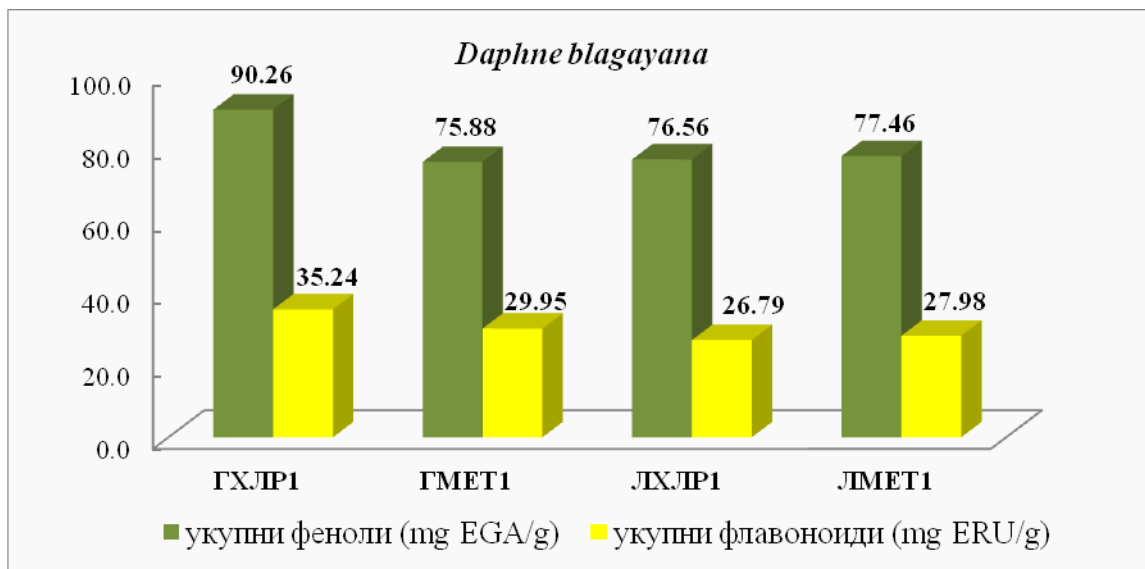
Биљка	Екстракт	УФ (mg EGA/g)	УФЛ (mg ERU/g)	(УФЛ/УФ)100 (%)
<i>D. blagayana</i> (1)	ГХЛР1	90,26±0,69	35,24±0,55	39,04
	ГМЕТ1	75,88±0,54	29,95±0,39	39,47
	ЛХЛР1	76,56±0,89	26,79±0,34	34,99
<i>D. sneorum</i> (2)	ЛМЕТ1	77,45±0,43	27,98±0,88	36,12
	ГХЛР2	76,45±0,79	24,67±0,35	32,27
	ГМЕТ2	68,77±0,95	26,56±0,67	38,62
<i>D. alpina</i> (3)	ЛХЛР2	69,67±0,85	34,23±0,89	49,13
	ЛМЕТ2	74,57±0,35	29,55±0,95	39,62
	ГХЛР3	80,56±0,35	34,65±0,89	43,01
	ГМЕТ3	88,98±1,05	31,45±0,15	35,35
	ЛХЛР3	78,98±0,67	28,09±0,85	35,57
	ЛМЕТ3	85,88±0,97	32,65±0,89	38,02

*ГХЛР-хлороформски екстракт гранчица; ГМЕТ- метанолски екстракт гранчица; ЛХЛР- хлороформски екстракт листова; ЛМЕТ- метанолни екстракт листова; 1- *Daphne blagayana*; 2- *Daphne sneorum*, 3- *Daphne alpina*; УФ- укупни феноли; УФЛ- укупни флавоноиди; приказане су средње вредности три мерења ±СД (стандардна девијација).

5.2.1.1. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте *D. blagayana*

Резултати укупног фенолног и флавоноидног сдржаја хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листова *D. blagayana* приказани су на хистограму 1. Фенолни садржај хлороформског екстракта гранчица (90,26±0,69 mg GA/g) био је већи од оног у метанолском екстракту лишћа (77,45±0,43 mg GA/g), хлороформском екстракту лишћа (76,56±0,89 mg GA/g) и метанолском екстракту гранчица (75,88±0,54 mg GA/g).

Садржај флавоноида у испитиваним екстрактима кретао се од 26,79±0,34 до 35,24±0,55 mg RU/g), при чему је најмања вредност измерена за хлороформски екстракт лишћа а највећа за хлороформски екстракт гранчица.

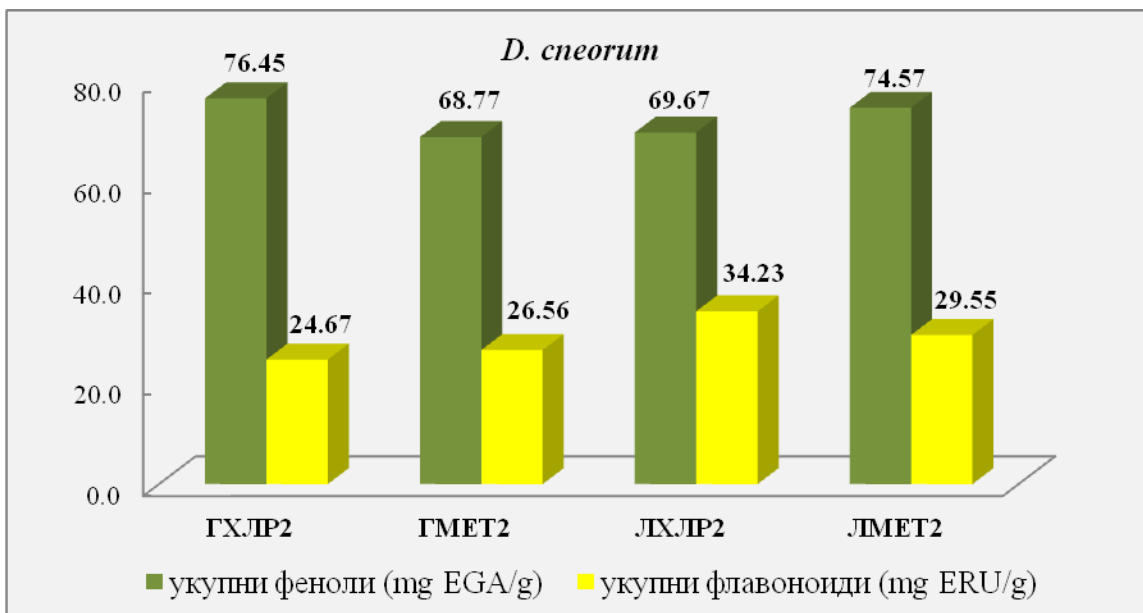


Хистограм 1. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима врсте *D. blagayana*

5.2.1.2. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте *D. sneorum*

Резултати укупног флавоноидног и фенолног садржаја хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листова врсте *D. sneorum* приказани су на хистограму 2. Садржај укупних фенола се кретао у опсегу од $68,77 \pm 0,95$ mg GA/g до $76,45 \pm 0,79$ mg GA/g. Укупни фенолни садржај код хлороформског екстракта гранчица ($76,45 \pm 0,79$ mg GA/g) био је већи од оног код метанолског екстракта листова ($74,57 \pm 0,35$ mg GA/g), хлороформског екстракта листова ($69,67 \pm 0,85$ mg GA/g) и метанолског екстракта гранчица ($68,77 \pm 0,95$ mg GA/g)

Садржај укупних флавоноида у испитиваним екстрактима биљке *D. sneorum* кретао се у опсегу од $24,67 \pm 0,35$ mg RU/g до $34,23 \pm 0,89$ mg RU/g, при чему је укупних флавоноида било највише у хлороформском екстракту листова, а најмање у хлороформском екстракту гранчица.

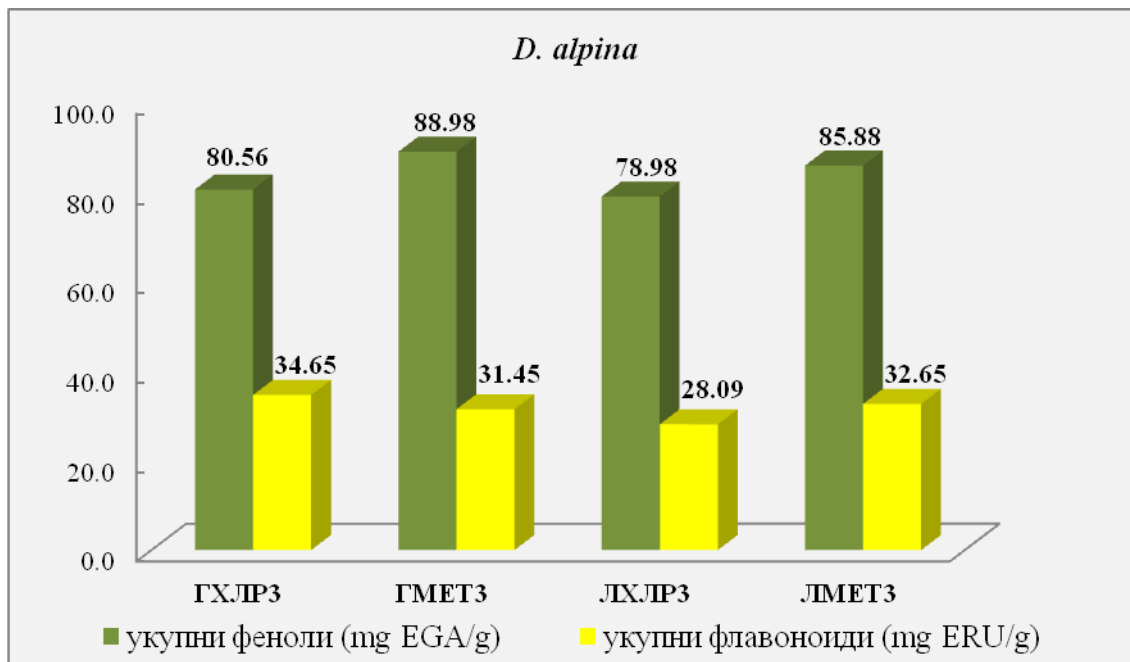


Хистограм 2. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима врсте *D. sneorum*

5.2.1.3. Укупни феноли и флавоноиди у испитиваним екстрактима врсте *D. alpina*

Резултати укупног фенолног и флавоноидног садржаја хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листова врсте *D. alpina* приказани су на хистограму 3. Међу испитиваним екстрактима, укупни фенолни садржај је био највећи у метанолском екстракту гранчица ($88,98 \pm 1,05$ mg GA/g) а најмањи у хлороформском екстракту листова ($78,98 \pm 0,67$ mg GA/g).

Укупан флавоноидни садржај у екстрактима врсте *D. alpina* кретао се у опсегу од $28,09 \pm 0,85$ mg RU/g до $34,65 \pm 0,89$ mg RU/g. Највећи флавоноидни садржај био је у хлороформском екстракту гранчица, док је најмањи садржај био у хлороформском екстракту листова.



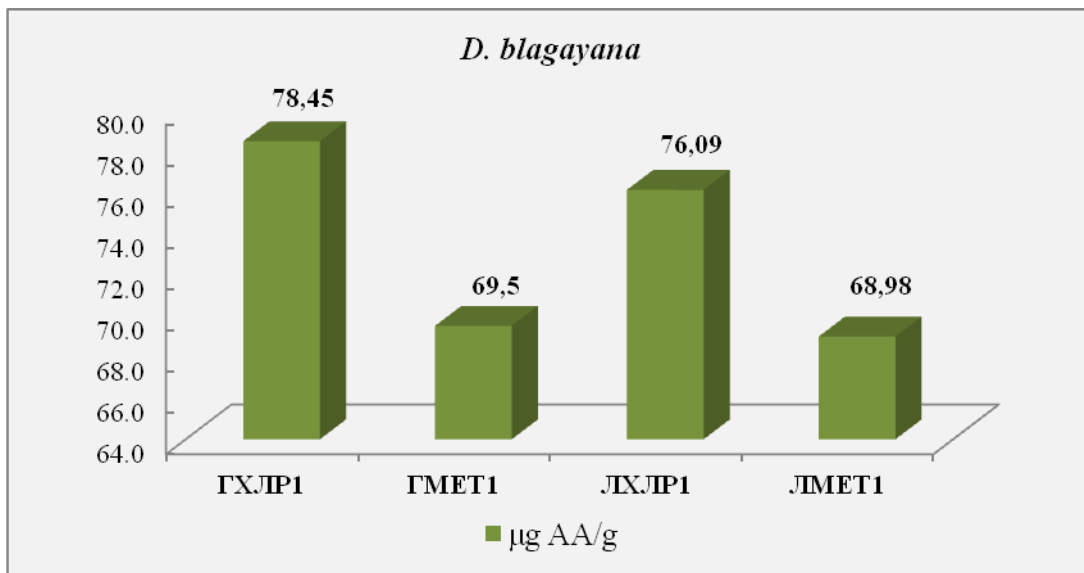
Хистограм 3. Садржај укупних фенола и флавоноида у екстрактима врсте *D. alpina*

5.3. АНТИОКСИДАТИВНЕ АКТИВОСТИ ЕКСТРАКТА *D. BLAGAYANA*, *D. CNEORUM* И *D. ALPINA*

5.3.1. Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката

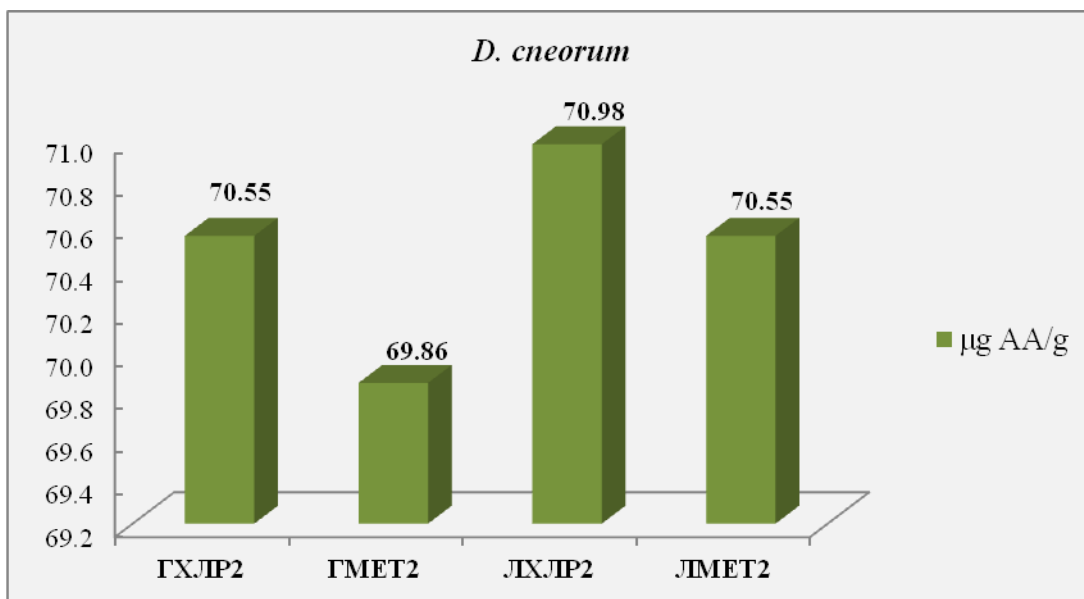
Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката, одређен фосфолидбенском методом, приказан је на хистограмима 4-6.

Резултати испитивања укупног антиоксидативног капацитета врсте *D. blagayana* показују да хлороформски екстракт гранчица испољава најјачу активност (78,45 mg AA/g) док је метанолски екстракт листова показао најслабију активност (68,98 mg AA/g).



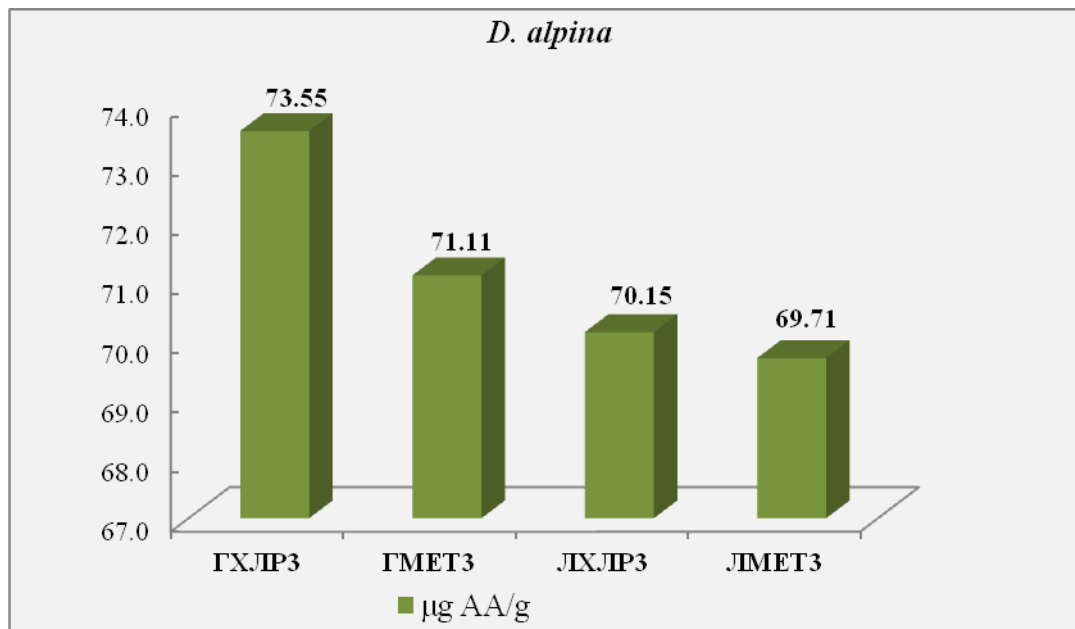
Хистограм 4. Укупан антиоксидативни капацитет екстраката врсте *D. blagayana*

Укупан антиоксидативни капацитет екстраката врсте *D. sneorum* добијених помоћу различитих растварача и од различитих делова биљке се кретао од 69,86 mg AA/g до 70,98 mg AA/g. Највећи укупни антиоксидативни капацитет имао је хлороформски екстракт листова, док је метанолски екстракт гранчица показао најмањи антиоксидативни капацитет.



Хистограм 5. Укупан антиоксидативни капацитет екстраката врсте *D. sneorum*

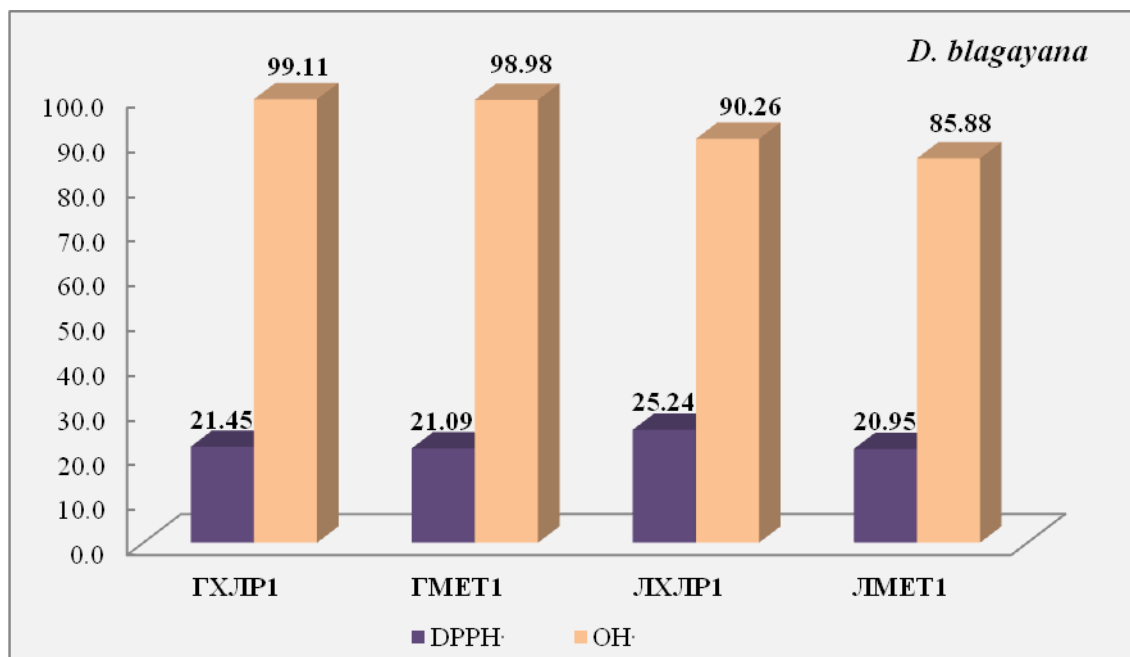
Екстракти биљне врсте *D. alpina* показали су антиоксидативну активност која је била у опсегу од $69,71 \pm 0,54$ mg AA/g за метанолски екстракт листова до $73,55 \pm 1,02$ mg AA/g за хлороформски екстракт гранчица (хистограм 5).



Хистограм 6. Укупан антиоксидативни капацитет екстраката врсте *D. alpina*

5.3.2. Капацитет неутралисања $DPFH^{\cdot}$ и OH^{\cdot} радикала испитиваних екстраката

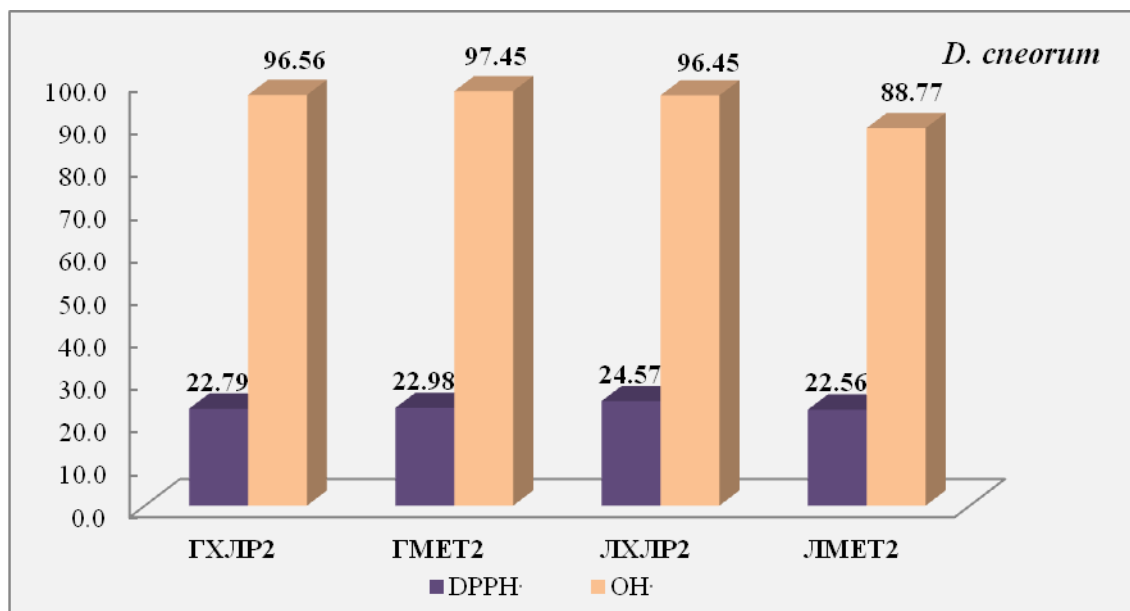
Капацитет неутралисања $DPFH^{\cdot}$ и OH^{\cdot} радикала испитиваних екстраката биљке *D. blagayana* приказан је на хистограму 7. Приказане вредности представљају IC_{50} вредности изражене у $\mu\text{g/ml}$. Капацитет неутралисања $DPFH^{\cdot}$ радикала кретао се у опсегу од $20,95 \mu\text{g/ml}$ до $25,24 \mu\text{g/ml}$, док се капацитет неутралисања OH^{\cdot} радикала кретао у опсегу од $85,88 \mu\text{g/ml}$ до $99,11 \mu\text{g/ml}$. Најјачу активност неутралисања оба радикала показао је метанолски екстракт листова, што се уочава на основу најмањих IC_{50} вредности. Са друге стране, најслабију антиоксидативну активност према $DPFH^{\cdot}$ радикалима има хлороформски екстракт листова ($IC_{50}=25,24 \mu\text{g/ml}$), док према OH^{\cdot} радикалима најлабију активност испољио је хлороформски екстракт гранчица ($IC_{50}=99,11 \mu\text{g/ml}$).



*Вредности добијене за стандарде: DPPH: ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26
 ОН: ГА=59,14±1,10; АА= 160,55±2,31; БХТ=33,92±0,79

Хистограм 7. Капацитет неутралисања DPPH и OH радикала екстраката врсте *D. blagayana*

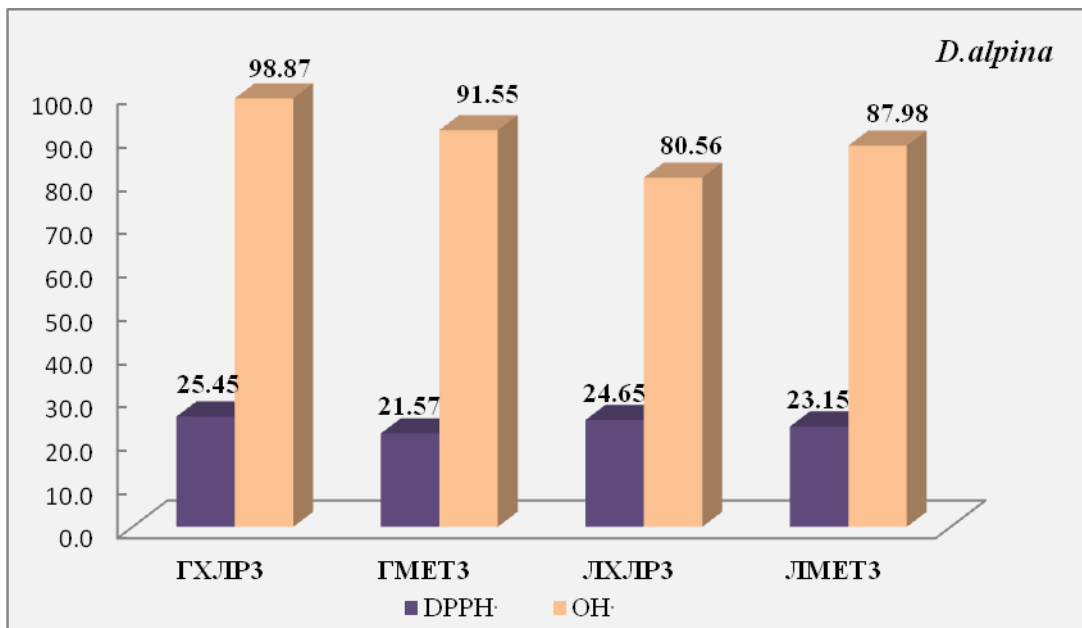
Антиоксидативна активност, процењена преко капацитета неутрализације DPPH и OH радикала екстраката биљке *D. sneorum* приказана је на хистограму 8. Најизраженију активност неутрализације обе врсте радикала показао је метанолски екстракт листова са IC₅₀ вредностима за DPPH тест (22,56 µg/ml), односно за OH тест (88,77 µg/ml). Са друге стране, најслабију антиоксидативну активност показали су хлороформски екстракт листова за DPPH тест (IC₅₀=24,57 µg/ml), односно метанолски екстракт гранчица за OH тест (IC₅₀=97,45 µg/ml).



*Вредности добијене за стандарде: DPPH: ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26
 ОН: ГА=59,14±1,10; АА= 160,55±2,31; БХТ=33,92±0,79

Хистограм 8. Капацитет неутралисања DPPH и OH радикала екстракта врсте *D. sneorum*

Екстракти добијени од гранчица и листова биљке *D. alpina* показали су антиоксидативну активност процењену преко капацитета неутралисања DPPH и OH радикала (хистограм 9). Све IC₅₀ вредности добијене за DPPH тест су биле изнад 20 µg/ml. Метанолски екстракт гранчица је показао највећу активност (IC₅₀=21,57±1,03 µg/ml), док су метанолски екстракт листова (IC₅₀=23,15±1,05 µg/ml) и хлороформски екстракти гранчица и листова (IC₅₀= 25,45±1,05 µg/ml и IC₅₀ = 25,45±0,89 µg/ml) показали слабију активност. Међутим, антиоксидативне активности су мање у односу на стандард – БХТ. Што се тиче капацитета неутралисања OH радикала, најбољу активност показао је хлороформски екстракт листова (IC₅₀= 80,56±1,05 µg/ml), док су метанолски екстракти гранчица и листова (IC₅₀= 91,55±1,05 µg/ml и IC₅₀= 87,98±1,07 µg/ml), као и хлороформски екстракт гранчица (IC₅₀= 98,86±0,94 µg/ml) показали слабију активност.

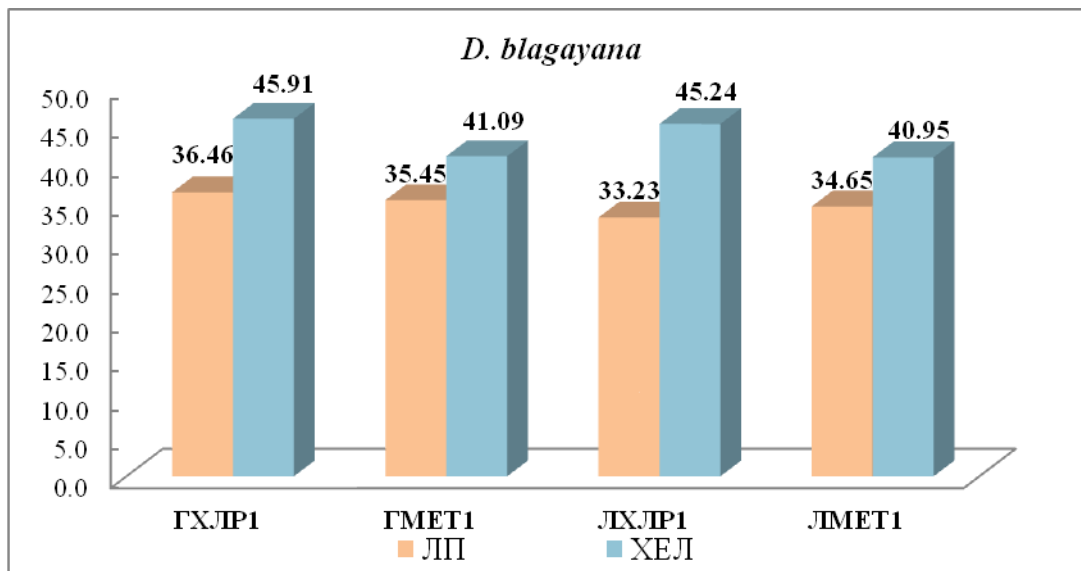


*Вредности добијене за стандарде: DPPH: ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26
 ОН: ГА=59,14±1,10; АА= 160,55±2,31; БХТ=33,92±0,79

Хистограм 9. Капацитет неутралисања DPPH и OH радикала екстракта врсте *D. alpina*.

5.3.3. Инхибиција липидне пероксидације и Fe^{2+} хелатациона активност испитиваних екстракта

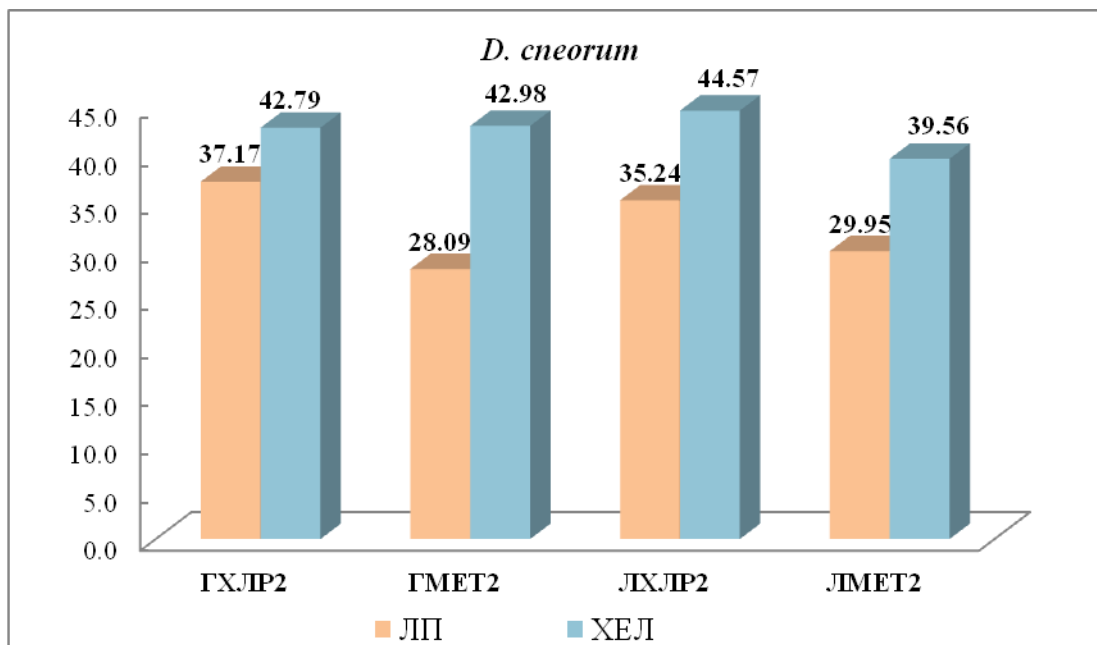
На хистограму 10. приказане су IC_{50} вредности екстракта биљке *D. blagayana* за инхибицију липидне пероксидације (ЛП) и Fe^{2+} хелатациона активност (ХЕЛ). Поређењем IC_{50} вредности за ЛП, може се уочити да постоји веома мала разлика међу испитиваним екстрактима. У поређењу са стандардом (БХТ) сви екстракти су испољили знатно слабију активност. Највећу ЛП активност испољио је хлороформски екстракт листова ($IC_{50}=33,23 \mu g/ml$) док је најслабију активност испољио хлороформски екстракт гранчица ($IC_{50}=36,46 \mu g/ml$). Што се тиче ХЕЛ активности, IC_{50} вредности су се кретале у опсегу од $40,95 \mu g/ml$ до $45,91 \mu g/ml$. Редослед у испољавању Fe^{2+} хелатационе активности је: ЛМЕТ1>ГМЕТ1>ЛХЛР1>ГХЛР1.



*Вредности добијене за стандарде (ЛР): ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26; α-токоферол=0,48±0,05

Хистограм 10. Потенцијал инхибиције липидне пероксидације (ЛП) и Fe²⁺ хелатациона активност (ХЕЛ) екстракта врсте *D. blagayana*.

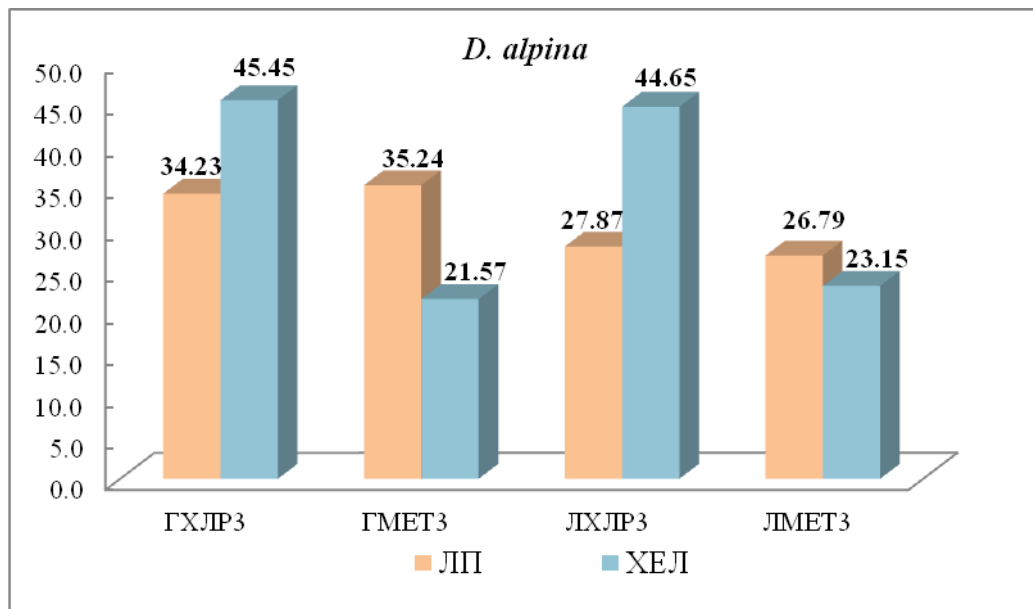
Потенцијална антиоксидативна активност екстракта биљке *D. sneorum*, на основу IC₅₀ вредности за ЛП и ХЕЛ активности приказана је на хистограму 11. Највећи потенцијал на ЛП показао је метанолски екстракт гранчица, постижући IC₅₀ вредност при концентрацији 28,09 µg/ml, док је најслабији потенцијал показао хлороформски екстракт гранчица, који IC₅₀ вредност достиже при концентрацији 37,17 µg/ml. IC₅₀ вредности ХЕЛ активности су се кретале у опсегу од 39,56 µg/ml до 44,57 µg/ml, при чему је најјачу активност показао метанолски екстракт листова, а најслабију хлороформски екстракт листова.



*Вредности добијене за стандарде: DPPH: ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26; α-токоферол=0,48±0,05.

Хистограм 11. Потенцијал инхибиције липидне пероксидације (ЛП) и Fe²⁺ хелатациона активност (ХЕЛ) биљке *D. sneorum*

Концентрације екстракта *D. alpina* потребне за постизање IC₅₀ вредности у ЛП и ХЕЛ моделима антиоксидативне анализе приказане су на хистограму 12. У ЛП моделу, опсег IC₅₀ вредности био је од 26,79 μg/ml до 35,24 μg/ml, при чему је редослед антиоксидативне активности био следећи: ЛМЕТ3>ЛХЛР3>ГХЛР3>ГМЕТ3. Најнижу концентрацију при којој се постиже IC₅₀ вредност Fe²⁺ хелатациона активност имао је метанолски екстракт гранчица (21,57 μg/ml), док је највиша концентрација за постизање IC₅₀ вредности била потребна за хлороформски екстракт гранчица (45,45 μg/ml), који самим тим, има и најнижи антиоксидативни потенцијал у овом моделу испитивања.



*Вредности добијене за стандарде: DPPH: ГА=3,79±0,69; АА=6,05±0,34; БХТ=15,61±1,26; α-токоферол=0,48±0,05.

Хистограм 12. Потенцијал инхибиције липидне пероксидације (ЛП) и Fe²⁺ хелатациона активност (ХЕЛ) биљке *D. sneorum*

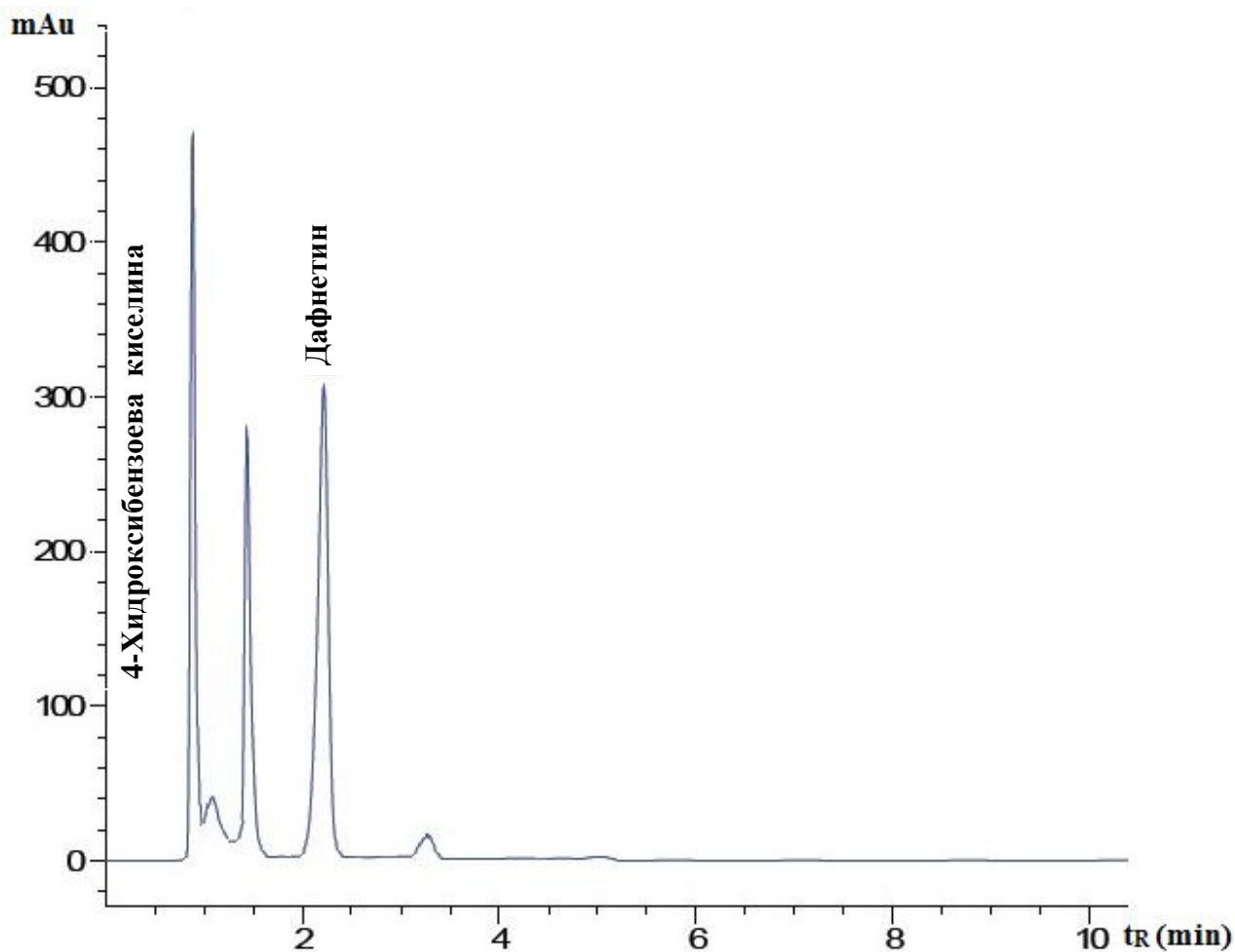
5.4. HPLC-UV АНАЛИЗА ЕКСТРАКАТА *D.BLAGAYANA*, *D.CNEORUM* И *D. ALPINA*

У циљу идентификације најзаступљенијих компоненти испитиваних екстраката *Daphne* врста коришћена је HPLC-UV анализа.

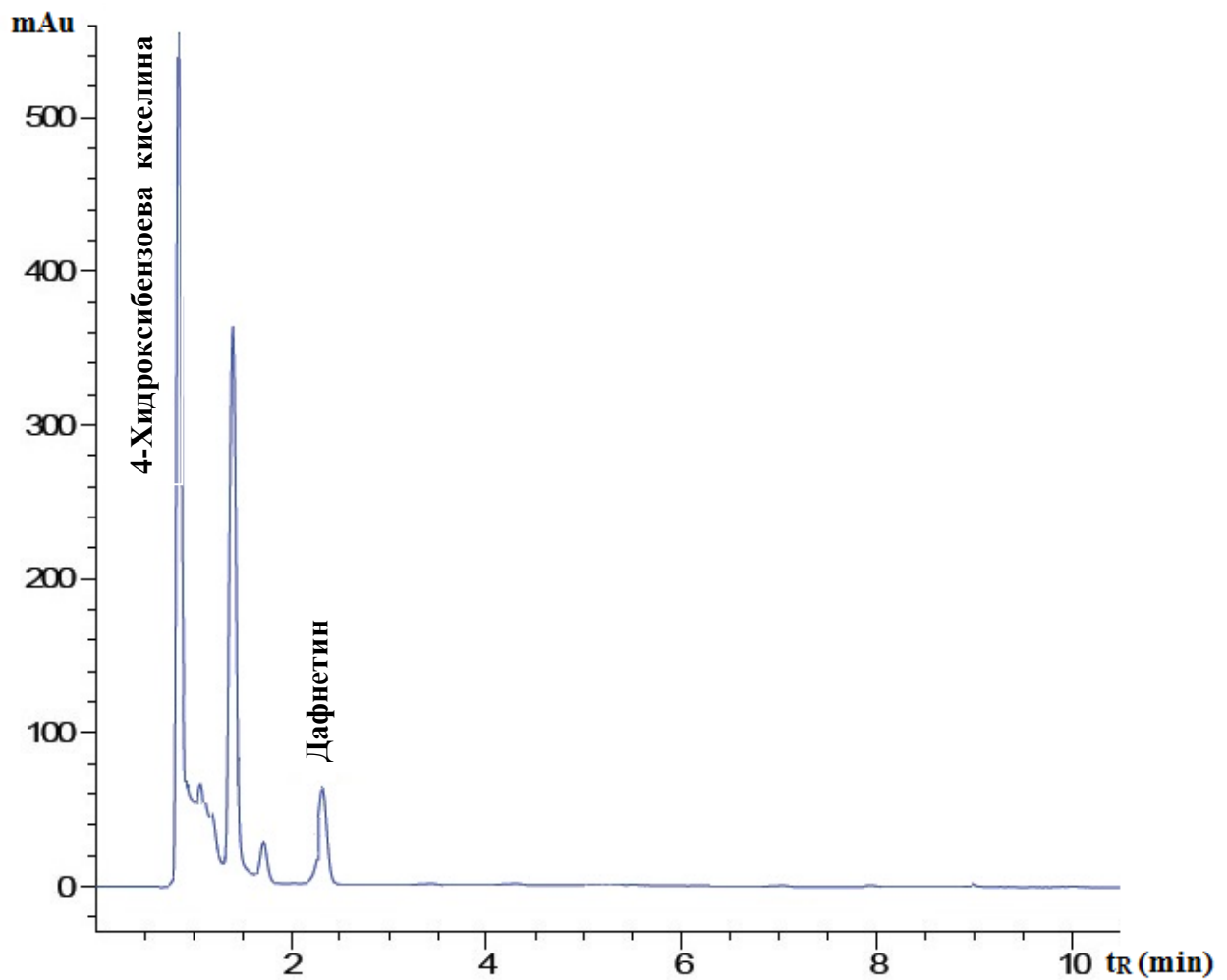
5.4.1. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте *D. blagayana*

На сликама од 28 до 33 приказани су HPLC хроматограми метанолских и хлороформских екстраката лишћа и гранчица *D. blagayana* и стандарда снимљени на 325 nm. Резултати HPLC анализе ових екстраката указују на присуство неколико различитих метаболита, међу којима доминантно место заузима 7,8-дихидроксикумарин (дафнетин, $t_r = 2,25 \pm 0,10$ мин.). Поред дафнетина, у екстрактима је идентификована и 4-хидроксибензоева киселина ($t_r = 0,96 \pm 0,10$ мин.). Идентификација ових метаболита извршена је поређењем ретенционих времена и UV спектра стандарда са ретенционим временима и UV спектрима конституената екстраката. Интензитет сигнала горе наведених метаболита у њиховим HPLC хроматограмима био је различит и специфичан за сваки екстракт. Однос ова два метаболита је био такав да је сигнал од дафнетина био

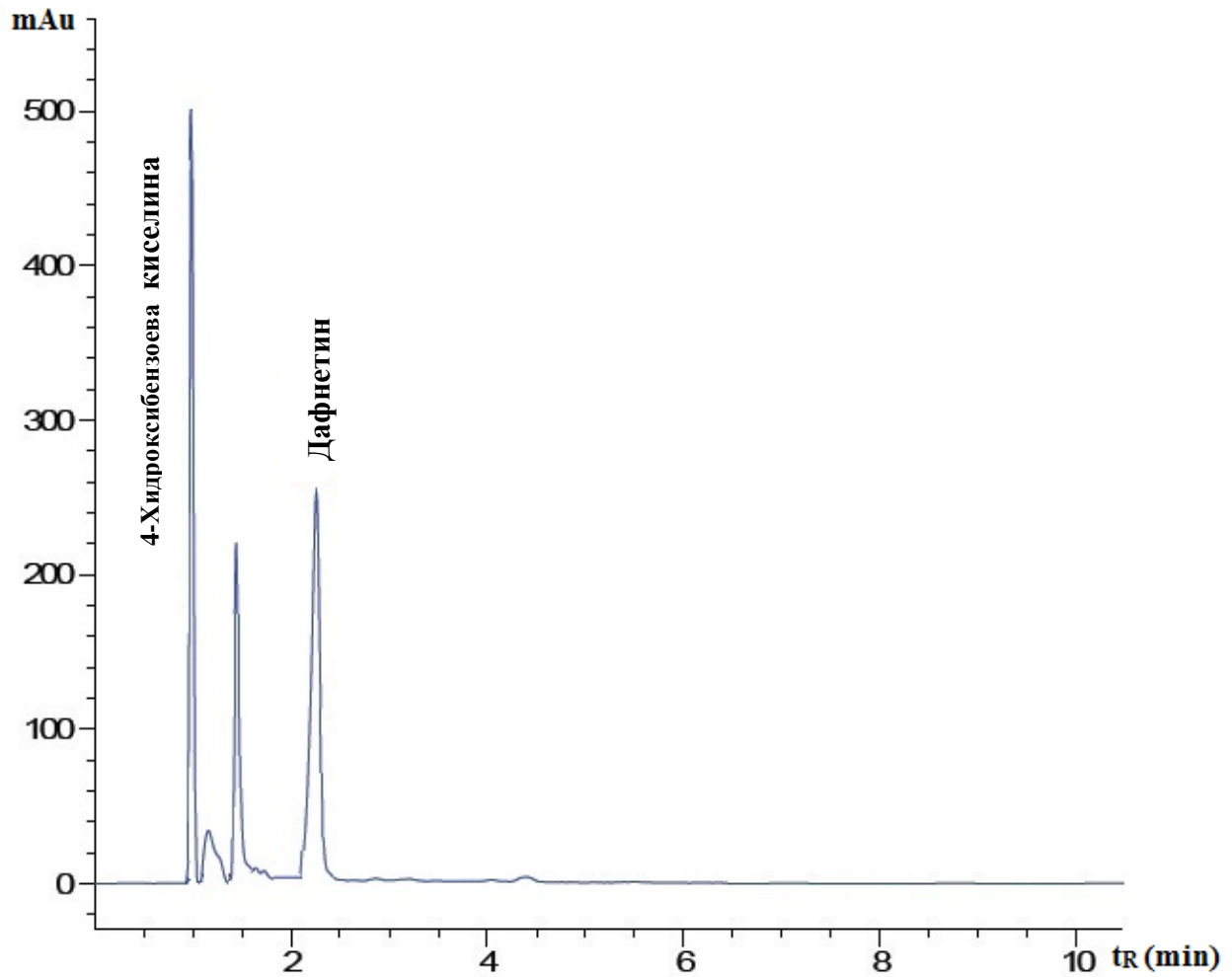
доминантнији (већег интензитета) у хлороформским екстрактима. За разлику од хлороформских екстраката уочени су сигнали већег интензитета за 4-хидроксибензоєву киселину код метанолских екстраката. Поред ова два једињења у приказаним хроматограмима се уочавају и други сигнали који се налазе на мањим ретенционим временима. Анализом њихових UV спектра можемо претпоставити да ова једињења припадају класама кумарина и флавоноида. Анализом UV спектра дафнетина уочавају се апсорпциони максимуми на следећим таласним дужинама: 204 nm (максимум највећег интензитета), 267 nm (максимум најслабијег интензитета) и 325 nm.



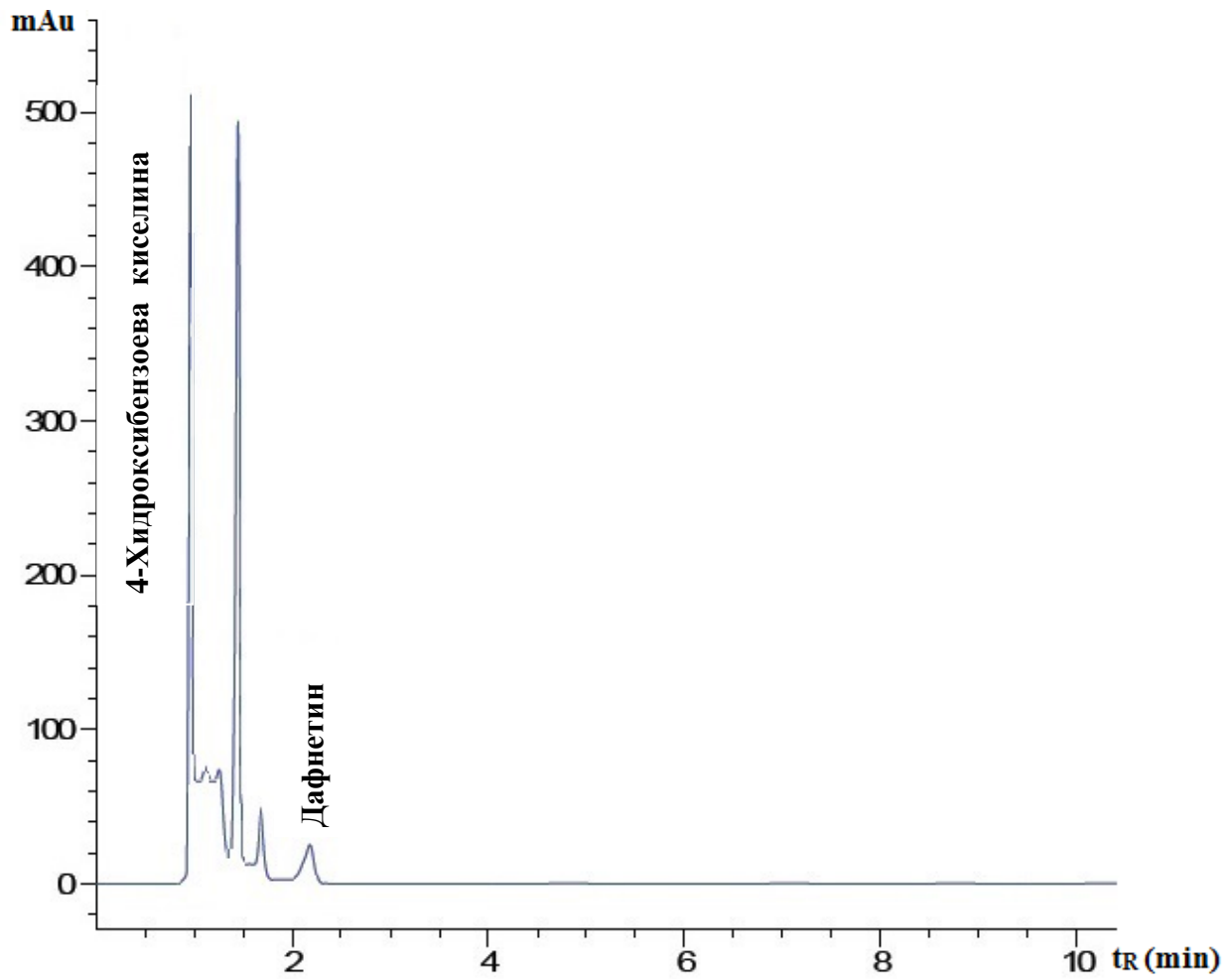
Слика 28. HPLC хроматограм хлороформског екстракта гранчица врсте *D. blagayana* снимљен на 325 nm



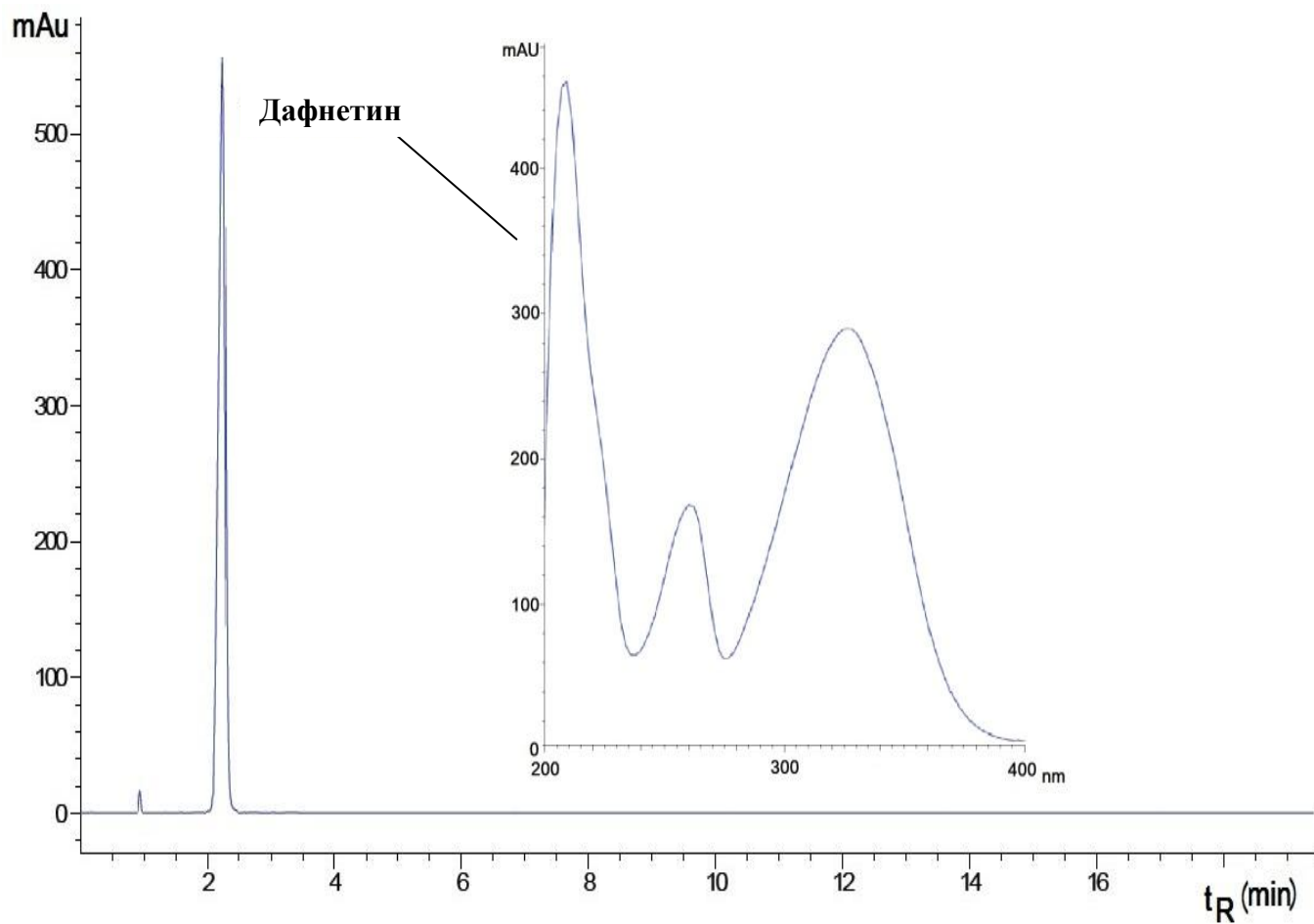
Слика 29. HPLC хроматограм метанолског екстракта гранчица врсте *D. blagayana* снимљен на 325 nm



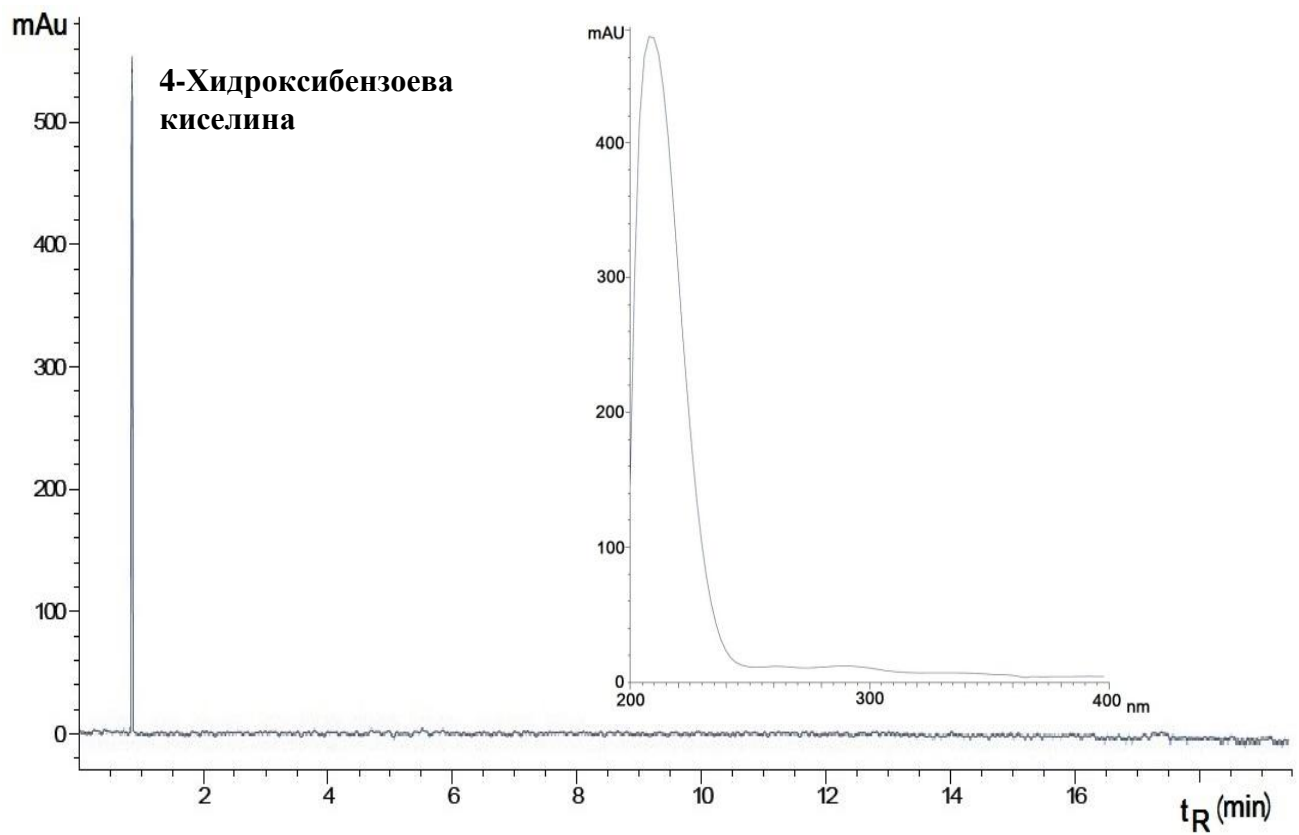
Слика 30. HPLC хроматограм хлороформског екстракта листова врсте *D. blagayana* снимљен на 325 nm



Слика 31. HPLC хроматограм метанолског екстракта листовa врстe *D. blagayana* снимљен на 325 nm



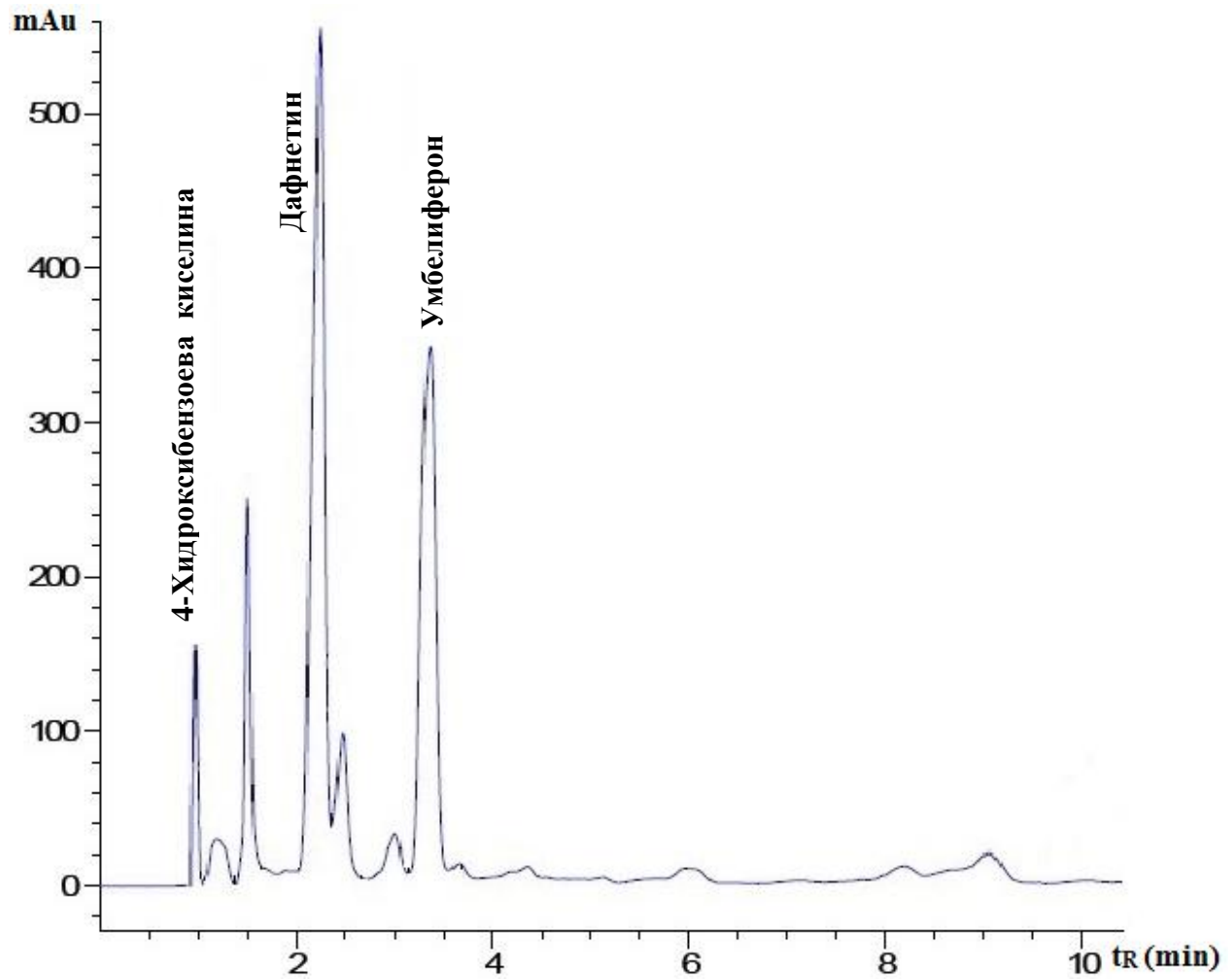
Слика 32. HPLC хроматограм и UV спектар дафнетина



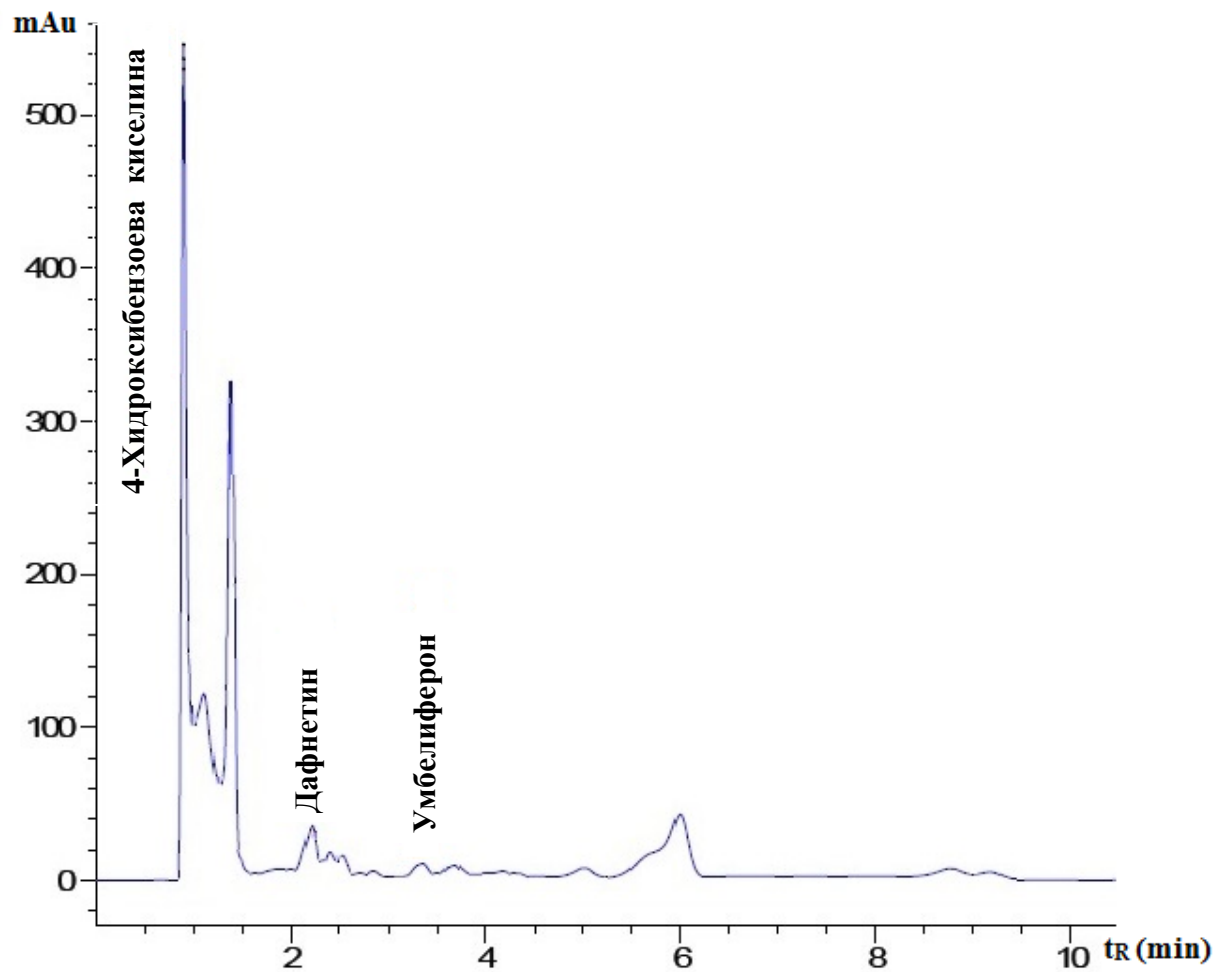
Слика 33. HPLC хроматограм и UV спектар 4-хидроксибензоеве киселине

5.4.2. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте *Daphne alpinia*

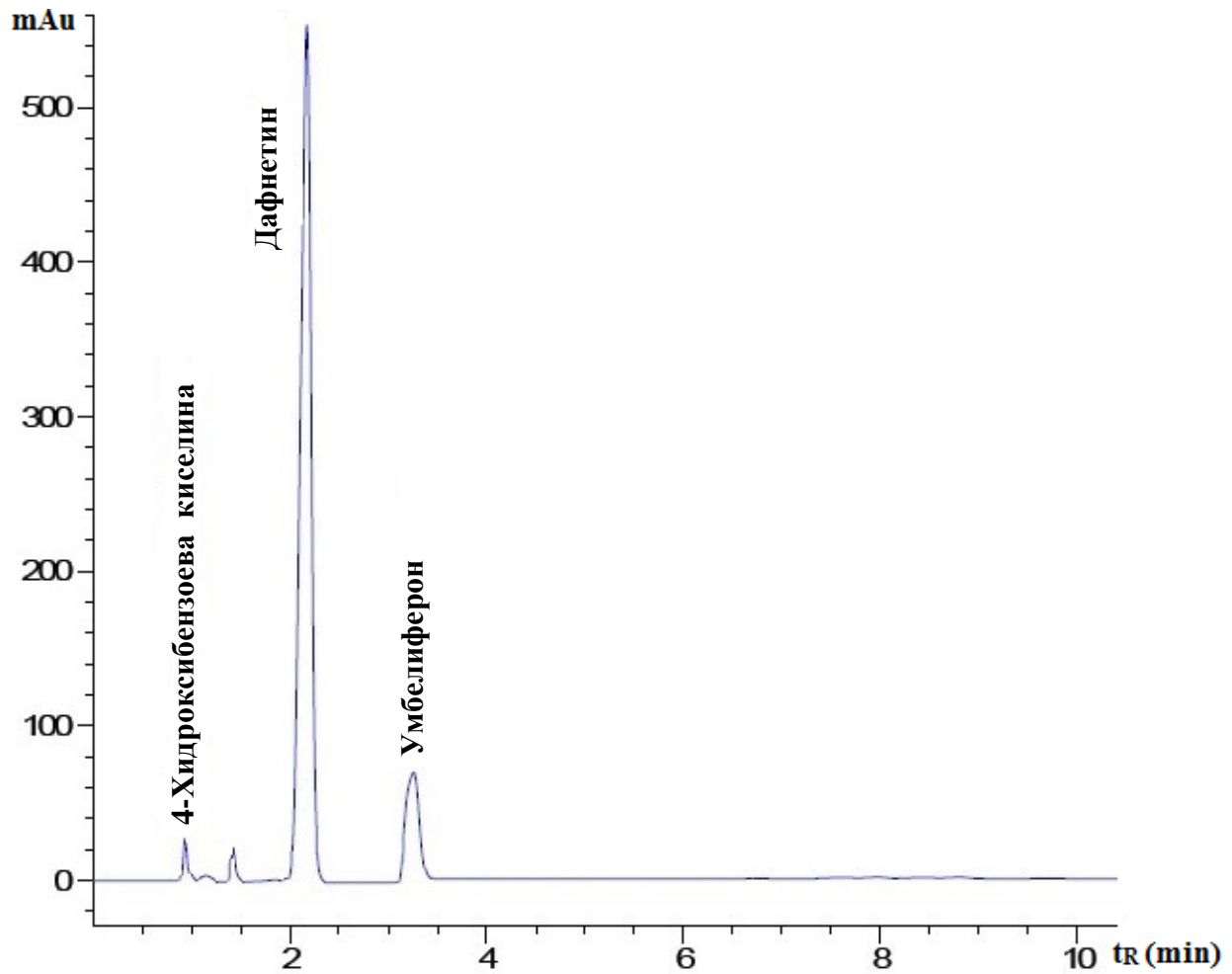
На сликама од 34 до 37 приказани су HPLC хроматограми хлороформских и метанолских екстраката гранчица и листових врста *D. alpinia* снимљени на 325 nm. На основу хроматограма и UV спектра у овим екстрактима уочава се присуство 4-хидроксибензојеве киселине и два хидроксикумаринска деривата, дафнетина и 7-хидроксикумарина (умбелиферона). Као нови метаболит ових екстраката, који није био присутан у екстрактима врсте *D. blagayana*, идентификован је 7-хидроксикумарин, који је у литератури познат као умбелиферон. Сигнал овог кумарина јавља се на ретенционом времену $t_R=3,25\pm 0,10$ мин. Његово присуство потврђено је поређењем ретенционог времена и UV спектра стандарда. UV спектар умбелиферона, у области од 200 до 360 nm садржи пет апсорпционих максимума на таласним дужинама: 220 nm, 240 nm, 255 nm, 290 nm и 330 nm (слика 38). Дафнетин има најинтензивније сигнале у HPLC хроматограмима хлороформских екстраката гранчица и листових. Сигнал најмањег интензитета који потиче од дафнетина уочава се у HPLC хроматограму метанолског екстракта гранчица. За разлику од хлороформских екстраката, сигнали од дафнетина у HPLC хроматограмима метанолских екстраката су знатно слабијег интензитета, што доводи до претпоставке да је ово једињење знатно заступљеније у хлороформским него у метанолским екстрактима гранчица и листових. Са друге стране, супротна запажања се могу уочити у случају 4-хидроксибензојеве киселине. У HPLC хроматограму хлороформског екстракта гранчица снимљеном на 325 nm уочава се веома интензиван сигнал на $t_R=3,25\pm 0,10$ мин. који потиче од 7-хидроксикумарина (умбелиферона). У хлороформском и метанолском екстракту листових сигнал од овог једињења је знатно мањег интензитета, док се у HPLC хроматограму метанолског екстракта гранчица једва уочава.



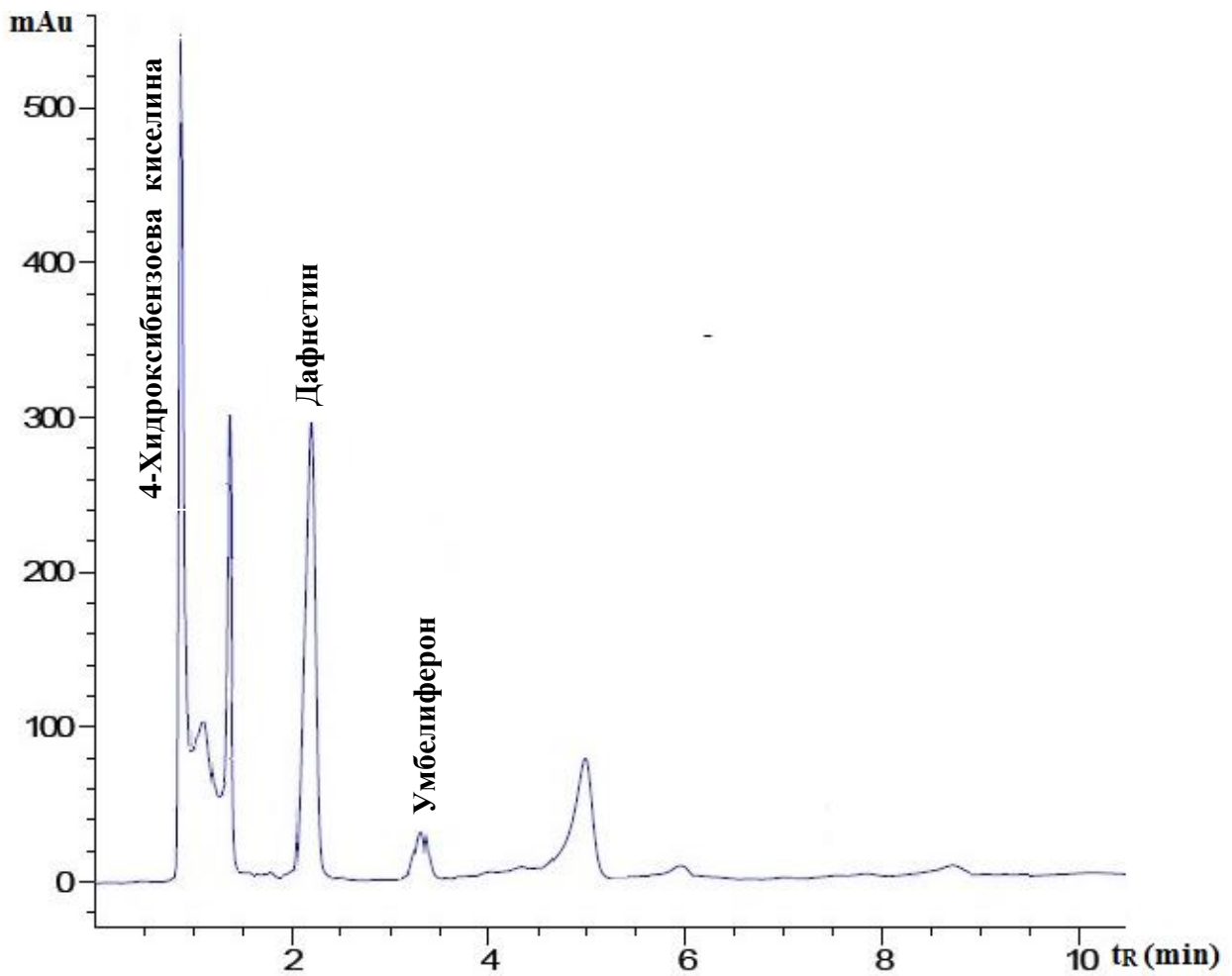
Слика 34. HPLC хроматограм хлороформског екстракта гранчица врсте *D. alpina* снимљен на 325 nm



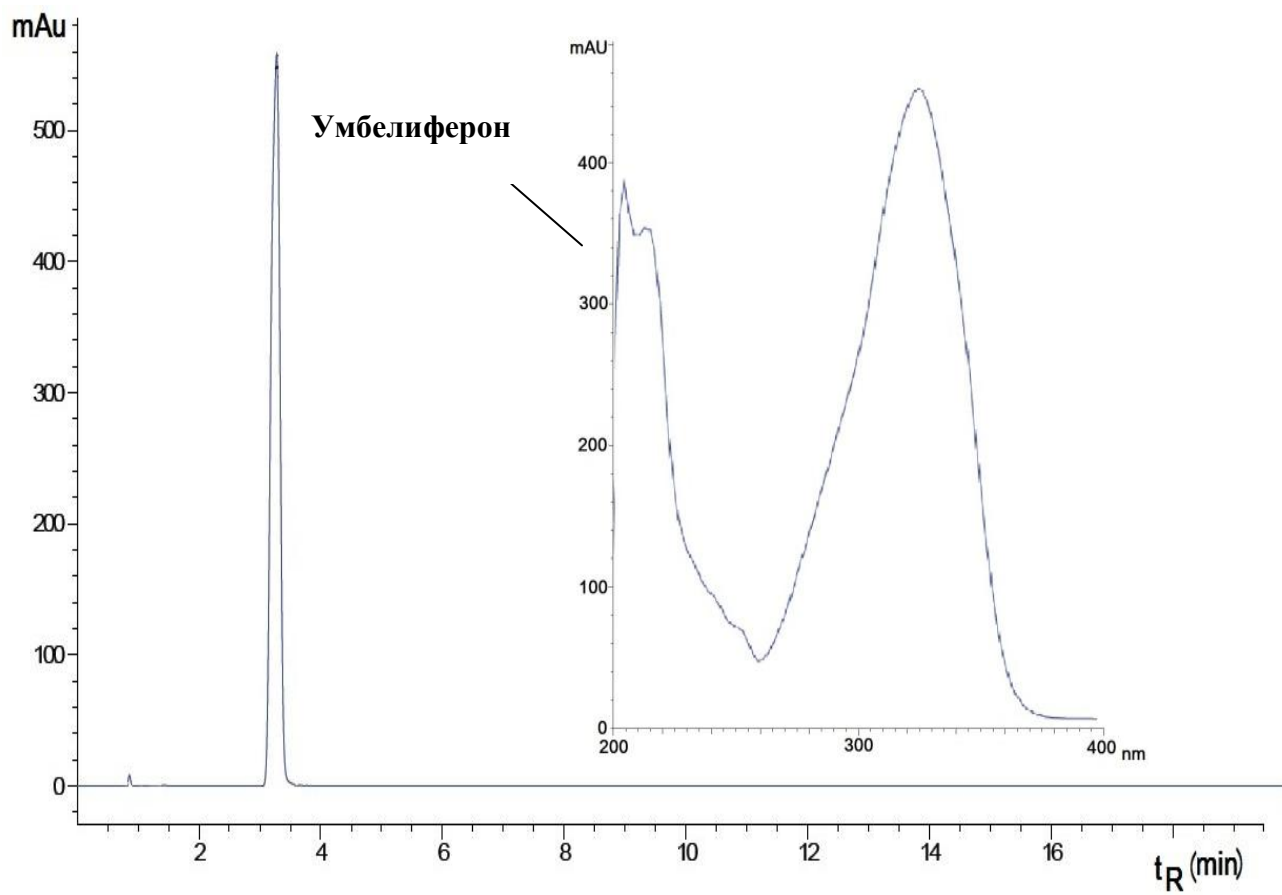
Слика 35. HPLC хроматограм метанолског екстракта гранчица врсте *D. alpina* снимљен на 325 nm



Слика 36. HPLC хроматограм хлороформског екстракта листова врсте *D. alpina* снимљен на 325 nm



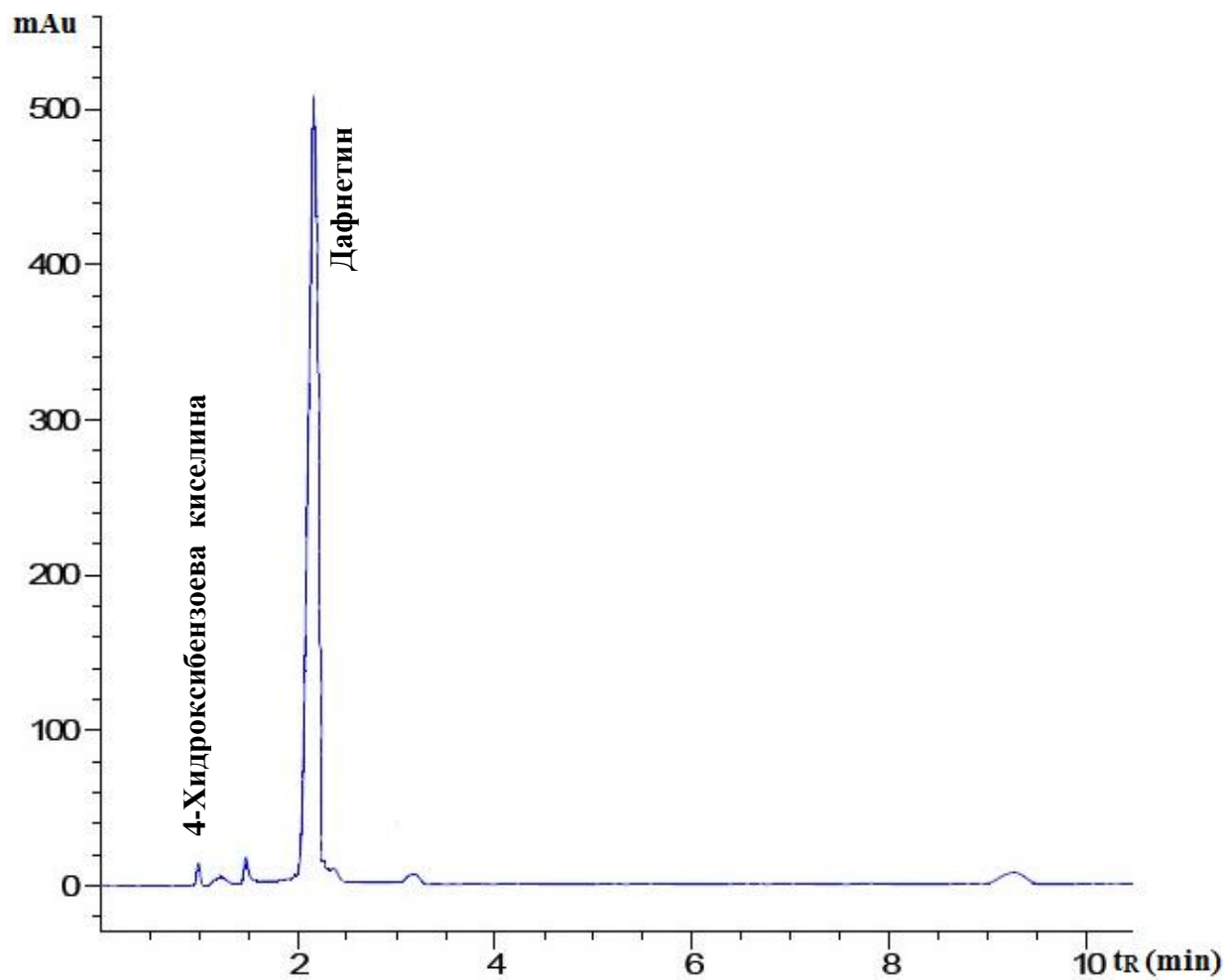
Слика 37. HPLC хроматограм метанолског екстракта листовa врсте *D. alpina* снимљен на 325 nm



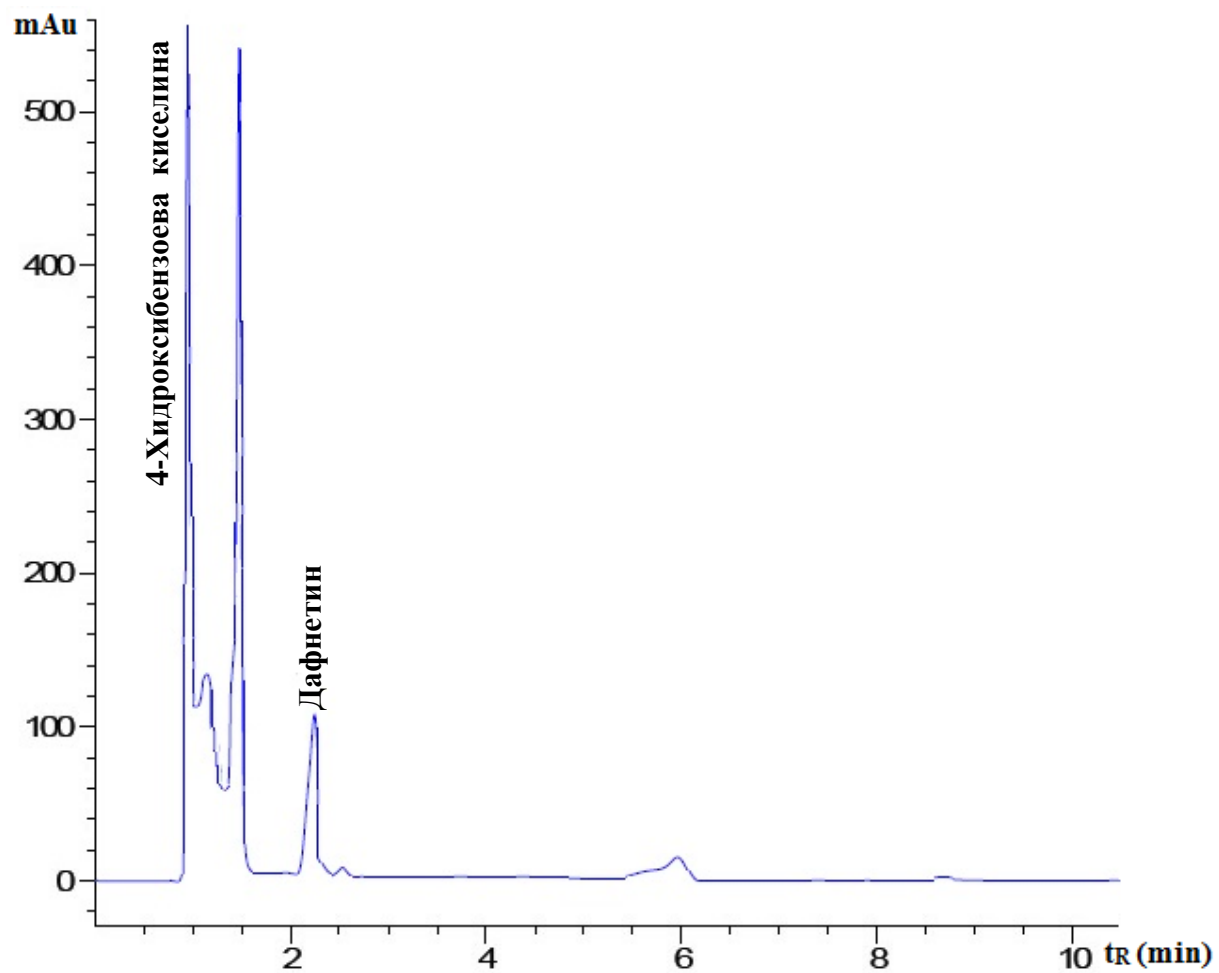
Слика 38. HPLC хроматограм и UV спектар умбелиферона

5.4.3. HPLC анализа испитиваних екстраката врсте *D. sneorum*

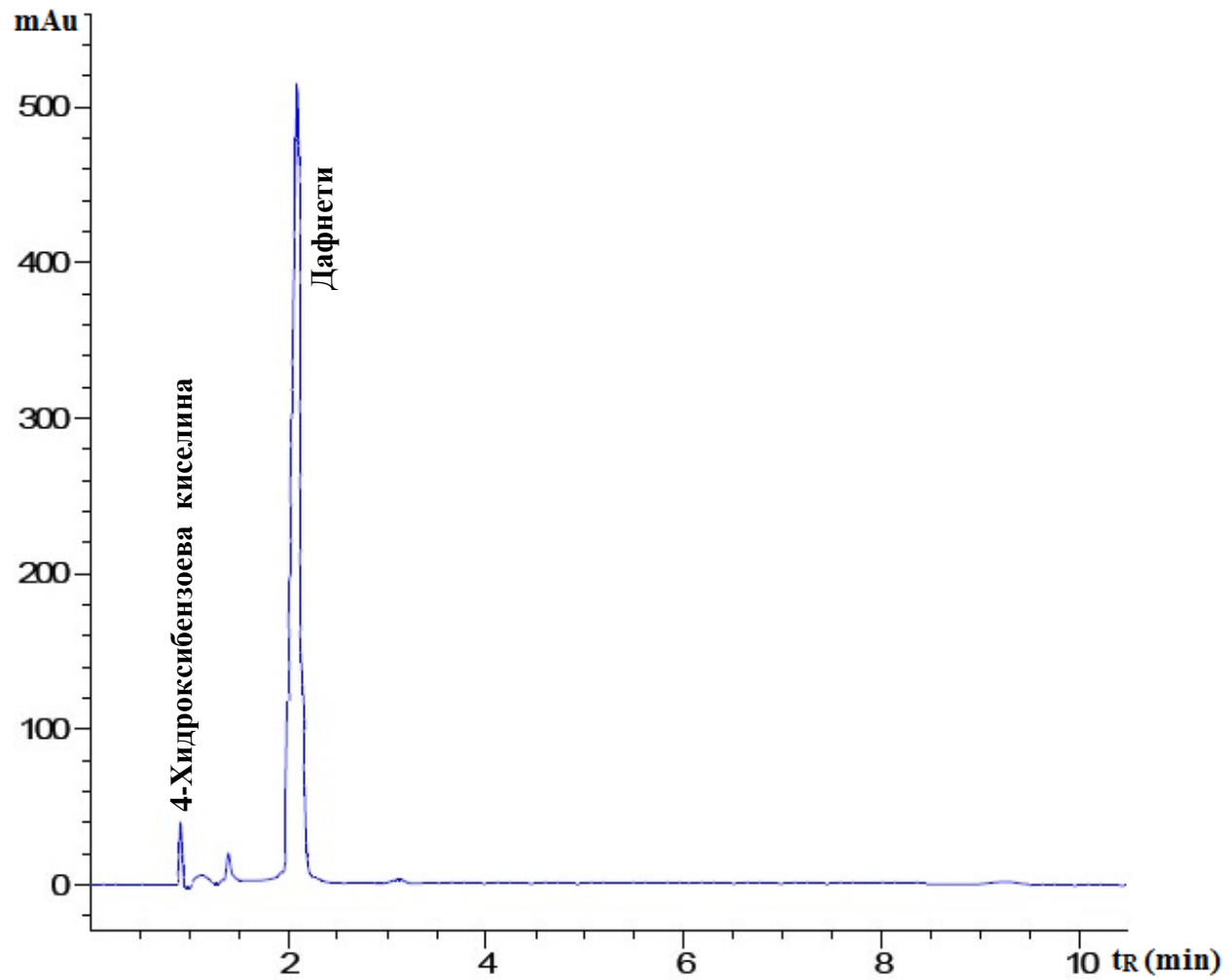
На сликама од 39 до 42 приказани су HPLC хроматограми испитиваних екстраката биљке *D. sneorum*. У HPLC хроматограмима хлороформског екстракта гранчица и хлороформског екстракта листова биљке *D. sneorum* као најинтензивнији пик на $t_r=2,18\pm 0,10$ мин. уочава се сигнал који потиче од дафнетина. Осим овог сигнала у овим HPLC хроматограмима уочава се и веома слаб сигнал који потиче од 4-хидроксибензојеве киселине. Са друге стране у HPLC хроматограмима метанолских екстраката гранчица и листова најинтензивнији сигнал потиче од 4-хидроксибензојеве киселине, док је у овим хроматограмима сигнал који потиче од дафнетина знатно слабијег интензитета. Ни у једном од анализираних екстраката *D. sneorum* није забележено присуство умбелиферона. На основу свега може се закључити да екстракти гранчица и листова биљке *D. sneorum* као најзаступљеније метаболите садрже 4-хидроксибензојеву киселину и дафнетин, а за разлику од екстраката биљке *D. alpina*, не садрже умбелиферон.



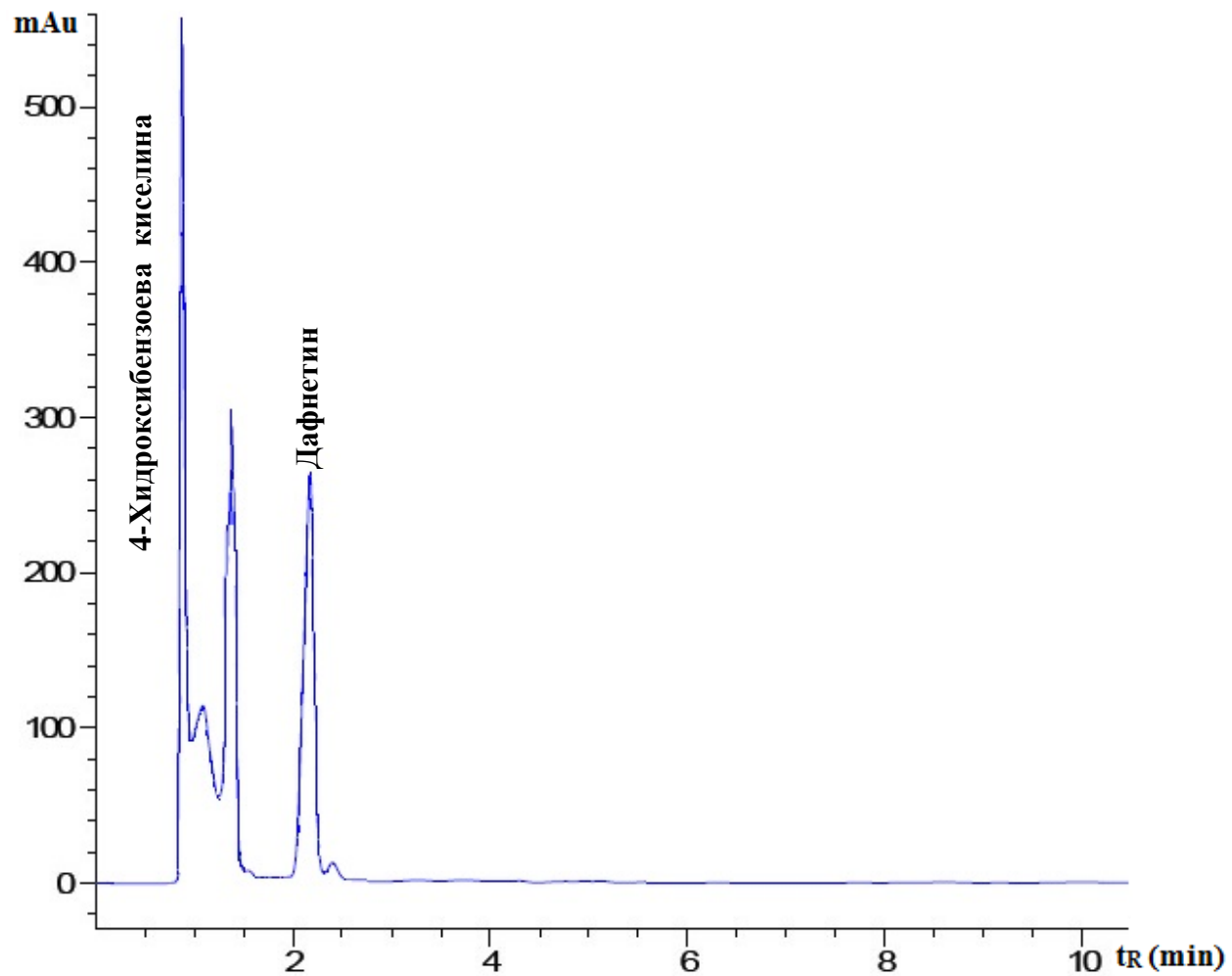
Слика 39. HPLC хроматограм хлороформског екстракта гранчица врсте *D. sneorum* снимљен на 325 nm



Слика 40. HPLC хроматограм метанолског екстракта гранчица врсте *D. sneorum* снимљен на 325 nm

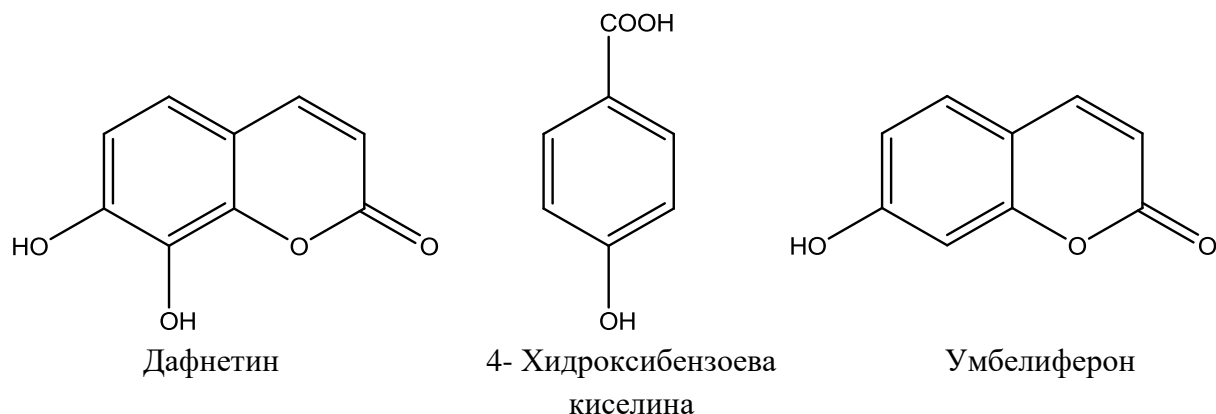


Слика 41. HPLC хроматограм хлороформског екстракта листова врсте *D. sneorum* снимљен на 325 nm



Слика 42. HPLC хроматограм метанолског екстракта листова врсте *D. sneorum* снимљен на 325 nm

Структуре идентификованих једињења приказане су на слици 43.



Слика 43. Структуре идентификованих једињења

У табели 5. приказано је присуство идентификованих метаболита у екстрактима *D. blagayana*, *D. sneorum* и *D. alpina*.

Табела 5. Присуство најзаступљенијих метаболита у испитиваним екстрактима

Биљка	Екстракт	Дафнетин	Умбелиферон	4-хидроксибензоева киселина
<i>D. blagayana</i> (1)	ГХЈР1	+	-	+
	ГМЕТ1	+	-	+
	ЛХЈР1	+	-	+
	ЛМЕТ1	+	-	+
<i>D. sneorum</i> (2)	ГХЈР2	+	-	+
	ГМЕТ2	+	-	+
	ЛХЈР2	+	-	+
	ЛМЕТ2	+	-	+
<i>D. alpina</i> (3)	ГХЈР3	+	+	+
	ГМЕТ3	+	+	+
	ЛХЈР3	+	+	+
	ЛМЕТ3	+	+	+

5.5. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА *D.BLAGAYANA*, *D.CNEORUM***И *D. ALPINA***

Микродилуционом методом, описаном у експерименталном делу, одређиване су минималне инхибиторна концентрација испитиваних екстраката у *in vitro* условима, које представљају најнижу концентрацију екстракта која спречава раст микроорганизама.

5.5.1. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте *D. blagayana*

Антибактеријска активност метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова *D. blagayana*, изражена као минимална инхибиторна концентрација (МИС), кретала се у опсегу од 15,62 до 125 µg/ml (табела 7). Најмања вредност МИС забележена је у случају метанолског екстракта гранчица према врсти *K. pneumoniae* и хлороформског екстракта листова према врстама *S. aureus* и *P. mirabilis* (МИС=15,62 µg/ml). Најслабије активности (МИС=125 µg/ml) показали су хлороформски екстракт гранчица према *P. vulgaris*, метанолски екстракт гранчица према *B. subtilis* и хлороформски екстракт листова према *P. vulgaris*, као и метанолски екстракт листова према *S. aureus*. У случају испитивања антифунгалне активности метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова *D. blagayana* вредности МИС су се кретале у опсегу од 15,62 до 125 µg/ml. Најбољу активност испољио је метанолски екстракт гранчица (МИС=15,62 µg/ml) и метанолски екстракт листова (МИС=31,25 µg/ml) према врсти *A. niger*. Најслабије активности (МИС=125 µg/ml) забележене су у случају метанолског екстракта гранчица према врсти *C. albicans*, хлороформског екстракта гранчица према *A. niger* и метанолског екстракта листова према *C. albicans*.

Табела 7. Антимикробна активност екстракта врсте *D. blagayana*

Микроорганизми	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	ГХЛР1	ЛХЛР1	ГМЕТ1	ЛМЕТ1	Тетрациклин	Кетоконазол
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	62,5	15,62	62,5	125	0,98	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	31,25	62,5	15,62	62,5	0,49	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	62,5	62,5	62,5	62,5	0,98	-
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	125	125	31,25	62,5	1,95	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC 14153	62,5	15,62	62,5	62,5	1,95	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	31,25	62,5	125	62,5	0,24	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62,5	62,5	125	125	0,98	-
<i>A. niger</i> ATCC 16404	125	62,5	15,62	31,25	-	0,98

5.5.2. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте *D. sneorum*

У табели 8. приказани су резултати испитивања антимикробне активности метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова биљке *D. sneorum*. Вредности МИС су се кретале од 15,62 µg/ml до 62,5 µg/ml. Највећу осетљивост према метанолском екстракту гранчица (МИС=15,62 µg/ml) показале су бактерије *P. mirabilis* и *K. pneumoniae*, док су *B. subtilis* и *P. vulgaris* биле најосетљивије према хлороформским екстрактима листова односно гранчица. Екстракти гранчица су показали исте активности према *S. aureus* и *E. coli* (МИС=62,5 µg/ml). Са друге стране, екстракти листова су имали исте МИС вредности за *S. aureus* и *K. pneumoniae* (31, 25 µg/ml) као и за *P. vulgaris* и *P. mirabilis* (62,5 µg/ml). Испитивани екстракти показују антифунгалну активност, за коју су се вредности МИС кретале у опсегу од 15,62 µg/ml до 125 µg/ml. Најосетљивија је била *C. albicans* према хлороформском екстракту листова и метанолском екстракту гранчица.

Табела 8. Антимикробна активност екстракта врсте *D. spongiae*

Микроорганизми	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	ГХЈР2	ЛХЈР2	ГМЕТ2	ЛМЕТ2	Тетрациклин	Кетоконазол
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	62,5	31,25	62,5	31,25	0,98	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	31,25	31,25	15,62	31,25	0,49	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	62,5	31,25	62,5	62,5	0,98	-
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	15,62	62,5	31,25	62,5	1,95	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC 14153	62,5	62,5	15,62	62,5	1,95	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	31,25	15,62	62,5	62,5	0,24	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	31,25	15,62	15,62	31,25	0,98	-
<i>A. niger</i> ATCC 16404	62,5	62,5	125	62,5	-	0,98

5.5.3. Антимикробна активност испитиваних екстраката врсте *D. alpina*

Антимикробна активност екстраката листова и гранчица биљке *D. alpina* добијених помоћу различитих растварача дата је у табели 9. Најмање МИС вредности (15,62 µg/ml) имали су хлороформски екстракт гранчица и листова према *B. subtilis*, као и метанолски екстракт листова према *P. vulgaris*. Хлороформски и метанолски екстракти гранчица показали су исте активности (МИС=62,5 µg/ml) према *S. aureus*, *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. Са друге стране, хлороформски и метанолски екстракти листова су имали исте МИС вредности (31,25 µg/ml) према *S. aureus* и *E. coli*. Најслабију активност (МИС=125 µg/ml) имао је метанолски екстракт листова према *K. pneumoniae* и *B. subtilis*. Генерално, хлороформски екстракти су показали боље антимикробне активности од метанолских екстраката, са изузетком дејства на *P. mirabilis* где су МИС вредности исте за све испитиване екстракте. Што се тиче антифунгалне активности, МИС вредности су се кретале у опсегу од 31,25 µg/ml до 125 µg/ml, при чему је најбољу активност испољио хлороформски екстракт листова према обе врсте испитиваних плесни.

Табела 9. Антимикробна активност екстракта биљке *D. alpina*

Микроорганизми	MIC ($\mu\text{g/mL}$)					
	ГХЛРЗ	ЛХЛРЗ	ГМЕТЗ	ЛМЕТЗ	Тетрациклин	Кетоконазол
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	62,5	31,25	62,5	31,25	0,98	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	31,25	31,25	62,5	125	0,49	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	31,25	31,25	62,5	31,25	0,98	-
<i>P. vulgaris</i> ATCC 13315	62,5	31,25	62,5	15,62	1,95	-
<i>P. mirabilis</i> ATCC 14153	62,5	62,5	62,5	62,5	1,95	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	15,62	15,62	62,5	125	0,24	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	62,5	31,25	62,5	125	0,98	-
<i>A. niger</i> ATCC 16404	62,5	31,25	62,5	125	-	0,98

5.6. КОМПРАТИВНА СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА ДОБИЈЕНИХ РЕЗУЛТАТА

5.6.1. Једнофакторска анализа варијансе укупних фенола, флавоноида и антиоксидативних активности

Једнофакторском анализом варијансе (АНОВА) утврђено је постојање статистички значајне разлике ($p < 0,05$) између испитиваних екстраката у количини укупних фенола и флавоноида као и испољеним антиоксидативним активностима (табела 10.).

Табела 10. Анализа варијансе (АНОВА) вредности укупних фенола, флавоноида и антиоксидативних активности испитиваних узорака и стандарда

АНОВА							
	Укупни феноли	Укупни флавоноиди	Укупни антиокс. капацитет	DPPH скевинџер активност	Инхибиција липидне пероксидације	Fe ²⁺ хелатација	Неутрали саће ОН [•] радикала
F	248,331	74,000	52,408	137,581	1.093,654	203,763	1.935,743
p	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*

F - експериментална вредност F-дистрибуције

p - вероватноћа за прихватање нулте хипотезе

*- разлика је статистички значајна ($p < 0,05$)

Како би се утврдило између којих конкретно група постоји статистички значајна разлика резултати мерења су анализирани накнадним *Tukey HSD* тестом.

5.6.2. *Tukey's HSD* тестирање укупног фенолног садржаја испитиваних екстраката

Међу екстрактима биљке *D. blagayana*, једино се хлороформски екстракт граница статистички значајно разликовао по количини укупних фенола од осталих екстраката ове биљке (табела 11). Са друге стране, анализом екстраката добијених од различитих делова биљке *D. alpina*, статистички значајна разлика у садржају фенолних једињења није утврђено само између хлороформских екстраката граница и листова. Код екстраката добијених из биљке *D. sneorum*, статистички значајне разлике није било између

хлороформског екстракта гранчица и метанолског екстракта листова, као и хлороформског екстракта листова и метанолског екстракта гранчица ове биљке. Сви екстракти биљке *D. alpina* се статистички значајно разликују по садржају фенолних молекула од испитиваних екстракта биљке *D. sneorum*. Компарацијом екстракта *D. alpina* са екстрактима биљке *D. blagayana*, углавном је установљено постојање статистички значајне разлике у садржају укупних фенола. Разлике није било између метанолског екстракта гранчица и хлороформског екстракта листова *D. alpina* према хлороформском екстракту гранчица односно метанолског екстракта листова *D. blagayana*. Што се тиче компаративне статистичке анализе екстракта биљака *D. sneorum* и *D. blagayana*, по садржају укупних фенолних једињења, хлороформски екстракт гранчица *D. sneorum* се није разликовао од метанолских екстракта гранчица и листова и хлороформског екстракта гранчица биљке *D. blagayana*. Нису се статистички значајно разликовали ни метанолски екстракт листова *D. sneorum* и хлороформски екстракт биљке *D. blagayana*.

Табела 11. Статистичка анализа добијених резултата укупног фенолног садржаја испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,000	ГМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,002	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ГХЛР3	0,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ЛХЛР3/ГХЛР2	0,015
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,000	ГМЕТ1/ГХЛР2	0,998	ЛХЛР3/ЛХЛР2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ3	0,632	ГМЕТ1/ЛХЛР2	0,000	ЛХЛР3/ГМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ГХЛР2	0,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,601	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,002
ГХЛР1/ЛХЛР2	0,000	ЛМЕТ1/ГХЛР3	0,002	ГМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	0,384	ГМЕТ3/ЛХЛР2	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ1	0,991	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	0,939	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,879	ЛМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР3	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	0,000	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР3	0,023	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,004	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,340	ГХЛР2/ЛХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР2	1,000	ГХЛР3/ГМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР2	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ЛМЕТ2	0,147
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ГХЛР3/ГХЛР2	0,000	ЛХЛР2/ГМЕТ2	0,935
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,104	ГХЛР3/ЛХЛР2	0,000	ЛХЛР2/ЛМЕТ2	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	0,349	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,000	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	0,000

5.6.3. Tukey's HSD тестирање укупног флавоноидног садржаја испитиваних екстраката

По садржају укупних флавоноида, метанолски екстракт биљке *D. blagayana* се није статистички значајно разликовао од хлороформског екстракта листа и метанолског екстракта гранчица исте биљке (табела 12). Између осталих екстраката ове биљке утврђено је постојање статистички значајне разлике у садржају флавоноидних једињења. Што се тиче екстраката добијених из биљке *D. alpina*, метанолски екстракт листова се није статистички значајно разликовао по садржају укупних флавоноида од метанолског и хлороформског екстракта гранчица. Екстракти биљке *D. sneorum* су се међусобно разликовали по садржају укупних флавоноида, сем хлороформског и метанолског екстракта гранчица, између којих није утврђено постојање статистички значајне разлике. Када се пореде екстракти добијени из различитих врста, садржај укупних флавоноида се није статистички значајно разликовао у више случајева. Тако се на пример метанолски екстракт гранчица биљке *D. blagayana* није разликовао од хлороформског екстракта листова и метанолских екстраката биљке *D. alpina* као и метанолског екстракта листова биљке *D. sneorum*. Хлороформски екстракти биљке *D. blagayana* се нису разликовали од хлороформских екстракта *D. alpina*. Хлороформски екстракт листова биљке *D. sneorum* се није разликовао од хлороформских екстракта гранчица друге две врсте као и метанолског екстракта листова биљке *D. alpina*. Такође, метанолски екстракт гранчица ове биљке се није разликовао по садржају укупних флавоноида од хлороформских екстраката листова друге две врсте као и метанолског екстракта листова биљке *D. blagayana*. Метанолски екстракт листова *D. sneorum* се није разликовао од метанолског екстракта листова биљке *D. blagayana* и од два екстракта биљке *D. alpina* (хлороформски екстракт листова и метанолски екстракт гранчица).

Табела 12. Статистичка анализа добијених резултата укупног флавоноидног садржаја испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,000	ГМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,107	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ3	0,326	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ГХЛР3	0,995	ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,004	ЛХЛР3/ГХЛР2	0,000
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,000	ГМЕТ1/ГХЛР2	0,000	ЛХЛР3/ЛХЛР2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР2	0,000	ЛХЛР3/ГМЕТ2	0,301
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,006	ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	0,362
ГХЛР1/ГХЛР2	0,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	1,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,634
ГХЛР1/ЛХЛР2	0,824	ЛМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	1,000	ГМЕТ3/ЛХЛР2	0,003
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ1	0,001	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,093
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	0,645	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,000	ЛМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР3	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	0,000	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,261
ЛХЛР1/ЛХЛР3	0,525	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,401	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,269	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	0,001
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,000	ГХЛР2/ЛХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР2	0,042	ГХЛР3/ГМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ГМЕТ2	0,097
ЛХЛР1/ЛХЛР2	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,065	ГХЛР2/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ2	1,000	ГХЛР3/ГХЛР2	0,000	ЛХЛР2/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,003	ГХЛР3/ЛХЛР2	1,000	ЛХЛР2/ЛМЕТ2	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	0,073	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,000	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	0,001

5.6.4. Tukey's HSD тестирање укупног укупног антиоксидативног капацитета**испитиваних екстраката**

Екстракти биљке *D. blagayana* су се по укупном антиоксидативном капацитету међусобно статистички значајно разликовали, сем метанолског екстракта гранчица и метанолског екстракта листова (табела 13). Са друге стране, између екстраката биљке *D. sneorum* нема статистички значајне разлике у укупном антиоксидативном капацитету. Што се тиче екстраката добијених од биљке *D. alpina*, статистички значајно се разликовао хлороформски екстракт гранчица од осталих испитиваних екстраката ове биљке док међу осталим екстрактима ове биљке није било статистички значајне разлике. Компаративна анализа екстраката све три испитиване врсте је утврђено да не постоји статистички значајна разлика у укупном антиоксидативном капацитету између метанолских екстраката гранчица и метанолских екстраката листова. Поређењем екстраката листова биљке *D. alpina* са екстрактима добијеним из биљке *D. sneorum*, статистички значајна разлика је постојала једино између метанолског екстракта листова *D. alpina* и метанолског екстракта гранчица *D. sneorum*. Екстракти листова *D. alpina* се по укупном антиоксидативном капацитету нису разликовали и од метанолског екстракта гранчица биљке *D. blagayana*. Хлороформски екстракти *D. sneorum* као и метанолски екстракт гранчица ове биљке се није разликовао од метанолског екстракта листова биљке *D. blagayana*. Статистички значајна разлика није постојала између метанолског екстракта гранчица биљке *D. blagayana* и хлороформског екстракта гранчица и метанолског екстракта листова биљке *D. sneorum*.

Табела 13. Статистичка анализа добијених резултата укупног антиоксидативног капацитета испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,015	ГМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,001
ГХЛР1/ГМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,989	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,859
ГХЛР1/ЛМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ3	0,231	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	1,000
ГХЛР1/ГХЛР3	0,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ3	1,000	ЛХЛР3/ГХЛР2	1,000
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,000	ГМЕТ1/ГХЛР2	0,781	ЛХЛР3/ЛХЛР2	0,939
ГХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР2	0,334	ЛХЛР3/ГМЕТ2	1,000
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ2	1,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	1,000
ГХЛР1/ГХЛР2	0,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,781	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,410
ГХЛР1/ЛХЛР2	0,000	ЛМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГМЕТ3/ГХЛР2	0,997
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	0,657	ГМЕТ3/ЛХЛР2	1,000
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	0,038	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,569
ЛХЛР1/ГМЕТ1	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,974	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,997
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	0,000	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,260	ЛМЕТ3/ГХЛР2	0,934
ЛХЛР1/ГХЛР3	0,007	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	0,062	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,547
ЛХЛР1/ЛХЛР3	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,913	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,260	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	0,934
ЛХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,000	ГХЛР2/ЛХЛР2	1,000
ЛХЛР1/ГХЛР2	0,000	ГХЛР3/ГМЕТ3	0,011	ГХЛР2/ГМЕТ2	0,983
ЛХЛР1/ЛХЛР2	0,000	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ЛМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,000	ГХЛР3/ГХЛР2	0,001	ЛХЛР2/ГМЕТ2	0,711
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР2	0,006	ЛХЛР2/ЛМЕТ2	1,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	0,998	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,000	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	0,983

5.6.5. Tukey's HSD тестирање DPPH „скевинцер” активности испитиваних екстраката

Између свих тестираних екстраката и стандарда (бутилхидрокситолуеан, аскорбинска киселина и гална киселина) постоји статистички значајна разлика у степену неутрализације DPPH радикала (табела 14).

Међусобним тестирањем екстраката биљке *D. blagayana*, статистички значајна разлика је постојала између хлороформског и метанолског екстракта листова. Активност хлороформског екстракта гранчица се статистички разликовала од активности хлороформског екстракта листова и метанолског екстракта гранчица. Међу осталим екстрактима ове биљке није било међусобне статистички значајне разлике у испољавању активности. Што се тиче екстраката добијених из биљке *D. alpina*, једино се активност метанолског екстракта гранчица статистички значајно разликовала од активности које су испољили хлороформски екстракти гранчица и листова ове биљке. Остали екстракти се нису међусобно разликовали по испољеној активности. Активности екстраката биљке *D. sneorum* нису се статистички значајно међусобно разликовале. Компаративном статистичком анализом екстраката све три биљне врсте, показано је да се активност екстраката *D. blagayana* најчешће разликовала од активности које су показале екстракти добијени из друге две биљне врсте. Тако се активност хлороформског екстракта гранчица (*D. blagayana*) статистички значајно разликовала од хлороформских екстраката гранчица и листова *D. alpina* и хлороформског екстракта листова *D. sneorum*, а метанолски екстракт листова разликовао од хлороформских екстраката гранчица и листова биљака *D. alpina*, односно *D. sneorum*. Активност метанолског екстракта гранчица *D. blagayana* се разликовала од активности хлороформског екстракта листова *D. sneorum* и хлороформских екстраката *D. alpina*. Активност хлороформског екстракта листова (*D. blagayana*) се разликовала од активности коју је испољио метанолни екстракт *D. alpina*. Статистички значајна разлика је постојала и међу активностима које су испољили метанолски екстракт гранчица биљке *D. alpina* и хлороформски екстракт листова биљке *D. sneorum*.

Табела 14. Статистичка анализа добијених резултата DPPH „скевинцер” активности испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,004	ГМЕТ1/БХТ	0,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,895
ГХЛР1/ГМЕТ1	1,000	ЛМЕТ1/ГХЛР3	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,994
ГХЛР1/ЛМЕТ1	1,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	0,005	ГМЕТ3/ГА	0,000
ГХЛР1/ГХЛР3	0,002	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	1,000	ГМЕТ3/АА	0,000
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,024	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,324	ГМЕТ3/БХТ	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ3	1,000	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,597	ЛМЕТ3/ГХЛР2	1,000
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,709	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	0,006	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,890
ГХЛР1/ГХЛР2	0,925	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,445	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	1,000
ГХЛР1/ЛХЛР2	0,030	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,776	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	1,000
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,829	ЛМЕТ1/ГА	0,000	ЛМЕТ3/ГА	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,982	ЛМЕТ1/АА	0,000	ЛМЕТ3/АА	0,000
ГХЛР1/ГА	0,000	ЛМЕТ1/БХТ	0,000	ЛМЕТ3/БХТ	0,000
ГХЛР1/АА	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,999	ГХЛР2/ЛХЛР2	0,646
ГХЛР1/БХТ	0,000	ГХЛР3/ГМЕТ3	0,003	ГХЛР2/ГМЕТ2	1,000
ГХЛР1/ГМЕТ1	0,001	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,263	ГХЛР2/ЛМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	0,001	ГХЛР3/ГХЛР2	0,110	ЛХЛР2/ГА	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР3	1,000	ГХЛР3/ЛХЛР2	0,998	ЛХЛР2/АА	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР3	1,000	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,178	ЛХЛР2/БХТ	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ3	0,005	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,059	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ3	0,400	ГХЛР3/ГА	0,000	ГМЕТ2/ГА	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР2	0,187	ГХЛР3/АА	0,000	ГМЕТ2/АА	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР2	1,000	ГХЛР3/БХТ	0,000	ГМЕТ2/БХТ	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,286	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,034	ЛМЕТ2/ГА	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,105	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	0,847	ЛМЕТ2/АА	0,000
ЛХЛР1/ГА	0,000	ЛХЛР3/ГХЛР2	0,581	ЛМЕТ2/БХТ	0,000
ЛХЛР1/АА	0,000	ЛХЛР3/ЛХЛР2	1,000	ГА/АА	0,286
ЛХЛР1/БХТ	0,000	ЛХЛР3/ГМЕТ2	0,732	ГА/БХТ	0,000

Tukey's HSD тест

Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	1,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	0,400	АА/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ГХЛР3	0,001	ЛХЛР3/ГА	0,000	ГМЕТ2/АА	0,000
ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,008	ЛХЛР3/АА	0,000	ГМЕТ2/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ГМЕТ3	1,000	ЛХЛР3/ВНТ	0,000	ЛМЕТ2/ГА	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,422	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,796	ЛМЕТ2/АА	0,000
ГМЕТ1/ГХЛР2	0,709	ГМЕТ3/ГХЛР2	0,962	ЛМЕТ2/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ЛХЛР2	0,010	ГМЕТ3/ЛХЛР2	0,043	ГА/АА	0,286
ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,557	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,864	ГМЕТ1/ГА	0,000
ГМЕТ1/АА	0,000				

*ГХЛР-хлороформски екстракт гранчица; ГМЕТ- метанолни екстракт гранчица; ЛХЛР- хлороформски екстракт листова; ЛМЕТ- метанолни екстракт листова; 1- *Daphne blagayana*; 2- *Daphne sneorum*, 3- *Daphne alpina*; АА- аскорбинска киселина; ГА- гална киселина; БХТ- бутилхидрокситолуен.

5.6.6. Tukey's HSD тестирање инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката

Анализом варијансе IC_{50} вредности тестираних узорака (екстраката и стандарда) показано је да постоји статистички значајна разлика у степену инхибиције липидне пероксидације (табела 15). Tukey's HSD тестом је утврђено да статистички значајна разлика постоји између свих тестираних узорака и стандарда. Међу испитиваним екстрактима, разлика је постојала између метанолског екстракта листова биљке *D. alpina* и хлороформских екстраката гранчица биљака *D. sneorum* и *D. blagayana*. IC_{50} вредности инхибиције липидне пероксидације осталих екстраката нису се статистички значајно разликовале.

Табела 15. Статистичка анализа резултата инхибиције липидне пероксидације испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,992	ГМЕТ1/ЛХЛР2	1,000	ЛХЛР3/ГА	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ1	1,000	ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,261	ЛХЛР3/АА	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ1	1,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,693	ЛХЛР3/БХТ	0,000
ГХЛР1/ГХЛР3	1,000	ГМЕТ1/ГА	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,115
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,103	ГМЕТ1/АА	0,000	ГМЕТ3/ГХЛР2	1,000
ГХЛР1/ГМЕТ3	1,000	ГМЕТ1/БХТ	0,000	ГМЕТ3/ЛХЛР2	1,000
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,040	ЛМЕТ1/ГХЛР3	1,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,300
ГХЛР1/ГХЛР2	1,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	0,378	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,743
ГХЛР1/ЛХЛР2	1,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	1,000	ГМЕТ3/ГА	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,123	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,183	ГМЕТ3/АА	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,440	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,999	ГМЕТ3/БХТ	0,000
ГХЛР1/ГА	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	1,000	ЛМЕТ3/ГХЛР2	0,020
ГХЛР1/АА	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,428	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,115
ГХЛР1/БХТ	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,864	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ГМЕТ1	1,000	ЛМЕТ1/ГА	0,000	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	0,994
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	1,000	ЛМЕТ1/АА	0,000	ЛМЕТ3/ГА	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР3	1,000	ЛМЕТ1/БХТ	0,000	ЛМЕТ3/АА	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР3	0,727	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,476	ЛМЕТ3/БХТ	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ3	1,000	ГХЛР3/ГМЕТ3	1,000	ГХЛР2/ЛХЛР2	1,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ3	0,457	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,247	ГХЛР2/ГМЕТ2	0,068
ЛХЛР1/ГХЛР2	0,959	ГХЛР3/ГХЛР2	0,997	ГХЛР2/ЛМЕТ2	0,287
ЛХЛР1/ЛХЛР2	1,000	ГХЛР3/ЛХЛР2	1,000	ГХЛР2/ГА	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,777	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,531	ГХЛР2/АА	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,991	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,925	ГХЛР2/БХТ	0,000
ЛХЛР1/ГА	0,000	ГХЛР3/ГА	0,000	ЛХЛР2/ГМЕТ2	0,300
ЛХЛР1/АА	0,000	ГХЛР3/АА	0,000	ЛХЛР2/ЛМЕТ2	0,743

ЛХЛР1/БХТ	0,000	ГХЛР3/БХТ	0,000	ЛХЛР2/ГА	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	1,000	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,259	ЛХЛР2/АА	0,000
ГМЕТ1/ГХЛР3	1,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	1,000	ЛХЛР2/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,224	ЛХЛР3/ГХЛР2	0,056	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	1,000
ГМЕТ1/ГМЕТ3	1,000	ЛХЛР3/ЛХЛР2	0,259	ГМЕТ2/ГА	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,097	ЛХЛР3/ГМЕТ2	1,000	ГМЕТ2/АА	0,000
ГМЕТ1/ГХЛР2	1,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	1,000	ГМЕТ2/БХТ	0,000
ЛМЕТ2/АА	0,000	ЛМЕТ2/БХТ	0,000	ЛМЕТ2/ГА	0,000

5.6.7. Tukey's HSD тестирање Fe^{2+} хелатационе активности испитиваних екстраката

Статистичком анализом IC_{50} вредности Fe^{2+} хелатационе активности испитиваних узорака утврђено је постојање статистички значајне разлике (табела 16). Активност хлороформских екстраката *D. blagayana* се статистички значајно разликовала од метанолских екстраката исте биљке. Такође, статистички значајна разлика у испољавању активности је утврђена између хлороформских и метанолских екстраката биљке *D. alpina*. Што се тиче екстраката добијених из биљке *D. sneorum*, IC_{50} вредности метанолског екстракта листова су се статистички значајно разликовале од вредности добијених за хлороформске екстракте али и од метанолског екстракта гранчица исте биљке исте. Роређењем екстраката добијених од различитих биљака, статистички значајна разлика је углавном присутна између метанолских и хлороформских екстраката различитих делова биљака. Изузетак су метанолски екстракти биљке *D. alpina*, чије су се добијене IC_{50} вредности статистички значајно разликовале од метанолских екстраката биљака *D. sneorum* и *D. blagayana* као и хлороформски екстракт гранчица биљке *D. blagayana* који се разликовао од хлороформског екстракта гранчица биљке *D. sneorum*.

Табела 16. Статистичка анализа резултата Fe^{2+} хелатационе активности испитиваних узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЛР1/ЛХЛР1	0,999	ГМЕТ1/ГХЛР3	0,001	ГХЛР3/ЛМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР3	0,011	ЛХЛР3/ГМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ЛХЛР3/ЛМЕТ3	0,000
ГХЛР1/ГХЛР3	1,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ЛХЛР3/ГХЛР2	0,543
ГХЛР1/ЛХЛР3	0,922	ГМЕТ1/ГХЛР2	0,664	ЛХЛР3/ЛХЛР2	1,000
ГХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ЛХЛР2	0,014	ЛХЛР3/ГМЕТ2	0,686
ГХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,521	ЛХЛР3/ЛМЕТ2	0,000
ГХЛР1/ГХЛР2	0,037	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,783	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,750
ГХЛР1/ЛХЛР2	0,889	ЛМЕТ1/ГХЛР3	0,001	ГМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ГХЛР1/ГМЕТ2	0,060	ЛМЕТ1/ЛХЛР3	0,007	ГМЕТ3/ЛХЛР2	0,000
ГХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ1	0,002	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ1	0,001	ЛМЕТ1/ГХЛР2	0,558	ЛМЕТ3/ГХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ГХЛР3	1,000	ЛМЕТ1/ЛХЛР2	0,009	ЛМЕТ3/ЛХЛР2	0,000
ЛХЛР1/ЛХЛР3	1,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,420	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ГМЕТ3	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,865	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЛР1/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР3	0,997	ГХЛР2/ЛХЛР2	0,603
ЛХЛР1/ГХЛР2	0,188	ГХЛР3/ГМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ГМЕТ2	1,000
ЛХЛР1/ЛХЛР2	0,999	ГХЛР3/ЛМЕТ3	0,000	ГХЛР2/ЛМЕТ2	0,027
ЛХЛР1/ГМЕТ2	0,277	ГХЛР3/ГХЛР2	0,117	ЛХЛР2/ГМЕТ2	0,743
ЛХЛР1/ЛМЕТ2	0,000	ГХЛР3/ЛХЛР2	0,994	ЛХЛР2/ЛМЕТ2	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	1,000	ГХЛР3/ГМЕТ2	0,180	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	0,016

5.6.8. Tukey's HSD тестирање способности неутралисања OH^{\bullet} радикала испитиваних екстраката

АНОВА тестом IC_{50} вредности способности неутралисања OH^{\bullet} радикала испитиваних екстраката утврђено је постојање статистички значајне разлике између екстраката добијених из биљке *D. blagayana* исту активност су показали екстракти гранчица ове биљке, док су се активности осталих екстраката међусобно статистички разликовале (табела 17). Од четири испитивана екстракта биљке *D. sneorum*, три екстракта су показала активности које се међусобно нису статистички разликовале, док се IC_{50} вредност метанолског екстракта листа ове биљке статистички разликовала од IC_{50} вредности остала три екстракта. Способности неутралисања OH^{\bullet} радикала екстраката биљке *D. alpina* су се међусобно статистички значајно разликовале на основу добијених IC_{50} вредности. Није било статистички значајне разлике између испољених активности хлороформских екстраката гранчица све три биљне врсте. Такође, добијене IC_{50} вредности метанолских екстраката листова све три биљне врсте се међусобно нису статистички разликовале. Метанолски екстракт гранчица и хлороформски екстракт листова биљке *D. sneorum* су имали исте активности као хлороформски екстракти гранчица биљака *D. alpina* и *D. blagayana*. IC_{50} вредности метанолских екстраката гранчица и листова биљке *D. alpina* као и метанолског екстракта листова биљке *D. sneorum* се нису статистички значајно разликовале од вредности добијених за хлороформски екстракт листова биљке *D. blagayana*. Способност неутралисања OH^{\bullet} радикала метанолског екстракта биљке *D. blagayana* се није статистички разликовала од активности које су испољили хлороформски екстракти гранчица и листова као и метанолски екстракт гранчица биљке *D. sneorum*.

Табела 17. Статистичка анализа резултата способности неутралисања ОН радикала узорака

<i>Tukey's HSD</i> тест					
Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност	Узорци	р-вредност
ГХЈР1/ЛХЈР1	0,000	ГМЕТ1/ГМЕТ2	0,978	ЛХЈР3/БХТ	0,000
ГХЈР1/ГМЕТ1	1,000	ГМЕТ1/ЛМЕТ2	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ3	0,013
ГХЈР1/ЛМЕТ1	0,000	ГМЕТ1/ГА	0,000	ГМЕТ3/ГХЈР2	0,000
ГХЈР1/ГХЈР3	1,000	ГМЕТ1/АА	0,000	ГМЕТ3/ЛХЈР2	0,000
ГХЈР1/ЛХЈР3	0,000	ГМЕТ1/БХТ	0,000	ГМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ГХЈР1/ГМЕТ3	0,000	ЛМЕТ1/ГХЈР3	0,000	ГМЕТ3/ЛМЕТ2	0,114
ГХЈР1/ЛМЕТ3	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЈР3	0,000	ГМЕТ3/ГА	0,000
ГХЈР1/ГХЈР2	0,196	ЛМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ГМЕТ3/АА	0,000
ГХЈР1/ЛХЈР2	0,152	ЛМЕТ1/ЛМЕТ3	0,468	ГМЕТ3/БХТ	0,000
ГХЈР1/ГМЕТ2	0,796	ЛМЕТ1/ГХЈР2	0,000	ЛМЕТ3/ГХЈР2	0,000
ГХЈР1/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ1/ЛХЈР2	0,000	ЛМЕТ3/ЛХЈР2	0,000
ГХЈР1/ГА	0,000	ЛМЕТ1/ГМЕТ2	0,000	ЛМЕТ3/ГМЕТ2	0,000
ГХЈР1/АА	0,000	ЛМЕТ1/ЛМЕТ2	0,086	ЛМЕТ3/ЛМЕТ2	1,000
ГХЈР1/БХТ	0,000	ЛМЕТ1/ГА	0,000	ЛМЕТ3/ГА	0,000
ЛХЈР1/ГХЈР1	0,000	ЛМЕТ1/АА	0,000	ЛМЕТ3/АА	0,000
ЛХЈР1/ЛХЈР1	0,002	ЛМЕТ1/БХТ	0,000	ЛМЕТ3/БХТ	0,000
ЛХЈР1/ГХЈР3	0,000	ГХЈР3/ЛХЈР3	0,000	ГХЈР2/ЛХЈР2	1,000
ЛХЈР1/ЛХЈР3	0,000	ГХЈР3/ГМЕТ3	0,000	ГХЈР2/ГМЕТ2	0,999
ЛХЈР1/ГМЕТ3	0,874	ГХЈР3/ЛМЕТ3	0,000	ГХЈР2/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЈР1/ЛМЕТ3	0,508	ГХЈР3/ГХЈР2	0,328	ГХЈР2/ГА	0,000
ЛХЈР1/ГХЈР2	0,000	ГХЈР3/ЛХЈР2	0,263	ГХЈР2/АА	0,000
ЛХЈР1/ЛХЈР2	0,000	ГХЈР3/ГМЕТ2	0,922	ГХЈР2/БХТ	0,000
ЛХЈР1/ГМЕТ2	0,000	ГХЈР3/ЛМЕТ2	0,000	ЛХЈР2/ГМЕТ2	0,996
ЛХЈР1/ЛМЕТ2	0,967	ГХЈР3/ГА	0,000	ЛХЈР2/ЛМЕТ2	0,000
ЛХЈР1/ГА	0,000	ГХЈР3/АА	0,000	ЛХЈР2/ГА	0,000

ЛХЈР1/АА	0,000	ГХЈР3/БХТ	0,000	ЛХЈР2/АА	0,000
ЛХЈР1/БХТ	0,000	ЛХЈР3/ГМЕТ3	0,000	ЛХЈР2/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ1	0,000	ЛХЈР3/ЛМЕТ3	0,000	ГМЕТ2/ЛМЕТ2	0,000
ГМЕТ1/ГХЈР3	1,000	ЛХЈР3/ГХЈР2	0,000	ГМЕТ2/ГА	0,000
ГМЕТ1/ЛХЈР3	0,000	ЛХЈР3/ЛХЈР2	0,000	ГМЕТ2/АА	0,000
ГМЕТ1/ГМЕТ3	0,000	ЛХЈР3/ГМЕТ2	0,000	ГМЕТ2/БХТ	0,000
ГМЕТ1/ЛМЕТ3	0,000	ЛХЈР3/ЛМЕТ2	0,000	ЛМЕТ2/ГА	0,000
ГМЕТ1/ГХЈР2	0,478	ЛХЈР3/ГА	0,000	ЛМЕТ2/АА	0,000
ГМЕТ1/ЛХЈР2	0,398	ЛХЈР3/АА	0,000	ЛМЕТ2/БХТ	0,000

6. Дискусија

Примена биљних лекова у алтернативној медицини све је више присутна у свету и стиче све већу популарност у земљама у развоју [163]. До сада су испитиване многе биолошке активности бројних биљних врста. Једињења изолована из ових биљака нашла су примену у алтернативној терапији, било на директан начин, било као модели за добијање нових синтетичких супстанци [164]. Иако лековите биљке и њихови конституенти могу поседовати биолошке активности, потенцијална токсичност ових биоактивних супстанци није у потпуности утврђена [163]. Самим тим, употреба препарата биљног порекла би требало бити под контролом здравствених радника, како би се омогућила ефикасност и здравствена безбедност. Нерационална и погрешна употреба различитих биљних припревака може довести до одсуства биолошких ефеката или чак до токсичних ефеката, који могу бити и леталног исхода [166].

Циљ овог истраживања је испитавање хемијског састава, као и антиоксидативне и антимикробне активности екстраката три биљне врсте из рода *Daphne* (*Daphne blagayana* L., *Daphne sneorum* L. и *Daphne alpina* L.). Рад је обухватио одређивање укупних фенолних и флавоноидних једињења спектрофотометријском методом, као и идентификацију најзаступљенијих секундарних метаболита применом HPLC-UV методе. У наставку истраживања испитивана је антиоксидативна активност у *in vitro* условима (одређивање укупне антиоксидативне активности, одређивање DPPH „скевинцер” активности, одређивање инхибиције липидне пероксидације, Fe²⁺ хелатациона активност и одређивање антиоксидативне активности на нивоу хидроксил радикала). Посебан део истраживања био је усмерен на испитивање антимикробне активности.

Испитиване врсте, *Daphne blagayana* L., *Daphne sneorum* L. и *Daphne alpina* L., су прикупљене са различитих локалитета на подручју Србије. Екстракти су припремљени одвојеном екстракцијом гранчица и листова помоћу растварача различитих поларности (метанол и хлороформ). Резултати приноса екстракције су показали да је принос добијених екстраката по граму дроге био већи код метанолских екстраката (19,78-27,46 g/100g дроге) у односу на екстракте добијене екстракцијом помоћу хлороформа (2,08-7,02 g/100g дроге). Испитивањем укупног фенолног садржаја, који се у анализираним узорцима кретао од 68,77±0,95 mg GA/g до 90,26±0,69 mg GA/g, утврђен је висок садржај фенола у екстрактима све три врсте. Највећи садржај фенола је имао хлороформски екстракт гранчица врсте *D. Blagayana*, а најмањи метанолни екстракт гранчица *D. sneorum*.

Количина фенолних једињења у екстрактима у великој мери зависи од начина екстракције и поларности растварача [167].

Резултати одређивања укупних флавоноида указују на висок садржај ових једињења у испитиваним екстрактима. Садржај укупних флавоноида се кретао од $24,67 \pm 0,35$ mg RU/g до $35,24 \pm 0,55$ mg RU/g, при чему је највећи флавоноидни садржај имао хлороформски екстракт гранчица *D. blagayana*, а најмањи хлороформски екстракт гранчица *D. sneorum*. Феноли и флавоноиди показују различите биолошке активности, међу којима су изражене антиоксидативна и антимикуробна активност.

Уколико се упореде екстракти добијени од листова све три биљне врсте, може се уочити да је садржај укупних фенола био већи код екстраката добијених екстракцијом метанолом као растварачем. Истраживањем спроведеним од стране *Cottigli* и сар. (2001), које је између осталог обухватало и одређивање укупног фенолног састава екстраката листова врсте *D. gnidium*, добијени су слични резултати [115]. И у овој студији, укупни фенолни садржај метанолског екстракта листова ($157,47$ mg GA/g) је био већи од укупног фенолног садржаја хлороформског екстракта листова ($104,41$ mg GA/g). Једноставним процедурама, описаним у овом раду, као што су таложење, наизменично растварање у растварачима различите поларности, могуће је добити фракције екстраката које су богатије фенолним и флавоноидним једињењима од екстракта добијених класичним методама екстракције [115].

Досадашња истраживања су показала да нека фенолна и флавоноидна једињења испољавају антиоксидативну активност у биолошким системима, углавном услед њихових редокс особина, што може имати битну улогу у апсорпцији и неутрализацији слободних радикала при чему смањују негативно дејство синглетног и триплетног кисеоника или врше разградњу пероксида [168]. Механизам дејства флавоноида у смањењу продукције и неутралисању слободних радикала, на чему се заснива њихово антиоксидативно дејство је познат, па је интересовање за даље проучавање ових једињења велико [169]. Способност неутралисања слободних радикала чини флавоноидна једињења значајним за терапеутску или профилактичку примену, нпр. након инфекција, запаљења, опекотина или повреда услед излагања зрачењу [170]. Антиоксидативна активност фенолних киселина је значајна у одбрамбеним механизмима биолошких система, али и за стабилност хране. Новија истраживања су показала да неки полифенолни биљни конституенти показују много јачу

активност од витамина С и Е [170, 76]. Овакви резултати, добијени у *in vitro* истраживањима указују и на значајан заштитни антиоксидативни потенцијал *in vivo*.

Флавоноидна једињења, у организму се у малој количини апсорбују у дигестивном тракту у облику агликона или гликозида. Највећа количина флавоноидних једињења под дејством интестиналне флоре подлеже различитим, ензимским реакцијама. Те реакције обухватају хидролизу, цепање хетероцикличног прстена који садржи кисеоник, дехидроксилацију и декарбоксилацију, при чему као један од продуката настају различите фенолне киселине [172]. Фенолне киселине, настале из флавоноидних прекурсора, могу се апсорбовати из црева, потврднати коњугацији и орто-метиловању у јетри, а потом ући у крвоток где испољавају своју антиоксидативну улогу [173]. Ово је указало на потребу даљег испитивања наших узорака и извођења тестова процене антиоксидативне и антимикробне активности. С обзиром да сви испитивани екстракти испољавају биолошка дејства, може се претпоставити да и поларне и неполарне компоненте екстраката утичу на испољавање биолошких активности. Фенолна једињења су снажни антиоксиданси и имају велики потенцијал у спречавању оштећења ћелија изазваних реактивним кисеоничним врстама и на тај начин штите организам од кардиоваскуларних, канцерогених и осталих обољења [169, 174, 175]. Ипак, допринос појединачних компоненти укупној антиоксидативној заштити је тешко утврдити. Испољена активност екстраката може бити резултат синергистичког дејства различитих једињења. На пример, *Fuhrman* и сар. (2000) су својим истраживањем утврдили боље антиоксидативно дејство смеше ликопена и других биљних полифенолних једињења у поређењу са утицајем сваког појединачног једињења [176].

Биљке су богат извор природних антиоксиданаса у које спадају токофероли, витамин С, каротеноиди и биљни феноли. Истраживањима је показана и веза антиоксидативне активности природних производа са количином присутних фенолних једињења [177-179]. Биљни полифеноли се не сматрају увек правим антиоксидансима, али је у многим *in vitro* истраживањима установљен антиоксидативни потенцијал фенолних материја у воденом екстракту, "скевинцер" радикала, као и појачање резистентности према оксидацији липопотеина мале густине, који указују на патогенезу у случају коронарних болести [178]. Сматра се да се део антиоксидативног потенцијала многих врста биљака, воћа и бобица може приписати полифенолним компонентама. Способност

мономерних фенола да делују као антиоксиданси зависи од степена коњугације, броја и распореда супституената (функционалних група) и молекулске масе [179]. Пошто је потврђено присуство фенолних и флавоноидних молекула у нашим екстрактима, постављен је циљ испитивања антиоксидативне активности екстраката. Антиоксидативни профили екстраката одређени су преко неколико стандардних метода.

Највећи укупни антиоксидативни капацитет показује хлороформски екстракт гранчица биљке *D. blagayana* (78,45 $\mu\text{g AA/g}$). Овај екстракт, у односу на остале екстракте испитиване у овом раду, је имао највећи фенолни и флавоноидни садржај, што указује на директну пропорционалност хемијског састава и испољене активности.

Једињења која могу да донирају протоне или електроне DPPH \cdot радикалу могу се сматрати антиоксидансима и „сакупљачима” слободних радикала. Такође, уколико једињења имају способност неутралисања OH \cdot радикала, генерисаних у *in vitro* моделу представљају потенцијално добре антиоксидансе, који могу своју активност испољити и у *in vivo* моделима. Способност неутралисања OH \cdot радикала као DPPH \cdot „скевинцер” активност испитиваних екстраката приказани су на хистограмима 7-9. Добијене IC₅₀ вредности DPPH \cdot „скевинцер” активности екстраката су се кретале у опсегу од 20,95 $\mu\text{g/ml}$ до 25,24 $\mu\text{g/ml}$. Уколико се међусобно пореде екстракти добијени од исте биљке (хлороформски и метанолски екстракти гранчица и листова) може се запазити да је код сваке биљке најслабију активност показао метанолски екстракт листова, док су најбољу активност показали хлороформски екстракти гранчица, са изузетком екстраката биљке *D. blagayana* где је најбољу активност показао хлороформски екстракт листова. Испитивани екстракти су показали и добру антиоксидативну активност процењену преко способности неутралисања OH \cdot радикала (IC₅₀=80,56 $\mu\text{g/ml}$ – 99,11 $\mu\text{g/ml}$). И у овом случају, најслабије активности су показали метанолски екстракти листова, са изузетком хлороформског екстракта листова *D. alpina*, док су најбољу активност испољили екстракти гранчица (хлороформски за врсте *D. blagayana* и *D. alpina* и метанолски врсте *D. sneorum*). Ростојање разлика у способности неутралисања слободних радикала (DPPH \cdot и OH \cdot) и одсуство потпуне корелације са количиним укупних фенола и флавоноида, вероватно је резултат присуства једињења из других група секундарних метаболита, која могу испољити наведене активности као и међусобног синергизма међу конституентима екстраката.

Испитивани екстракти су показали и активност инхибиције пероксидације липида као и антиоксидантну хелирајућу Fe^{2+} активност. Потенцијал инхибиције липидне пероксидације (ЛП) кретао се у опсегу IC_{50} вредности од 26,79 $\mu\text{g/ml}$ до 37, 17 $\mu\text{g/ml}$, при чему су, као и код претходних модела испитивања антиоксидативне активности, најјаче активности испољили екстракти гранчица (хлороформски *D. blagayana* и *D. sneorum* и метанолски *D. alpina*). Слични резултати су добијени и у процени Fe^{2+} хелатационе (IC_{50} =21,57 - 45,45), где хлороформски екстракти гранчица показују најбољу активност, сем у случају екстраката врсте *D. sneorum*, где је најбољу активност испољио метанолски екстракт гранчица.

С обзиром на појаву све веће резистенције микроорганизама према конвенционалним антибиотицима, један од најзначајнијих циљева истраживачких тимова широм света је испитивање биљака и дефинисање хемијских састојака који испољавају антимикуробну активност. Као пример оваквих тврдњи стоји чињеница да је на различитим скуповима посвећеним проучавањима лековитог биља, једна од главних тема "антимикробна активност природних производа". На пример, на Конгресу Светске секције за испитивање лековитог биља (2-7 септембар 2007., Грац, Аустрија) презентовано преко 230 експерименталних радова у оквиру секције *Natural Products with Antimicrobial Activity* [180]. Ипак, највећи број радова се односи на *in vitro* испитивања, што је заиста далеко од званичне потврде терапијске ефикасности.

Секундарни метаболити присутни у биљкама могу садржати различите функционалне групе. Разлика у антимикуробној активности појединих компонената је следећа: феноли > алдехиди > кетони > алкохоли > етри > угљоводоници [181]. Биљке поседују скоро неограничену способност синтезе хемијски структурно различитих молекула, насталих различитим биосинтетичким путевима. Биосинтеза ових супстанци представља механизам одбране и одговор биљке на напад биљних патогена и појаву инфекције (фитоалексини). Ако у биљци имају овакву улогу, сасвим је јасно, да ће се ова способност једињења испољити и у *in vitro* условима. Ипак, као што је и напоменуто, екстраполација ка *in vivo* ефикасности није тако једноставна, па зато и нема пуно биљних лекова потврђене ефикасности и оправдане примене код инфективних обољења.

Последњих деценија дефинисани су најважнији секундарни биљни метаболити који поседују антимикуробну активност [182]. Ови састојци су одговорни за одређену

делотворност биљних дрога. Потврђено је да антимикуробну активност поседују бројни полифенолни састојци биљака (једноставни полифеноли, фенолне киселине, лигнани, полипептиди, полиацетилени, масне киселине па чак и неки једноставни шећери или органске киселине) [183-186]. Фармаколошко деловање фенолних једињења повезано је са хемијском структуром њихових молекула. Пошто постоји велики број различитих хемијских структура ових једињења, веома је широк и спектар њихове активности и терапијске примене. Генерално посматрано фенолна једињења се не одликују снажним, фармаколошким деловањем, па је употреба дрога, које их садрже, најделотворнија у сврху профилаксе, лечења почетних фаза болести или као допуна медикаментозној терапији [183].

Фенолне компоненте токсично делују на микроорганизме, а механизам деловања обухвата инхибицију оксидованих компоненти, као и могућу реакцију са сулфхидрилним групама кроз више неспецифичних реакција са протеинима.

Микродилуционом методом се одређује минимална инхибиторна концентрација, а то је најнижа концентрација антибиотика (у овом случају, екстракта биљке) која спречава раст микроорганизма. Антимикуробна активност се одређује у *in vitro* условима да би се одредила: делотворност антибиотика у раствору, концентрација у телесним течностима и ткивима и осетљивост тестираног микроорганизма у *in vitro* условима.

Резултати приказани у табелама 7-9 показују антимикуробну активност екстраката испитиваних *Daphne* врста, чије су се вредности минималних инхибиторних концентрација кретале у опсегу 15,62-125 $\mu\text{g/mL}$.

Што се тиче антибактеријске активности, екстракти испитиваних биљних врста су испољили различите активности. Антибактеријске активности су испитиване на грам позитивним бактеријама. *S. aureus* је била најосетљивија на хлороформски екстракт листа врсте *D. blagayana* (MIC=15,62 $\mu\text{g/mL}$). Метанолски екстракти гранчица врсте *D. blagayana* и *D. sneorum* су испољили најјачу активност према *K. pneumoniae*. Најнижа вредност минималне инхибиторне концентрације (15,62 $\mu\text{g/mL}$) према *P. mirabilis* забележена је код метанолског екстракта гранчица врсте *D. sneorum* и хлороформског екстракта листова *D. blagayana*. Хлороформски екстракти листова врсте *D. alpina* су показали јаку активност према *B. subtilis* (MIC=15,62 $\mu\text{g/mL}$). Активност са истом вредношћу минималне инхибиторне концентрације према овој бактерији испољио је и

хлороформски екстракт листова биљке *D. sneorum*. Према *P. vulgaris* најбољу активност су испољили хлороформски екстракт гранчица *D. sneorum* и метанолски екстракт листова *D. alpina*.

Поред антибактеријске активности, испитивана је и антифунгална активност према гљивичним сојевима *Candida albicans* и *Aspergillus niger*. Најбољу антифунгалну активност испољили су хлороформски екстракт листова и метанолски екстракт гранчица биљке *D. alpina* према *C. albicans*, као и метанолски екстракт гранчица *D. blagayana* према *A. niger* са минималном инхибиторном концентрацијом, која је износила 15,62 $\mu\text{g/mL}$.

Резултати HPLC анализе испитиваних екстраката указују на присуство неколико класа секундарних метаболита. На основу изгледа UV спектра раздвојених једињења, може се закључити да се углавном ради о фенолним и флавоноидним секундарним метаболитима. Компарацијом ретенционих времена и UV спектра стандарда са ретенционим временима и UV спектрима једињења присутним у екстрактима идентификована су три једињења: 7,8-дихидроксикумарин (дафнетин), 7-хидроксикумарин (умбелиферон) и 4-хидроксибензоева киселина. Дафнетин и 4-хидроксибензоева киселина су идентификовани у испитиваним екстрактима све три биљне врсте. Кумарински дериват умбелиферон, идентификован је у екстрактима врсте *D. alpina*, док у екстрактима врста *D. blagayana* и *D. sneorum* његово присуство није потврђено. Интензитети сигнала који потичу од дафнетина и 4-хидроксибензоеве киселине, идентификованих у свим испитиваним екстрактима су се разликовали, с тим што се уочава да је сигнал од дафнетина у свим хлороформским екстрактима био већег интензитета од сигнала који потиче од 4-хидроксибензоеве киселине. Са друге стране, у свим метанолским екстрактима однос интензитета сигнала ова два једињења је супротан (сигнал од дафнетина је био мањег интензитета). Овакви подаци указују на утицај растварача различите поларности на екстракцију појединих компоненти из узорака. 4-Хидроксибензоева киселина је поларнији молекул од дафнетина, па је и интензитет њеног сигнала интензивнији у хроматограмима метанолских екстраката, што индикује на њену већу заступљеност у овим екстрактима.

Дафнетин је од раније познат као метаболит рода *Daphne* и изолован је из неколико врста овог рода. Досадашња научна истраживања су потврдила да овај кумарински метаболит поседује различите врсте биолошких активности, укључујући антимикуробну, антиоксидантну, неуропротективну, антималаријску, антикоагулантну и имуномодулаторску активност [187-189]. Што се тиче испољавања антимикуробне активности, потврђено је да дафнетин делује на грам позитивне бактерије. Алкиловањем дафнетина до 7-*O*-метил деривата, диметил деривата или диалил деривата губи се антимикуробна активност, али са друге стране, алкил супституисани деривати показују фунгистатичну активност. За разлику од алкиловања, ацетиловање дафнетина не резултује губитком антимикуробне активности, већ насупротив, ацетиловани деривати инхибирају раст већег броја бактерија [190]. С обзиром да је претходним истраживањима потврђена његова антиоксидативна и антимикуробна активност, несумњиво је, да овај кумарински дериват у значајној мери доприноси испољеним активностима екстрактура биљака које су обухваћене овим радом. Поред дафнетина, у свим екстрактурама је потврђено и присуство 4-хидроксибензојеве киселине. То је фенолна киселина, која такође испољава антимикуробну и снажну антиоксидативну активност испитану преко више модела [191, 192]. У екстрактурама врстее *D. alpina* је потврђено присуство 7-хидроксикумарина (умбелиферона). То је кумарински дериват за који је потврђено да поседује фармаколошку активност. *In vivo* студија спроведена на зечевима са индукованим дијабетесом, показала је да умбелиферон побољшава антиоксидативни статус, враћањем маркера липидне пероксидације, неензимских и ензимских антиоксиданаса на нормалне вредности [193]. Поред антиоксидативне активности, испољава и антимикуробно, аналгетско и хипогликемијско дејство [190, 194].

7. ЗАКЉУЧЦИ

У оквиру ове докторске дисертације извршена је фитохемијска анализа метанолских и хлороформских екстраката гранчица и листова биљних врста *Daphne blagayana* L., *Daphne sneorum* L. и *Daphne alpina* L., као и испитивање антиоксидативних и антимикуробних активности ових екстраката. На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

- Испитивањем садржаја укупних фенола утврђено је да сви екстракти имају висок садржај ових једињења. Садржај укупних фенола зависи од поларности растварача коришћеног за екстракцију, дела биљке из које је добијен екстракт (лист или гранчица) као и испитиване *Daphne* врсте. Ове вредности су износиле од $68,77 \pm 0,95$ mg EGA/g до $90,26 \pm 0,69$ mg EGA/g. Највећи садржај укупних фенола имају хлороформски екстракт гранчица *D. blagayana* ($90,26 \pm 0,69$ EGA/g) и метанолски екстракт гранчица *D. alpina* ($88,98 \pm 1,05$ EGA/g). Наведени екстракти се међусобно статистички значајно не разликују по садржају укупних фенола ($p > 0,05$).
- Испитивани екстракти садрже значајне количине флавоноида, чије се вредности крећу од $24,67 \pm 0,35$ mg ERU/g до $35,24 \pm 0,55$ mg ERU/g. Највећи садржај укупних флавоноида имају хлороформски екстракти гранчица *D. blagayana* ($35,24 \pm 0,55$ mg ERU/g) и *D. alpina* ($34,65 \pm 0,89$ mg ERU/g), као и хлороформски екстракт листова *D. sneorum* ($34,23 \pm 0,89$ mg ERU/g). Ова три екстракта се међусобно статистички значајно не разликују ($p > 0,05$).
- Укупан антиоксидативни капацитет испитиваних екстраката износио је од $68,98$ mg AA/g до $78,45$ mg AA/g. Највећи антиоксидативни капацитет имао је хлороформски екстракт гранчица *D. blagayana* који се статистички значајно разликовао од осталих испитиваних екстраката ($p > 0,05$). Испољена активност је пропорционална високом садржају укупних фенола и флавоноида, који је утврђен код наведеног екстракта.
- Испитивани екстракти су показали способност неутрализације OH^\cdot радикала са IC_{50} вредностима од $80,56$ $\mu\text{g/g}$ до $99,11$ $\mu\text{g/g}$. Генерално, екстракти листова све три врсте су показали бољу активност од екстраката гранчица. Најбољу активност показује хлороформски екстракт листова *D. alpina* ($\text{IC}_{50} = 80,56$ $\mu\text{g/g}$)

- Испитивани екстракти испољавају активност у неутрализацији DPPH[·] радикала са IC₅₀ вредностима изнад 20 µg/g. Најмања IC₅₀ вредност одређена је за метанолски екстракт листова *D. blagayana* (20,95 µg/g).
- Потенцијал инхибиције липидне пероксидације испитиваних екстраката креће се у опсегу IC₅₀ вредности од 26,79 µg/g до 37,17 µg/g. IC₅₀ вредности мање од 30 µg/g показују екстракти листова *D. alpina* и метанолски екстракти гранчица и листова *D. sneorum*.
- Испитивани екстракти су испољили Fe²⁺ хелатациону активност са IC₅₀ вредностима од 21,57 µg/g до 45,91 µg/g. Најбоље активности испољавају метанолски екстракти гранчица и листова *D. sneorum* са IC₅₀ вредностима 21,57 µg/g, односно 23, 15 µg/g. Ова два екстракта се међусобно статистички не разликују по испољеним активностима (p>0,05). Са друге стране, ова два екстракта се од осталих екстраката статистички значајно разликују по испољеној Fe²⁺ хелатационој активности (p<0,05).
- HPLC-UV анализом испитиваних екстраката, потврђено је да екстракти садрже секундарне метаболите из група фенола и кумарина, међу којима доминирају два кумаринска деривата (дафнетин и умбелиферон) и једна фенолна киселина (4-хидроксибензоева киселина).
- Дафнетин и 4- хидроксибензоева киселина су присутни у испитиваним екстрактима све три *Daphne* врсте, док је умбелиферон присутан само у екстрактима врсте *D. alpina*.
- Антимикробна активност испитиваних екстраката, изражена преко минималне инхибиторне концентрације кретала се у опсегу од 15,62 до 125 µg/ml. Најбољу антифунгалну активност (MIC=15,62 µg/ml) испољавају хлороформски екстракт листова и метанолски екстракт гранчица врсте *D. sneorum* (према *C. albicans*) и метанолски екстракт гранчица врсте *D. blagayana* (према *A. niger*).

На основу свега изнетог, може се закључити да три испитане врсте рода *Daphne* садрже значајне количине фенолних и флавоноидних једињења и испољавају добру антимикуробну и антиоксидативну активност. Њихова активност је специфична за сваку врсту и зависи од хемијског састава екстракта, који је специфичан за део биљке који је испитиван и примењени растварач. Будућа истраживања би требало да иду у правцу изоловања биоактивних компонената, као и испитивање биолошких активности у *in vivo* условима. Добијени резултати су показали да биљке из рода *Daphne* могу представљати извор нових, природних, фармаколошки активних једињења, и да могу наћи потенцијалну примену у фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Vickers A, Zollman C. Herbal medicine. *Bmj* 1999; 319(7216): 1050-1053.
2. Kartal M. Intellectual property protection in the natural product drug discovery, traditional herbal medicine and herbal medicinal products. *Phytotherapy Research* 2007; 21(2): 113-119.
3. De Vos P. European materia medica in historical texts: longevity of a tradition and implications for future use. *Journal of ethnopharmacology* 2010; 132(1): 28-47.
4. Duke JA. *Handbook of medicinal herbs*. CRC press, 2002.
5. Fisher P, Ward A. Medicine in Europe: complementary medicine in Europe. *Bmj* 1994; 309(6947): 107-111.
6. De Abreu IN, Sawaya ACH, Eberlin MN, Mazzafera P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*pilocarpus microphyllus* stapf). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 2005; 41(6): 806-811.
7. Ott J, Hofmann A. *Pharmacothoeon: Entheogenic drugs, their plant sources and history*. Natural Products Company, 1993.
8. DeKosky ST, Williamson JD, Fitzpatrick AL, Kronmal RA, et al. Ginkgo biloba for prevention of dementia: a randomized controlled trial. *Jama* 2008; 300(19): 2253-2262.
9. Bent S, Kane C, Shinohara K, Neuhaus J, Hudes ES, Goldberg H, Avins AL. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. *New England Journal of Medicine* 2006; 354(6): 557-566.
10. Etkin NL. Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge. *Journal of ethnopharmacology* 2001; 76(2): 177-182.
11. Evans WC. *Trease and Evans' pharmacognosy*. Elsevier Health Sciences, 2009.
12. National policy on traditional medicine and regulation of herbal medicines: Report of a WHO global survey. World Health Organization, Geneva 2005, from <http://whqlibdoc.who.int/publications/2005/9241593237.pdf>
13. Li WF, Jiang JG, Chen J. Chinese medicine and its modernization demands. *Archives of medical research* 2008; 39(2): 246-251.
14. Harrison, Holt, Pattison, Elton. Who and how many people are taking herbal supplements? A survey of 21923 adults. *International journal for vitamin and nutrition research* 2004; 74(3): 183-186.

15. Li JWH, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 2009; 325(5937): 161-165.
16. Sahoo N, P Manchikanti, Dey S. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* 2010; 81(6): 462–71.
17. Schmidt B, Ribnicky DM, Poulev A, Logendra S, Cefalu WT, Raskin, I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism* 2008; 57: S3-S9.
18. Barnes PM, Bloom B, Nahin R. Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. CDC National Health Statistics Report 2008, from <http://www.cdc.gov/nchs/data/nhsr/nhsr012.pdf>
19. Bennett RN, Wallsgrove RM. Tansley Review No. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 1994; 127: 617-633.
20. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39(5): 603-613.
21. Pichersky E. Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* 2000; 5(10): 439-445.
22. Jensen RA. The shikimate/arogenate pathway: link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiologia Plantarum* 1986; 66(1): 164-168.
23. Parr AJ, Bolwell GP. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80(7): 985-1012.
24. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews* 1998; 56(11): 317-333.
25. Kleemann R, Verschuren L, Morrison M, Zadelaar S, van Erk MJ, Wielinga PY, Kooistra T. Anti-inflammatory, anti-proliferative and anti-atherosclerotic effects of quercetin in human in vitro and in vivo models. *Atherosclerosis* 2011; 218(1); 44-52.
26. Sridar C, Goosen TC, Kent UM, Williams JA, Hollenberg PF. Silybin inactivates cytochromes P450 3A4 and 2C9 and inhibits major hepatic glucuronosyltransferases. *Drug metabolism and disposition* 2004; 32(6): 587-594.
27. de Lemos ML. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth *Annals of Pharmacotherapy* 2001; 35(9): 1118-1121.
28. Fang N, Casida JE. New bioactive flavonoids and stilbenes in cube resin insecticide. *Journal of natural products* 1999; 62(2): 205-210.

29. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003; 64(5): 923-933.
30. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition* 1992; 32(1): 67-103.
31. Handique JG, Baruah JB. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive and Functional Polymers* 2002; 52(3): 163-188.
32. O'Kennedy R, Thornes RD (Eds.). *Coumarins: biology, applications, and mode of action*. John Wiley & Sons, 1997.
33. Hoult JRS, Paya M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General Pharmacology: The Vascular System* 1996; 27(4): 713-722.
34. Kozyra M, Głowniak K, Zabża A, Zgórk G, Mroczek T, Cierpicki T, Mudło, I. Column chromatography and preparative TLC for isolation and purification of coumarins from *Peucedanum verticillare* L. Koch ex DC. *Journal of Planar Chromatography-Modern TLC* 2005; 18(103): 224-227.
35. Cohen AJ. Critical review of the toxicology of coumarin with special reference to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. *Food and cosmetics toxicology* 1979; 17(3): 277-289.
36. Sproll C, Ruge W, Andlauer C, Godelmann R, Lachenmeier DW. HPLC analysis and safety assessment of coumarin in foods. *Food chemistry* 2008; 109(2): 462-469.
37. Perone VB. The natural occurrence and uses of toxic coumarins. *Microbial Toxins* 2013: 67-88.
38. Fentem JH, Fry JR. Species differences in the metabolism and hepatotoxicity of coumarin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 1993; 104(1): 1-8.
39. Kurosaki F, Nishi A. Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from cultured carrot cells. *Phytochemistry* 1983; 22(3): 669-672.
40. Rukachaisirikul V, Naklue W, Sukpondma Y, Phongpaichit S. An antibacterial biphenyl derivative from *Garcinia bancana* MIQ. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 2005; 53(3): 342-343.

41. Paine MF, Wilbur WW, Heather LH, Susan NP, Kimberly LB, Anne BC, Sherri SB, Brian FT, Paul BW. A furanocoumarin-free grapefruit juice establishes furanocoumarins as the mediators of the grapefruit juice–felodipine interaction. *The American journal of clinical nutrition* 2006; 83(5): 1097-1105.
42. Markham T, Rogers S, Collins P. Narrowband UV-B (TL-01) phototherapy vs oral 8-methoxypsoralen psoralen–UV-A for the treatment of chronic plaque psoriasis. *Archives of dermatology* 2003; 139(3): 325-328.
43. Goldblatt, L. Aflatoxin: scientific background, control, and implications. Elsevier, 2012.
44. Manolov I, Maichle-Moessmer C, Danchev N. Synthesis, structure, toxicological and pharmacological investigations of 4-hydroxycoumarin derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 2006; 41(7): 882-890.
45. Kostova I, Raleva S, Genova P, Argirova R. Structure-activity relationships of synthetic coumarins as HIV-1 inhibitors. *Bioinorganic chemistry and applications* 2006; 2006: 1-9.
46. Marcu MG, Schulte TW, Neckers L. Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *Journal of the National Cancer Institute* 2000; 92(3): 242-248.
47. Melagraki G, Afantitis A, Igglessi-Markopoulou O, Detsi A, Koufaki M, Kontogiorgis C, Hadjipavlou-Litina DJ. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *European journal of medicinal chemistry* 2009; 44(7): 3020-3026.
48. Fylaktakidou KC, Hadjipavlou-Litina DJ, Litinas KE, Nicolaides DN. Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Current pharmaceutical design* 2004; 10(30): 3813-3833.
49. Choi YH, Yan GH. Anti-allergic effects of scoparone on mast cell-mediated allergy model. *Phytomedicine* 2009; 16(12): 1089-1094.
50. Jang SI, Kim YJ, Lee WY, Kwak KC, Baek SH, Kwak GB, Chai KY. Scoparone from *Artemisia capillaris* inhibits the release of inflammatory mediators in RAW 264.7 cells upon stimulation cells by interferon- γ plus LPS. *Archives of pharmacal research* 2005; 28(2): 203-208.
51. Molnar M, Čačić M. Biological activity of coumarin derivatives—a review. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 2011; 3(2): 55-64.

52. Bielawska K, Malinowska M, Cyuńczyk M. Wpływ kumaryn na organizm człowieka. *Bromatologia. Chemia. Toksykologia* 2014; XLVII (2): 213-221.
53. Lacy A, O'Kennedy R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. *Current pharmaceutical design* 2004; 10(30): 3797-3811.
54. McDermott JH. Antioxidant nutrients: current dietary recommendations and research update. *Journal of the American Pharmaceutical Association* 1999; 40(6): 785-799.
55. Castro L, Freeman BA. Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition* 2001; 17(2): 161-163.
56. Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, Astley, SB. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Molecular aspects of medicine* 2002; 23(1): 209-285.
57. Shahidi F. *Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications*. The American Oil Chemists Society, 1997.
58. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. *Current medicinal chemistry* 2005; 12(8): 887-916.
59. Stańczyk, M, Gromadzińska J, Wasowicz W. Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2005; 18(1): 15-26.
60. Stanchev S, Hadjimitova V, Traykov T, Boyanov T, Manolov I. Investigation of the antioxidant properties of some new 4-hydroxycoumarin derivatives. *European journal of medicinal chemistry* 2009; 44(7): 3077-3082.
61. Dianzani, MU, Barrera G, Alvarez S, Evelson P, Boveris, A. Pathology and physiology of lipid peroxidation and its carbonyl products. *Free radical pathophysiology* 2008: 19-38.
62. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 2008; 57(6): 1446-1454.
63. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 1994; 52(8): 253-265.

64. Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2006; 38(9): 1482-1495.
65. Fisman ML, Di Egidio M, Ricart KC, Repetto MG, Borodinsky LN, Llesuy SF, Sica RE. Evidence of oxidative stress in familial amyloidotic polyneuropathy type 1. *Archives of neurology* 2003; 60(4): 593-597.
66. Farooqui T, Farooqui AA. Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson's disease* 2011; 2011: 1-9.
67. Repetto M, Maria A, Guzmán J, Giordano O, Llesuy S. Protective effect of *Artemisia douglasiana* Besser extracts in gastric mucosal injury. *Journal of pharmacy and pharmacology* 2003; 55(4): 551-557.
68. Repetto M, Boveris A. Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2010; 10(7): 615-623.
69. Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova, N, Kaplan M, Coleman R, Fuhrman B. Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress, atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *The American journal of clinical nutrition* 2000; 71(5): 1062-1076.
70. Puthongsiriporn U, Scheideler SE, Sell JL, Beck MM. Effects of vitamin E and C supplementation on performance, in vitro lymphocyte proliferation, and antioxidant status of laying hens during heat stress. *Poultry science* 2001; 80(8): 1190-1200.
71. Servili M, Sordini B, Esposto S, Urbani S, Veneziani G, Di Maio I, Taticchi, A. Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants* 2013; 3(1): 1-23.
72. Hertog MG, Feskens EJ, Kromhout D, Hollman PCH, Katan MB. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 1993; 342(8878): 1007-1011.
73. Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Bmj* 1996; 312(7029): 478-481.
74. Renaud SD, de Lorgeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 1992; 339(8808): 1523-1526.
75. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry* 2001; 8(7): 797-807.

76. Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Buren LV, et al. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free radical research* 2002; 36(2): 217-233.
77. Moellering RC, Graybill JR, McGowan JE, Corey L. Antimicrobial resistance prevention initiative-an update: Proceedings of an expert panel on resistance. *American journal of infection control* 2007; 35(9): S1-S23.
78. Cohen ML. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 1992; 257(5073): 1050-1055.
79. Sack RB, Rahman M, Yunus M, Khan EH. Antimicrobial resistance in organisms causing diarrheal disease. *Clinical infectious diseases* 1997; 24(Supplement 1): S102-S105.
80. Tekwu EM, Pieme AC, Beng VP. Investigations of antimicrobial activity of some Cameroonian medicinal plant extracts against bacteria and yeast with gastrointestinal relevance. *Journal of ethnopharmacology* 2012; 142(1): 265-273.
81. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews* 1999; 12(4): 564-582.
82. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences* 2005; 78(5): 431-441.
83. Barbour EK, Al Sharif M, Sagherian VK, Habre AN, Talhouk RS, Talhouk SN. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 2004; 93(1): 1-7.
84. McCutcheon AR, Ellis SM, Hancock REW, Towers, GHN. Antibiotic screening of medicinal plants of the British Columbian native peoples. *Journal of Ethnopharmacology* 1992; 37(3): 213-223.
85. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature* 2004; 432(7019): 829-837.
86. Freiesleben SH, Jäger AK. Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms-A Review. *Medicinal & Aromatic Plants* 2014; 3(2): 154.
87. Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 107(2): 182-188.
88. Arora DS, Kaur GJ. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of natural medicines* 2007; 61(3): 313-317.

89. Ejim L, Farha MA., Falconer SB, Wildenhain J, Coombes BK, Tyers M, Brown ED, and Wright GD. Combinations of antibiotics and nonantibiotic drugs enhance antimicrobial efficacy. *Nature chemical biology* 2011; 7(6): 348-350.
90. Noshad D. *Daphne Sudden Death Syndrome (DSDS): pathogen identification, characterization and screening for disease resistance*. The University of British Columbia, 2007.
91. Halda JJ. Some taxonomic problems in the genus *Daphne* L. *Acta Musei Richnoviensis Sect. Nat.* 1999; 6(3): 195-233.
92. Brickell CD, Mathew B. *Daphne, The Genus in the Wild and in Cultivation: 1-188*, The Alpine Garden Society, Lye End Link, St. John's, Woking GU21 1SW, Surrey, 1978.
93. Webb D. A., and Ferguson I. K. (1968). *Daphne* In: *Flora Europaea* 2: 256-258. Cambridge University Press, Cambridge.
94. Jušković, M, Vasiljević, P, Ranđelović, V, Stevanović, V, Stevanović, B. Comparative analysis of populations of the Balkan endemic species *Daphne malyana* Blečić (Thymeleaceae). *Archives of Biological Sciences* 2010; 62(4): 1151-1162.
95. Paulin A. Über die geographische Verbreitung von *Daphne Blagayana* Freyer. Von Alfons Paulin. Kleinmayr & Bamberg, 1972: 30-52.
96. Grey-Wilson C, Hawthorne L: *Gartenhandbuch. Steingartenpflanzen: Mit mehr als 450 Pflanzen*. Royal Horticultural Society, 2005: 46.
97. Martini F, Poldini, L. *Daphne blagayana* Freyer (Thymelaeaceae), nuova per la flora d'Italia. *Webbia* 1990; 44(2): 295-306.
98. Dakskobler I, Vončina A, Gantar T. Rastišča in združbene razmere vrste *Daphne blagayana* v povodju Idrijce. *Hladnikia* 2011; 28: 3-16.
99. Yurukov S, Zhelev P. The woody flora of Bulgaria: a review. *Schweizerische Zeitschrift für Forstwesen* 2001; 152(2): 52-60.
100. Blečić V. In: *Flora Sr Srbije* 3, M. Josifović (Ed.), Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd, 1972, p.p. 570-578.
101. R. Lakušić, *Planinske biljke*, III izdanje, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990.

102. Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA. *Flora Europaea Vol 2. Roseaceae to Umbelliferae*. Cambridge University Press, 1978. p.p. 256-258.
103. Agnihotri S, Wakode S, Agnihotri A. An overview on anti-inflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. *Indian journal of natural products and resources* 2010; 1(2): 150-167.
104. Mansoor F, Anis I, Ali S, Choudhary MI, Shah MR. New dimeric and trimeric coumarin glucosides from *Daphne retusa* Hemsl. *Fitoterapia* 2013; 88: 19-24.
105. Ullah N, Ahmad S, Malik A. Phenylpropanoid glycosides from *Daphne oleoides*. *Chemical and pharmaceutical bulletin Tokyo* 1999; 47: 114-115.
106. Yeşilada E, Üstün O, Sezik E, Takaishi Y, Ono Y, Honda G. Inhibitory effects of Turkish folk remedies on inflammatory cytokines: interleukin-1 α , interleukin-1 β and tumor necrosis factor α . *Journal of Ethnopharmacology* 1997; 58(1): 59-73.
107. Yeşilada E, Taninaka H, Takaishi Y, Honda G, Sezik E, Momota H, Taki T. In vitro inhibitory effects of *Daphne oleoides* ssp. *oleoides* on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. *Cytokine* 2001; 13(6): 359-364.
108. Zhi-Wen WEI, Xiao-Wen GAO, Zheng WF. Anti-Tumor Activities of Total Flavonoids from the Roots of *Daphne Genkwa*. *Pharmaceutical Journal of Chinese People's Liberation Army* 2008-2.
109. Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Bae KH, Lee HK. Isolation of flavonoids, a biscoumarin and an amide from the flower buds of *Daphne genkwa* and the evaluation of their anti-complement activity. *Phytotherapy Research* 2006; 20(7): 610-613.
110. Zhang CF, Zhang SL, He X, Yang XL, Wu HT, Lin BQ, Yuan CS. Antioxidant effects of *Genkwa flos* flavonoids on Freund' s adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats. *Journal of ethnopharmacology* 2014; 153(3): 793-800.
111. Da Yu Li CL, Jin Q, Lee JW, Lee MK, Hwang BY. A New Tiglliane-Type Diterpenoid from *Daphne genkwa*. *Notes* 2014; 35(2): 669.
112. Taniguchi M, Fujiwara A, Baba K. Three flavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* 1997; 45(1): 183-188.
113. Taniguchi M, Fujiwara A, Baba K, Wang NH. Two biflavonoids from *Daphne acutiloba*. *Phytochemistry* 1998; 49: 863-867.

114. Liang S, Xiong Z, Tian J, Zhang WD. Flavones from *Daphne feddei*. *Chemistry of Natural Compounds* 2011; 47(5): 816-817.
115. Chaabane F, Boubaker J, Loussaif A, Neffati A, Kilani-Jaziri S, Ghedira K, Chekir-Ghedira L. Antioxidant, genotoxic and antigenotoxic activities of *daphne gnidium* leaf extracts. *BMC complementary and alternative medicine* 2012; 12(1): 153.
116. Cottigli F, Loy G, Garau D, Floris C, Caus M, Pompei R, Bonsignore L. Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* 2001; 8(4): 302-305.
117. Hu X, Jin H, Xu W, Zhang W, Liu X, Yan S, Zhang WD. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Daphne retusa* Hemsl. *Journal of ethnopharmacology* 2008; 120(1): 118-122.
118. Avicenna, Ab. *The Canon of Medicine*, Volume 2, Soroush Press, Tehran, pp: 214-215. (Translated by Sharafkandi in 1997)
119. Javidnia K, Miri R, Jahromi Rahim BNNK. A preliminary study on the biological activity of *Daphne mucronata* Royle. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003; 11(1): 28-31.
120. Kupeli E, Tosun A, Yesilada E. Assessment of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Daphne pontica* L.(Thymelaeaceae). *Journal of ethnopharmacology* 2007; 113(2): 332-337.
121. Kupchan SM, Baxter RL. Mezerin: antileukemic principle isolated from *Daphne mezereum* L. *Science* 1975; 187(4177): 652-653.
122. Fisher PB, Hermo JrH, Solowey WE, Dietrich MC, Edwalds GM, Weinstein IB, Kusama M. Effect of recombinant human fibroblast interferon and mezerin on growth, differentiation, immune interferon binding and tumor associated antigen expression in human melanoma cells. *Anticancer research* 1985; 6(4): 765-774.
123. Craker LE, Simon, JEH. *Species and Medicinal Plants: Recent Advances in Botany, Horticulture and Pharmacology* Vol. 2, Oryx Press, Canada, 1987.
124. Xu X, Konirbay B, Jenis J. *The Kazakh Materia Medica*. The Ethnic Press, Beijing, 2009.
125. Kizaibek M, Daniar M, Li L, Upur H. Antiproliferative activity of different extracts from *Daphne altaica* Pall. on selected cancer cells. *Journal of Medicinal Plants Research* 2011; 5(15): 3448-3452.

126. Ulubelen A, Terem B, Tuzlacı E. Coumarins and Flavonoids from *Daphne gnidioides*. *Journal of Natural Products* 1986; 49: 692-694.
127. Katti SB, Tandon JS. Chemical Investigation on *Daphne papyracea*. *Indian journal of chemistry section b-organic chemistry including medicinal chemistry* 1979; 18(2): 189-190.
128. Zirvi KA. Isolation of daphnetin-8-beta-glucoside from *Daphne acuminata*. *Planta medica* 1977; 31(2): 119-122.
129. Basu NK, Nasipuri RN. A note on sedative and other constituents of *Daphne papyracea*. *Current Science* 1962; 31(11): 463.
130. Cooper MR, Johnson AW. Poisonous plants in Britain and their effects on animals and man. HM Stationery Office, London, 1984.
131. Liu J, Tian J, He W, Xie J, Hu Z, Chen X. Spectrofluorometric Study of the Binding of Daphnetin to Bovine Serum Albumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; 35: 671-677.
132. Stout GH, Balkenhol WG, Poling M, Hickernell GL. The Isolation and Structure of Daphnetoxin, the Poisonous Principle of *Daphne* Species. *Journal of the American Chemical Society* 1970; 92: 1070-1071.
133. Fuller TC, McClintock E. Poisonous plants of California. University of California Press, Berkeley, Calif., USA, 1986: 432 pp.
134. Xu WC, Shen JG, Jiang JQ. Phytochemical and biological studies of the plants from the genus *Daphne*. *Chemistry & biodiversity* 2011; 8 (7): 1215-1233.
135. Niwa M, Sugino H, Takashima S, Sakai T, Wu C, Wu TS, Kuoh CS. A new coumarin glucoside from *Daphne arisanensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 1991; 39: 2422–2424.
136. Hu XJ, Jin HZ, Su J, Zhang W, Xu WZ, Yan SK, Zhang WD. Coumarins from *Daphne retusa*. *Chinese Journal of Natural Medicines* 2009; 7: 34-36.
137. Gu S, He J. Daphnoretin induces cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma (HOS) cells. *Molecules* 2012; 17(1): 598-612.
138. Kim MA, Kang K, Lee HJ, Kim M, Kim CY, Nho, CW. Apigenin isolated from *Daphne genkwa* Siebold et Zucc. inhibits 3T3-L1 preadipocyte differentiation through a modulation of mitotic clonal expansion. *Life sciences* 2014; 101(1): 64-72.

139. Yuan H, Bi K, Chang W, Yue R, Li B, Ye J, Zhang W. Total synthesis of Daphnodorin A. *Tetrahedron* 2014; 70(47): 9084-9092.
140. Yusa K, Oh-hara T, Tsukahara S, Baba K, Taniguchi M, Kozawa M, Tsuruo T. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by daphnodorins. *Antiviral research* 1994; 25(1): 57-66.
141. Baba K, Yoshikawa M, Taniguchi M, Kozawa M. Biflavonoids from *Daphne odora*. *Phytochemistry* 1995; 38(4): 1021-1026.
142. Li S, Chou G, Hseu Y, Yang H, Kwan H, Yu Z. Isolation of anticancer constituents from *flos genkwa* (*Daphne genkwa* Sieb. et Zucc.) through bioassay-guided procedures. *Chemistry Central Journal* 2013; 7: 159.
143. Watanabe I, Yanai T, Awano KI, Kogami K, Hayashi K. Volatile components of *Zinchoge* flower (*Daphne odora* Thunb.). *Agricultural and Biological Chemistry* 1983; 47(3): 483-490.
144. Huang SZ, Li XN, Ma QY, Dai HF, Li LC, Cai XH, Zhao YX. Daphnauranols A–C, new antifeedant sesquiterpenoids with a 5/6/7 ring system from *Daphne aurantiaca*. *Tetrahedron Letters* 2014; 55(27): 3693-3696.
145. Hong JY, Nam JW, Seo EK, Lee SK. Daphnane diterpene esters with anti-proliferative activities against human lung cancer cells from *Daphne genkwa*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 2010; 58(2): 234-237.
146. He W, Cik M, Appendino G, Puyvelde L, Leysen JE, Kimpe N. Daphnane-type diterpene orthoesters and their biological activities. *Mini reviews in medicinal chemistry* 2002; 2(2): 185-200.
147. Inamori Y, Takeuchi K, Baba K, Kozawa M. Antifungal and insecticidal activities of daphnodorins A, B and C. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 1987; 35(9): 3931-3934.
148. Huang SZ, Zhang XJ, Li XY, Kong LM, Jiang HZ, Ma QY, Zhao YX. Daphnane-type diterpene esters with cytotoxic and anti-HIV-1 activities from *Daphne acutiloba* Rehd. *Phytochemistry* 2012; 75: 99-107.
149. Jo SK, Hong JY, Par HJ, Lee SK. Anticancer activity of novel daphnane diterpenoids from *Daphne genkwa* through cell-cycle arrest and suppression of Akt/STAT/Src signalings in human lung cancer cells. *Biomolecules & therapeutics* 2012; 20(6): 513.

150. Li ZJ, Li XM, Piao YJ, Choi DK, Kim SJ, Kim JW, Lee JH. Genkwadaphnin induces reactive oxygen species (ROS)-mediated apoptosis of squamous cell carcinoma (SCC) cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2014; 450(2): 1115-1119.
151. Lin-gen Z, Seligmann O, Lotter H, Wagner H. (-)-Dihydrosesamin, a lignan from *Daphne tangutica*. *Phytochemistry* 1983; 22(1): 265-267.
152. Pan L, Zhang XF, Deng Y, Zhou Y, Wang H, Ding, LS. Chemical constituents investigation of *Daphne tangutica*. *Fitoterapia* 2010; 81(1): 38-41.
153. Okunishi T, Takaku N, Wattanawikkit P, Sakakibara N, Suzuki S, Sakai F, Umezawa T, Shimada M. Lignan production in *Daphne odora* cell cultures. *Journal of Wood Science* 2002; 48: 237-241.
154. Singleton V, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology* 1999; 299: 152-175.
155. *Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta (Ph. Jug. IV)*. National Institute for Health Protection, Belgrade, 1984.
156. Brighente IMC, Dias M, Verdi LG, Pizzolatti MG. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. *Pharmaceutical Biology* 2007; 45(2): 156-161.
157. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 1999; 269(2): 337-341.
158. Kumarasamy Y, Byres M, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of some scottish plants for free-radical scavenging activity. *Phytotherapy Research* 2007; 21(7): 615-621.
159. Hsu CK, Chiang BH, Chen YS, Yang JH, Liu CL. Improving the antioxidant activity of buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn) sprout with trace element water. *Food Chemistry* 2008; 108(2): 633-641.
160. Carter P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical biochemistry* 1971; 40(2): 450-458.
161. Hinneburg I, Dorman HJD, Hiltunen R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chemistry* 2006; 97(1): 122-129.

162. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods* 2007; 42(4): 321-324.
163. Yam MF, Sadikun A, Ahmad M., Akowuah GA, Asmawi MZ. Toxicology evaluation of standardized methanol extract of *Gynura procumbens*. *Journal of ethnopharmacology* 2009; 123(2): 244-249.
164. Houghton PJ. Chemistry and biological activity of natural and semi-synthetic chromone alkaloids. *Studies in Natural Products Chemistry* 2000; 21: 123-155.
165. Elisabetsky E, Wannmacher L. The status of ethnopharmacology in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 1993; 38(2): 129-135.
166. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39(5): 603-613.
167. Moller JKS, Madsen HL, Aaltonen T, Skibsted LH. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. *Food Chemistry* 1999; 64(2): 215-219.
168. Saha MR, Hasan SMR, Akter R, Hossain MM, Alam MS, Alam MA, Mazumder MEH. In vitro free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* Linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* 2008; 6(2): 197–202.
169. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 2000; 63(7): 1035-1042.
170. Varon R, Garcia-Moreno M, Valera-Ruiperez D, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, Ladron-de Guevara RG, Havsteen BH. Kinetic analysis of a general model of activation of aspartic proteinase zymogens. *Journal of theoretical biology* 2006; 242(3): 743-754.
171. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 1997; 2(4): 152-159.
172. Pietta PG, Gardana C, Mauri PL. Identification of Ginkgo biloba flavonol metabolites after oral administration to humans. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 1997; 693(1): 249-255.
173. Merfort I, Heilmann J, Weiss M, Pietta P, Gardana C. Radical scavenger activity of three flavonoid metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNs. *Planta medica* 1996; 62(4): 289-292.

174. Lee SK, Mbwambo ZH, Chung H, Luyengi L, Gamez EJ, Mehta RG, Pezzuto JM. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. *Combinatorial chemistry & high throughput screening* 1998; 1(1): 35-46.
175. Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry MM, Cai S. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. *Journal of agricultural and Food chemistry* 1995; 43(11): 2798-2799.
176. Fuhrman B, Volkova N, Rosenblat M, Aviram M. Lycopene synergistically inhibits LDL oxidation in combination with vitamin E, glabridin, rosmarinic acid, carnosic acid, or garlic. *Antioxidants and Redox Signaling* 2000; 2(3): 491-506.
177. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46(10): 4113-4117.
178. Pollard SE, Kuhnle GG, Vauzour D, Vafeiadou K, Tzounis X, Whiteman M, Spencer JP. The reaction of flavonoid metabolites with peroxynitrite. *Biochemical and biophysical research communications* 2006; 350(4): 960-968.
179. Hodnick WF, Milosavljevic EB, Nelson JH, Pardini RS. Electrochemistry of flavonoids, *Biochemical Pharmacology* 1988; 37(13): 2607-2611.
180. Society for Medicinal Plant Research. International congress and annual meeting of the Society for Medicinal Plant Research: September 2-6, 2007, Graz, Austria. Thieme.
181. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology* 2000; 88(2): 308-316.
182. Wallace RJ. Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004; 63(04): 621-629.
183. Lin CM, Chen CS, Chen CT, Liang YC, Lin JK. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002; 294(1): 167-172.
184. Saleem M, Nazir M, Ali MS, Hussain H, Lee YS, Riaz N, Jabbar A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates 2010. *Natural product reports*; 27(2): 238-254.
185. Kabara JJ, Swieczkowski DM, Conley AJ, Truant JP. Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1972; 2(1): 23-28.

186. Barbary OM, El-Sohaimy SA, El-Saadan MA, Zeitoun AMA. Antioxidant, antimicrobial and anti-HCV activities of lignan extracted from flaxseed. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 2010; 6: 247-56.
187. Süntar I, Akkol EK, Keles H, Yesilada E, Sarker SD, Arroo R, Baykal T. Efficacy of *Daphne oleoides* subsp. *kurdica* used for wound healing: identification of active compounds through bioassay guided isolation technique. *Journal of ethnopharmacology* 2012; 141(3): 1058-1070.
188. Yu W, Wang H, Ying H, Yu Y, Chen D, Ge W, Shi L. Daphnetin attenuates microglial activation and proinflammatory factor production via multiple signaling pathways. *International immunopharmacology* 2014; 21(1): 1-9.
189. Shu K, Kuang N, Zhang Z, Hu Z, Zhang Y, Fu Y, Min W. Therapeutic effect of daphnetin on the autoimmune arthritis through demethylation of proapoptotic genes in synovial cells. *Journal of translational medicine* 2014; 12(1): 1-11.
190. Jurd L, Corse J, King AD, Bayne H, Mihara K. Antimicrobial properties of 6, 7-dihydroxy-, 7, 8-dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarins. *Phytochemistry* 1971; 10(12): 2971-2974.
191. Cho JY, Moon JH, Seong KY, Park KH. Antimicrobial activity of 4-hydroxybenzoic acid and trans 4-hydroxycinnamic acid isolated and identified from rice hull. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 1998; 62(11): 2273-2276.
192. McDonald S, Prenzler PD, Antolovich M, Robards K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. *Food chemistry* 2001; 73(1): 73-84.
193. Ramesh B, Pugalendi KV. Antioxidant role of umbelliferone in STZ-diabetic rats. *Life sciences* 2006; 79(3): 306-310.
194. Lino CS, Taveira ML, Viana GSB, Matos FJA. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research* 1997; 11(3): 211-215.
195. Ramesh B, Pugalendi KV. Antihyperglycemic effect of umbelliferone in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of medicinal food* 2006; 9(4): 562-566.