



UNIVERZITET U NIŠU
MEDICINSKI FAKULTET



MARIJA S. GOČMANAC-IGNJATOVIĆ

**ISPITIVANJE SPAZMOLITIČKIH,
BRONHODILATATORNIH,
ANTIOKSIDATIVNIH I ANTIMIKROBNIH
EFEKATA EKSTRAKATA I ETARSKOG
ULJA MORAČA (*Foeniculum vulgare* Miller)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2017.



UNIVERSITY OF NIŠ
MEDICAL FACULTY



MARIJA S. GOČMANAC-IGNJATOVIĆ

**INVESTIGATION OF THE SPASMOLYTIC,
BRONCHODILATORY, ANTIOXIDANT AND
ANTIMICROBIAL EFFECTS OF THE
EXTRACTS AND ESSENTIAL OIL OF
FENNEL (*Foeniculum vulgare* Miller)**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2017.

Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor:	Prof. dr Suzana Branković, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu
Naslov:	ISPITIVANJE SPAZMOLITIČKIH, BRONHODILATATORNIH, ANTIOKSIDATIVNIH I ANTIMIKROBNIH EFEKATA EKSTRAKATA I ETARSKOG ULJA MORAČA (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller)
Rezime:	<p>Morač (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller) se vekovima koristi u tradicionalnoj medicini. Sprovedeno istraživanje je imalo za cilj da ispita biološki, biohemijski i mikrobiološki profil ove biljne vrste i njen mogući lekoviti potencijal. Biološka aktivnost je proučavana ispitivanjem dejstva različitih ekstrakata i etarskog ulja na glatku muskulaturu tankog creva i traheje pacova, određena je antioksidativna i antimikrobna aktivnost i izvršena je hemijska analiza ekstrakata i etarskog ulja. Ispitivana je i razlika između spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata nadzemnih delova morača, koji su sakupljeni u tri različite godine. Ovo istraživanje je pokazalo da ekstrakti, a posebno etarsko ulje različitih nadzemnih delova biljke pokazuju značajno relaksantno dejstvo, kako na spontane, tako i na stimulisane kontrakcija glatkih mišića tankog creva i traheje pacova. Ekstrakti i etarsko ulje morača su pokazali dobru antioksidativnu aktivnost koja je određivana kao sposobnost ekstrakata da vežu slobodne radikale (DPPH-metoda), kao sposobnost ekstrakata i etarskog ulja da spreče lipidnu peroksidaciju β-karotena u emulziji β-karoten/linolna kiselina. Ekstrakti i etarsko ulje morača su pokazali slabu antimikrobnu aktivnost koja je ispitivana protiv Gram (-) i Gram (+) bakterija izolovanih iz gastrointestinalnog i respiratornog trakta. Hemijska analiza je pokazala da se razlike u sastavu ekstrakata i etarskog ulja odražavaju na biološku aktivnost istih.</p>
Naučna oblast:	Medicina
Naučna disciplina:	Fiziologija
Ključne reči:	morač, ileum, ekstrakt, etarsko ulje, spazmolitičko dejstvo, traheja, polifenoli, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost
UDK:	582.794.1:612.33
CERIF klasifikacija:	B 470 Fiziologija
Tip licence Kreativne zajednice:	CC BY-NC-SA

Data on Doctoral Dissertation

Doctoral Supervisor:	Prof. dr Suzana Branković, full Professor of Medicine, University of Nis
Title:	INVESTIGATION OF THE SPASMOLYTIC, BRONCHODILATORY, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL EFFECTS OF THE EXTRACTS AND ESSENTIAL OIL OF FENNEL (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller)
Abstract:	Fennel (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller) is used for centuries in traditional medicine. The research was aimed to investigate biological, biochemical and antimicrobial properties of this plant species and its possible medicinal potential. Examination is evaluated by determining the biological activities such as studies of the effects of different extracts and essential oil on the smooth muscles of the small intestine and rat trachea, which is determined by antioxidative and antimicrobial activity. Chemical analysis of extracts and essential oil was also performed. The study is the difference between the spasmolytic activity of essential oils and extracts of the aerial parts fennel, which were collected in three different years. This study showed that extracts, especially essential oil of different kinds of ground parts of the plant showed significant relaxant effect, in spontaneous, as well as the stimulated smooth muscle contraction of trachea and small intestine of rats. The extracts and essential oil of fennel, have shown good antioxidant activity which was determined as the ability of the extracts to bind free radicals (DPPH method) and the ability of extracts and essential oils to prevent lipid peroxidation of β -carotene in the emulsion of β -carotene/linoleic acid. The extracts and essential oil of fennel, showed poor antimicrobial activity which was tested against both Gram (-) and Gram (+) bacteria isolated from the gastrointestinal and respiratory tract. Chemical analysis showed that the differences in the composition of the essential oil and extracts reflect their biological activity.
Scientific Field:	Medicine
Scientific Discipline:	Physiology
Key Words:	fennel, ileum, extract, essential oil, spasmolytic effect, trachea, polyphenols, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity
UDC:	582.794.1:612.33
CERIF Classification:	B 470 Fiziologija
Creative Commons License Type:	CC BY-NC-SA

LISTA SKRAĆENICA

1,4-DHP	1,4-dihidropiridin
100 MENP	metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu
100 MLE	metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu
100MES	metanolni ekstrakt stabla morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu
100MEZP	metanolni ekstrakt zrelog ploda morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu
80 MLE	metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 80% metanolu
80MENP	metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača ekstrahovan u 80% metanolu
80MES	metanolni ekstrakt stabla morača ekstrahovan u 80% metanolu
80MEZP	metanolni ekstrakt zrelog ploda morača ekstrahovan u 80% metanolu
ACh	acetilholin
AK	askorbinska kiselina
ALT	alanin-aminotransferaza
ANOVA	analiza varijanse
AO	antioksidativna aktivnost
AST	aspartat-aminotransferaza
BKCa	kalijumovi kanali sa velikom provodljivošću
CCl ₄	karbon-tetrahlorid
CFU	Colony forming units
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
CYP2C9	citohrom P450 2C9 gen
DNES	difuzni neuroendokrini sistem
DNFB	2,4-dinitrofluorobenzen
DPPH-radikal	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal
EC ₅₀	efektivna koncentracija koja inhibiše 50% kontrakcija glatke muskulature ileuma pacova

EUL	etarsko ulje lista morača
EUNP	etarsko ulje nedozrelog ploda morača
EUZP	etarsko ulje zrelog ploda morača
FD	funkcionalna dispepsija
FGIP	funkcionalni gastrointestinalni poremećaj
GAE	ekvivalent galne kiseline
GC	gasna hromatografija
GC-FID	plamenojonizacioni detektor
GC-MS	gasna hromatografija-masena spektrometrija
GI	gastrointestinalni
GIP	gastrični inhibitorni polipeptid
GLP	glukagonu-sličan peptid
H ₂ OL	vodeni ekstrakt lista morača
H ₂ OMES	vodeni ekstrakt stabla morača
H ₂ ONP	vodeni ekstrakt nedozrelog ploda morača
H ₂ OZP	vodeni ekstrakt zrelog ploda morača
HPLC	tečna hromatografija visokih performansi
HSV-1	virus Herpes simplex tip 1
IC ₅₀	koncentracija uzorka koja je potrebna da inhibiše 50% slobodnih DPPH radikala ili da spreči obezbojavanje 50% β -karotena
ICC	intersticijske Kahalove ćelije
ICC-AP	intersticijske Kahalove ćelije Auerbahovog pleksusa
ICC-DMP	intersticijske Kahalove ćelije lokalizovane u dubokom mišićnom pleksusu
ICC-IM	intramuskularne intersticijske Kahalove ćelije
ICC-MY	mijenteričke intersticijske Kahalove ćelije
ICC-SMP	intersticijske Kahalove ćelije lokalizovane u submukozi i submukoznom pleksusu
IL	interleukin
IP ₃	inozitol trifosfat

L-NAME	L-nitroarginin metil estar
MAO	monoamino-oksidaža
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MDA	malon dialdehid
MHA	Mueller-Hinton agar
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MKLL	miozin-kinaza lakih lanaca
PI-3	virus parainfluence tip 3
PVPP	polivinil polipirolidon
RK	ruzmarinska kiselina
RUE	ekvivalent rutina
SIC	sindrom iritabilnog creva
SKCa	kalijumovi kanali sa malom provodljivošću
TNF	tumorski faktor nekroze
TTC	2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorid
USDA	United States Department of Agriculture
VIP	vazoaktivni intestinalni polipeptid

Zahvalnost

Izrada ove doktorske disertacije ne bi bila moguća bez pomoći i saradnje grupe ljudi kojima dugujem ogromnu zahvalnost:

***Prof. dr Suzani Branković**, za nesebičnu pomoć, veliku strpljivost, upornost, pokretačku snagu, znanje i profesionalizam koji su pratili izradu ovog rada;*

***Prof. dr Mirjani Radenković**, za korisne savete, znanje, procenu i ocenu ove doktorske disertacije.*

***Prof. dr Dušanki Kitić**, za nesebičnu pomoć, znanje, profesionalizam, ljudskost i prijateljstvo.*

***Prof. dr Tatjani Mihailov-Krstev**, za nesebičnu pomoć i antimikrobnu analizu uzoraka.*

***Doc. dr Bojani Miladinović**, za nesebičnu pomoć i korisne savete.*

Posebnu zahvalnost dugujem:

***Prof. dr Gordani Stojanović**, za nesebičnu pomoć pri analizi etarskih ulja.*

***Prof. dr Bojanu Zlatkoviću**, za pomoć pri klasifikaciji biljne vrste.*

***Dipl. hemičaru Slavoljubu Živanoviću**, za pomoć u analiziranju velikog broja uzoraka.*

***Asist. Milici Kostić** za pomoć i korisne savete.*

*Zahvaljujem se i dragim kolegama sa **Katedre za fiziologiju** koji su mi pružali podršku u toku izrade rada.*

***Roditeljima i bratu**, na podršci svake vrste, neizmernoj ljubavi i pokretačkoj snazi.*

*Posebno zahvaljujem **suprugu Marku**, na strpljenju, ljubavi i podršci, koji su mi davali snagu u toku izrade ove teze.*

*Mojim anđelima **Aleksandru i Tari**, koji mom životu daju smisao...*

Ovo istraživanje je realizovano u okviru projekata Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije broj III 46013 i III 41018 i Internog projekta br. 25, Medicinskog fakulteta u Nišu.

Autor

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	3
2.1. MORAČ (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller).....	3
2.2. TRADICIONALNA I FARMAKOLOŠKA UPOTREBA MORAČA	5
2.3. HEMIJSKI SASTAV MORAČA	7
2.3.1. Polifenoli.....	8
2.3.2. Flavonoidi	9
2.3.3. Fenolne kiseline	11
2.4. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST	11
2.4.1. Acetilholin	15
2.4.2. Noradrenalin	17
2.4.3. Glatki mišići gastrointestinalnog i respiratornog sistema	17
2.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST	22
2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST	24
2.6.1. Gram-negativne bakterije.....	24
2.6.2. Gram-pozitivne bakterije	28
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	32
4. MATERIJAL I METODE	33
4.1. BILJNI MATERIJAL	33
4.2. PRIPREMA EKSTRAKATA	33
4.3. IZOLOVANJE ETARSKOG ULJA	33
4.4. ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA	34

4.4.1.	Eksperimentalne životinje korišćene za ispitivanje spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata morača u uslovima <i>in vitro</i>	34
4.4.2.	Izolovanje i postavljanje ileuma pacova	34
4.4.3.	Izolovanje i postavljanje traheje pacova	35
4.4.4.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na spontane kontrakcije ileuma pacova	35
4.4.5.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom	36
4.4.6.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum-hlorida.....	37
4.4.7.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalcijum hlorida	37
4.4.8.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom barijum hlorida.....	38
4.4.9.	Procena kontraktilnosti ileuma pacova u uslovima primena etarskog ulja i ekstrakta morača i blokatora azot-oksidi sintetaze.....	38
4.4.10.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na spontane kontrakcije traheje pacova	39
4.4.11.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije traheje pacova izazvane acetilholinom	39
4.4.12.	Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije traheje pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida.....	39
4.5.	ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA I UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTIMA MORAČA	41
4.6.	ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA MORAČA.....	42
4.7.	HEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA I ETARSKIH ULJA MORAČA.....	43
4.7.1.	HPLC analiza ekstrakata.....	43
4.7.2.	Hemijski sastav etarskog ulja.....	43
4.8.	ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA.....	44
4.8.1.	Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih radikala (DPPH metoda).....	44
4.8.2.	Inhibicija obezbojavanja β -karotena	45
4.9.	ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA.....	46
4.9.1.	Mikrobiološki sojevi	46
4.9.2.	Mikrodiluciona metoda.....	46
4.10.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	47
5.	REZULTATI.....	48

5.1. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

.....	48
5.1.1. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača na spontane kontrakcije ileuma pacova	48
5.1.2. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na spontane kontrakcije ileuma pacova	52
5.1.3. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na spontane kontrakcije ileuma pacova	56
5.1.4. Uticaj ekstrakata stabljike morača na spontane kontrakcije ileuma pacova.....	59
5.1.5. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom	60
5.1.6. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom	73
5.1.7. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom	85
5.1.8. Uticaj ekstrakata stabljike morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom	95
5.1.9. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida	97
5.1.10. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida	102
5.1.11. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida	106
5.1.12. Uticaj ekstrakata stabljike morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida	108
5.1.13. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalcijum-hlorida	110
5.1.14. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom barijum-hlorida	112
5.1.15. Procena kontraktilnosti ileuma pacova u uslovima primena etarskog ulja i ekstrakta morača i blokatora azot-oksida sinteze (L-NAME).....	114
5.1.16. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na spontane kontrakcije izolovane traheje pacova	115
5.1.17. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane acetilholinom	116
5.1.18. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane rastvorom kalijum-hlorida.....	117
5.2. PRINOSI MORAČA	118
5.3. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA I TANINA U EKSTRAKTIMA MORAČA	119
5.4. SADRŽAJ FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA U EKSTRAKTIMA MORAČA.....	121
5.5. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA MORAČA.....	123
5.6. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA.....	125
5.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I ETARSKOG ULJA MORAČA	127

6. DISKUSIJA	130
6.1. FITOKONSTITUENTI MORAČA.....	130
6.2. SPAZMOLITIČKA I BRONHODILATATORNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA	132
6.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA.....	137
6.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA.....	139
7. ZAKLJUČCI	141
8. LITERTURA	144
PRILOG 1	166
HPLC hromatogrami flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima morača (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller).....	166
PRILOG 2	170
GC hromatogrami jedinjenja u etarskom ulju morača (<i>Foeniculum vulgare</i> Miller)	170
BIOGRAFIJA AUTORA	171

1. UVOD

Biljne vrste i biljni proizvodi, koji sadrže biološki aktivne sastojke, sve više se primenjuju u ishrani ali i u terapeutske svrhe. Iz tih razloga se sprovode intenzivna naučna istraživanja kojim se analiziraju potencijalni terapeutski efekti biljaka kao i mehanizmi dejstava biološki aktivnih jedinjenja.

Funkcionalni gastrointestinalni poremećaji (FGIP) su grupa od više od dvadesetak hroničnih medicinskih stanja gastrointestinalnog trakta koje karakteriše poremećen motilitet creva (Qu i sar, 2014). Funkcionalna dispepsija (FD) i sindrom iritabilnog creva (SIC), uz konstipaciju i ezofagealne smetnje su najzastupljenije bolesti ove grupe (Palsson i Whitehead, 2013).

Karakteristike funkcionalnih gastrointestinalnih poremećaja su odsustvo strukturne ili biohemijske abnormalnosti koje bi opravdale postojanje simptoma koji se manifestuju u obliku dijareje, bolova u truhu, spazma, flatulencije i konstipacije (Oshima i Miwa, 2015; Corazziari, 2004).

Patogeneza FGIP nije još uvek potpuno razjašnjena. Smatra se da FGIP nastaju sadejstvom genetskih faktora i faktora spoljašnje sredine (ishrana, psihosocijalni faktori i dr.) (Drossman, 2006). Mogući mehanizmi nastanka FGIP su poremećaji kontrolnih sistema koji utiču na motilitet digestivnog trakta ili poremećaji kontraktilnosti glatkomišićnih ćelija, odnosno FGIP su posledica motoričke i senzoričke disfunkcije.

Bronhijalna astma je oboljenje respiratornog sistema koje se manifestuje epizodama gušenja, kašlja i opstrukcije usled reverzibilnog spazma glatke muskulature disajnih puteva (Halayko i sar, 2006). Abnormalna kontraktilnost, odnosno povećan tonus glatke muskulature disajnih puteva, može doprineti nastanku bronhospazma i bronhijalne astme (Webb, 2003; Leal i sar, 2006).

Funkcionalni poremećaji gastrointestinalnog trakta i poremećaji ventilacije pluća spadaju u oboljenja koja zahvataju veliki procenat populacije. Statistika pokazuje da u Sjedinjenim Američkim Državama svaka četvrta osoba ima simptome funkcionalnih poremećaja

digestivnog sistema (Drossman i sar, 2007). Podaci Svetske Zdravstvene Organizacije ukazuju da se opstruktivna bolest disajnih puteva-bronhijalna astma, javlja kod 5-10% odraslih osoba (Lowgagon, 1999).

Poremećaji kontraktilnosti muskulature digestivnog i respiratornog sistema uglavnom se tretiraju sintetskim medikamentima, koji mogu izazvati brojne neželjene efekte (Farhadi i sar, 2001; Borrelli i sar, 2009). Zbog toga se sve više pažnje posvećuje proučavanju prirodnih biljnih proizvoda koji sadrže sastojke koji mogu da utiču na kontraktilne procese u glatkomišićnim ćelijama. Takođe, biološki aktivne komponente biljaka predstavljaju osnovu za nastanak novih terapijskih preparata.

2. OPŠTI DEO

2.1. MORAČ (*Foeniculum vulgare* Miller)

Biljka morač (*Foeniculum vulgare* Miller) pripada bogatoj porodici Apiaceae (*Umbelliferae*) koja istovremeno predstavlja i jednu od najznačajnijih porodica u grupi cvetnica. Pomenuta porodica, u generalnom smislu, obuhvata oko 300 rodova sa oko 3000 vrsta. U našoj zemlji su prisutna 53 roda sa 138 vrsta. Brojni predstavnici ove porodice su još od davnina korišćeni u tradicionalnoj medicini zbog svojih lekovitih svojstava (Josifović, 1973).

Pripadnici porodice Apiaceae su dvogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, retko mogu biti i polužbunovi. Usled jače razvijenog kolenhima stabljike mogu dostići visinu i do 3 metra, a prečnik stabla im može biti i do 5 cm. Listovi su naizmjenično, retko naspramno raspoređeni, naročito su krupni u osnovi stabljike. Jednom ili višestruko su perasto deljeni na različite načine, te su često zbog toga isecci različitog oblika, nekada veoma tanak ili končasti. Lisna drška u osnovi prelazi u lisni rukavac koji obuhvata stabljiku. Cvetovi su uglavnom dvopolni (retko jednopolni) i sitni, aktinomorfni, ponekad po obodu zigomorfni. Najčešće su grupisani u složene štitove kojima se bočne grane ne završavaju cvetovima, već prostim štitovima. Ređe su grupisani u proste štitove, kada imaju oblik glavice. Unutar cvasti, priperci mogu obrazovati omotač ispod glavnog štita (involukrum) ili ispod štitića (involucelum). Cvetovi se sastoje iz pet čašičnih, pet kruničnih listića, pet prašnika i dva oplodna listića. Čašica je, ili slabo razvijena na gornjem delu plodnika, ili gotovo neprimetna. Krunični listići su žuti ili žutozeleni, retko beli ili crveni, slobodni, dvorežnjeviti ili usečeni, retko celi, kod zigomorfni cvetova nejednaki, veći prema spoljnoj strani cvasti. Prašnici su slobodni, a tučak je najčešće sa dvostrukim (ređe jednostrukim) plodnikom i u svakom okcu se nalazi po jedan semeni zametak. Plodnik je podcvetan. Na plodniku su često prisutne nektarije u obliku mesnate jastučaste tvorevine (discus) ili proširenja (stylopodium) iz kojih se izdižu dva stubića sa lepljivim žigovima. Plod je šizokarpijum koji se nakon sazrevanja raspada na dva jednosemena merikarpijuma koji su vezani izvesno vreme za nosač ploda (karpofor). Plodovi su na spoljašnjoj (dorzalnoj) strani ispupčeni, a na unutrašnjoj (ventralnoj) pljosnati i većim delom se međusobno dodiruju. Na svakom plodu se uglavnom

nalazi po pet glavnih, uzdužnih rebara (lat. *juga primaria*), u kojima su smešteni provodni snopići. Između glavnih rebara se često razvijaju sporedna rebra (lat. *juga secundaria*), a na gornjem kraju se mogu naći ostaci stubića i čašice. Kanali sa etarskim uljem se nalaze u zidu plodnika (perikarp) ili svuda okolo ili između glavnih rebara u brazdama (lat. *vittae vallecularis*), retko ispod glavnih rebara (lat. *vittae intrajugalis*) ili na ventralnoj strani (lat. *vittae commissuralis*). Seme često prirasta za zid plodnika (Josifović, 1973).

Biljke roda *Foeniculum* su višegodišnje zeljaste biljke koje su ponekad pri osnovi delimično odrvenjane i tada imaju polužbunastu formu. Stabljika je najčešće razgranata i izbrazdana. Listovi su obično 3-4 puta perasto deljeni, sa končastim režnjevima. Štitovi su krupni, sa velikim brojem zrakova. Nema involukruma i involuceluma. Čašični listići su redukovani, bez zubaca, a krunični listići su obično žuti, izduženo jajastog oblika. Plod je jajasto izdužen i plodići su sa po pet istaknutih rebara. U brazdama je po jedan kanal, a na ventralnoj strani ploda su smeštena po dva kanala sa etarskim uljem. Rod obuhvata jednu vrstu rasprostranjenu u oblasti Mediterana-morač (*Foeniculum vulgare*), koja je kao subsponsantana vrsta zastupljena i u flori naše zemlje (Josifović, 1973).



Slika 2.1. Morač (*Foeniculum vulgare* Miller)

Morač (*Foeniculum vulgare*) je dvogodišnja ili višegodišnja zeljasta biljka. Stabljika biljke je uspravna, okrugla, sitno izbrazdana, šuplja, od osnove razgranata, visine od 0,9 do 2 m. Listovi su višestruko perasto deljeni, sivoplavi i goli. Prizemni listovi su na drškama, a ostali su

sedeći, sa rukavcem. Režnjevi poslednjeg reda su linearni do skoro nitasti. Rukavci obuhvataju stabljiku, dugački su 3-6 cm i najčešće su prošireni. Štitovi su dosta krupni, sa 4-25 zrakova različite dužine. Involukrum i involucelum nisu razvijeni u cvastima. Cvetovi su sitni, tamnožuti do zelenožuti, a stubići tučka su kratki (Slika 2.1). Plod je jajasto izdužen, sa jasno izraženim rebrima, dužine 4-10,5 mm i širine 2,5 mm. Brazde sa etarskim uljem su sa po jednim kanalom, a na ventralnoj strani sa po dva kanala.

Morač se od davnina uzgaja. Raste na njivama, u poljoprivrednim kulturama, ali i na zapuštenim površinama. Morač je u Srbiji zastupljen kao široko gajena vrsta. Osim kao gajena, morač se sreće i kao zadivljala vrsta u južnim, toplijim krajevima Srbije. Opšte je rasprostranjena vrsta u Sredozemlju i u jugozapadnoj Aziji. Biljka je prijatnog mirisa, jestiva i koristi se u prehrambene svrhe. Različiti delovi biljke, posebno plod, koriste se kao zamena za anis (*Pimpinella anisum*) zbog sličnog mirisa, a upotrebljavaju se i u proizvodnji likera i aperitiva, sapuna i pasta za zube (Guilled i Manzanons, 1996; Oktay i sar, 2003).

2.2. TRADICIONALNA I FARMAKOLOŠKA UPOTREBA MORAČA

Morač se od davnina koristi u ishrani u različitim delovima sveta, posebno u Indiji i Iranu. Zbog svog karakterističnog i prijatnog mirisa koristi se kao dodatak različitim jelima i napicima. Prirodne, lepe i intenzivne boje dobijene iz lišća i cvetova morača se primenjuju u tekstilnoj i kozmetičkoj industriji. Seme morača se od davnina u Pakistanu i Indiji upotrebljava za osvežavanje daha. Nadzemni delovi (stablo, list, cvet i plod) biljke su se koristili kao laktagog kod dojilja jer stimulišu izlučivanje mleka (Agarwal i sar, 2008).

U različitim delovima sveta morač se koristio za lečenje brojnih stanja i oboljenja, kao što su, nadutost, bolovi u truhu, gastritis, bol i ulkus želuca, dijareja i povraćanje, iritabilni kolon, infantilne kolike, groznica, prehlada, nesаница, konjuktivitis, artritis, bubrežne kolike, promene u usnoj duplji, bolesti jetre, različite vrste karcinoma (Rather i sar, 2016; Pradhan i sar, 2008).

U literaturi su opisani sledeći efekti ekstrakata i etarskog ulja morača:

relaksantni - opisano je da primena hemisjskog sredstva SJ-200 (Himcospaz), koje predstavlja mešavinu ekstrakata biljaka i sadrži i ekstrakt morača, značajno inhibiše acetilholinom i histaminom indukovane kontrakcije tankog creva pacova (Venkataranganna i sar, 2002). Takođe je opisano relaksantno dejstvo etarskog ulja morača na prostaglandinom i oksitocinom stimulisane kontrakcije uterusa (Ostad i sar, 2001);

antimikrobni - vodeni ekstrakt ploda morača inhibisao je rast Gram-negativnih bakterija: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* (Kaur i Arora, 2009; Manonmani i Abdul Khadir, 2011; Badgular i sar, 2014). Dokazan je antibakterijski efekat etarskog ulja, metanolnog i etanolnog ekstrakta ploda morača protiv *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida* i *Pseudomonas syringae*, gde je etarsko ulje je pokazalo veći antimikrobni potencijal od ekstrakata (Gulfraz i sar, 2008; Badgular i sar, 2014). Ispitivanja antimikrobnog efekta različitih vrsta ekstrakata ploda morača protiv Gram-negativnih (*Escherichia coli* i *Salmonella typhi*), i Gram-pozitivnih bakterije (*Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*) i gljiva (*Candida albicans* i *Aspergillus flavus*) su pokazala da metanolni ekstrakt ima najveću antimikrobnu aktivnost (Roby i sar, 2013; Badgular i sar, 2014). Etarsko ulje ploda morača pokazalo je značajnu antivirusnu aktivnost na DNK virus Herpes simplex tip 1 (HSV-1) i RNK virus parainfluence tip 3 (PI-3) (Orhan i sar, 2012; Badgular i sar, 2014);

antiinflamatorni - oralna primena metanolnog ekstrakta ploda morača kod pacova i miševa je pokazala inhibitorne efekte na akutne (karagenanom iz algi izazvan edem šape, arahidonskom kiselinom uzrokovan edem uva) i subakutne inflamatorne bolesti (formaldehidom izazvan artritis) i na IV tip alergijske reakcije (Choi i Hwang, 2004; Eun-Mi i Jae-Kwan, 2004);

antioksidativni - morač je dugo poznat kao prirodni antioksidans i usled sadržaja fenola i flavonoida pokazuje visoku antioksidativnu aktivnost, pri čemu etarsko ulje morača pokazuje snažniju antioksidativnu aktivnost u odnosu na vodeni i etanolni ekstrakt ove biljke (Shahat i sar, 2011; Oktay i sar, 2003; Díaz-Maroto i sar, 2005; Anwar i sar, 2009);

antialergijski - metanolni ekstrakt ploda morača pokazuje značajnu inhibiciju 2,4-dinitrofluorobenzenom (DNFB) indukovano tipa odložene preosetljivosti nakon oralne primene, a opisani su i njegovi imunosupresivni efekti (Choi i Hwang, 2004);

bronhodilatatorni - opisan je značajni bronhodilatatorni efekat etanolnog ekstrakta i etarskog ulja morača kod zamoraca (Boskabady i sar, 2004);

antimutageni - usled oralne primene etarskog ulja različitih delova morača opaženo je značajno smanjenje frekvencije aberantnih promena, hromozomskih aberacija i citotoksičnosti (Tripathi i sar, 2013);

antinocioceptivni - metanolni ekstrakt nadzemnih delova biljke morač pokazao je značajno smanjenje osetljivost na bolne nadražaje kod miševa (Nassar i sar, 2010);

hepatoprotektivni - primena etarskog ulja morača kod pacova, kod kojih je karbon-tetrahloridom (CCl₄) izazvano oštećenje jetre, dovelo je do značajnog smanjenja koncentracije AST-a, ALT-a i bilirubina u serumu, što ukazuje na hepatoprotektivni efekat etarskog ulja ove biljke (Ozbek i sar, 2003).

Ostali opisani efekti etarskog ulja i ekstrakata različitih delova biljke morač su: antipiretički (Tanira i sar, 1996), antitrombotički (Tognolini i sar, 2007; Yoshioka i Tamada, 2005), kardioprotektivni (Abdul-Ghani i Amin, 1988; El Bardai i sar, 2001), hipolipidemijski (Oulmouden i sar, 2011), hipoglikemijski (El-Soud i sar, 2011), citoprotektivni i antitumorski (Pradhan i sar, 2008), kao i efekti na poboljšanje memorije i umanjenje stresa (Naga Kishore i sar, 2012; Padma i Khosa, 2002; Koppula i sar, 2013).

2.3. HEMIJSKI SASTAV MORAČA

Prema podacima USDA (Sekretarijata Poljoprivrede Sjedinjenih Američkih Država) morač sadrži brojna jedinjenja i minerale. Ova biljna vrsta je jako bogata mineralima kao što su fosfor, kalijum, natrijum i kalcijum (preko 50 mg u 100 g biljke), sadrži značajnu količinu magnezijuma (oko 17 mg/100 g biljke) i malu količinu gvožđa i cinka. Takođe, analize pokazuju veliku zastupljenost dijetnih vlakana i vitamina. Najviše je zastupljen vitamin C (oko 12 mg/100 g biljke), a prisutni su i vitamini B grupe (B1, B2, B3 i B6) i vitamini A, E i K u manjoj količini. Cvet i stablo biljke sadrže masti i ugljene hidrate u većoj količini od ostalih delova biljke. Detektovano je oko 20 (mono i polinezasićenih) masnih kiselina u svim delovima biljke (Barros i sar, 2010). Fitohemijskim analizama različitih delova morača izolovana su fenolne komponente i nekoliko klasa sekundarnih metabolita (Jamwal i sar, 2013; Grover i sar, 2013).

U svim biljkama primarni metaboliti nastaju na isti način. Primarni metabolizam biljaka obuhvata procese fotosinteze (u kojima se stvara glikoza) i transformacije dobijene glikoze do složenih šećera. U primarni metabolizam spada i glikoliza do masnih i aminokiselina, sve do sinteze lipida i proteina.

Sekundarni metabolizam se nadovezuje na primarni i predstavlja katabolizam i transformaciju finalnih proizvoda primarnog metabolizma. Sekundarni metaboliti su po svojoj hemijskoj prirodi veoma različita jedinjenja nastala pod dejstvom različitih enzima. Ovu grupu obuhvataju terpeni, alkaloidi, polifenoli i druga jedinjenja (Kovačević, 2004). Različite su uloge sekundarnih metabolita. Neki imaju uloge koenzima u enzimskim sistemima koji učestvuju u rastu, razvoju i ćelijskom disanju biljke. Neki su značajni za adaptaciju biljne vrste na različite uslove, za odbranu biljke od faktora spoljašnje sredine (patogeni faktori, UV zračenje, slobodni radikali, i dr.) (Savić, 1993).

Fitohemijskim analizama morača identifikovana su sledeća jedinjenja: fenoli, masne kiseline, isparljiva jedinjenja, ugljovodonici i još nekoliko drugih klasa sekundarnih metabolita. Identifikovana je 21 masna kiselina iz različitih delova morača (kapronska, kaprinska, kaprilna, undekanska, laurinska, miristinska, miristoleinska kiselina i dr). Nezasićene masne kiseline su više zastupljene od zasićenih. Najveća koncentracija omega-3 masnih kiselina je pronađena u listu morača, a najmanja u cvasti (Barros i sar, 2010).

U etarskom ulju ploda morača pronađen je veliki broj isparljivih jedinjenja (Akgül i Bayrak, 1988; Fang i sar, 2006). Najzastupljeniji su *trans*-anetol, estragol, *D*-limonen, fenhon, fenilpropanoid (Diao i sar, 2014). Veliki broj isparljivih komponenti je detektovano i u ekstraktima morača (Guillén i Manzanos, 1996; Damjanović i sar, 2005). Najzastupljeniji su *trans*-anetol, estragol i fenhon. Zastupljenost ovih jedinjenja je različita u različitim delovima biljke (Gross i sar, 2009).

2.3.1. Polifenoli

Polifenoli su sekundarni metaboliti biljaka sa izrazitom biološkom aktivnošću. Dele se na: fenolne kiseline, flavonoide, stilbene, lignane i tanine (Habauzit i sar, 2014).

Poslednjih decenija se polifenoli dosta izučavaju zbog značajnog dejstva u očuvanju zdravlja. Opisana su antioksidativna, antiinflamatorna, antimikrobna, antitumorska, kardio- i neuroprotektivna dejstva polifenola (Lišková i sar, 2015; Shahzad i sar, 2014; Catel-Ferreira i sar, 2015; Chang i sar, 2013; Irti i Varoni, 2014). Polifenolna jedinjenja reaguju sa tkivnim proteinima, enzimima i membranskim receptorima što menja njihovu aktivnost zbog čega postoji sve veća zastupljenost polifenola u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Parisi i sar, 2014).

Tanini su grupa polifenolnih jedinjenja koja su oporog ukusa i netoksična su. Usled stvaranja nerastvorljivih kompleksa sa belančevinama ispoljavaju brojne biološke efekte kao što su antimikrobno, antiinflamatorno, antidijaroično, antioksidativno i adstringentno delovanje. Tanini se koriste i kao antidoti kod trovanja teškim metalima i alkaloidima (Kovačević, 2004; Crozier i sar, 2006).

2.3.2. Flavonoidi

Flavonoidi su najpoznatiji sekundarni metaboliti biljaka sa značajnim uticajem na zdravlje ljudi. Njihov skelet se sastoji iz C6-C3-C6 jedinice u kojima su dva benzenova prstena povezana preko C3 jedinice.

Danas je opisano preko 8000 različitih jedinjenja ove klase koja su zastupljena u svakodnevnoj ljudskoj ishrani (Bigović, 2013). Flavonoidi su najzastupljeniji u citrusima, jabukama, čokoladi, orašastom voću, crnom luku, čajevima, vinu i pivu. Značajni su za razvoj i reprodukciju biljaka, kao i za njihov odgovor na stres. Na njihovu produkciju utiču različiti faktori, a najznačajniji su: visoke i niske temperature, UV-B zračenje, niska koncentracija ugljen-dioksida, jaka svetlost, lokalitet i genetika same biljke (Liu i sar, 2013).

Poznata je njihova antioksidativna aktivnost koja se ogleda u hvatanju slobodnih radikala (Okawa i sar, 2001; Firuzi i sar, 2004; Shiba i sar, 2008). Pored antioksidativne funkcije flavonoidi poboljšavaju funkciju endotela krvnih sudova, smanjuju krvni pritisak, regulišu dislipidemiju, inhibiraju oksidaciju LDL-čestica. Dokazano je da su flavonoidi dobri vazodilatatorni, imunomodulatorni, antinocioceptivni i anti-inflamatorni agensi, modifikuju nivo glukoze nakon obroka, poboljšavaju memoriju koja opada starenjem (Mulvihill i Huff, 2010).

Morač predstavlja značajan izvor flavonoida. Najzastupljeniji flavonoidi u moraču su kvercetin, kemferol i apigenin (Faudale i sar, 2008; Roby i sar, 2013). U vodenom ekstraktu morača su najzastupljeniji kvercetin i kemferol (Parejo i sar, 2004), a u metanolnom ekstraktu morača su najzastupljenij kvercetin i apigenin (Roby i sar, 2013).

Kvercetin pokazuje brojne farmakološke efekte: snižava krvni pritisak kod eksperimentalnih životinja i kod ljudi tako što izaziva vazodilataciju (Perez i sar, 2014). Vodeni ekstrakti kvercetina imaju hepatoprotektivni efekat što je dokazano na pacovima kojima je izazvano oštećenje jetre aflatoksinima. Taj efekat kvercetin ostvaruje inhibiranjem oštećenja DNK. Kod miševa hranjenih velikom količinom masti, holesterola i saharoze (Western diet), kvercetin je smanjio nagomilavanje masnog tkiva i poboljšao ekspresiju gena koji regulišu metabolizam masti i ugljenih hidrata i mitohondrijalni transport (Kobori, 2014). Kvercetin uz dodatak askorbinske kiseline održava normalni nivo monoamino-oksidaze (MAO) čije aktivnosti mogu uzrokovati depresiju (Bandaruk i sar, 2014). Dodavanje kvercetina u hranu pacovima koji su bili izloženi γ -zračenju je sprečilo oštećenje leukocita i smanjilo oštećenje DNK (Benković i sar, 2008).

Kemferol pokazuje antiinflamatornu, antioksidativnu i imunomodulatornu aktivnost. Kvercetin i kemferol inhibiraju oslobađanje histamina iz mastocita, kao i oslobađanje medijatora zapaljenja TNF- α , IL-1 β i IL-6 (Park i sar, 2008). Kemferol stimuliše sintezu insulina u β -ćelijama pankreasa i njegovu sekreciju, ispoljava i lipolitičko i antihipertenzivno dejstvo (Zhang i Liu, 2011; Loizzo i sar, 2007; Yu i sar, 2006). U visokim dozama ispoljava citotoksično dejstvo, izazivajući apoptozu ćelija osteosarkoma i karcinoma pluća, ne ispoljavajući citotoksično dejstvo na ostale zdrave ćelije (Huang i sar, 2010; Ruiz i sar, 2006; Sharma i sar, 2007).

Apigenin pokazuje antitumorsku, antioksidativnu, anksiolitičku, imunomodulatornu i citoprotektivnu aktivnost. Pokazuje veliku citotoksičnost na liniju ćelija leukemije (Ruela-de-Sousa i sar, 2010; Shukla i Gupta, 2010). Veoma je snažan inhibitor CYP2C9 gena (cytochrome P450 family 2 subfamily C member 9) i enzima kojima se metabolišu mnogi lekovi (Si i sar, 2009). Apigenin ima protektivno dejstvo kod oštećenje bubrega pacova izazvano ciklosporinima (Chong i sar, 2009). Aktivira nosače monoamina (Zhao i sar, 2010), ligand je centralnih benzodiazepinskih receptora (Viola i sar, 1995) i neselektivni antagonist centralnih opioidnih

receptora (Katavic i sar, 2007). Može stimulisati neurogenezu kod starijih i sprečava neuroinflamaciju (Taupin, 2009; Venigalla i sar, 2015). Apigenin povećava nivo antioksidativnih enzima i tako ispoljava svoju antioksidativnu aktivnost (Nielsen i sar, 1999; Myhrstad i sar, 2002).

Luteolin je flavonoid zastupljen u mnogim biljnim vrstama (voće, povrće, lekovito bilje). Pokazuje brojne biološke efekte, a najznačajniji su antiinflamatorni, antitumorski, antihipertenzivni, antioksidativni i antialergijski. Antikancerski efekat ostvaruje indukcijom apoptoze što dovodi do inhibicije kancerogeneze i supresije metastatskih procesa (Lin i sar, 2008).

2.3.3. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline mogu biti derivati benzojeve ili derivati cimetine kiseline. U derivate benzojeve kiseline spadaju: benzojeva, *p*-hidroksibenzojeva, protokatehinska, siringinska, vanilinska i galna kiselina. U derivate cimetine kiseline spadaju: cimetna, *p*-kumarinska, ferulna, kafena i sinapinska kiselina. Ove kiseline se uglavnom koriste kao konzervansi, ali i kao antiinflamatorni agensi i antioksidansi čija antioksidativna aktivnost raste sa porastom broja hidroksilnih grupa (Mahmood i sar, 2012). U moraču se nalaze: 3-*O*-kafeoilhina kiselina, 4-*O*-kafeoilhina kiselina, 5-*O*-kafeoilhina kiselina, 1,3-*O*-di-kafeoilhina kiselina, 1,4-*O*-di-kafeoilhina kiselina i 1,5-*O*-di-kafeoilhina kiselina (Faudale i sar, 2008).

2.4. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST

Gastrointestinalni trakt ima svoj nervni sistem-enterički nervni sistem koji se nalazi u celom zidu digestivne cevi, od jednjaka do anusa koji ima veoma značajnu ulogu u kontroli gastrointestinalnih funkcija. Sastoji se iz oko 500 miliona neurona. Zbog svoje veličine, složenosti i određene strukturne sličnosti često se naziva drugim mozgom. On kontroliše pokretljivost i sekreciju gastrointestinalnog trakta. Čine ga dva spleta-spoljni splet koji se naziva

mijenterički (Auerbahov) pleksus i leži između longitudinalnog i cirkularnog mišićnog sloja i unutrašnji splet koji se naziva submukozni (Majsnerov) pleksus koji leži u submukozi. Mijenterički pleksus uglavnom kontroliše pokretljivost, a submukozni gastrointestinalnu sekreciju i prokrvljenost.

Enterički nervni sistem može funkcionisati sam za sebe, nezavisno od spoljnih nerava, mada stimulacija autonomnog nervnog sistema može dovesti do naknadne aktivacije ili inhibicije gastrointestinalnih funkcija.

Senzorna nervna vlakna koja polaze od gastrointestinalnog epitela kao aferentna vlakna idu do oba pleksusa enteričkog nervnog sistema i do prevertebralnih ganglija simpatičkog nervnog sistema. Neka vlakna simpatičkim nervima idu do kičmene moždine dok druga vagusom idu do moždanog stabla. Ovi senzorni nervi izazivaju lokalne reflekse u samom crevu i reflekse koji se vraćaju do creva ili iz prevertebralnih ganglija ili iz CNS-a.

Mijenterički nervni pleksus se uglavnom sastoji iz velikog broja interneurona koji su lančano povezani i paralelno su postavljeni u zidu creva. Oni su svojim bočnim vlaknima međusobno povezani, ali povezani su i sa submukoznim pleksusom. Kada je ovaj pleksus stimulisan izaziva porast tonusa muskulature creva, porast intenziteta i učestalosti ritmičkih kontrakcija, brže kretanje peristaltičkih talasa. Međutim, ovaj pleksus nije isključivo ekscitatorni jer postoje inhibitorni neuroni koji sekretuju peptide. Ovi inhibitorni signali su korisni za inhibiciju muskulature nekih kontrahovanih intestinalnih sfinktera koji regulišu prolazak hrane između susednih segmenata gastrointestinalnog trakta (pilorusni sfinkter, sfinkter ileocekalne valvule).

Submukozni pleksus je odgovoran za kontrolu funkcija unutar zida malih segmenata creva kao što su lokalna intestinalna sekrecija, lokalna apsorpcija i lokalne kontrakcije submukoznih mišića.

Intersticijske Kahalove ćelije (ICC) su vrsta intersticijskih ćelija. Stvaraju bioelektrične spore talase koji se šire do glatkih mišićnih ćelija, tako da nastala depolarizacija inicira ulazak jona kalcijuma i kontrakciju. Zato se smatraju pejsmejkerskim ćelijama u gastrointestinalnom traktu (Sanders, 2006).

Opisano je više morfoloških vrsta ICC na osnovu njihove lokalizacije (Hanani i sar, 2005; Komuro, 2006). Oko mijenteričkog pleksusa su lokalizovane mijenteričke intersticijske

Kahalove ćelije (ICC-MY ili ICC-MP) i intersticijske Kahalove ćelije Auerbahovog pleksusa (ICC-AP). To su multipolarne ćelije koje formiraju mrežu oko mijenteričnog pleksusa u prostoru između kružnih i uzdužnih slojeva mišića. Intramuskularne intersticijske Kahalove ćelije (ICC-IM) su lokalizovane u kružnom (ICC-CM) i uzdužnom (ICC-LM) mišićnom sloju. Opisane su i intersticijske Kahalove ćelije lokalizovane u dubokom mišićnom pleksusu (ICC-DMP), intersticijske Kahalove ćelije lokalizovane u submukozi i submukoznom pleksusu (ICC-SMP), kao i intersticijske Kahalove ćelije lokalizovane u subserozi (Al-Shboul, 2013).

U tankom crevu, ICC-MY su organizovane u snopove od po najviše pet ćelija (Rumessen i sar, 1993). U tesnoj su vezi sa mijenteričkim pleksusom i imaju receptore za različite neurotransmitere i cirkulišuće hormone (Vannucchi i sar, 1997; Patterson i sar, 2001). Ove ćelije su mnogo brojnije u ileumu nego u ostalim delovima tankog creva (Rømer i Mikkelsen, 1998; Wang i sar, 2003). ICC-DMP su povezane specijalnim vezama sa holinergičkim i nitrergičkim nervima, a poroznim vezama sa glatkim mišićima što im omogućava da prenose informacije od nerava do mišića (Vanderwinden, 1999).

Autonomni nervni sistem kontroliše funkciju intestinalnog trakta. Kranijalni deo parasimpatičkog sistema potiče od vagusa i obilno inerviše jednjak, želudac i pankres, a slabije usnu duplju, faringealnu regiju, tanko crevo i prvu polovinu debelog creva. Sakralni deo parasimpatičkog sistema potiče iz II, III i IV sakralnog segmenta kičmene moždine i pelvičkim nervima dolazi do distalne polovine debelog creva. Postganglijski neuroni parasimpatičkog sistema su smešteni u mijenteričkom i submukoznom pleksusu. Stimulacija parasimpatičkih nerava izaziva porast aktivnosti celog enteričkog nervnog sistema, a samim tim i stimulaciju pojedinih gastrointestinalnih funkcija (ne svih, jer su neki enterički neuroni inhibitorni).

Simpatička vlakna gastrointestinalnog trakta potiču iz Th5-L2 segmenata kičmene moždine. Najveći deo preganglijskih vlakana po izlasku iz kičmene moždine ulaze u simpatički lanac, pa u periferne ganglije, celijačni ganglion i različite mezenterične ganglije, gde su smeštena tela većine postganglijskih neurona. Postganglijska vlakna se šire duž krvnih sudova, do svih delova creva i završavaju se na neuronima enteričkog nervnog sistema. Simpatikus, za razliku od parasimpatikusa, ravnomerno inerviše sve delove gastrointestinalnog trakta. Stimulacija simpatičkog nervnog sistema inhibiše aktivnost gastrointestinalnog trakta direktnim dejstvom noradrenalina koji relaksira glatku muskulaturu i neurone enteričkog nervnog sistema.

Aferentna nervna vlakna iz creva se završavaju u enteričkom nervnom sistemu. Pored njih, grupa vlakana koja potiče iz neurona smeštenih u enteričkom nervnom sistemu pruža se kroz autonomne nerve koji se završavaju u prevertebralnim simpatičkim ganglijama (celijačni, mezenterični i hipogastrični ganglion). Drugi tip vlakana potiče iz dorzalnih korenova kičmene moždine ili iz kranijalnih jedara, direktno provode signale iz creva u kičmenu moždinu ili moždano stablo prolazeći zajedno sa simpatičkim ili parasimpatičkim nervnim vlaknima.

Anatomska organizacija enteričkog nervnog sistema i njegove veze sa vegetativnim nervnim sistemom, omogućavaju 3 tipa gastrointestinalnih refleksa:

1. Refleksi koji se u potpunosti odvijaju u enteričkom nervnom sistemu (refleksi koji kontrolišu gastrointestinalnu peristaltiku, sekreciju, lokalne inhibitorne efekte, i dr.).

2. Refleksi koji idu od creva do paravertebralnih simpatičkih ganglija i zatim se vraćaju do gastrointestinalnog trakta (gastrokolični refleks, enterogastrični refleksi, kolonoilealni refleks).

3. Refleksi koji idu od creva do kičmene moždine ili moždanog stabla a zatim se vraćaju u gastrointestinalni trakt (refleksi želuca i duodenuma, refleks defekacije, bolni refleksi koji inhibišu celi gastrointestinalni trakt) (Furness, 2006).

U poslednje tri decenije otkriveno je više od 40 peptida u digestivnom traktu, u različitim tipovima ćelija i one su svrstane u difuzni neuroendokrini sistem.

Difuzni neuroendokrini sistem (DNES) obuhvata endokrine ćelije raspoređene pojedinačno ili u grupama i peptidergične i aminergične neurone i/ili vlakna, u epitelnom i vezivnom tkivu mnogih organa. Komponente DNES stvaraju peptidne hormone (regulatorne peptide) i biogene amine, koji endokrinim, neuroendokrinim, parakrinim, autokrinim, jukstakrinim, neurotransmitterskim, neuromodulatornim i egzokrinim dejstvom utiču na brojne funkcije u organizmu.

Najvažniji peptidi čija je endokrina uloga nesumnjivo dokazana su: gastrin, sekretin, holecistokinin, gastrični inhibitorni polipeptid (GIP), somatostatin, motilin i glukagonu-sličan peptid (GLP). Drugi važni gastrointestinalni hormoni koji su takođe i neurotransmiteri: neurotenzin, peptid YY, enteroglukagon i glukagonu-sličan peptid 2 su peptidi koje sekretuju tipične endokrine ćelije.

U enteričkom nervnom sistemu su i sledeći neuropeptidi: holecistokinin, neuropeptid Y, neurotenzin, peptid YY, somatostatin, supstanca P, vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP).

S obzirom da je više od 40 peptida indentifikovano u gastrointestinalnom traktu, on predstavlja najveći endokrini organ našeg organizma. Veliki napredak u upoznavanju njihove uloge načinjen je u poslednjoj deceniji.

Neurotransmiteri koji se najčešće javljaju u neuronima enteričkog nervnog sistema su acetilholin i noradrenalin.

2.4.1. Acetilholin

Acetilholin se sintetiše u holinergičkim neuronima i glavni je regulator motiliteta gastrointestinalnog trakta i pankreasne sekrecije. Acetilholin se skladišti u nervnim završecima i oslobađa se pri depolarizaciji nerava. Oslobođeni acetilholin se vezuje za postsinaptičke muskarinske i/ili nikotinske receptore.

Nikotinski acetilholinski receptori pripadaju porodici ligand-zavisnih jonskih kanala i sastoje se iz α , β , γ , δ i ϵ subjedinica. Veruje se da je α subjedinica medijator postsinaptičke membranske depolarizacije nastale usled vezivanja acetilholina za receptor.

Nikotinski receptori su tipični predstavnici jonskih kanala koje otvara ligand (LGIC). Sastoje se iz ukupno 5 subjedinica, a oligomerna struktura (2α , β , γ , δ) poseduje dva mesta za vezivanje acetilholina. Da bi se receptor aktivirao potrebno je da se za njega vežu 2 molekula acetilholina. Kod kičmenjaka postoje dva glavna tipa nAChR: neuro-mišićni i neuronski tip. Neuronski tip nikotinskog receptora nalazi se u CNS-u i svim autonomnim ganglijama. Neuro-mišićni tip receptora je lokalizovan na neuro-mišićnim sinapsama skeletne muskulature i stimulacija ovih receptora dovodi do mišićne kontrakcije. Na postsinaptičkoj mišićnoj membrani identifikovana su tri subtipa nAChR: fetalni mišićni – $\alpha 1\beta 1\delta\gamma$, adultni mišićni – $\alpha 1\beta 1\delta\epsilon$ i neuronski – $\alpha 7$ subtip nAChR (Trailović i sar, 2011). Kod kičmenjaka postoji najmanje 12 α -subjedinica i 3 β -subjedinice, ali samo ograničeni broj njih gradi funkcionalne receptore. Samo subjedinice od $\alpha 7$ do $\alpha 12$ čine homomerni kanal (bez kombinacije sa β -subjedinicama). Različiti homomerni i heteromerni receptori imaju različite farmakološke karakteristike (Robertson i sar, 2007b). Pored klasičnog mišićnog tipa nAChR koji sadrži $\alpha 1$ subjedinicu, neuromišićna sinapsa sadrži i presinaptički $\alpha 2\beta 3$ neuronski tip nAChR. Ovaj tip receptora je odgovoran za pojačano oslobađanje ACh (autoreceptori). To znači da ACh aktivacijom ovih autoreceptora može pojačati

svoje sopstveno oslobađanje (presinaptička modulacija). Nasuprot tome, odsustvo ovog efekta tokom neuro-mišićne blokade (pojava se označava se kao tetanično slabljenje-„tetanic fade“), smatra se da nastaje kao posledica inhibicije navedenog presinaptičkog autoreceptora na nervnom završetku (Trailović i sar., 2011). Acetilholin na nivou neuro-mišićne sinapse deluje tako što aktivira nikotinski receptor. Značajno je da koncentracija ACh koja se oslobađa na neuro-mišićnim sinapsama vertebrata, može da dostigne koncentraciju i do 5mM (PuttACharya i sar, 2013). Aktivacija nikotinskog receptora ima za posledicu otvaranje natrijumovih jonskih kanala i nastanak brze depolarizacije, koja inicira generisanje akcionog potencijala u mišićnom vlaknu. U prisustvu funkcionalne acetilholinesteraze, u intaktnoj neuro-mišićnoj sinapsi, bilo koji molekul acetilholina uspe da aktivira najviše jedan nikotinski receptor, pre nego što biva razgrađen. Funkcija ovog enzima je upravo da ograniči koncentraciju acetilholina u sinaptičkoj pukotini i vreme prisustva acetilholina na postsinaptičkoj mišićnoj membrani, i tako spreči produženo delovanje neurotransmitera na nikotinskim receptorima. Ova ograničavajuća dejstva acetilholinesteraze su veoma važna, jer pod određenim uslovima i sam acetilholin može da izazove nervno-mišićnu blokadu. Do ove pojave dolazi kada je acetilholin prisutan u dovoljno visokoj koncentraciji (ACh aplikovan u višim koncentracijama od fizioloških, inhibicija acetilholinesteraze). Pojava koja se u ovim uslovima javlja naziva se “blokada depolarizacijom” i do nje dolazi usled produžene depolarizacije postsinaptičke mišićne membrane (Bowman, 2006; Rang i sar, 2012).

Muskarinski receptori pripadaju grupi receptora vezanih za G-protein, a ova grupa se nazivaju još i metabotropni receptori. G-protein vezani receptori predstavljaju monomere koji se sastoje od 7 transmembranskih segmenata. Jedna od intracelularnih petlji, veća je nego ostale i stupa u interakciju sa G-proteinom. Ovaj protein je membranski protein, koji se sastoji od 3 subjedinice (α , β , γ), pri čemu α -subjedinice poseduju aktivnost GTP-aze. Kada se agonist veže za muskarinski receptor, dolazi do konformacijskih promena, uključujući i citoplazmatski deo receptora. To za posledicu ima oslobađanje α -subjedinice od $\beta\gamma$ -subjedinice. Ovo je “aktivna forma” G-proteina koji difunduje u membranu i može da se udruži sa različitim enzimima i jonskim kanalima, prouzrokujući aktivaciju ili inaktivaciju. Do sada je otkriveno 5 različitih tipova muskarinskih receptora. Pri tome su tri tipa (M1 – “nervni”; M2 – “srčani”; M3 –

“glatkomišićni i žlezdani”) dobro ispitani i opisani. Za tipove M4 i M5 zna se da su lokalizovani u CNS-u, ali njihova uloga nije u potpunosti objašnjena. Aktivacija članova neparne grupe (M1, M3, M5) muskarinskih receptora dovodi do stimulacije inozitol-fosfatnog puta (IP3 put), dok aktivacija muskarinskih receptora parne grupe (M2, M4) ima za posledicu inhibiciju enzima adenil-ciklaze i smanjenje intraćelijske koncentracije cAMP (Rang i sar, 2012).

2.4.2. Noradrenalin

Sintetiše se iz tirozina i oslobađa iz postganglijskih simpatičkih nervnih završetaka. Nakon adekvatnog stimulusa iz nervnih završetaka oslobađaju se sekretorne granule koje sadrže noradrenalin i vezuju se za adrenergičke receptore.

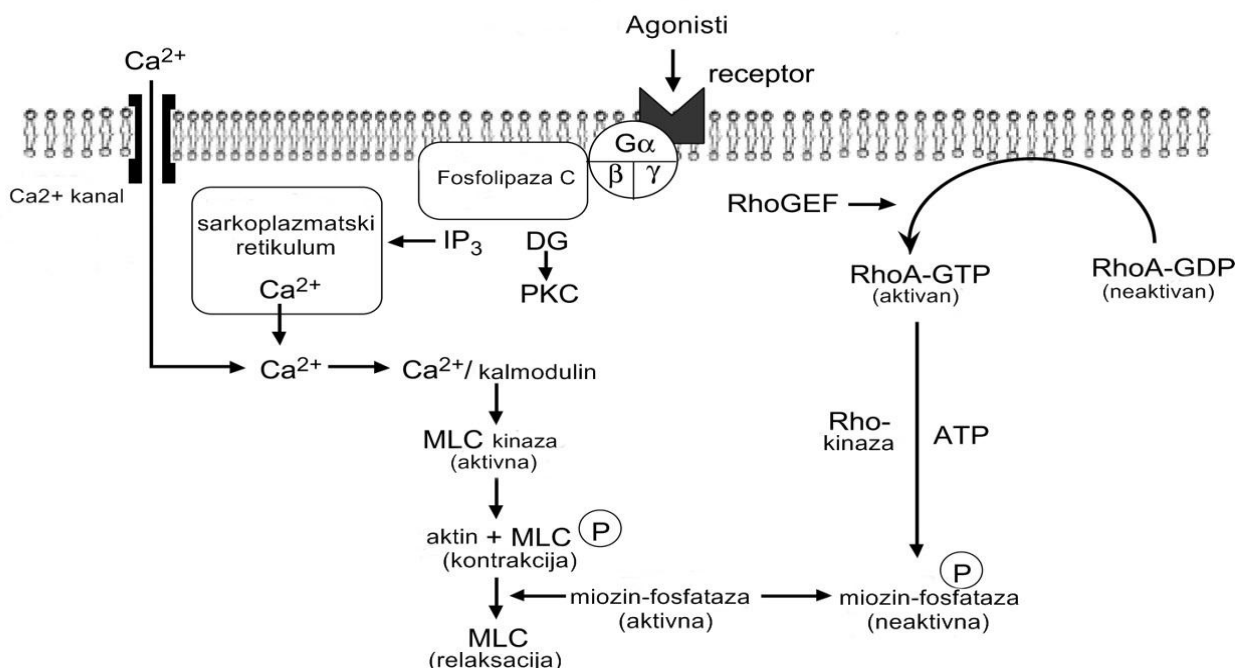
Postoje 2 tipa ovih receptora (α i β) i pripadaju familiji G protein vezujućih receptora (GPCR) koje aktiviraju kateholamini, posebno noradrenalin i adrenalin. Alfa-adrenergički receptori se najčešće klasifikuju u $\alpha 1A$, $\alpha 2A$, $\alpha 1B$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\alpha 2D$. Beta-adrenergički receptori se klasifikuju u $\beta 1$, $\beta 2$ i $\beta 3$ podtipove. Svoju ulogu ostvaruju preko stimulacije ili inhibicije adenil-ciklaze.

2.4.3. Glatki mišići gastrointestinalnog i respiratornog sistema

Glatki mišići su raspoređeni po celom telu kao pojedinačna mišićna vlakna (u jetri, slezini, plućima i dr.) ili kao kompaktni sloj koji čini zidove unutrašnjih šupljina-organa u digestivnom traktu, mokraćnoj bešici, krvnim sudovima i dr. Kada se kontrahuju, glatko-mišićne ćelije se skraćuju. Na taj način se menja dijametar cevastih organa i krvnih sudova i kontroliše se protok i kretanje sadržaja kroz njih. Inervisani su od strane autonomnog nervnog sistema, a pored toga, na njihovu kontraktilnost utiču hormoni, parakrini i autokrini agensi i drugi lokalni hemijski signali.

Glatki mišići su građeni od aktinskih i miozinskih filamenata, ali oni nemaju pravilan raspored kao u skeletnim mišićima. Aktinski filamenti se sastoje iz aktinskih i tropomiozinskih molekula bez troponina. Pričvršćeni u za gusta tela, a između njih su miozinski filamenti.

Susedne ćelije su povezane poroznim vezama koje omogućavaju lako širenje akcionih potencijala sa jedne ćelije na drugu.



Slika 2.2 Mehanizam kontrakcije glatkih mišića

Kao odgovor na specifične stimulse dolazi do porasta intraćelijske koncentracije slobodnog kalcijuma (Ca^{2+}). Porast koncentracije slobodnog kalcijuma je sekundarne prirode i nastaje kao posledica aktivacije fosfolipaze C i inozitol trifosfata (IP_3) što rezultira oslobađanjem kalcijuma iz intraćelijskih depoa kao što je sarkoplazmatski retikulum i/ili dolazi do otvaranja kalcijumskih kanala koji se nalaze u membrani glatke mišićne ćelije, što dovodi do ulaska kalcijuma iz ekstraćelijskog prostora.

Glavni put ulaska ekstraćelijskog kalcijuma je kroz voltažno-zavisne Ca^{2+} kanale što dovodi do brzog porasta koncentracije intraćelijskog kalcijuma (Slika 2.2). Klasifikacija Ca^{2+} kanala uključuje šest tipova (L, T, N, P, Q i R). L- i T-tipovi Ca^{2+} kanala su najznačajniji, dok P, Q i R-tipovi ovih kanala nisu pronađeni u glatko-mišićnim ćelijama gastrointestinalnog trakta (Farrugia, 1999).

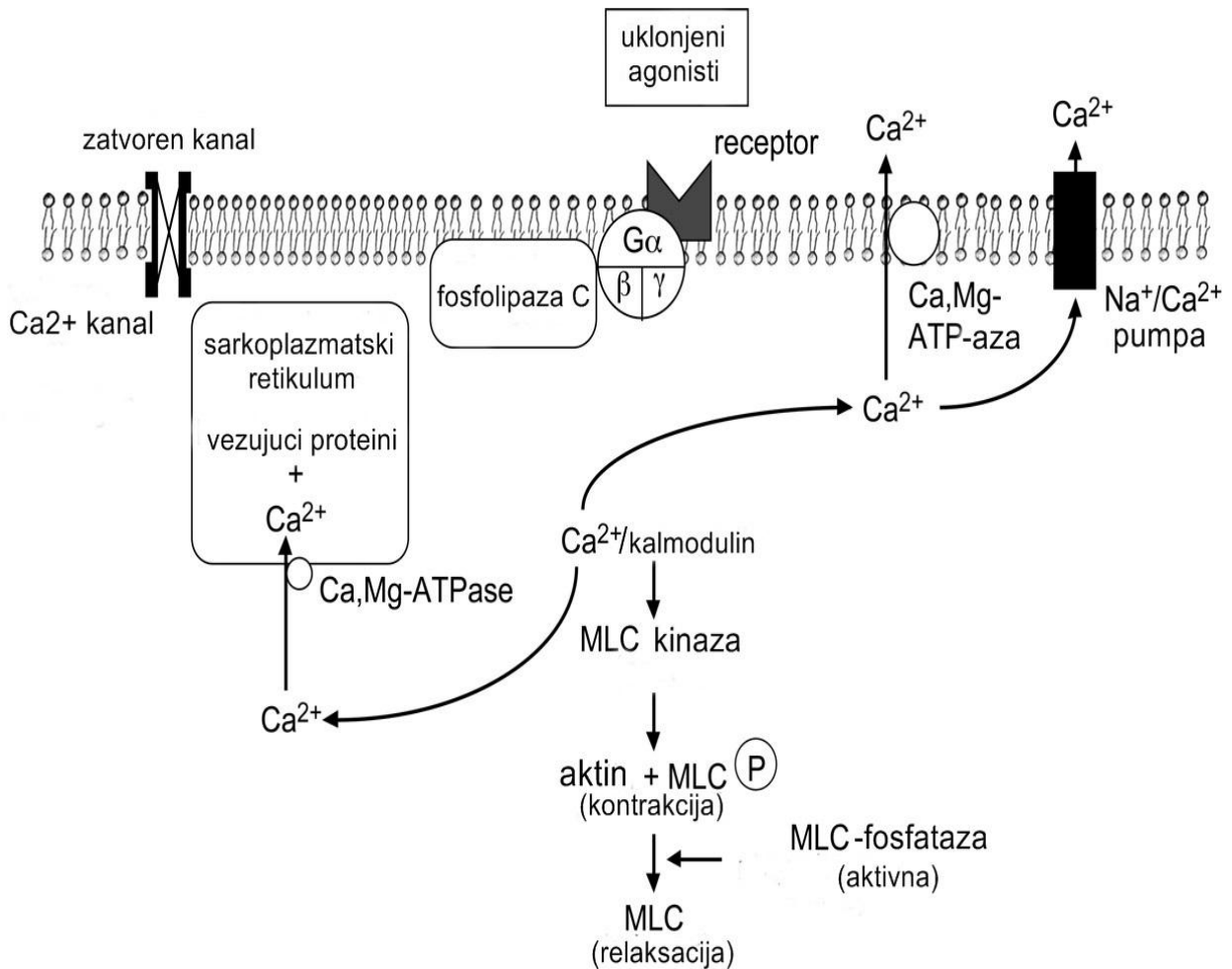
L-tip Ca^{2+} kanala je neophodan za ulazak kalcijuma u glatkomišićne ćelije i njihovu kontrakciju, zato i ne iznenađuje njihova velika zastupljenost u svim delovima gastrointestinalnog trakta. Ovaj tip kanala se sastoji iz 5 subjedinica ($\alpha 1$, $\alpha 2$, β , δ i γ). $\alpha 1$ je najbitnija transmembranska komponenta ovog tipa Ca^{2+} kanala. L-tip Ca^{2+} kanala ima visok prag aktivacije i sporo se inaktivira. Aktivacija L- Ca^{2+} kanala ne zavisi od cAMP (kao u srcu), već od inozitol-trifosfata (IP3). Ovi kanali ne predstavljaju samo glavni put za ulazak ekstraćelijskog kalcijuma već i aktiviraju Ca^{2+} -zavisne- K^+ kanale što dovodi do hiperpolarizacije membrane. Zajednička farmakološka karakteristika L- kanala je da su svi osetljivi na derivate 1,4-DHP (1,4-dihidropiridin) koji blokiraju kanal, ali i na jedinjenja koja aktiviraju kanal (BayK 8644). Blokada ovih kanala dovodi do prestanka ili do značajnog smanjenja aktivnosti glatkih mišića u crevima (Farrugia, 1999).

T-tip Ca^{2+} kanala ima nizak prag aktivacije i brzo se inaktivira. Opisani su u glatkomišićnim ćelijama gastrointestinalnog trakta zamoraca i pacova (Farrugia, 1999).

U glatkim mišićima creva su detektovani Ca^{2+} -zavisni K^+ kanali za čije otvaranje je pored depolarizacije neophodno i povećanje koncentracije intraćelijskog kalcijuma (Gojković-Bukarica i sar, 2004; Ascroft, 2000). Postoje tri podtipa ovih kanala koji se razlikuju prema kinetici, provodljivosti i farmakološkim osobinama: kanali sa malom, intermedijernom i velikom provodljivošću. Kalijumski kanali sa malom provodljivošću (SKCa) su najzastupljeniji u glatkim mišićima creva i mogu se aktivirati samo porastom koncentracije intraćelijskog kalcijuma, što se javlja u vreme kada je membranski potencijal blizak potencijalu mirovanja. Ovi kanali imaju važnu ulogu u regulisanju frekvencije akcionog potencijala. Kanali sa velikom provodljivošću (BKCa) su uključeni u hiperpolarizaciju i doprinose repolarizaciji. Njihova fiziološka uloga je vezana za kontrakciju glatkih mišića, oslobađanje neurotransmitera i nervnu ekscitabilnost. Za vreme membranskog potencijala ovi kanali su zatvoreni, ali ih može aktivirati porast intraćelijskog kalcijuma (Ivković, 2013).

Nastanak akcionog potencijala u gastrointestinalnim glatko-mišićnim ćelijama je vezan za ulazak kalcijumovih jona, te zato Na^+ kanali nisu neophodni za njegovo generisanje. Dugo se mislilo da ovi kanali nisu prisutni u gastrointestinalnim miocitima, međutim, postoje istraživanja koja ukazuju na njihovo prisustvo i na njihovu ulogu u regulaciji membranskog potencijala (Holm i sar, 2000; Strege i sar, 2003; Ou i sar, 2002; Strege i sar, 2003, Lyford i Farrugia, 2003).

Nakon povećanja intraćelijske koncentracije kalcijuma dolazi do njegovog vezivanja za kalmodulin (kalcijum vezujući protein). Miozin glatkih mišića sadrži 4 laka lanca. Da bi započeo ciklus poprečnih mostova laki lanci treba da se fosforilišu, a enzim koji ih fosforiliše je miozin-kinaza lakih lanaca (MKLL), a nju aktivira kompleks kalcijum-kalmodulin i tako započinje ciklus poprečnih mostova (Berridge, 1993; Himpens i sar, 1995). Aktinske niti klize između miozinskih i mišić se skraćuje. Energija za ovaj ciklus se dobija iz ATP-a aktivnošću enzima miozin-ATP-aze. Ciklus poprečnih mostova traje sve dok je kalcijum prisutan u dovoljnoj koncentraciji u sarkoplazmi, te je tonus glatkih mišića uglavnom određen koncentracijom kalcijuma u sarkoplazmi. U nekim glatkim mišićima fosforilacija lakih lanaca miozina se održava na niskom nivou usled odsustva spoljnih stimulus.



Slika 2.3. Mehanizam relaksacije glatkih mišića

Relaksacija glatkih mišića nastaje kao rezultat prestanka delovanja stimulusa ili direktnim delovanjem supstance koja inhibiše kontraktilni mehanizam. Da bi došlo do relaksacije treba da se smanji intraćelijska koncentracija kalcijuma ili da se poveća aktivnost enzima miozin-fosfataze, koji uklanja visokoenergetski fosfat iz lakih lanaca miozina, što dovodi do usporavanja ili zaustavljanja ciklusa poprečnih mostova (relaksacija). Membrana glatko-mišićne ćelije i sarkoplazmatskog retikuluma sadrži Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP-azu koja uklanja kalcijum iz citozola (Slika 2.3). Na citoplazmi glatkomišićne ćelije je prisutna i $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ pumpa koja pomaže u smanjenu intraćelijske koncentracije kalcijuma. Tokom relaksacije su inaktivni membranski receptori i Ca^{2+} -zavisni voltažni kanali su zatvoreni što onemogućava ulazak vanćelijskog kalcijuma u ćeliju.

Međutim, održavanje kontrakcije i pored vraćanja intraćelijske koncentracije kalcijuma na bazalni nivo omogućava aktiviranje kalcijum senzitivnog mehanizma. Ovaj mehanizam uključuje aktivaciju RhoA, malog GTP-vezujućeg proteina iz porodice Rho, koji stimuliše aktivnost RhoA-kinaze koja fosforiliše i time infibiše miozin fosfatazu. Tako se održava kontrakcija jer laki lanac miozina ne može da se fosforiliše (Somlyo i Somlyo, 2000; Webb, 2003).

Autonomni nervni sistem, osim kontraktilnosti glatke muskulature gastrointestinalnog trakta, reguliše i funkciju muskulature respiratornog sistema. Dušnik (trachea) je cevast organ, koji pripada donjim disajnim putevima. Nadovezuje se na donji deo (prstenastu hrskavicu) grkljana, a završava se dušničkom račvom kojom je podeljen na levi i desni primarni bronh (glavne dušnice).

Vagus svojim parasimpatičkim granama inerviše dušnik, dok simpatička inervacija potiče iz donjeg vratnog i gornjeg grudnog gangliona. Pod dejstvom simpatikusa dolazi do opuštanja mišića i proširenja dušnika (bronhodilatacija), dok se kod stimulacije parasimpatikusa javlja povećanje tonusa glatkih mišića i sužavanje ovog organa (bronhokonstrikcija).

Bronhokonstrikcija se definiše kao sužavanje vazdušnih puteva pluća (bronhija i bronhiola). Protok vazduha u vazdušnim putevima mogu da ograniče tri faktora: spazam glatkih mišića u bronhijama i bronhiolama, inflamacija vazdušnih puteva, povećana produkcija sluzi usled alergijske reakcije ili iritacije. Bronhokonstrikcija se inicira aktivacijom parasimpatičkog

nervnog sistema. Postganglijska parasimpatička vlakna otpuštaju acetilholin pored glatkog mišićnog sloja koji okružuje bronhije (Risesen-ov mišić). Čelije glatkih mišića na svojoj membrani imaju M3 tip muskarinskih receptora. Aktivacija tih receptora acetilholinom aktivira intraćelijski Gq protein, koji zatim aktivira fosforilaza-C (PFC) put, što se završava povišenjem nivoa intracelularnog kalcijuma, pa dolazi do kontrakcije glatkih mišića. Mišićne kontrakcije uzrokuju smanjenje dijametara bronhija, čime se povećava njihov otpor.

2.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST

Slobodni radikali su hemijske vrste koje poseduju jedan (ili više) nesparenih elektrona i zbog toga su veoma reaktivni i neselektivni. Mogu biti elektroneutralni, ali i pozitivno ili negativno naelektrisani (radikal katjoni i radikal anjoni). Slobodni radikali nastaju oksidoredukcionim procesima ili homolitičkim raskidanjem postojeće hemijske veze (termolizom, fotolizom, zračenjem visoke energije).

Različiti procesi u spoljašnjoj sredini (jonizujuće, ultraljubičasto i toplotno zračenje, biohemija azotovih oksida i dr.) i procesi u samoj ćeliji dovode do stvaranja slobodnih radikala u živoj ćeliji. To su najčešće oksidativna fosforilacija (u mitohondrijama), oksidativna hidrosilacija (u mikrozomima), fagocitoza, katalitičke reakcije nekih enzima (oksidaza), procesi lipidne peroksidacije i dr (Koraćević i sar, 2003).

Slobodni radikali kao izuzetno reaktivne hemijske vrste dovode do oksidativnog oštećenja ćelijskih struktura velikim brojem mehanizama kao, što su peroksidacija polinezasićenih masnih kiselina koja je praćena poremećajem propustljivosti membrana; oksidacija tiolnih grupa enzima što dovodi do njihove inaktivacije; oksidativno cepanje molekula nukleinskih kiselina što dovodi do mutacija i kancerogeneze, i dr. Svaki tip molekula može biti oštećen ovim procesom što može imati mnoge negativne posledice. Lipidna peroksidacija je najizrazitiji negativni fenomen u delovanju slobodnih radikala i predstavlja autokatalitički i uglavnom ireverzibilan proces. Lipidnu peroksidaciju može pokrenuti bilo koji oksidans sposoban da oduzme atom vodonika koji se nalazi u α -položaju od mesta dvostruke veze u molekulu masne kiseline iz lipidne membrane. Od svih kiseoničnih radikala, najveći oksidacioni

potencijal ima hidroksil-radikal pa je on najčešće odgovoran za pokretanje ovog procesa (Lobo i sar, 2010). Druga faza ovog procesa predstavlja razgradnju nestabilnih primarnih produkata pri čemu se dobijaju brojni sekundarni produkti: kratkolančani ugljovodonici, aldehidi i ketoni, kao i krajnji produkt lipidne peroksidacije – malonil-dialdehid (MDA). Pored brojnih sekundarnih produkata stvaraju se i novi radikali koji stvaraju uslove da se lipidna peroksidacija lančano ponavlja. Reaktivni sekundarni produkti, posebno MDA, reaguju sa slobodnim -SH i -NH₂ grupama aminokiselina, proteina, peptida, nukleotida i fosfolipida, modifikujući ove makromolekule, a rezultat je gubitak njihove funkcije (Nielsen i sar, 1997).

Antioksidanti su supstance koje, prisutne u malim količinama u odnosu na supstrat koji je podložan oksidaciji (lipidi, proteini, ugljeni hidrati, DNK), inhibiraju ili potpuno sprečavaju njihovu oksidaciju. Delovanje antioksidanata zasniva se na njihovoj sposobnosti da: deluju kao "skevindžeri" (hvatači) slobodnih radikala, tj. donori elektrona ili H-atoma, heliraju ili vezuju jone metala, sprečavajući njihovu katalitičku funkciju u procesima, razgrađuju hidro-perokside lipida, transformišuci ih u neradikalske vrste, inhibiraju neke enzime, pokazuju sinergističke efekte, redukuju određena jedinjenja i dr (Aruoma, 1996). Istraživanja pokazuju da što su antioksidansi zastupljeniji u ishrani to je manja učestalost bolesti u ispitivanoj populaciji (Krishnaiah i sar. 2011). Dokazana je i veza između reaktivnih kiseoničnih vrsta i raznih degenerativnih bolesti kao što su: kardiovaskularne bolesti, dijabetes, kancer, artritis, Alchajmerova i Parkinsonova bolest (Aruoma, 2003). U brojnim studijama je potvrđeno blagotvorno delovanje prirodnih antioksidanasa (Denisov i Afanasev, 2005).

Utvrđeno je da fenolna jedinjenja iz biljaka imaju antioksidativna dejstva, tj. da sprečavaju oksidaciju lipida (Xu, 2012). Ova jedinjenja mogu biti lipofilnog karaktera (vitamin E) zastupljena u žitaricama, soji, orašastim plodovima i hidrofilnog karaktera (kvercetin) prisutna u začinskom bilju, voću i povrću (Xu, 2012). Antioksidativno dejstvo morača, jedna od funkcija kojom ova biljka ispoljava svoju biološku aktivnost, objašnjava se prisustvom fenola i flavonoida (Oktay i sar, 2003).

Postoje različite metode kojima se može utvrditi antioksidativni potencijal hrane i bioloških sistema (Prior i Cao, 1999; Huang i sar, 2005; Besco i sar, 2007). Mogu se podeliti u dve grupe: u prvoj grupi su metode koje mere sposobnost hvatanja slobodnih radikala, a u drugoj grupi su metode koje procenjuju sposobnost zaštite od lipidne peroksidacije. Određivanje i

ispitivanje antioksidativne aktivnosti je veoma složeni proces jer zavisi od mnogo faktora koji se mogu menjati, kao što su različite metode, vrsta radikala koja se koristi, supstrat koji se oksiduje, i dr (Miguel, 2010).

2.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST

Mikroorganizmi kontaminiraju hranu koju čovek koristi i tako predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje. Upotreba konzervanasa sprečava razvoj bakterija i na taj način se obezbeđuje bezbednost hrane. Međutim, u današnje vreme se dosta zna o štetnim svojstvima sintetskih konzervanasa i izbegava se hrana u kojoj se nalaze (Wu i sar, 2008). Etarska ulja i ekstrakti biljaka iz kojih su izolovana jedinjenja sa antimikrobnom aktivnošću (fenolna jedinjenja) sve češće se koriste kao zamena za veštačke konzervanse (Conner, 1993).

Najčešći uzročnici kontaminacije hrane i vode su bakterije koje se, kada dospeju u organizam, razmnožavaju i izazivaju infekcije gastrointestinalnog sistema ili produkuju toksine i dovode do alimentarnih intoksikacija.

2.6.1. Gram-negativne bakterije

2.6.1.1. Rod *Escherichia*

Ove bakterije su štapićastog oblika, nalaze se pojedinačno ili u parovima, mogu biti pokretne i nepokretne. Aerobi su i fakultativni anaerobi. Imaju veliku sposobnost fermentisanja različitih šećera. Rod čine 5 vrsta: *E. coli*, *E. harmanii*, *E. fergusonii*, *E. vulneris* i *E. blattae* (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

E. coli je jako otporna i na niske i na visoke temperature. Osetljiva je na hlor i hlorna jedinjenja. Produkuje više toksina: endotoksin, enterotoksin, alfa- i beta- hemolizine.

Ova bakterija je sastavni deo crevne mikroflore čoveka gde učestvuje u transformaciji belančevina i ugljenih hidrata, sintetiše vitamin B12 i antibiotik kolicin. Kada dođe do pada imunog sistema ili kada ova bakterija dospe u druge organske sisteme, izaziva crevne

poremećaje, urinarne infekcije, sepsu. Izvor ove bakterije su izmet i mokraća obolelih ljudi i životinja.

Antibiotici sulfinamidi, ampicilini, tetraciklini i cefalosporini se koriste u terapiji infekcija izazvanih *E. coli*.

Zavisno od vrste *E. coli* koja je uzrokovala infekciju i toksina koje produkuje postoji 5 vrsta intestinalnih infekcija:

- Enterotoksigena *E. coli* (ETEC)-izaziva infekciju indirektno (preko kontaminirane hrane) i direktno (preko obolele osobe). Oštećenje sluzokože tankog creva postiže stvaranjem 2 vrste toksina: ST-toksina i LT-toksina.
- Enterohemoragična *E. coli* (EHEC), produkuje egzotoksine kojima oštećuje sluzokožu debelog creva i izaziva različite oblike krvavih dijareja.
- Enteropatogena *E. coli* (EPEC), napada sluzokožu tankog creva uništavajući mikrovile ćelija. Uzročnik je dijareja kod dece.
- Enteroinvazivne *E. coli* (EIEC) su uzročnici oboljenja sličnog dizenteriji.
- Enteroagregativne *E. coli* (EAEC) su uzročnici akutnih i hroničnih dijareja koje dugo traju. Produkuju hemolizine, toksin sličan ST-toksinu (Mihailov-Krstev, 2009).
-

2.6.1.2. Rod *Pseudomonas*

Ovaj rod karakterišu pravi ili zakrivljeni štapići sa jednom ili nekoliko flagela. Aerobi su, široko rasprostranjeni u prirodi. Neke vrste su patogene za čoveka (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology).

Najčešći uzročnik infekcija je *Pseudomonas aeruginosa*. Otporan je na visoke temperature, široko je rasprostranjen u vodi, zemlji i hrani. Toksičan je usled produkcije egzotoksina, endotoksina, enzima i hemolizina. Izaziva meningitis, infekcije pluća, oka, urinarnog i gastrointestinalnog trakta.

Otporna je na peniciline i β -laktame i vrlo brzo razvija rezistenciju, te se u terapiji primenjuje kombinovana, agresivna terapija aminoglikozidima i antipseudomonalnim β -laktamima i hinolonima (Strohl i sar, 2001).

2.6.1.3. Rod *Enterobacter*

Ovaj rod se sastoji iz 4 vrste bakterija: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. georgoviae* i *E. sakazaki*. Imaju peritrihijalno raspoređene flagele. Kapsulu sintetišu samo neki sojevi roda *Enterobacter*. Pripadaju grupi fakultativno anaerobnih bakterija i lako se kultiviraju *in vitro* (na jednostavnim hranljivim podlogama). Imaju somatski O - antigen i flagelarni H - antigen, a inkapsulirani sojevi K-antigen. Široko su rasprostranjeni u prirodi: u zemljištu, vodi i nekim namirnicama. Povremeno ili stalno kolonizuju digestivni trakt ljudi i životinja čineći deo fiziološke mikroflore.

Vrste iz roda *Enterobacter* izazivaju oportunističke infekcije u slučaju prolazne ili trajne imunodeficijencije domaćina, kolonizacije novih tkiva i porasta virulencije. Najčešće izazivaju infekcije urinarnog trakta, a nisu retke ni infekcije respiratornog sistema. Poslednjih godina vrste roda *Enterobacter* postaju sve značajniji uzročnici intrahospitalnih infekcija.

Bakterije roda *Enterobacter* najčešće se izoluju iz fecesa, urina, sputuma i brisa rane. Produkcija beta-laktamaza i razvoj nekih mehanizama za inaktivaciju antibiotika i hemioterapeutika ima za posledicu nastanak rezistencije kod određenog procenta roda *Enterobacter* (Strohl i sar, 2001).

2.6.1.4. Rod *Proteus*

Rodu *Proteus* pripadaju dve vrste: *Proteus mirabilis* i *Proteus vulgaris*. Obe vrste su štapićastog oblika. Imaju peritrihijalno raspoređene flagele i vrlo su pokretljive. Nemaju sposobnost sinteze kapsule. Rastu i razmnožavaju se i u aerobnim i u anaerobnim uslovima (fakultativni anaerobi). Njihove kulture imaju neprijatan miris na trulež.

Široko su rasprostranjeni u prirodi, prisutni su u zemljištu, vodi i namirnicama. Prilagođeni su i parazitskom načinu života. Tipični su predstavnici oportunističkih bakterija, počinju da se razmnožavaju kada padne imunitet organizma. Ulaze u sastav fiziološke mikroflore digestivnog trakta. *P. mirabilis* češće izaziva oboljenja ljudi nego *P. vulgaris*. Značajan medicinski problem predstavljaju proteusom izazvane urinarne infekcije, meningitisi i infekcije rana, a naročito intrahospitalne infekcije kao što su: infekcije mekih tkiva, pneumonija, absces pluća, septikemija i dr.

Iako je većina sojeva osjetljiva na ampicilin, cefalotin i aminoglikozidne antibiotike, nisu retki sojevi koji su rezistentni na veći broj antibiotika i/ili hemioterapeutika (Strohl i sar, 2001).

2.6.1.5. Rod *Klebsiella*

Ovom rodu pripadaju nepokretne, oksidaza negativne bakterije oblika štapa sa istaknutom kapsulom na bazi polisaharida. Nalaze se svuda u prirodi. One se mogu naći u vodi, zemljištu, biljkama, insektima, životinjama i ljudima. Ovom rodu pripadaju: *K. granulomatis*, *K. oxytoca*, *K. michiganensis*, *K. pneumoniae* (subsp. *ozaenae*, subsp. *pneumonia* i subsp. *rhinoscleromatis*), *K. quasipneumoniae* (subsp. *quasipneumoniae* i subsp. *similipneumoniae*) i *K. variicola*.

Ove bakterije se mogu naći pojedinačno, u parovima ili u kratkim lancima. Nemaju specifične zahteve rasta i dobro rastu na standardnom laboratorijskom mediju, ali najbolje uspevaju na temperaturi između 35 i 37° C i pri pH 7,2. Fakultativni su anaerobi. Članovi roda proizvode istaknutu kapsulu ili sluzavi sloj, koji se može koristiti za serološku identifikaciju.

Klebsiella pneumoniae subsp. *pneumonia* pripada grupi oportunističkih bakterija i izaziva oboljenja pretežno kod osoba sa smanjenom odbrambenom sposobnošću. Ima najveći medicinski značaj od svih *Klebsiella*. Kod dece i odraslih iznad 50 godina starosti izaziva teške infekcije respiratornog sistema. Iz respiratornih puteva infekcija može da se proširi na sluzokožu paranazalnih sinusa, a sve češće se opisuju i slučajevi meningitisa i septikemije. Kod dece izaziva enteritise i enterokolitise koji po težini kliničke slike podsećaju na dizenteriju. Takođe, izaziva i urinarne infekcije koje se odlikuju teškim lečenjem i čestim recidivima (Strohl i sar, 2001).

2.6.1.6. Rod *Morganella morganii*

Rod *Morganella* sadrži samo vrstu *M. morganii*. Bakterije ovog roda su oportunističke vrste koje u slučajevima pada imuniteta mogu izazvati različita oboljenja ljudi, a najčešće infekcije urinarnog trakta. Sposobnost izazivanja ovih infekcija je rezultat delovanja nekoliko faktora virulencije, među kojima je najvažniji enzim ureaza. Hidroliza uree na CO₂ i amonijak obezbeđuje bakteriji izvor azota, a alkalizacija urina deluje toksično na uroepitel i olakšava kristalizaciju soli i stvaranje kamena u mokraćnoj bešici i bubregu. Virulenciji doprinose i fimbrije omogućavajući vezivanje za epitel mokraćnih puteva, dok hemolizin, zajedno sa ureazom, igra važnu ulogu u prodiranju bakterije u unutrašnjost ćelije. Proteinaza je još jedan važan faktor virulencije koja razgrađujući imunoglobuline, smanjuje efikasnost odbrane inficiranog organizma. Ova bakterija je široko rasprostranjena u prirodi. Nalazi se u zemlji, otpadnim materijama i vodama, kao i u intestinalnom traktu ljudi i životinja. Njom izazvana oboljenja mogu biti endogena i egzogena. Najčešće se javljaju u bolničkim uslovima, a prenose se preko ruku osoblja, katetera i drugih instrumenata tokom intervencija u urinarnom traktu. Zbog otpornosti na dezinficijense i antibiotike, predstavlja značajan medicinski problem (Strohl i sar, 2001).

2.6.2. Gram-pozitivne bakterije

2.6.2.1. Rod *Staphylococcus*

Bakterije ovog roda su loptastog oblika, grupisane u vidu nepravilnih grozdova. Nepokretne su, ne formiraju endospore. Fakultativni su anaerobi. Ne fermentišu ugljene hidrate, ali patogene vrste fermentišu manitol. Vrlo su otporne i na niske i na visoke temperature, kao i na sušenje. Rasprostranjene su u prirodi, nalaze se u vodi, vazduhu, različitim namirnicama. Najčešće su meso, mesni proizvodi, jaja i mleko izvor infekcije stafilokokom.

Patogeni predstavnici ovog roda produkuju sledeće toksine: leukocidin (izaziva destrukciju ljudskih leukocita), hemolizin (vrši destrukciju životinjskih eritrocita), enterotoksin, dermatoksin, eritrogeni toksin. Od enzima produkuju kolagenazu, koagulazu, fibrinolizin, fosfataze, lipaze, proteaze i beta-laktamaze (Mihailov-Krstev, 2009).

Najznačajnije vrste ovog roda su: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Staphylococcus saprophyticus*.

Izvor zaraze patogenim stafilokokama je sekret iz nosa i nazofarinksa. Prenose se vazдушnim putem i kontaktom (direktnim i indirektnim). Mogu izazivati oboljenja svih organa, najčešće izazivaju infekcije kože, pluća, i sluzokože (rinitisi, laringitisi, infekcije usne duplje). Mogu biti uzročnici težih oboljenja kao što su artritis, meningitis, osteomijelitis, pleuritis i apsces. Dospevanjem u krv mogu dovesti do teške stafilokokne septikemije. Enterotoksini stafilokoka mogu izazvati teške enterokolitise.

Stafilokokne infekcije su se ranije jako uspešno lečile penicilinskim antibioticima, ali su ove bakterije vremenom stekle rezistenciju. Danas se u terapiji koriste eritromicin, kanamicin i novija polusintetska jedinjenja penicilina (Karakašević, 1997).

Staphylococcus aureus (zlatni streptokok) produkuje pigment zlatno žute boje, usled čega je i dobio ime. Fakultativni je anaerob i striktni patogen. Svoju toksičnost duguje toksinima i enzimima koje sintetiše. Sintetiše intracelularne (fibronektin vezujući faktor, faktor nagomilavanja) i ekstracelularne metabolite (superantigeni egzotoksini i α , β , γ i δ toksini).

S. aureus je prisutan na koži i sluzokožama i izaziva oboljenja direktnim prodorom (invazivne bolesti), delovanjem toksina (intoksikacijske bolesti) i kombinacijom ovih grupa (Mihajlov-Krstev, 2009).

Terapija se sprovodi vankomicinom, zbog pojave rezistencije na peniciline i cefalosporine (Strohl i sar, 2001).

2.6.2.2. Rod *Streptococcus*

Bakterije ovog roda su piogene bakterije. Nepokretne su, asporogene koke, koje se grupišu u vidu kraćih ili dužih lanaca, aerobne su ili fakultativno anaerobne, obuhvataju veliki

broj različitih vrsta značajnih za humanu medicinu. Osetljive su na dejstvo fizičkih i hemijskih agenasa od drugih bakterija. Prema tipu hemolize koje stvaraju na krvnom agaru, mogu se podeliti u tri grupe: β hemolitičke, α hemolitičke i ahemolitičke. Za svoj rast zahtevaju optimalne vrednosti temperature, PH, osmotski pritisak i dr. Streptokoke poseduju veliki broj strukturnih elemenata, egzo - produkata, toksina koji su dobri antigeni i značajni faktori virulencije. Veliki broj vrsta poseduje kapsulu polisaharidne prirode koja je dobar antigen i služi kao zaštita od fagocita, fimbrije koje im omogućavaju adherenciju za ćelije domaćina. Egzoprodukti i toksini streptokoka su streptokinaza (omogućava razgradnju tromba), streptolizin, hijaluronidaza, proteinaze, DNA-aze, eritrogeni toksin - Dikov toksin (Strohl i sar, 2001).

- **Grupa A streptokoka (*Streptococcus piogenes*)** - Ova bakterija izaziva najveći broj oboljenja kod ljudi. Prema mehanizmu nastanka ova oboljenja se mogu podeliti u tri grupe: 1. Invazivna oboljenja gnojnog karaktera - zavisno od lokalizacije ova bakterija može dovesti do gnojnih zapaljenja skoro svih tkiva i organa, a najteža komplikacija je sepsa. 2. Bolesti izazvane streptokoknim toksinima - najčešće oboljenje ove grupe je šarlah. Nastaje delovanjem eritroidnog toksina, javlja se kod dece, i počinje običnim tonzilitisom. 3. Post-streptokokne sekvele-su oboljenja nastala kao kasne posledice infekcije vrstom *Streptococcus pyogenes*. To su: reumatska groznica i poststreptokokni glomerulonefritis. Njihova patogenezna nije u potpunosti razjašnjena ali smatra se da ulogu igra autoimuna komponenta.

- **Grupa B streptokoka (*Streptococcus agalaktiae*)** - je uslovno patogena bakterija i može izazvati oboljenja urogenitalnog trakta. Česta je kod žena a najpatogenija je za novorođenčad kod kojih može izazvati rani i kasni oblik oboljenja. Do infekcije dolazi u toku prolaska kroz porođajni kanal majke, u kome se nalazi grupa B streptokoka. Rani oblik oboljenja, par dana posle rođenja može proteći pod kliničkom slikom pneumonije ili sepse. Kasni oblik je najčešće meningitis koji se javlja u toku prvog meseca života.

- **Grupa D streptokoka (*Enterococcus*)** - Glavni predstavnik je *Enterococcus faecalis*. Ova bakterija normalno naseljava crevni trakt kod ljudi i životinja. To su krupne koke, najčešće raspoređene u vidu diplokoka. Mogu da budu α , β ili ahemolitičke. Otporne su na veći broj hemijskih sredstava i multirezistentne na antibiotike i hemoterapeutike. Izazivaju infekcije urinarnog i genitalnog trakta, žučnih puteva i teško se leče. Za razliku od drugih streptokoka, enterokoke hidrolizuju eskulin nakon inkubacije i dodavanja gvožđa i menjaju boju tečne podloge u crno.

- **α hemolitički streptokok** - je široka grupa streptokoka koja na krvnom agaru daje α tip hemolize. Pod normalnim uslovima predstavljaju normalnu floru gornjeg respiratornog trakta. U određenim slučajevima mogu izazvati oboljenja. Najvažniji predstavnici su: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* i *Streptococcus mutans*. Kod pacijenata sa imunodeficijencijom mogu izazvati teška oboljenja kao što su bakterijski endokarditis ili apscesi mozga. Dovode se u vezu sa nastankom zubnog kariesa zato što naseljavaju usnu duplju i razgrađuju ugljene hidrate do kiselina.

Streptococcus pneumoniae (pneumokok) su bakterije ovalnog ili kružnog oblika raspoređene u parovima (diplokoke) ili u vidu kratkih lanaca. Obavijene su kapsulom polisaharidnog sastava. Nepokretne su i fakultativno anaerobne. Postoje i oblici koji su izgubili kapsulu i te pneumokoke nisu patogene. Patogene pneumokoke luče enzime kao što je pneumolizin i proteazu koja razlaže imunoglobuline A1 smanjujući efikasnost sluzokožne imunosti. Nastanjuju sluzokožu gornjih disajnih puteva gde pripadaju normalnoj bakterijskoj flori. Usled deficita imuniteta može doći do njihovog preteranog razmnožavanja, širenja i nastanka infekcije.

Ove bakterije su uslovno patogene. Izazivaju zapaljenje pluća, srednjeg uha, sinusa, meningitis i sepsu. U terapiji oboljenja uzrokovanih streptokokom koriste se penicilini, makrolidi i hinoloni (Strohl i sar, 2001).

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj doktorske disertacije je ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontraktilnost izolovanog ileuma i traheje pacova. Rezultati ispitivanja ove biljne vrste na kontraktilnost glatke muskulature treba da pokažu mogući lekoviti potencijal ove biljne vrste.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

- Ispitivanje uticaja morača na spontane kontrakcije glatke muskulature ileuma i traheje pacova
- Ispitivanje dejstva morača na acetilholinom stimulisane kontrakcije creva i traheje pacova i procena njegovog uticaja na holinergički sistem
- Ispitivanje uticaja morača na kontrakcije ileuma i traheje stimulisane rastvorom kalijum-hlorida
- Ispitivanje uticaja morača na kontrakcije ileuma stimulisane barijum-hloridom, kao i na kontrakcije u medijumu bez jona kalcijuma u smislu procene dejstva morača na mehanizme kontrakcije glatkih mišića
- Procena kontraktilnosti muskulature ileuma pacova u uslovima primene morača i blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME)
- Ispitivanje razlika između spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata nadzemnih delova morača, koji su sakupljeni u tri različite godine i procena reakcije ove biljne vrste na promenu klimatskih uslova
- Ispitivanje hemijskog sastava ekstrakta i etarskog ulja morača i utvrđivanje razlika između spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata različitih delova morača (list, stablo, zreli i nedozreli plod)
- Određivanje antioksidativne aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata morača korišćenjem dva modela (DPPH i β -karoten/linolna kiselina)
- Određivanje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata morača, koji izazivaju najveće spazmolitičke efekte, protiv sojeva Gram (+) i Gram (-) bakterija.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. BILJNI MATERIJAL

Nadzemni delovi biljne vrste morač (*Foeniculum vulgare* Miller) sakupljani su krajem avgusta 2012., 2013. i 2014. godine na lokalitetu Niša. Područje se nalazi uz reku Nišavu, na nadmorskoj visini od oko 200 m, na 43°19' severne geografske širine i 21°54' istočne geografske dužine. Prosečna godišnja temperatura je 11,4°C. Godišnji nivo padavina je oko 589,6 mm po kvadratnom metru. Zemljište područja je peščana ilovača. Područje ima umereno-kontinentalnu klimu.

Morač je ručno bran. Sakupljeni biljni materijal sušen je na tamnom, dobro provetrenom mestu, u hladu i čuvan u papirnim kesama do analize. Delovi biljke (stabljika, list i plod) samlevani su na mehaničkom mlinu do odgovarajućeg stepena usitnjenosti i kao takvi korišćeni za pripremu ekstrakata i etarskog ulja.

4.2. PRIPREMA EKSTRAKATA

Za ekstrakciju biljnog materijala kao ekstrakciona sredstva korišćeni su sledeći organski rastvarači: apsolutni metanol, metanol (80% v/v) i voda. Svaki od tri ekstrakta pripremljen je tako što je najpre biljni materijal ekstrahovan odgovarajućim rastvaračem u odnosu 1:10 u ultrazvučnom kupatilu 20 minuta. Zatim je izvršena filtracija kroz filter-papir, a dobijeni filtrat, odnosno tečni ekstrakt, je uparen do suva, u rotacionom vakuum uparivaču (Kika-Werke). Ekstrakti su čuvani do analize u dobro zatvorenim staklenim bočicama na temperaturi do 4°C. U daljem tekstu ekstrakti će biti označeni na sledeći način: ME (ekstrakcija vršena apsolutnim metanolom), M80E (ekstrakcija vršena metanolom 80% (v/v)) i H₂O (ekstrakcija vršena vodom).

4.3. IZOLOVANJE ETARSKOG ULJA

Osušeni i usitnjeni delovi biljke (100 g) destilovani su 150 minuta u Clevenger aparatu. Ulje je ekstrahovano dietil-etrom (Et₂O) i anhidrovano bezvodnim Na₂SO₄. Nakon 24h, smeša je

filtrirana, a rastvarač je uklonjen vakuum-uparivačem. Etarsko ulje je čuvano u staklenoj bočici na 4°C do analize.

4.4. ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

Uticao etarskog ulja i ekstrakata različitih delova biljke morač na kontraktilnost glatke muskulature je ispitivan na izolovanom ileumu i traheji pacova.

4.4.1. Eksperimentalne životinje korišćene za ispitivanje spazmolitičke aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata morača u uslovima *in vitro*

Za određivanje spazmolitičke aktivnosti korišćeni su pacovi Wistar albino soja (250-310 g), muškog pola, starosti 3-5 meseca. Životinje su odgajene u Vivarijumu Medicinskog fakulteta u Nišu. Sve eksperimentalne procedure su u skladu za Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama, a odobrene su i od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Nišu. Životinje su čuvane u kavezima od nerđajućeg čelika u standardnim laboratorijskim uslovima. Temperatura vazduha se održavala u granicama od 20-24°C. Životinje su imale slobodni pristup hrani i vodi.

4.4.2. Izolovanje i postavljanje ileuma pacova

Pacovi su žrtvovani nakon dvanaestočasovnog gladovanja. Trbušna duplja je otvarana, ileum je brzo izolovan i ubačen u Petrijevu šolju sa *Tyrod*-ovim rastvorom. Segmenti ileuma očišćeni od mezenterijuma, dužine oko 2 cm su postavljeni u kupatila za izolovane organe, zapremine 10 mL ispunjena *Tyrod*-ovim rastvorom za izolovano crevo, koji je bio zagrevan na 37°C i aerisan smešom kiseonika (95%) i ugljen-dioksida (5%). Sastav *Tyrod*-ovog rastvora je

bio: 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM CaCl₂ i 5.5 mM glukoze.

Jedan kraj ileuma je bio pričvršćen za držač, dok je drugi deo bio povezan sa transdukterom (TSZ-04-E, Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska). Kontrakcije izolovanog ileuma su registrovane i analizirane uz pomoć kompjuterskog programa SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System (Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska).

Adaptacija izolovanog ileuma je iznosila 30 minuta do stabilizacije bazalnog tonusa. Ispitivani ekstrakti i ulje su dodavani direktno u kupatilo za izolovane organe.

4.4.3. Izolovanje i postavljanje traheje pacova

Traheja je izolovana i odvajana iz grudnog koša nakon žrtvovanja životinje i postavljena u Petrijevu šolju ispunjenu *Krebs-Ringer*-ovim rastvorom. Nakon odvajanja ostataka vezivnog tkiva, traheja je isecana na segmente koji su se sastojali od tri do četiri hrskavičava prstena. Segmenti traheje su postavljeni u kupatila za izolovane organe, zapremine 10 mL koja su bila ispunjena *Krebs-Ringer*-ovim rastvorom, zagrevanim na 37°C i aerisan smešom kiseonika (95%) i ugljen-dioksida (5%). Sastav *Krebs-Ringer*-ovog rastvora je bio: NaCl 137 mM; KCl 2,81 mM; CaCl₂ 1,8 mM; MgCl₂ 0,1 mM; NaH₂PO₄, 0,417 mM; NaHCO₃ 11,9 mM i glikoza 11,10 mM. Nakon stabilizacije izolovane traheje u trajanju 60 min, u kupatila za izolovane organe su direktno dodavane ispitivane supstance. Promene u kontraktilnosti traheje su registrovane pomoću sistema TSZ-04-E, Experimetria Ltd, Budimpešta, Mađarska i analizirane su uz pomoć softvera SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System.

4.4.4. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na spontane kontrakcije ileuma pacova

Nakon perioda adaptacije izolovanog ileuma i uspostavljanja pravilne kontraktilnosti, u kupatila za izolovane organe su dodavani ispitivani uzorci u rastućim logaritamskim

koncentracijama. Dodavanje ispitivanih uzoraka vršeno je kumulativno u koncentracijama od 0,01 do 3 mg/mL.

Promene tonusa su merene kao površina ispod krivulje i bazalne linije, pre i nakon davanja svake koncentracije ispitivanih uzoraka, a rezultati izražavani kao razlika između površina krive pre i nakon dodavanja ispitivanih uzoraka. Za svaku koncentraciju ispitivanog uzorka efekat je izračunavan u procentima u odnosu na početnu spontanu aktivnost izolovanog creva bez prisustva ispitivanih uzoraka.

4.4.5. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom

Nakon perioda adaptacije preparata ileuma, njegove kontrakcije su stimulisane kumulativnim dodavanjem rastućih koncentracija ACh u vodeno kupatilo (5-1500 nM). Na osnovu dobijenih rezultata je konstruisana kontrolna kriva koncentracijski-zavisnih kontrakcija. Preparat je nakon toga ispiran *Tyrodovim* rastvorom i čekano je da se ponovo uspostave stabilne spontane kontrakcije. Zatim je u vodeno kupatilo dodavan ispitivani uzorak u koncentraciji od 1 mg/mL i nakon 5 minuta je ponovljena serija sa istim koncentracijama ACh i formirana je nova kriva kontraktilnog efekta ACh. Preparat ileuma je ponovo ispiran, ostavljan do ponovnog uspostavljanja stabilnih spontanih kontrakcija i postupak je ponovljen sa koncentracijom uzorka od 3 mg/mL. Spazmolitički efekat ispitivanih uzoraka je predstavljen kroz seriju krivulja kojima je prikazan kontraktilni efekat ACh koji je postignut u prisustvu ispitivanih uzoraka i upoređen je sa efektom samog ACh (Branković i sar, 2011).

4.4.6. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum-hlorida

Preparat izolovanog ileuma je postavljen u vodeno kupatilo i ostavljen je 30 minuta dok se ne razvije stabilna kontraktilnost, a zatim je u vodeno kupatilo dodavan 80 mM KCl. Nakon što su se toničke kontrakcije stimulisane KCl ustalile, dodavani su ispitivani uzoci kumulativno u rastućim koncentracijama (od 0,01 do 3 mg/mL). Spazmolitički efekat uzorka je izračunavan na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta KCl (Bigović i sar, 2010).

4.4.7. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalcijum hlorida

Nakon perioda adaptacije preparata ileuma u rastvoru bez jona kalcijuma, njegove kontrakcije su stimulisane kumulativnim dodavanjem rastućih koncentracija CaCl_2 u vodeno kupatilo (0,03-10 μM). Na osnovu dobijenih rezultata je konstruisana kontrolna kriva koncentracijski-zavisnih kontrakcija (Branković i sar, 2009). Preparat je zatim ispiran rastvorom. Nakon toga su u vodeno kupatilo dodavani ispitivani uzorci koji su izazivali najbolje inhibitorne efekte (10% etarsko ulje zrelog ploda morača i 10% metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 100%-tnom metanolu iz 2014. godine) u koncentraciji od 1 mg/mL i nakon 5 minuta je ponovljena serija sa istim koncentracijama CaCl_2 i formirana je nova kriva kontraktilnog efekta CaCl_2 u prisustvu ispitivanog uzorka u koncentraciji od 1 mg/mL. Preparat ileuma je ponovo ispiran i postupak je ponovljen sa koncentracijom uzorka od 3 mg/mL. Spazmolitički efekat ispitivanih uzoraka je predstavljen kroz seriju krivulja kojima je prikazan kontraktilni efekat CaCl_2 koji je postignut u prisustvu ispitivanih uzoraka i upoređen je sa efektima kontrolne serije u kojoj je delovao samo CaCl_2 .

4.4.8. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom barijum hlorida

Nakon perioda adaptacije preparata ileuma, stimulisane su njegove kontrakcije kumulativnim dodavanjem rastućih koncentracija BaCl_2 u vodeno kupatilo (3–900 μM) i na osnovu dobijenih rezultata je konstruisana kontrolna kriva koncentracijski-zavisnih kontrakcija. Preparat je nakon toga ispiran *Tyrodovim* rastvorom i čekano je da se ponovo uspostave stabilne spontane kontrakcije. Nakon toga je u vodeno kupatilo dodavan ispitivani uzorak (10% etarsko ulje zrelog ploda morača i 10% metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 100%-tnom metanolu iz 2014. godine) u koncentraciji od 1 mg/mL i nakon 5 minuta je ponovljena serija sa istim koncentracijama BaCl_2 . Formirana je nova kriva kontraktilnog efekta BaCl_2 u prisustvu ispitivanog uzorka u koncentraciji od 1 mg/mL. Preparat ileuma je ponovo ispiran, ostavljan do ponovnog uspostavljanja stabilnih spontanih kontrakcija i postupak je ponovljen sa koncentracijom uzorka od 3 mg/mL. Spazmolitički efekat ispitivanih uzoraka je predstavljen kroz seriju krivulja kojima je prikazan kontraktilni efekat BaCl_2 koji je postignut u prisustvu ispitivanih uzoraka i upoređen je sa efektom samog BaCl_2 (Branković i sar, 2011).

4.4.9. Procena kontraktilnosti ileuma pacova u uslovima primena etarskog ulja i ekstrakta morača i blokatora azot-oksida sintetaze

Preparat izolovanog ileuma je postavljan u vodeno kupatilo i ostavljen je 30 minuta dok se ne razvije stabilna kontraktilnost. Nakon toga je u vodeno kupatilo dodato 100 μM L-NAME i ispitivani uzorci koji su izazivali najbolje inhibitorne efekte (10% etarsko ulje zrelog ploda morača i 10% metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 100%-tnom metanolu iz 2014. godine) kumulativno, u rastućim koncentracijama (od 0,01 do 3 mg/mL). Efekat uzorka je izračunavan na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta L-NAME (Sedighi i sar, 2014).

4.4.10. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na spontane kontrakcije traheje pacova

Nakon perioda adaptacije izolovane traheje i uspostavljanja pravilne kontraktilnosti, u kupatila za izolovane organe su dodavani ispitivani uzorci koji su izazivali najbolje inhibitorne efekte (10% etarsko ulje zrelog ploda morača i 10% metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 100%-tnom metanolu iz 2014. godine) kumulativno, u rastućim logaritamskim koncentracijama (0,01 do 3 mg/mL).

Promene tonusa glatke muskulature izolovane traheje su merene kao površina ispod krivulje i bazalne linije, pre i nakon davanja svake koncentracije ispitivanih uzoraka, a rezultati izražavani kao razlika između površina krive pre i nakon dodavanja ispitivanih uzoraka. Za svaku koncentraciju ispitivanog uzorka efekat je izračunavan u procentima u odnosu na početnu spontanu aktivnost izolovane traheje bez prisustva ispitivanih uzoraka (Ouédraogo i sar, 2013).

4.4.11. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije traheje pacova izazvane acetilholinom

Preparat izolovane traheje je postavljen u vodeno kupatilo i ostavljen je 60 minuta dok se ne razvije stabilna kontraktilnost. Nakon toga je u vodeno kupatilo dodat Ach u koncentraciji 1500 nM. Nakon što su se toničke kontrakcije stimulisane ACh ustalile dodavao se ispitivani uzorak kumulativno u rastućim koncentracijama (od 0,01 do 3 mg/mL). Spazmolitički efekat uzorka je izračunavan na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta ACh.

4.4.12. Ispitivanje uticaja etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije traheje pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida

Preparat izolovane traheje je postavljen u vodeno kupatilo i ostavljen je 60 minuta dok se ne razvije stabilna kontraktilnost. Nakon toga je u vodeno kupatilo dodavan KCl (80 mM) da bi se postigla visoka koncentracija u rastvoru. Pošto su se toničke kontrakcije stimulisane KCl ustalile, dodavan je ispitivani uzorak kumulativno u rastućim koncentracijama (od 0,01 do 3 mg/mL). Spazmolitički efekat uzorka je izračunavan na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta KCl (Bigović i sar, 2010).

4.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH POLIFENOLA I UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTIMA MORAČA

Količina ukupnih polifenola određuje se Folin-Ciocalteu (F-C) metodom u kojoj istoimeni reagens meri sposobnost sokova i ekstrakta da redukuju fosfomolibdensku i fosfotungistinsku kiselinu do plavo obojenog kompleksa, čija se apsorbanca meri na 725 nm.

Ukupni tanini se određuju, takođe, sa Folin-Ciocalteu reagensom uz korišćenje nerastvorenog polivinil polipirolidona (PVPP), koji vezuje tanine u rastvoru. Razlika ukupnih i netaninskih polifenola predstavlja sadržaj tanina.

Sadržaji ukupnih polifenola i tanina određeni su metodom po Hagermanu (2000). Za izradu kalibracione krive koriste se standard galne kiseline (Tabela 4.1), pa se rezultati oba sadržaja izražavaju kao ekvivalent galne kiseline (GAE) (mg GAE na g ekstrakta).

F-C reagens (2N) je komercijalno dostupan i predstavlja heksavalentni kiseli kompleks fosfomolibdena i fosfotungistata, koji po specifikaciji proizvođača treba da bude bistar, sveto-žut rastvor. Promena boje u maslinasto zelenu indikuje neupotrebljivost reagensa. Čuva se u tamnoj boci, u frižideru. F-C reagens se za potrebe metode razblažuje jednakom zapreminom destilovane vode (1:1, V/V). Pored F-C reagensa, koristi se i 20% rastvor Na_2CO_3 , nerastvorni PVPP, koji je komercijalno dostupan i rastvor standarda galne kiseline. Rastvor standarda koncentracije 0,1 mg/mL se priprema na sledeći način: 25 mg standarda se rastvori u 25 mL destilovane vode i dobijeni rastvor razblaži 10 puta za izradu radnog rastvora. Kalibraciona kriva se formira na osnovu izmerenih apsorbanca rastućih koncentracija standarda (1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$) uz slepu probu, koja umesto standarda sadrži destilovanu vodu. Iz kalibracione krive se izračunava sadržaj ukupnih polifenola i tanina.

Ukupni polifenoli se iz uzorka određuju na sledeći način: 0,02 mL uzorka razblaženog vodom u koncentraciji od 3 mg/mL se pipetira u epruvetu, razblaži destilovanom vodom do 0,5 mL, doda 0,25 mL F-C reagensa i 1,25 mL prezasićenog rastvora Na_2CO_3 . Sadržaj epruvete se dobro promućka i nakon 40 minuta, meri apsorbanca na 725 nm. Sadržaj se izračunava iz kalibracione krive.

Ukupni tanini se određuju na isti način kao i ukupni polifenoli sa malo drugačijom pripremom uzorka. Kako se tanini vezuju na nerastvorni PVPP, u kivetu se doda 100 mg PVPP,

1 mL destilovane vode i 1 mL uzorka i ovaj rastvor dobro promućka. 100 mg PVPP je dovoljan da veže 2 mg tanina, pa ako je sadržaj tanina veći od 10%, uzorak se mora razblažiti.

Nakon 15 minuta na +4°C, smeša se ponovo dobro promućka i centrifugira 10 minuta na 3000 obrtaja u minuti. Svi tanini su vezani na nerastvorni PVPP, a sva ostala fenolna jedinjenja se nalaze u supernatantu, pa se on i koristi za određivanje ne-taninskih polifenola po istom postupku za određivanje ukupnih polifenola. Kako se uzorak razblažuje destilovanom vodom u odnosu 1:1, preporučuje se da se koristi dva puta veća zapremina uzorka. Sadržaj ne-taninskih polifenola se izražava u mg GAE na g ekstrakta, a iz razlike se dobija sadržaj tanina.

Tabela 4.1. Priprema standarda za izradu kalibracione krive

	Rastvor katehina (μL)	Destilovana voda (μL)	F-C reagens (μL)	Rastvor Na ₂ CO ₃ (μL)	Galna kiselina (μg)
Slepa proba	0	500	250	1250	0
S1	20	480	250	1250	2
S2	40	460	250	1250	4
S3	60	440	250	1250	6
S4	80	420	250	1250	8
S5	100	400	250	1250	10

4.6. ODREĐIVANJE SADRŽAJA UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA MORAČA

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određivan je AlCl₃ metodom. Ekstrakti su najpre razblaženi metanolom do koncentracije od 1 mg/mL, a zatim je po 1 mL dobijenog rastvora pomešan sa 1 mL rastvora AlCl₃ × 6H₂O (20 mg/mL). Apsorbancija je merena na 430 nm na UV-VIS spektrofotometru nakon 10 minuta. Rezultati su prikazani kao mikrogrami rutina po miligramu ekstrakta (μg RU/mg), uz kalibracionu krivu (Lamaison i Carnat, 1990).

4.7. HEMIJSKI SASTAV EKSTRAKATA I ETARSKIH ULJA MORAČA

4.7.1. HPLC analiza ekstrakata

HPLC (tečna hromatografija visokih performansi) analiza je rađena po metodi Kostić i sar. (2015), sa malom modifikacijom. Kvalitativna i kvantitativna analiza je rađena na Agilent 1200 HPLC sistemu (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif., U.S.A.) sa diode array detektorom (DAD) i analitičkom kolonom Purospher STAR RP-18e (150 × 4,6 mm), promera čestica od 5 μm (Merck, Darmstadt, Germany). Ekstrakti su rastvarani u metanolu i vodi HPLC stepena čistoće. Injektovana je zapremina ekstrakta od 10 μL, koncentracije 10 mg/mL, protoka 0,7 mL/min. Sistem za eluiranje se sastojao iz 0.1% vodenog rastvora trifluorosirćetne kiseline (A) i acetonitrila (B) sa linearnim gradijentom: 0-3 min 5-5% B, 3-32 min 5-28% B, 32-44 min 25-50% B, 44-52 min 50-80% B, 52-54 min 80-90% B, 54-59 min 90-5% B i 59-60 min 5% B. Radna temperatura je održavana na 30°C. Sadržaj polifenolnih jedinjenja je izračunat preko kalibracione krive, koja je konstruisana na osnovu standardnih rastvora. Standardni rastvori su injektovani i detektovani u triplikatu u 5 rastućih koncentracija (0,2, 1, 5, 20 i 50 μg/mL).

4.7.2. Hemijski sastav etarskog ulja

Hemijski sastav etarskog ulja analiziran uz pomoć GC-MS (gasna hromatografija-masena spektrometrija) i GC-FID (plamenojonizacioni detektor). Svi uzorci su analizirani na 7890/7000B GC-MS/MS triple quadruple sistemu (Agilent Technologies, USA, sa Combi PAL aut samplerom). Svi uzorci su snimani u triplikatu. Korišćena je kapilarna kolona HP-5MS (5% fenilmetilsiloksan, 30 m x 0.25 mm, debljine filma 0.25 μm). Temperaturni program je održavan na 50 °C tokom 2 sata i 25 minuta, zatim od 50 do 290° C zagrevan sa po 4° C min⁻¹. Injektovano je 1 μL rastvora etarskog ulja u etru u koncentraciji 10 mikrolitara po mL u split odnosu 40:1. Noseći gas je helijum sa protokom od 1.0 mL min⁻¹. MS je radio pri jonizacionom naponu od 70 eV sa masenim skeniranjem u rasponu 40-650. GC-FID analiza je izvedena pod istim eksperimentalnim uslovima kao što je već navedeno za GC-MS analizu. Procentni sastav je

preračunat na osnovu površine GC-FID pikova, bez korekcionih faktora. Komponente su identifikovane pomoću AMDIS softvera (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System, Ver. 2.1, DTRA/NIST, 2011), na osnovu lineranih retencionih indeksa (RI), koji su određeni na osnovu retencionih vremena standardne serije n-alkana (C₈-C₄₀) i poređenjem masenih spektara sa masenim spektrima Wiley 6 i NIST02 biblioteka masenih spektara.

4.8. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

4.8.1. Određivanje sposobnosti vezivanja slobodnih radikala (DPPH metoda)

DPPH-radikal (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikal) je stabilan azotni radikal ljubičaste boje čiji rastvor u metanolu ima maksimum apsorpcije na 515 nm. DPPH-radikal ma široku primenu u ispitivanju antioksidativne aktivnosti izolovanih supstanci, ekstrakata i hrane.

Metoda se zasniva na reakciji metanolnog rastvora DPPH u prisustvu ispitivanog antioksidansa, pri čemu nastaje neradikalsko jedinjenje i smanjuje se apsorbanca usled obezbojavanja radikala.

Određivanje antioksidativne aktivnosti ekstrakata u DPPH sistemu odnosno sposobnost uzorka da "hvata" slobodne radikale, vršena je po metodi koju su opisali Chang i saradnici (2010) sa izvesnom modifikacijom. Ova metoda se zasniva na redukciji DPPH radikala u DPPH-H, pri čemu se prati promena boje iz ljubičaste u žutu. Rastvori različitih koncentracija ekstrakata i etarskih ulja, zapremine 40 µL, pomešani su sa po 120 µL etanola u udubljenjima mikrotitarske ploče sa 96 mesta, nakon čega je dodavan etanolni rastvor DPPH (0.05 mM). Sadržaj mikrotitarskih ploča su dobro promešani, a potom ostavljeni na tamnom mestu na sobnoj temperaturi 30 minuta. Apsorbancija uzoraka je merena na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland) na 540 nm. Inhibicija slobodnih radikala je računata po formuli:

$$\% \text{ inhibicije DPPH} = [(A_K - A_A) / (A_K - A_S)] \times 100\%$$

U jednačini A_K predstavlja apsorbanciju kontrolnog reagensa koga je činio etanol i rastvor DPPH, A_A predstavlja apsorbanciju ispitivanog uzorka, dok je A_S apsorbancija slepe probe, odnosno etanola. Pomoću dobijenih procenata inhibicije i odgovarajućih koncentracija rastvora uzoraka konstruisane su prave, a zatim su pomoću dobijenih jednačina rezultati izraženi preko IC_{50} (koncentracija uzorka koja neutrališe 50% slobodnih radikala). Antioksidativna aktivnost je poređena sa poznatim korišćenim antioksidansima askorbinskom i ruzmarinskom kiselinom.

4.8.2. Inhibicija obezbojavanja β -karotena

Sposobnost ekstrakata i etarskog ulja da inhibira proces lipidne peroksidacije ispitivan je u sistemu koji je opisan od strane istraživača Koleve i saradnika sa izvesnim modifikacijama (2002). Ova metoda podrazumeva ispitivanje sposobnosti uzorka da zaštiti linolnu kiselinu od lipidne peroksidacije, sprečavajući trošenje β -karotena koji bi u odsustvu ekstrakta vršila zaštitu, što se uočava zadržavanjem žute boje sistema. Priprema rastvora β -karotena je vršena tako što je 2 mg β -karotena rastvoreno u 10 mL hloroforma. Dva mililitra ovog rastvora je uparavano na vakuum uparivaču na 40°C, zajedno sa dodatom linolnom kiselinom (40 mg) i emulgatorom Tween 20 (400 mg). Nakon uparavanja hloroforma, u balon je dodato i 100 mL oksigenisane destilovane vode, čime je formirana emulzija. Kao slepa proba korišćena je emulzija bez β -karotena. Dobijena emulzija je pipetirana (160 μ L) u udubljenja 96-mikrotitratrske ploče u kojima se već nalazilo po 20 μ L rastvora uzoraka različitih koncentracija. Mikrotitratrske ploče su zatim inkubirane 120 minuta na 55°C. Apsorbance su merene na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No 354, Thermo Labsystems, Finland) na 450 nm pre inkubiranja (A_0) i nakon 120 minuta (A_{120}). Procenat inhibicije računat je prema formuli (Barros i sar, 2007):

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{120}/A_0)$$

Konstruisane su prave koje prikazuju zavisnost koncentracije uzorka i procenata inhibicije, a zatim su pomoću dobijenih jednačina prave rezultati izraženi preko IC_{50} .

Antioksidativna aktivnost je poređena sa poznatim korišćenim antioksidansima, askorbinskom i ruzmarinskom kiselinom.

4.9. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

4.9.1. Mikrobiološki sojevi

Ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata različitih delova biljke morač vršeno je protiv sojeva bakterija izolovanih iz respiratornog i gastrointestinalnog trakta.

Gram (-) bakterije upotrebljavane za ispitivanje etarskog ulja i ekstrakata su *Escherichia coli* (iz ždrela i iz stolice), *Pseudomonas aeruginosa* (iz stolice), *Enterobacter aerogenes* (iz stolice), *Proteus mirabilis* (iz stolice), *Klebsiella pneumoniae* (iz ispljuvka) i *Morganella morganii* (iz ždrela).

Gram (+) bakterije su bile *Staphylococcus aureus* (iz ždrela) i *Streptococcus pneumoniae* (iz ispljuvka).

4.9.2. Mikrodiluciona metoda

Za testiranje antimikrobne aktivnosti etarskog ulja i ekstrakata morača korišćena je mikrodiluciona metoda prema propisima CLSI (2005). Izolovani sojevi mikroorganizama su inkubirani preko noći i od njih su, u sterilnom fiziološkom rastvoru, napravljene suspenzije turbiditeta 0,5 McFarlanda koje sadrže 1.5×10^8 CFU (colony forming units)/mL bakterija (CLSI 2005). Nakon toga je, prema uputstvu, napravljena odgovarajuća podloga (Mueller-Hinton bujon-MHB). Po 10 mL sterilisanih tečnih podloga je razliveno u sterilne epruvete i inokulisano sa po 133 μ l pripremljene suspenzije mikroorganizama, da bi se dobio konačan broj CFU od 2×10^6 /1 mL. Zatim je u svako od 96 udubljenja mikrotitarske ploče uneseno po 100 μ l inokulisane podloge i napravljena serija duplih razređenja etarskog ulja (u rasponu od 0,05-50

$\mu\text{L}/\text{mL}$) i ekstrakata (u rasponu od 0,10-100 mg/mL). Ukupna zapremina u svakom udubljenju je iznosila 100 μl , a gustina suspenzije 2×10^6 CFU/mL. Zatim su mikrotitarske ploče inkubirane na 37°C u trajanju od 24 časa izveden u tri ponavljanja.

Korišćene su dve kontrole rasta. Jedna je sadržala inokulisanu hranljivu podlogu (MHB), a druga inokulisanu hranljivu podlogu sa serijom duplih razblaženja rastvarača.

Antibiotik koji je korišćen kao pozitivna kontrola je hloramfenikol u opsegu koncentracija od 0.008-16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Najmanja koncentracija gde nije bilo vidljivog rasta definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Određivanje mikrobiološkog rasta je vršeno dodavanjem po 20 μl 0,5%-tnog vodenog rastvora TTC (2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorida) koji porasle kolonije boji u crveno (Sartorrato i sar, 2004). Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) je određivana tako što je sadržaj iz svih bunarčića, u kojima nije bilo crveno obojenih kolonija, prenošen na petri ploče sa Mueller-Hinton agarom (MHA), koje su zatim inkubirane 24 časa na 37°C i zatim su brojane porasle kolonije bakterija. MBC se definiše kao najniža koncentracija etarskog ulja i ekstrakata pri kojoj je ubijeno 99,9% inokulisanih mikroorganizama.

4.10. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka obavljena je korišćenjem programskog paketa SPSS 15.0. Kontinualne varijable predstavljene su srednjim vrednostima, standardnim devijacijama i medijanama. Utvrđivanje normalnosti raspodele kontinualnih varijabli obavljeno je Shapiro-Wilk testom.

Poređenje vrednosti kontinualnih varijabli između dve grupe, u zavisnosti od normalnosti raspodele, vršeno je Studentovim t testom (Student t-test) nezavisnih uzoraka, u slučaju normalne raspodele, ili Man Vitnjevim (Mann-Whitney) testom, u slučaju da raspodela odstupa od normalne, a za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli između više grupa, u zavisnosti od normalnosti raspodele, korišćena je analiza varijanse ANOVA, u slučaju normalne raspodele, odnosno Kruskal-Volisov (Kruskal-Wallis) test, u slučaju da raspodela odstupa od normalne. U slučaju ANOVA, sledstvenom post Hoc analizom vršeno je poređenje vrednosti iste kontinualne varijable ponaosob između svakog modaliteta iste kategorijske varijable sa svakim.

Statistički značajnim smatrani su nivoi značajnosti od $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

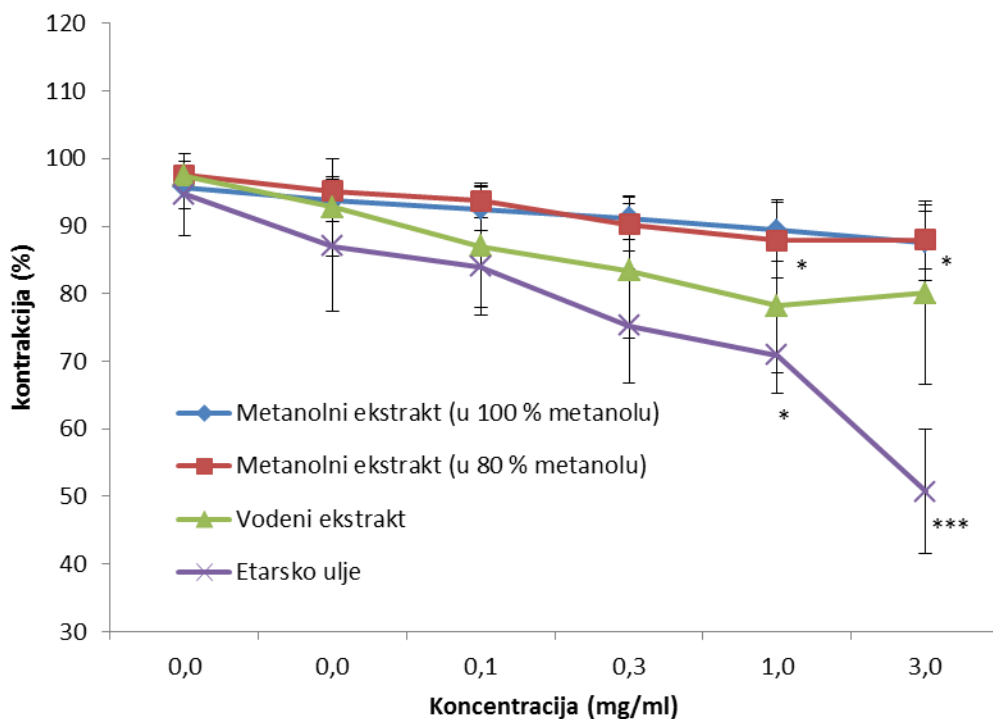
5.1.1. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača na spontane kontrakcije ileuma pacova

5.1.1.1. Etarsko ulje i ekstrakti lista morača iz 2012. godine

Analizom varijanse (ANOVA) u okviru ispitivanih uzoraka utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije kontrakcija ileuma kod metanolnih 80% ekstrakata ($p < 0,01$), kao i kod etarskog ulja ($p < 0,001$). Post Hoc analizom u okviru ispitivanih uzoraka, poređenjem različitih koncentracija ponaosob, utvrđeno je da su kod svih tipova uzoraka najveće inhibicije kontrakcije ileuma pri najvećim koncentracijama. Kod 80% metanolnog ekstrakta inhibicije pri koncentracijama 1 mg/mL ($87,85 \pm 5,60\%$) i 3 mg/mL ($87,94 \pm 4,2\%$) statistički su veće no pri koncentraciji od 0,01 mg/mL ($97,59 \pm 1,14\%$) ($p < 0,05$). Kod vodenog ekstrakta u odnosu na koncentraciju od 0,01 mg/mL ($97,41 \pm 2,23\%$) statistički značajno je veća inhibicija pri koncentraciji od 1 mg/mL ($78,19 \pm 9,99\%$) ($p < 0,05$), dok je inhibicija pri maksimalnoj koncentraciji ($80,11 \pm 9,53\%$) statistički značajno veća kako u odnosu na koncentraciju od 0,3 mg/mL ($p < 0,05$), u odnosu na 0,1 mg/mL ($86,98 \pm 9,10\%$) ($p < 0,01$), kao i u odnosu na koncentracije od 0,01 ($97,41 \pm 2,23\%$) i 0,03 mg/mL ($92,78 \pm 7,16\%$) ($p < 0,001$).

Istom analizom u okviru određenih koncentracija utvrđena je statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između poređenih tipova uzoraka i to pri koncentraciji od 1 mg/mL ($p < 0,05$) i maksimalnoj koncentraciji 3 mg/mL ($p < 0,01$). Post Hoc analizom koja je usledila utvrđeno je da je inhibicija najveća kod etarskog ulja pri svim koncentracijama, ali je statistički značajno viša pri koncentraciji 1 mg/mL ($70,90 \pm 5,70\%$) u odnosu na 100% i 80% metanolne ekstrakte ($p < 0,05$). Najveća je i inhibicija kod etarskog ulja je i za maksimalnu koncentraciju ($50,65 \pm 9,2\%$) u odnosu na svaki od preostala tri tipa ekstrakata ponaosob ($p < 0,01$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $50,65 \pm 9,2\%$ sa $EC_{50} = 2,92 \pm 0,08$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao 80% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma na $87,94 \pm 4,2\%$ (Slika 5.1)



Slika 5.1. Efekat ekstrakata i etarskog ulja lista morača iz 2012. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova
 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

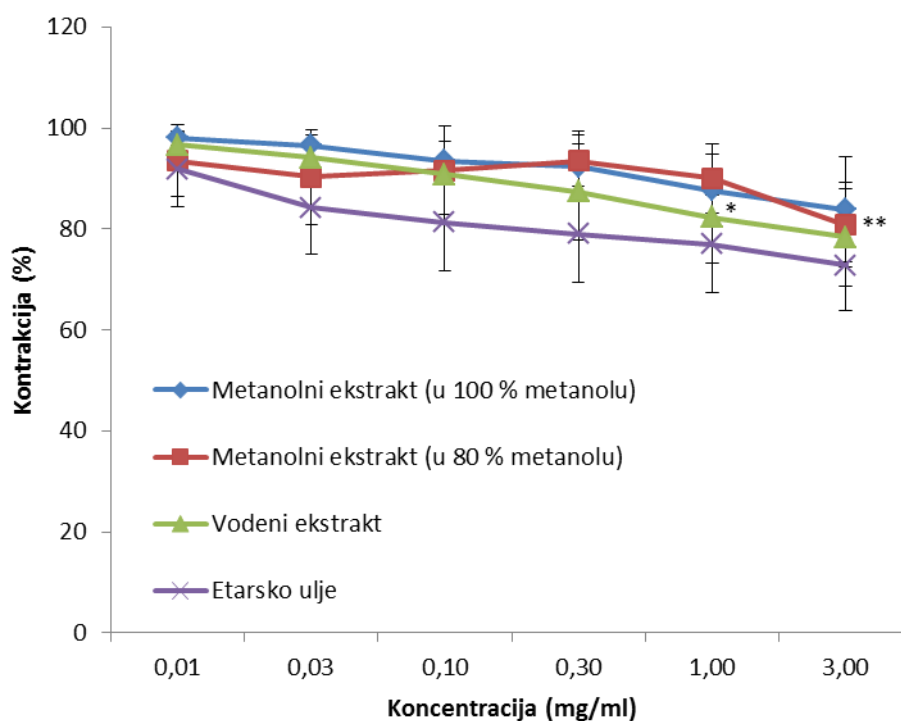
5.1.1.2. Etarsko ulje i ekstrakti lista morača iz 2013. godine

U okviru primenjenih uzoraka, izuzev kod 80% metanolnog ekstrakta, inhibicija spontanih kontrakcija ileuma pacova raste sa povećanjem njihove koncentracije, ali analizom varijanse utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije samo kod metanolnih 100% ekstrakata ($p < 0,001$). Post Hoc analizom je u ovom slučaju ustanovljeno da je inhibicija statistički značajno veća kod koncentracije 3 i 1 mg/mL u odnosu na koncentraciju 0,01 mg/mL

($p < 0,05$), dok je u odnosu na koncentraciju 0,03 mg/mL inhibicija veća kod koncentracije 1 mg/mL ($p < 0,05$), a još ubedljivije kod koncentracije 3 mg/mL ($p < 0,01$).

Analizom varijanse vrednosti inhibicije između ispitivanih uzoraka, u okviru određenih koncentracija, nije utvrđena statistički značajna razlika ni za jednu od ispitivanih koncentracija, kao ni razlika između pojedinih tipova uzoraka u poređenju ponaosob. Etarsko ulje daje najveću inhibiciju pri svim koncentracijama (za koncentraciju 3 mg/mL-inhibicija $72,83 \pm 9,13\%$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $72,83 \pm 9,13\%$ sa $EC_{50} = 8,05 \pm 0,12$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma na $83,88 \pm 8,5$ (Slika 5.2).



Slika 5.2. Efekat ekstrakata i etarskog ulja lista morača iz 2013. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

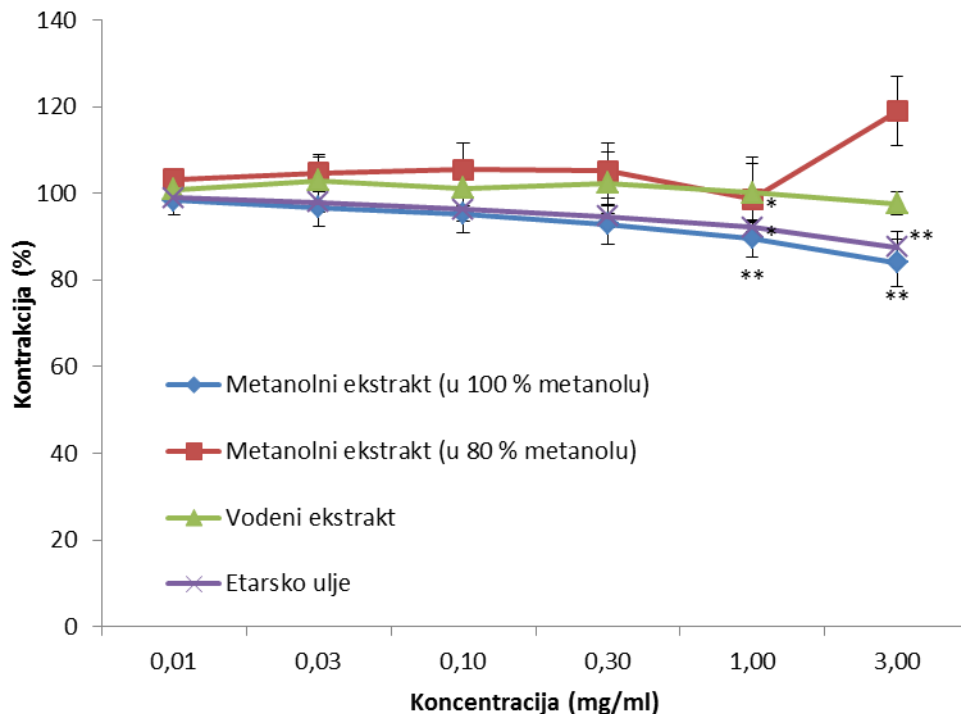
(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.1.1.3. Etarsko ulje i ekstrakti lista morača iz 2014. godine

U okviru primenjenih uzoraka, izuzev kod 80% metanolnog ekstrakta, inhibicija raste sa povećanjem njihove koncentracije. Analizom varijanse utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije kod 100% metanolnog ekstrakta i etarskog ulja ($p < 0,001$), kao i kod 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,05$). Post Hoc analizom je kod metanolnih ekstrakata ustanovljena najveća inhibicija za najvišu koncentraciju i ona je statistički viša u odnosu na koncentracije 0,01, 0,03 i 0,1 mg/mL na nivou ($p < 0,001$), a u odnosu na koncentraciju 1mg/mL $p < 0,01$. Inhibicija pri koncentraciji 1mg/mL, takođe je, statistički viša no pri koncentraciji 0,01 mg/mL ($p < 0,01$) i 0,03 mg/mL ($p < 0,05$). Kod 80% metanolnog ekstrakta statistički je značajno niža inhibicija pri koncentraciji 3mg/mL ($119,01 \pm 7,86\%$) u odnosu na koncentraciju 1 mg/mL ($98,72 \pm 9,60\%$) ($p < 0,05$). Kod etarskog ulja inhibicija pri koncentraciji 3 mg/mL je statistički značajno viša ($87,61 \pm 3,49\%$) u odnosu na koncentracije 0,01, 0,03, 0,1 ($p < 0,01$) i 0,3 mg/mL ($p < 0,05$). Takođe je inhibicija pri koncentraciji 1 mg/mL ($92,23 \pm 1,02\%$) viša u odnosu na koncentraciju 0,01mg/mL ($98,89 \pm 1,43\%$) ($p < 0,05$).

Analizom varijanse u okviru određenih koncentracija ispitivanih ekstrakata utvrđena je statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između tipova ekstrakata kod svih koncentracija izuzev najniže od 0,01 i to: na nivou $p < 0,05$ za koncentracije 0,03, 0,1 i 1 mg/mL, $p < 0,01$ kod 0,3 mg/mL i $p < 0,001$ za koncentraciju 3 mg/mL. Ono što treba zapaziti je da je najveću inhibiciju dao 100% metanolni ekstrakt. Pri koncentracijama od 0,1 i 0,03 mg/mL inhibicija 100% metanolnog ekstrakta je statistički značajno veća nego kod 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,05$), kao i pri najvišoj koncentraciji ($84,02 \pm 5,49\%$) ($p < 0,001$), pri kojoj je veća i u odnosu na onu kod vodenog ekstrakta ($97,61 \pm 2,71\%$) ($p < 0,01$). Pri najvišoj koncentraciji u odnosu na 80% metanolni ekstrakt veće su inhibicije i vodenog ekstrakta ($p < 0,01$) i etarskog ulja ($p < 0,001$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma na $84,02 \pm 5,49\%$ sa $EC_{50} = 10,76 \pm 0,07$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao 80% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL stimulisao kontrakcije ileuma (Slika 5.3).



Slika 5.3. Efekat ekstrakata i etarskog ulja lista morača iz 2014. godine na spontane kontrakcije ileuma
 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

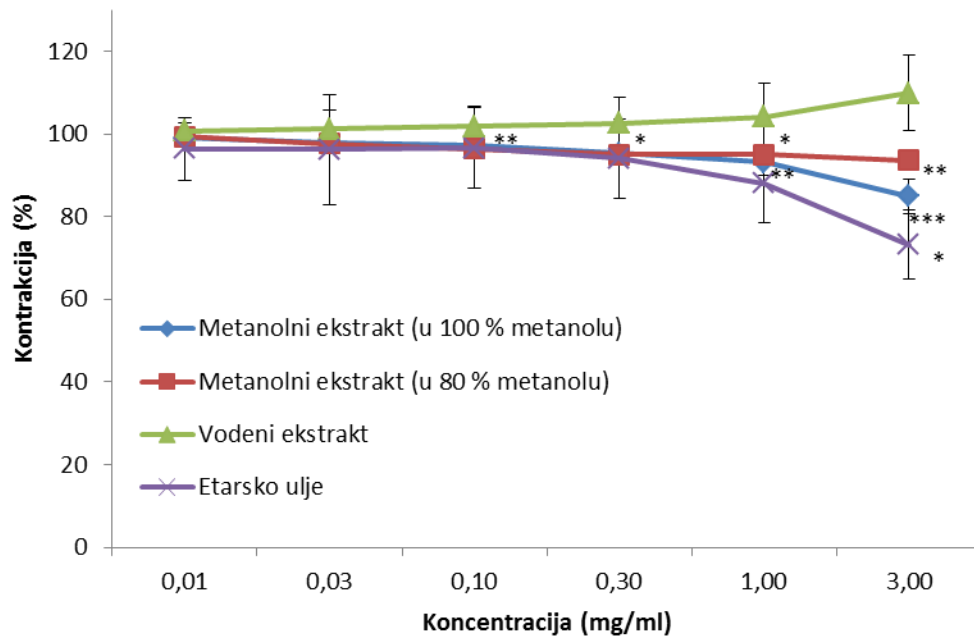
5.1.2. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na spontane kontrakcije ileuma pacova

5.1.2.1. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2012. godine

Analizom varijanse (ANOVA) u okviru ispitivanih ekstrakata utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije kod metanolnih 100% i 80% ekstrakata ($p < 0,001$). Post Hoc analizom u okviru ispitivanih tipova ekstrakata, poređenjem različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da su kod oba tipa ekstrakata najveće inhibicije pri najvećim koncentracijama, a značajne razlike u odnosu na niže koncentracije dobijene Post Hoc analizom. Iako ANOVA nije potvrdila statističku značajnost i kod etarskog ulja, utvrđeno je da inhibicija raste sa porastom koncentracije. Nasuprot tome, drugačija je situacija kod vodenog ekstrakta gde inhibicija opada sa porastom koncentracije.

Analizom varijanse u okviru određenih koncentracija ispitivanih uzoraka utvrđena je statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između poređenih tipova ekstrakata samo pri maksimalnoj koncentraciji od 3 mg/mL ($p < 0,01$). Sledstvenom Post Hoc analizom pri maksimalnoj koncentraciji je utvrđena statistički značajno veća inhibicija etarskog ulja ($73,11 \pm 8,38\%$) u odnosu na vodeni ekstrakt ($p < 0,05$) koji je stimulisao spontane kontrakcije ($109,88 \pm 9,23\%$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $73,11 \pm 8,38\%$ sa $EC_{50} = 5,92 \pm 0,14$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao vodeni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL stimulisao kontrakcije ileuma (Slika 5.4).



Slika 5.4. Efekat ekstrakata i etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2012. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova
 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

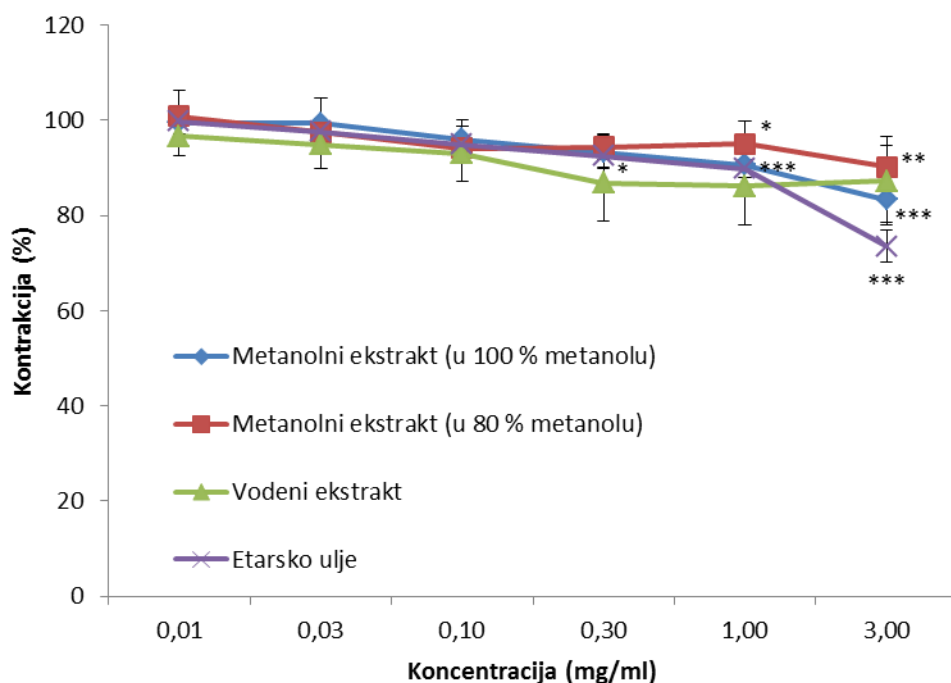
5.1.2.2. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2013. godine

Kod svih primenjenih ekstrakata, inhibicija raste sa povećanjem njihove koncentracije, a analizom varijanse utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije

kod 100% metanolnog ekstrakta i etarskog ulja ($p < 0,001$), kao i 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,01$).

Analizom varijanse u okviru određenih koncentracija nisu utvrđene statistički značajne razlike vrednosti inhibicije. Poređenjem tipova koncentracija ponaosob pri maksimalnoj koncentraciji utvrđeno je da je inhibicija etarskog ulja statistički značajno veća ($73,58 \pm 3,38\%$) u odnosu na 100% metanolni ekstrakt ($83,33 \pm 4,74\%$) ($p < 0,05$), kao i na 80% metanolni ekstrakt ($90,19 \pm 4,44\%$) ($p < 0,01$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $73,58 \pm 3,38\%$ sa $EC_{50} = 5,96 \pm 0,07$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao 80% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirao kontrakcije ileuma na $90,19 \pm 4,44\%$ (Slika 5.5).



Slika 5.5. Efekat ekstrakata i etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2013. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

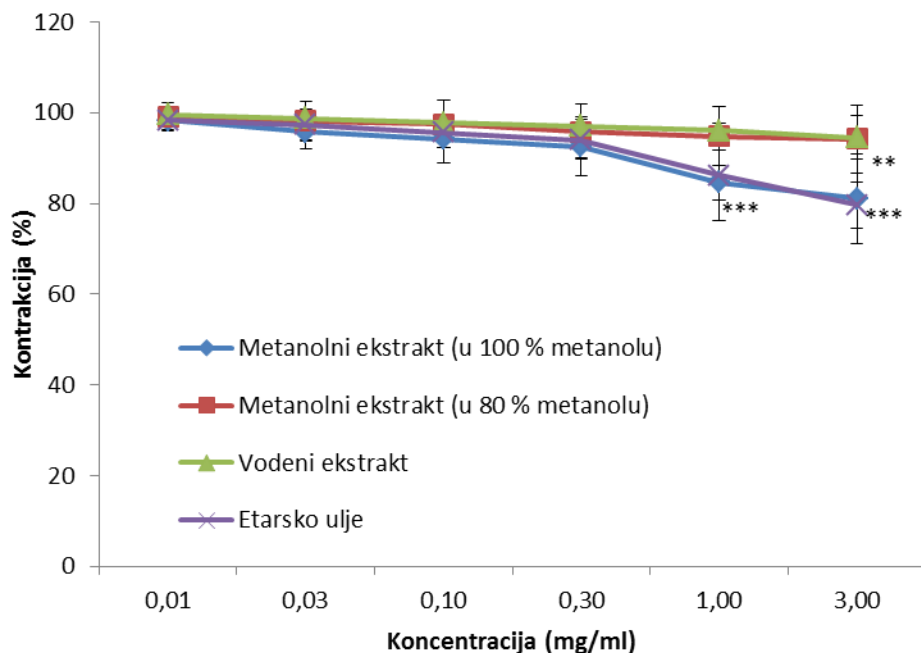
(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.1.2.3. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2014. godine

Kod svih tipova ekstrakata inhibicija raste sa povećanjem njihove koncentracije. Analizom varijanse utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije kod vodenih ($p < 0,01$) i ekstrakata eteričnog ulja ($p < 0,001$). Post Hoc analizom kod etarskog ulja utvrđeno je da je inhibicija pri koncentracijama 1 i 3 mg/mL statistički značajno viša u odnosu na koncentracije od 0,01, 0,03, 0,1 i 0,3 mg/mL ($p < 0,01$). Inhibicija vodenog ekstrakta koncentracije 3 mg/mL statistički je značajno veća no pri koncentracijama od 0,01 ($p < 0,01$) i 0,03 ($p < 0,05$).

Analizom varijanse je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između tipova ekstrakata kod koncentracija 1 mg/mL ($p < 0,05$) i 3 mg/mL ($p < 0,01$). Kod maksimalne koncentracije etarskog ulja inhibicija je statistički značajno veća od 80% metanolnog ekstrakta i vodenog ekstrakta ($p < 0,01$). I pri koncentraciji 1 mg/mL inhibicija ekstrakta etarskog ulja je veća u odnosu na vodeni ekstrakt ($p < 0,01$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $79,63 \pm 5,13\%$ sa $EC_{50} = 7,69 \pm 0,05$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao vodeni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirao kontrakcije ileuma na $94,49 \pm 4,80\%$ (Slika 5.6).



Slika 5.6. Efekat ekstrakata i etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2014. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.1.3. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na spontane kontrakcije ileuma pacova

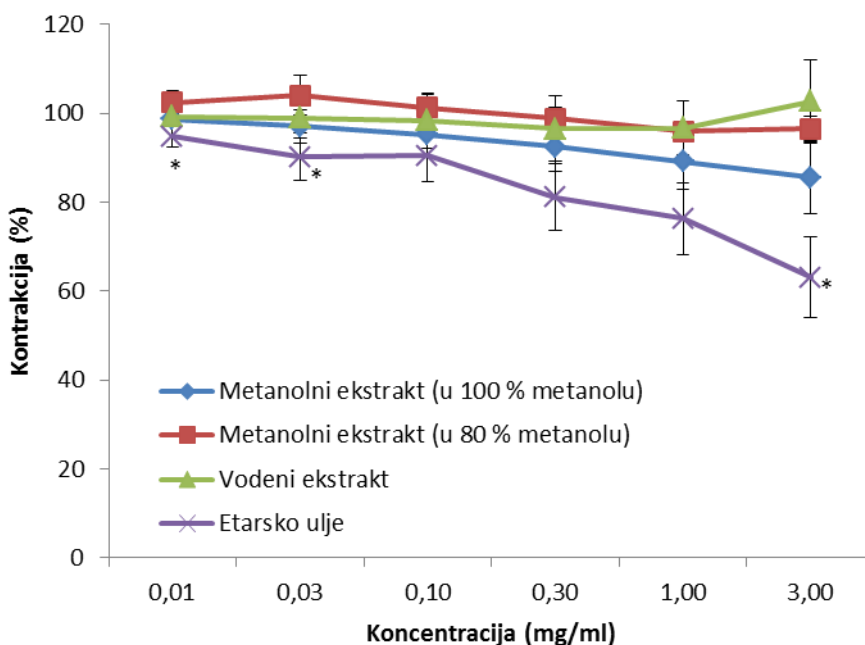
5.1.3.1. Etarsko ulje i ekstrakti nedozrelog ploda morača iz 2013. godine

Sa porastom koncentracije najveći porast inhibicije je kod etarskog ulja. U okviru ispitivanih uzoraka utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije kod etarskog ulja ($p < 0,05$), a Post Hoc analizom u kod etarskog ulja je utvrđeno da je pri maksimalnoj koncentraciji (3 mg/mL) ostvarena statistički značajno veća inhibicija ($63,06 \pm 9,08$ %) no pri koncentracijama od 0,01, 0,03 i 0,1 mg/mL ($p < 0,05$).

Poređenjem inhibicija za fiksirane vrednosti koncentracije analizom varijanse je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između poređenih tipova uzoraka pri koncentracijama 0,01, 0,03, 0,01 i 3 mg/mL ($p < 0,05$). Post Hoc analizom pri koncentracijama 0,01, 0,03 i 3 mg/mL

utvrđene su statistički značajno veće vrednosti inhibicije kod etarskog ulja no kod 80% metanolnog ekstrakta ($p<0,05$), kao i pri maksimalnoj koncentraciji ($96,55\pm 2,79\%$) ($p<0,01$). Pri maksimalnoj koncentraciji veća je inhibicija etarskog ulja i u odnosu na vodeni ekstrakt koji je dao stimulaciju ($102,72\pm 9,37$) ($p<0,01$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $63,06\pm 9,08\%$ sa $EC_{50}=4,19\pm 0,04$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao vodeni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL stimulisao kontrakcije ileuma (Slika 5.7).



Slika 5.7. Efekat ekstrakata i etarskog ulja nedozrelog ploda morača iz 2013. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

(* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$)

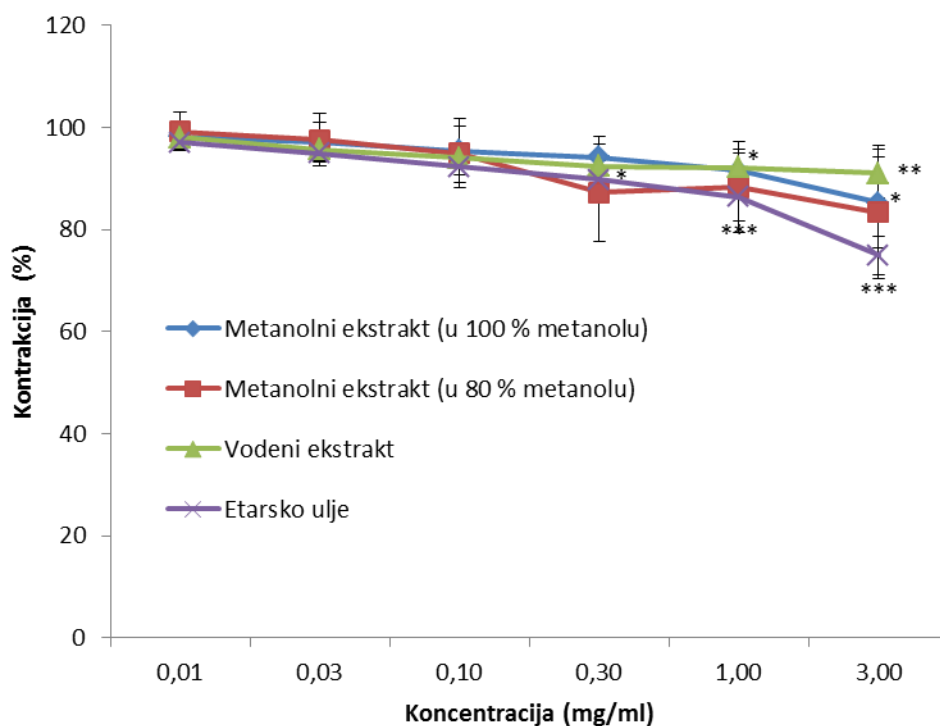
5.1.3.2. Etarsko ulje i ekstrakti nedozrelog ploda morača iz 2014. godine

Kod svih tipova ekstrakata sa porastom koncentracije dolazi do povećanja inhibicije. Analizom varijanse u okviru ispitivanih uzoraka utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije ekstrakata kod 100% i 80% metanolnih ekstrakata ($p<0,05$),

$p < 0,01$ kod vodenih i $p < 0,001$ kod etarskog ulja. Post Hoc analizom u okviru ispitivanih tipova ekstrakata, poređenjem različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika koje su najprisutnije kod etarskog ulja.

Iako analizom varijanse u okviru određenih koncentracija ispitivanih ekstrakata nije utvrđena statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između poređenih tipova ekstrakata, Post Hoc analiza je dokazala statistički značajnu razliku inhibicije između etarskog ulja ($74,97 \pm 3,80\%$) i vodenog ekstrakta ($90,99 \pm 4,73\%$) pri maksimalnoj koncentraciji (3 mg/mL) ($p < 0,05$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma na $74,97 \pm 3,80\%$ sa $EC_{50} = 6,70 \pm 0,14$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao vodeni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirao kontrakcije ileuma na $90,99 \pm 4,73\%$. (Slika 5.8).



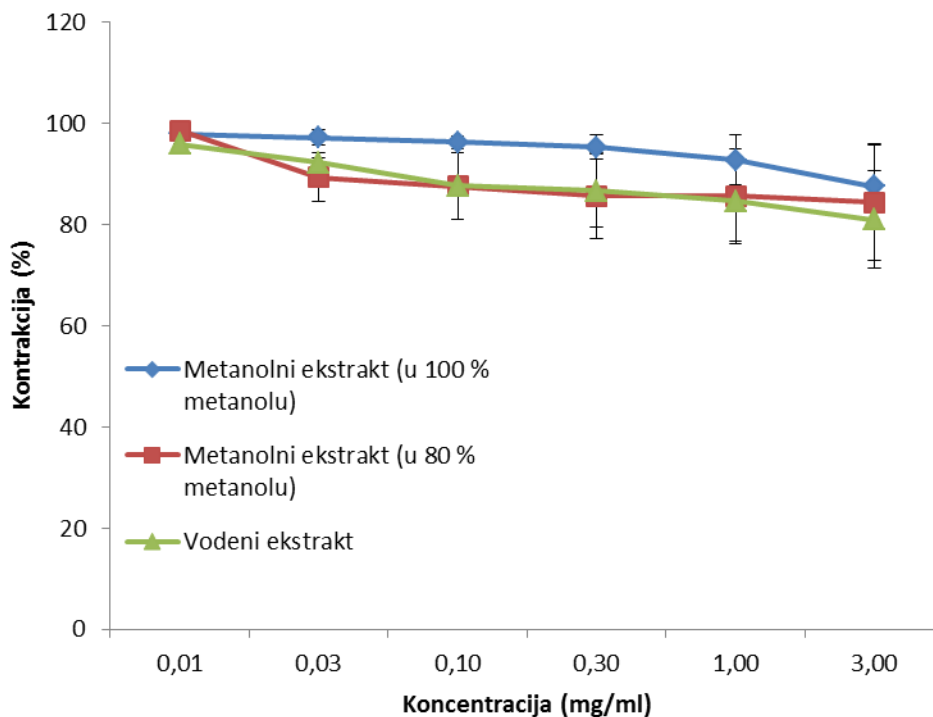
Slika 5.8. Efekat ekstrakata i etarskog ulja nedozrelog ploda morača iz 2014. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.1.4. Uticaj ekstrakata stabljike morača na spontane kontrakcije ileuma pacova

Ekstrakte stabla morača imali smo samo u 2012. godini i to obe vrste metanolnih i vodeni. Kod sva tri tipa uzorka evidentan je porast inhibicije sa porastom koncentracije, ali ipak nema statistički značajne povezanosti. Ni za određene koncentracije nisu utvrđene statistički značajne razlike inhibicije između tipova ekstrakata.

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao vodeni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma na $81,00 \pm 9,59\%$ sa $EC_{50} = 11,22 \pm 0,22$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao 80% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirao kontrakcije ileuma na $84,40 \pm 8,43\%$. (Slika 5.9).



Slika 5.9. Efekat ekstrakata stabljike morača iz 2014. godine na spontane kontrakcije ileuma pacova

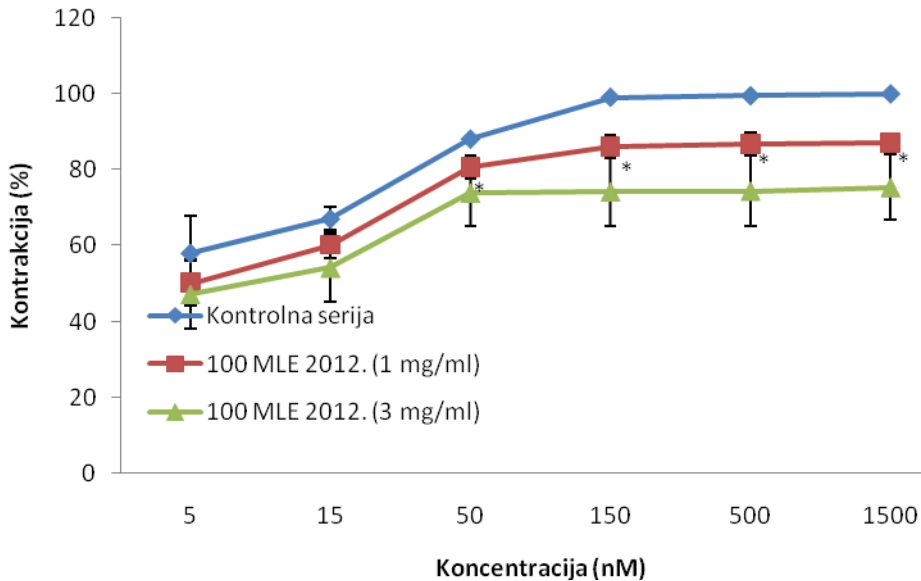
(* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

5.1.5. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom

5.1.5.1. Uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu

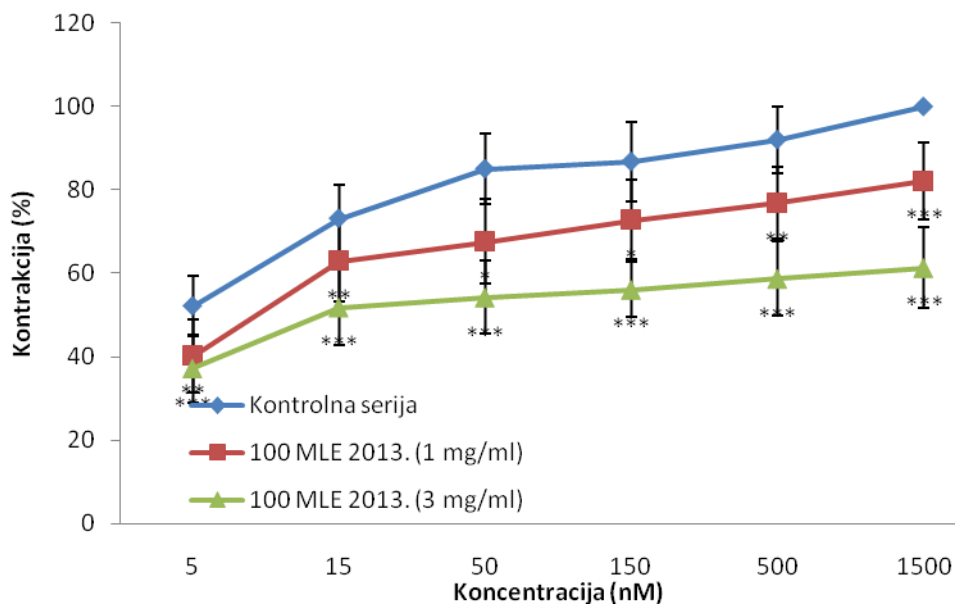
Vrednosti inhibicije ACh-om indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama su najveće kod primene ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL (Slike 5.10, 5.11 i 5.12).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2013. godine, gde je inhibicija kontrakcija indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL, značajno veća sa maksimalnim nivoom značajnosti ($p < 0,001$) za sve koncentracije ACh, a pri koncentracijama od 150, 500 i 1500 nM statistički značajne razlike postoje i u odnosu prisustvo ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL ($p < 0,05$).



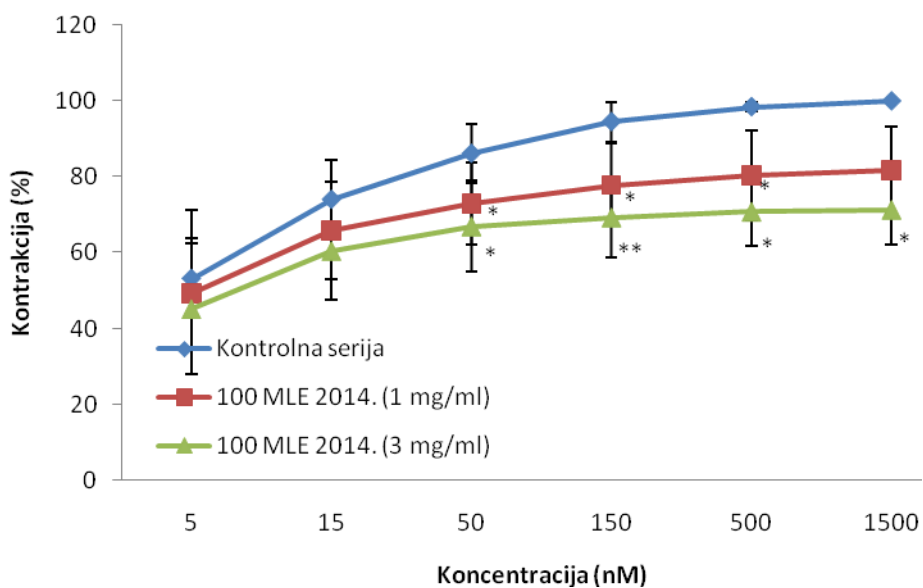
Slika 5.10. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2012. godine (100 MLE 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.11. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2013. godine (100 MLE 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01, ***p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.12. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2014. godine (100 MLE 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

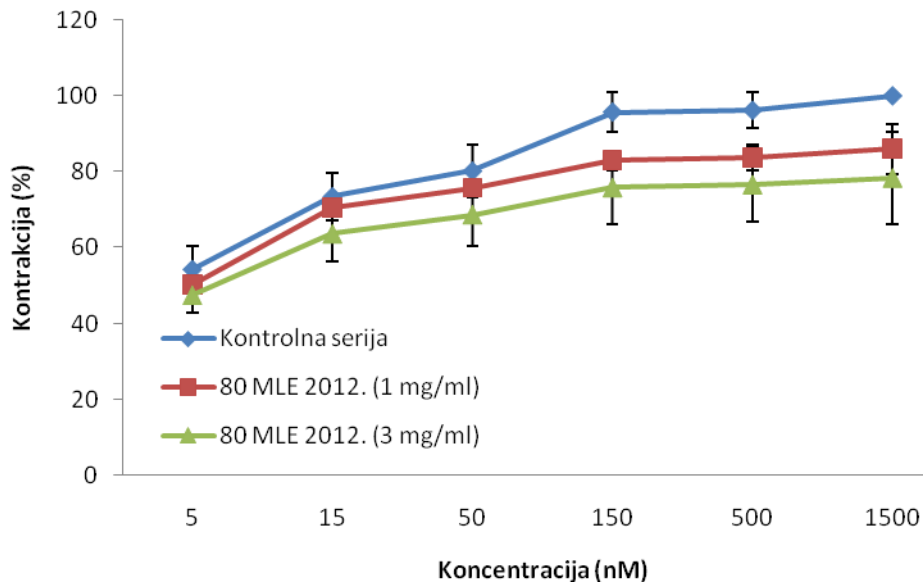
*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.5.2. Uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u 80% metanolu

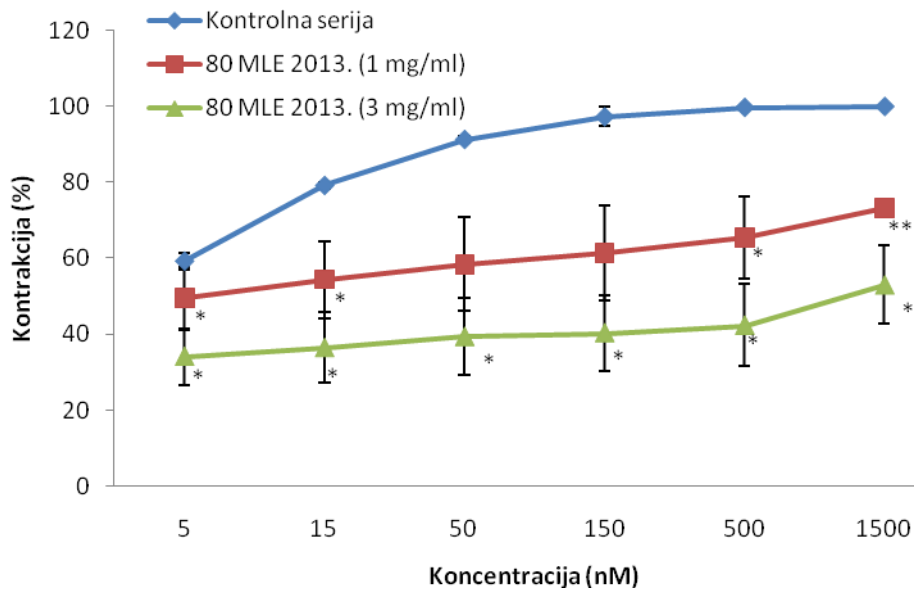
U slučaju uzoraka kod kojih su primenjivani i 80% metanolni ekstrakti vrednosti inhibicije su najveće kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.13, 5.14 i 5.15).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2014. godine, ali je veliki broj statističkih razlika i u 2013. godini, s tim da su nivoi značajnosti niži no u 2014. godini.

U 2014. godini su ostvarene statistički značajne razlike u inhibiciji kontrakcija indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL u odnosu na prisustvo ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL za sve koncentracije ACh izuzev za koncentraciju od 500 nM.

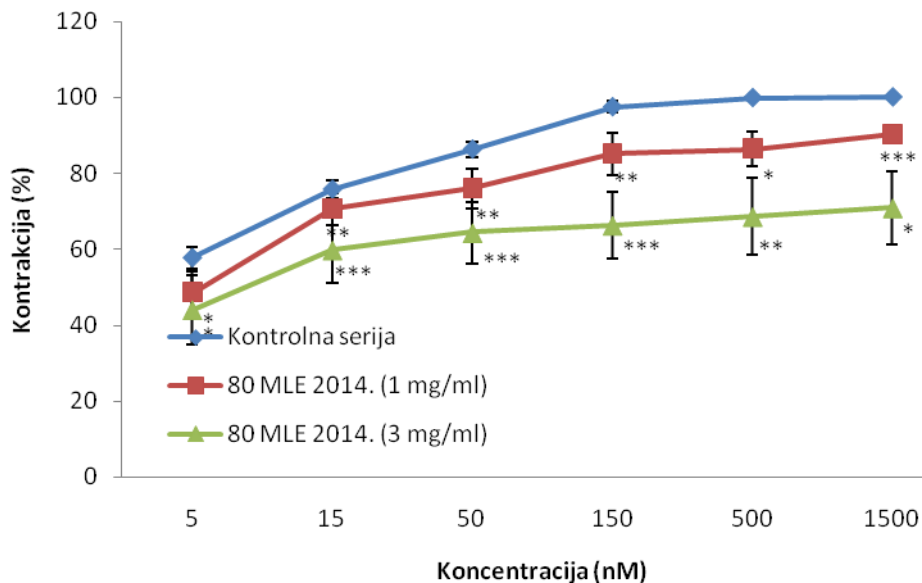


Slika 5.13. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2012. godine (80 MLE 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova



Slika 5.14. Inhibitorni uticaj metanalnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2013. godine (80 MLE 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



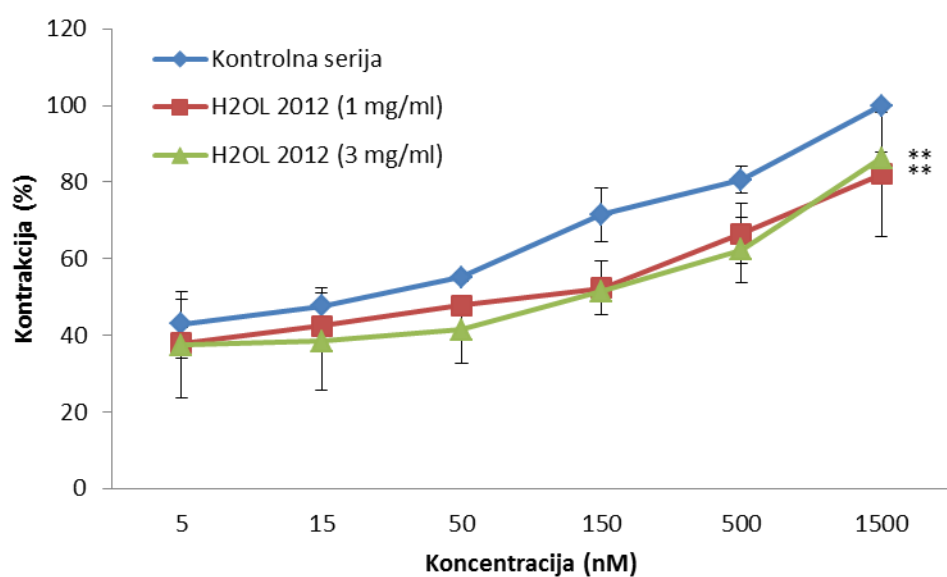
Slika 5.15 Inhibitorni uticaj metanalnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2014. godine (80 MLE 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01, p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.5.3. Uticaj vodenog ekstrakta lista morača

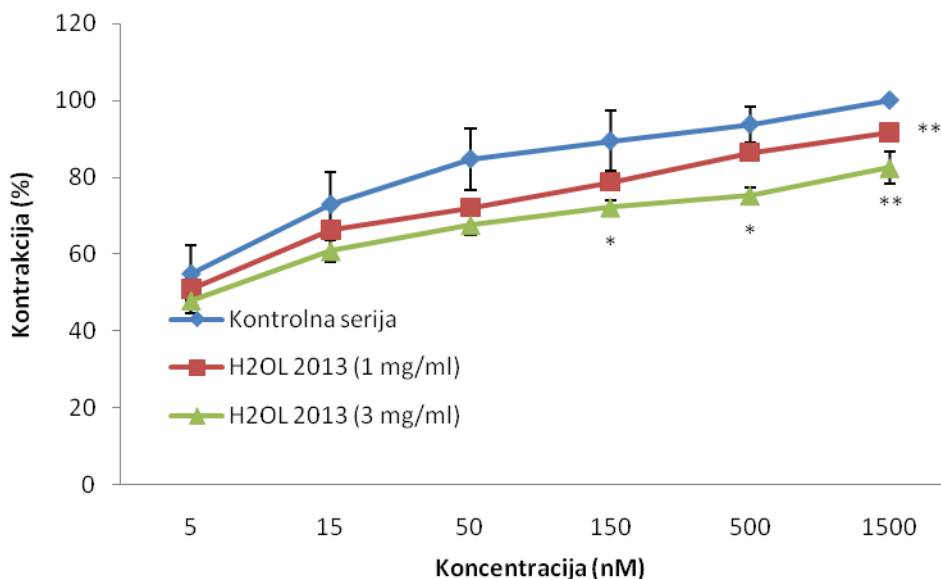
Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.16, 5.17 i 5.18).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2014. godine. Inhibicija kontrakcija indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL, ali i ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL statistički je značajno veća odnosu na kontrolu za gotovo sve koncentracije ACh.



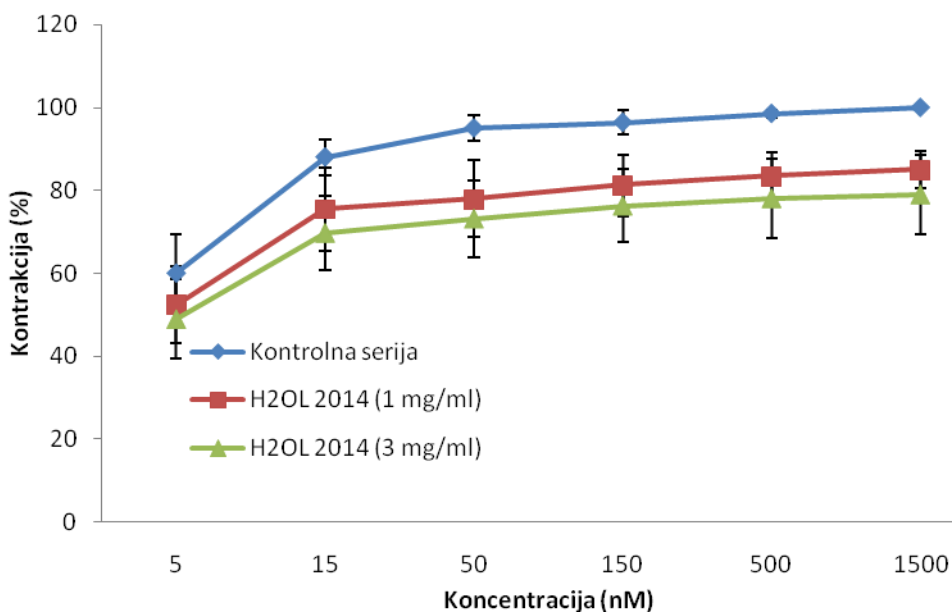
Slika 5.16. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta lista morača iz 2012. godine (H₂OL 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.17. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta lista morača iz 2013. godine (H₂OL 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

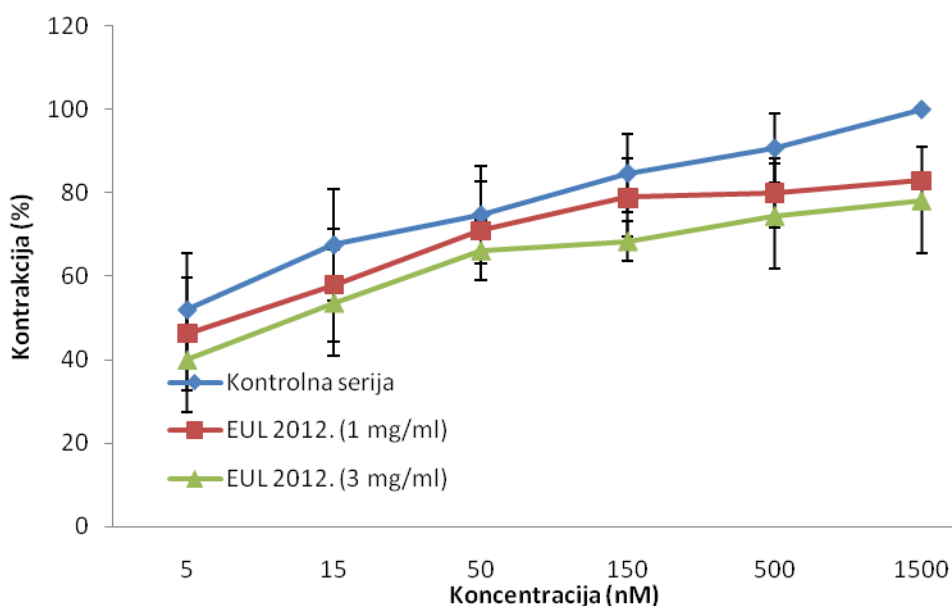


Slika 5.18. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta lista morača iz 2014. godine (H₂OL 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

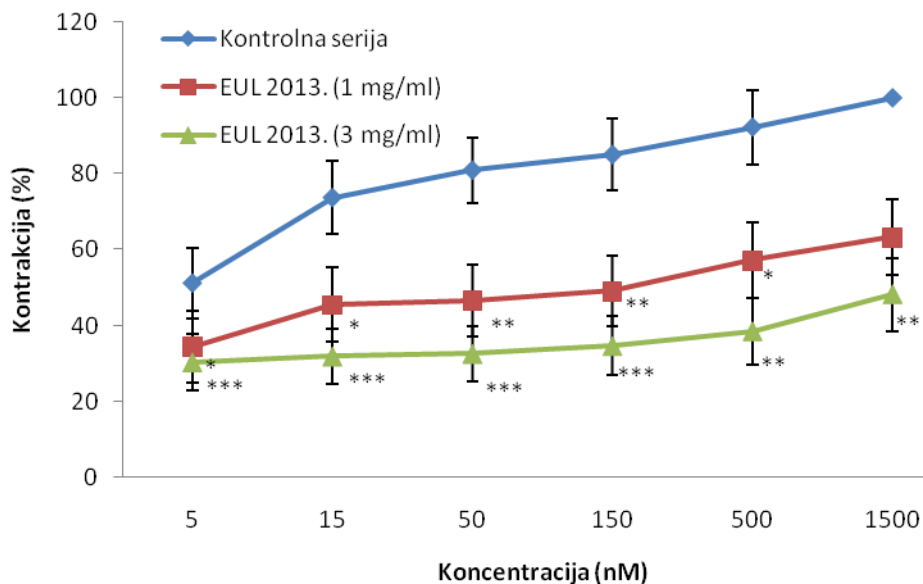
5.1.5.4. Uticaj etarskog ulja lista morača

Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.19, 5.20 i 5.21).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2013. godine. Inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL, ali i ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL statistički je značajno veća u odnosu na kontrolu za gotovo sve koncentracije Ach, izuzev za koncentraciju od 1500 nM.

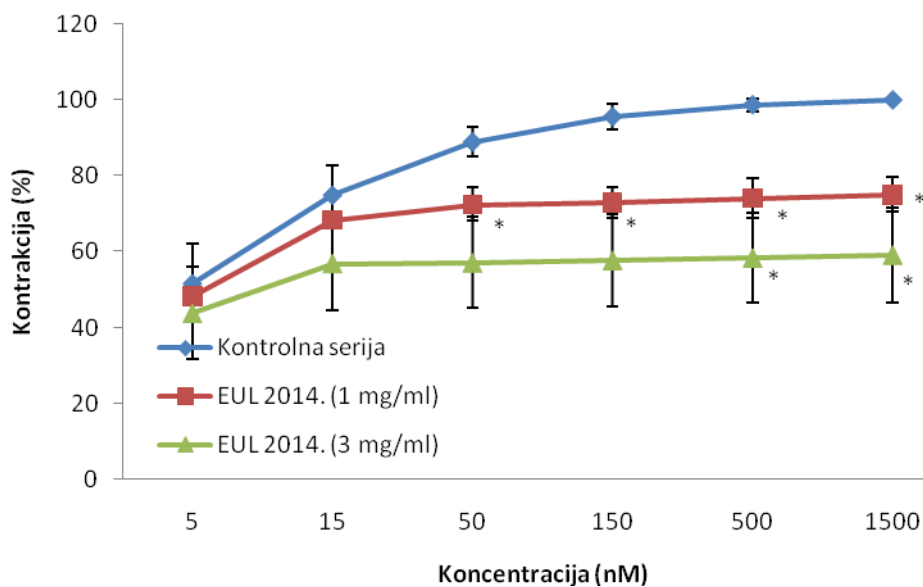


Slika 5.19. Inhibitorni uticaj etarskog ulja lista morača iz 2012. godine (EUL 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova



Slika 5.20. Inhibitorni uticaj etarskog ulja lista morača iz 2013. godine (EUL 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.21. Inhibitorni uticaj etarskog ulja lista morača iz 2014. godine (EUL 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U naredne četiri tabele date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova stimulisanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja i ekstrakata lista morača (100 % metanolni, 80 % metanolni i vodeni) iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL u odnosu na kontrolu, za različite koncentracije ACh, kao i rezultati poređenja između godina u kojima su pripremani uzorci.

Tabela 5.1. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu 100 % metanolnog ekstrakta lista morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	58,13	52,13	53,18	50,12	40,17^{a*}	49,16	47,13	37,14	45,20
15	67,14	73,14	74,03	60,17	63,02^{a*}	65,88	54,14	51,86	60,54
50	88,13	85,05	86,17	80,67	67,62^{a**}	72,90	74,01	54,22	67,02
150	99,11	86,80	94,54	86,15	72,82^{a*}	77,90	74,32	56,11	69,38
500	99,51	92,04^{c*}	98,47	86,73	76,96	80,40	74,49	58,75	70,90
1500	100,00	100,00	100,00	87,15	82,21	81,83	75,48	61,38	71,40

a – vs 2012, b – vs 2013, c – vs 2014.

* – p<0,05, ** – p<0,01

Tabela 5.2. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu 80 % metanolnog ekstrakta lista morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	54,32	59,24^{c*}	57,75	50,32	49,46^{ac*}	48,50	47,44	34,15	43,97
15	73,46	79,17^{c**}	75,75	70,46	54,37	70,59	63,63	36,47	59,76
50	80,21	91,30^{c*}	86,29	75,77	58,40	75,95	68,70	39,40	64,30
150	95,75	97,26	97,42	82,95	61,42	85,15	75,87	40,39	66,26
500	96,21	99,74	99,82	83,67	65,50	86,35	76,61	42,41	68,56
1500	100,00	100,00	100,00	86,06	73,28^{c**}	90,23	78,40	53,08	70,85

a – vs 2012, c – vs 2014.

* – p<0,05, ** – p<0,01

Iz prethodne dve tabele evidentno je da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, za sve koncentracije ACh, ostvarena u 2013. godini, sa statistički značajnim razlikama koje su date u tabelama.

Tabela 5.3. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu vodenog ekstrakta lista morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	42,96^{bc**}	54,91	60,06	38,01^{b*c**}	50,91	52,43	37,42	47,99	49,09
15	47,66^{b*c***}	72,97	88,06	42,52^{bc**}	66,42	75,48	38,39^{c*}	60,89	69,78
50	55,20^{b*c***}	84,74 ^{c*}	95,07	47,80^{bc**}	72,15	77,93	41,42^{c*}	67,62	73,21
150	71,49^{c***}	89,43	96,43	52,38^{b*c**}	78,88	81,23	51,55^{b**c*}	72,23	76,31
500	80,62^{b*}	93,76	98,56	66,55^{c*}	86,53	83,38	62,33	75,30	78,06
1500	100,00	100,00	100,00	82,05	91,82	85,04	86,22	82,52	78,96

b – vs 2013, c – vs 2014

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001

Na osnovu podataka u prethodnoj tabeli uočava se da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, ostvarena u 2012. godini i, u dominantnom broju slučajeva, statistički je značajno veća no u 2013., kao i 2014. godini sa nivoima značajnosti datim u tabeli.

Tabela 5.4. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja lista morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	51,98	51,29	51,74	46,28	34,46^{a**c*}	48,32	40,03	30,42^{ac*}	43,82
15	67,57	73,78	74,96	57,89	45,50^{a**c*}	68,46	53,72	32,00^{ac*}	56,92
50	74,78	80,99	88,95	70,93	46,71^{a**c*}	72,53	66,25	32,65^{a**c*}	57,13
150	84,71	85,08	95,61	78,87	49,17^{a*}	73,02	68,51	34,70^{a**c*}	57,75
500	90,74	92,31	98,71	80,04	57,20	74,14	74,58	38,54^{a*}	58,43
1500	100,00	100,00	100,00	82,97	63,37	75,09	78,25	48,23	59,16

a – vs 2013, c – vs 2014.

* – p<0,05, ** – p<0,01

Iz prethodne tabele evidentno je da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, za sve koncentracije ACh, ostvarena u 2013. godini, uz statistički značajne razlike koje su posebno izražene pri nižim koncentracijama ACh.

U Tabeli 5.5. date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja lista morača u trogodišnjem periodu ispitivanja. Evidentno je da su najveće vrednosti inhibicije kontrakcija indukovanih ACh-om ostvarene u prisustvu etarskog ulja, gde je u njegovoj koncentraciji od 0,3 mL inhibicija značajno veća no pri istoj koncentraciji vodenog ekstrakta, $p < 0,05$ za koncentracije ACh od 50 i 150 nM, tj. $p < 0,01$ za koncentraciju ACh od 500 nM.

Tabela 5.5. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja lista morača u trogodišnjem periodu ispitivanja

Metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1mL	ACh+0,3mL
5	54,98± 3,20	46,48± 5,49	43,16± 5,30
15	71,44± 3,06	63,09± 2,86	55,51± 5,50
50	86,45± 1,56	73,73± 6,56	59,79± 5,80
150	90,50± 6,22	75,95± 5,50	61,55± 6,44
500	94,75± 6,93	79,18± 8,37	63,60± 6,90
1500	100,00± 0,00	82,76± 9,04	65,54± 7,06
Metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u 80% metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1mL	ACh+0,3mL
5	57,10± 2,52	49,43± 0,91	41,85± 6,90
15	76,13± 2,87	65,14± 9,33	53,29± 14,69
50	85,93± 5,55	70,04± 10,08	57,46± 15,80
150	93,10± 5,94	77,74± 9,77	61,61± 13,91
500	98,90± 2,44	79,63± 9,10	63,39± 12,97
1500	100,00± 0,00	84,20± 8,29	67,93± 13,67
Vodeni ekstrakt lista morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1mL	ACh+0,3mL
5	52,64± 8,77	47,12± 7,92	44,83± 6,44
15	69,56± 16,41	61,47± 15,75	56,35± 16,17
50	78,34± 16,46	69,95± 14,42	64,90± 16,69
150	89,34± 11,04	74,29± 13,74	69,90± 12,80
500	93,53± 7,59	80,34± 9,39	73,95± 10,00
1500	100,00± 0,00	85,88± 7,49	81,37± 7,69
Etarsko ulje lista morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1mL	ACh+0,3mL
5	51,67± 0,35	43,02± 7,48	38,09± 6,91
15	72,10± 3,97 ^{b*}	57,28± 11,49	47,05± 13,56
50	81,58± 7,11	63,39± 14,47	47,77± 17,42 ^{c*}
150	87,30± 12,35 ^{b*}	65,82± 17,82	48,92± 17,25 ^{c*}
500	93,21± 8,85 ^{b*}	69,72± 17,43	52,52± 18,34 ^{c**}
1500	100,00± 0,00	73,55± 19,05	58,47± 17,95

Vrednosti u tabeli su prikazane kao X ± SD (Me)

^b– vs metanolni 80% ekstrakt, ^c– vs vodeni ekstrakt

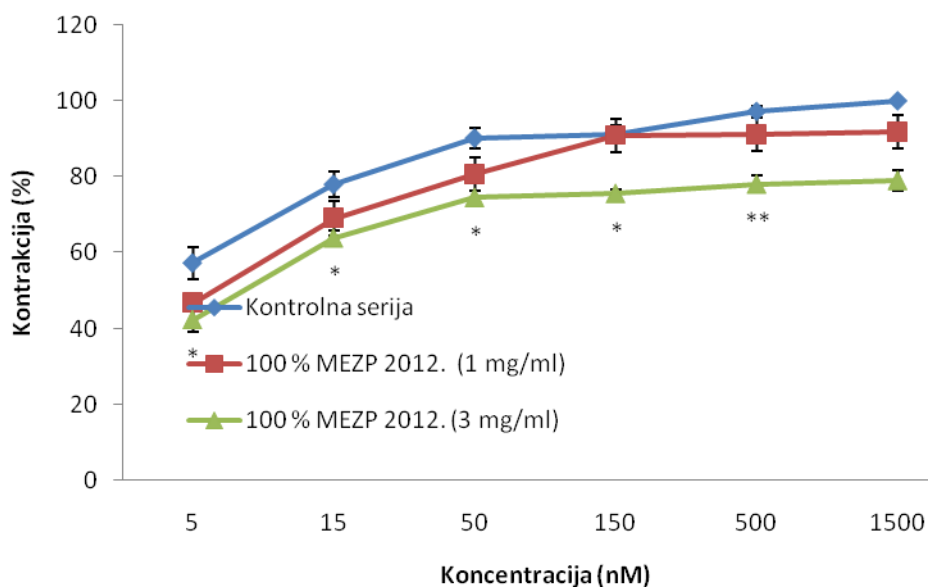
* – p<0,05, ** – p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka, Man-Vitnjev test)

5.1.6. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom

5.1.6.1. Uticaj metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu

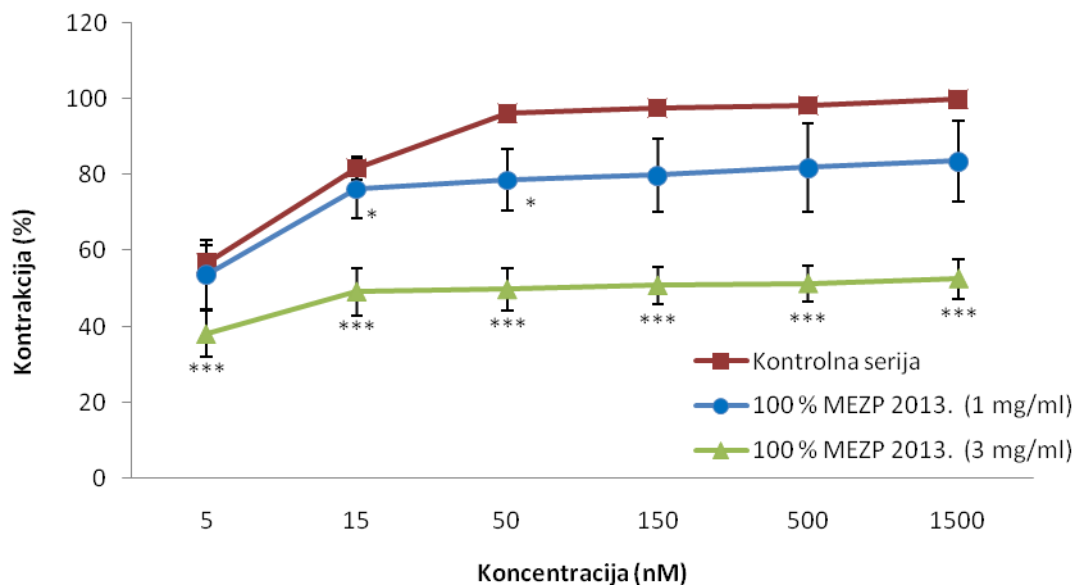
Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.22, 5.23 i 5.24).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2013. godine. Inhibicija kontrakcija indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL, ali i ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL statistički je značajno manja u odnosu na kontrolu za gotovo sve koncentracije ACh ($p < 0,05$, $p < 0,001$).



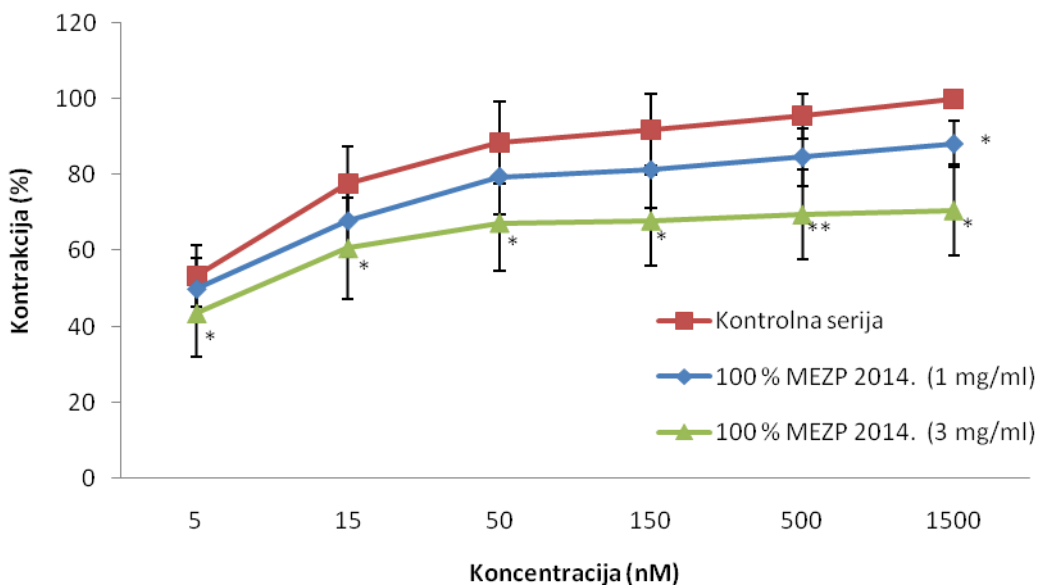
Slika 5.22. Inhibitorni metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2012. godine (100 MEZP 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.23. Inhibitorni metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2013. godine (100 MEZP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, ***-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



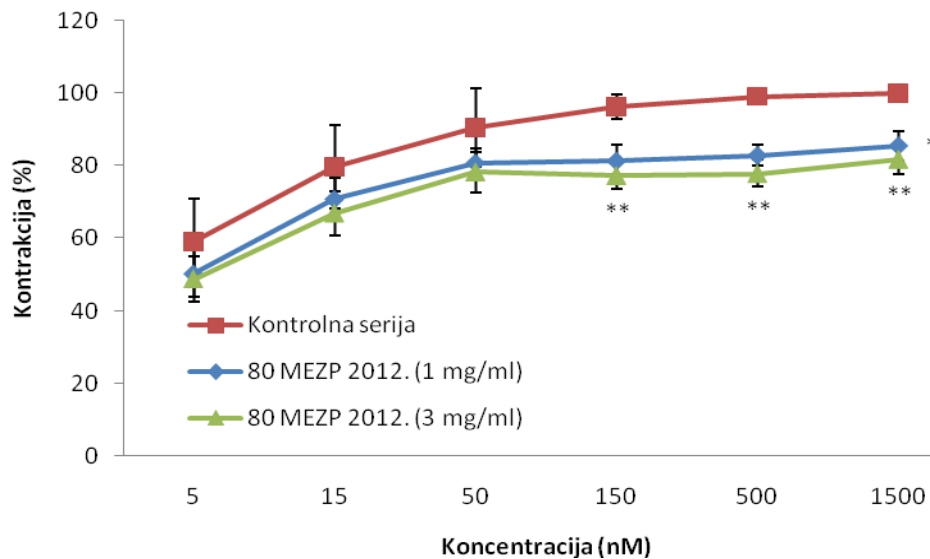
Slika 5.24. Inhibitorni metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2014. godine (100 MEZP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.6.2. Uticaj metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu

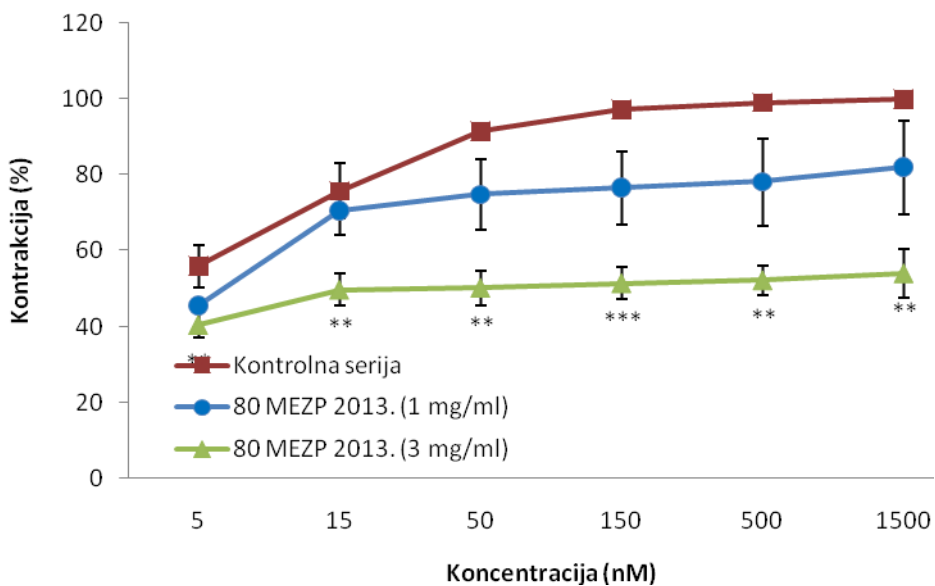
Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.25, 5.26 i 5.27).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2013. godine. Postoje i statistički značajne razlike između inhibicija kontrakcija u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL.



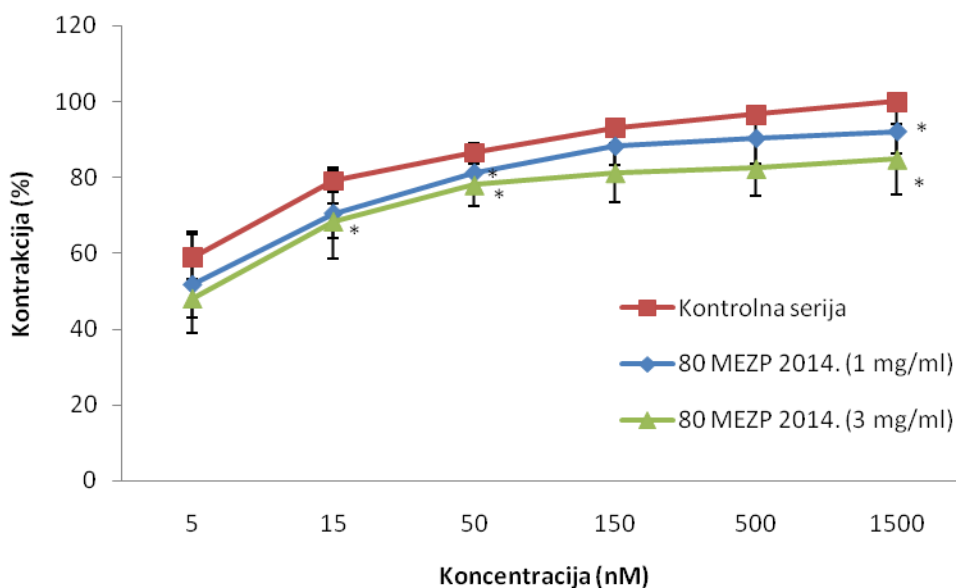
Slika 5.25. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2012. godine (80 MEZP 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.26. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2013. godine (80 MEZP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

- $p < 0,01$, *- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



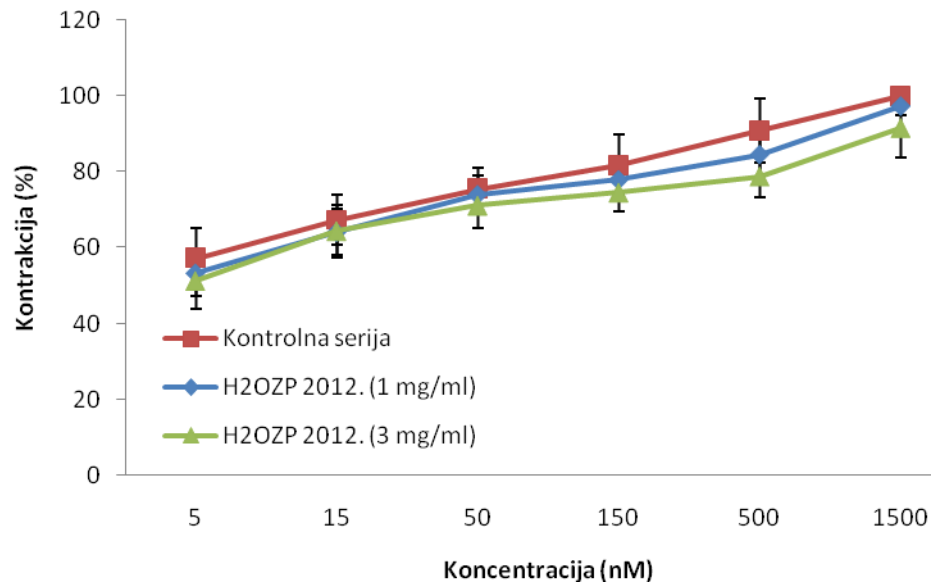
Slika 5.27. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2014. godine (80 MEZP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

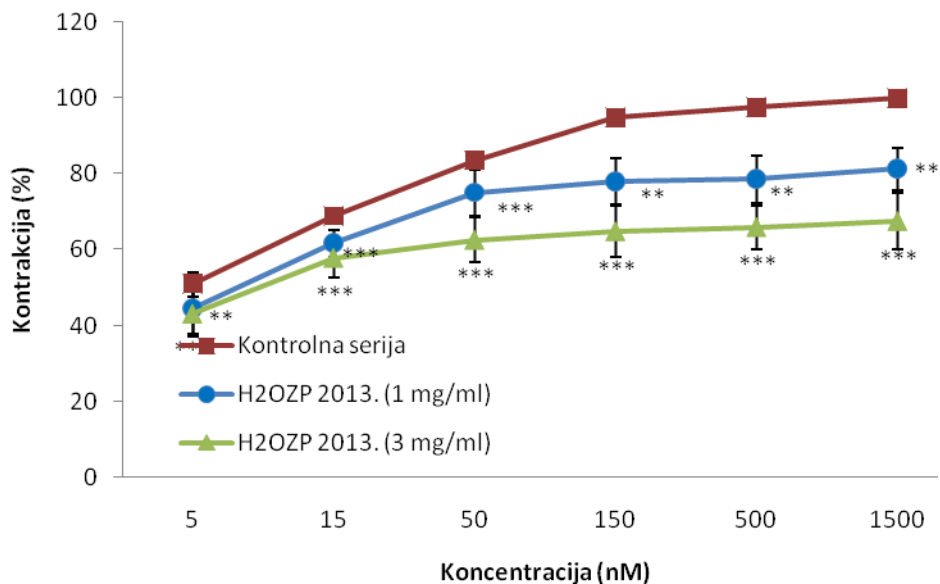
5.1.6.3. Uticaj vodenog ekstrakta zrelog ploda morača

Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.28, 5.29 i 5.30).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2013. godine i prisutne su pri svim koncentracijama ACh.

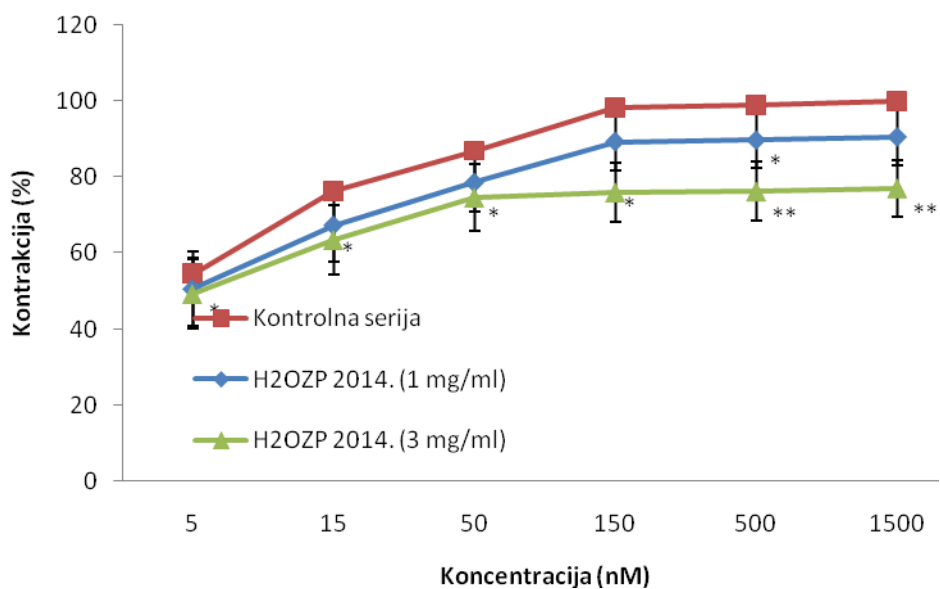


Slika 5.28. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta zrelog ploda morača iz 2012. godine (H₂OZP 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova



Slika 5.29. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta zrelog ploda morača iz 2013. godine (H₂OZP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

-p<0,01, *-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



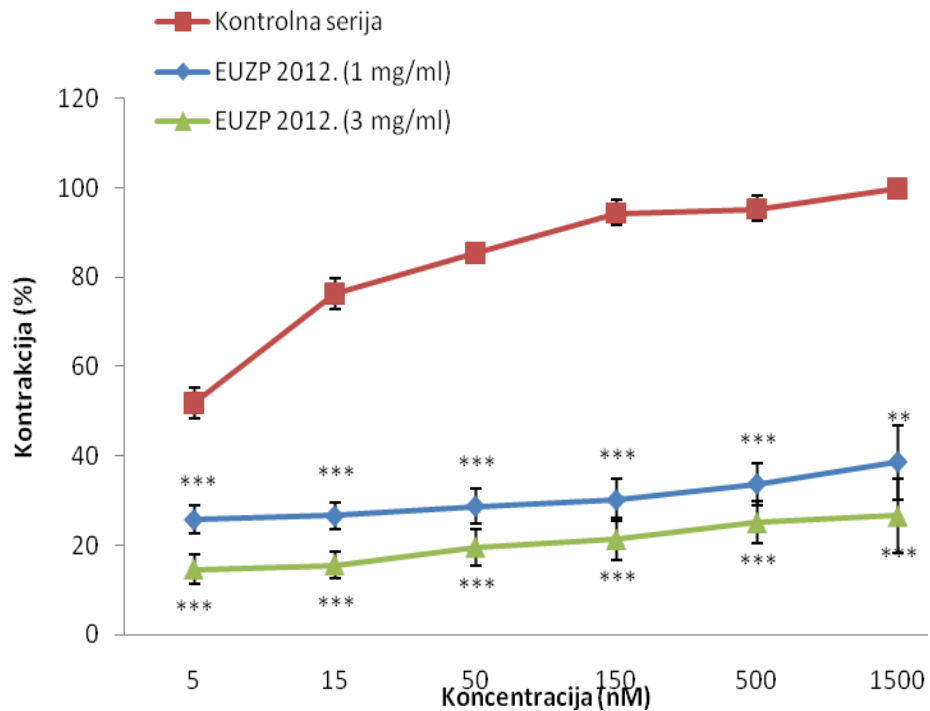
Slika 5.30. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta zrelog ploda morača iz 2014. godine (H₂OZP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.6.4. Uticaj etarskog ulja zrelog ploda morača

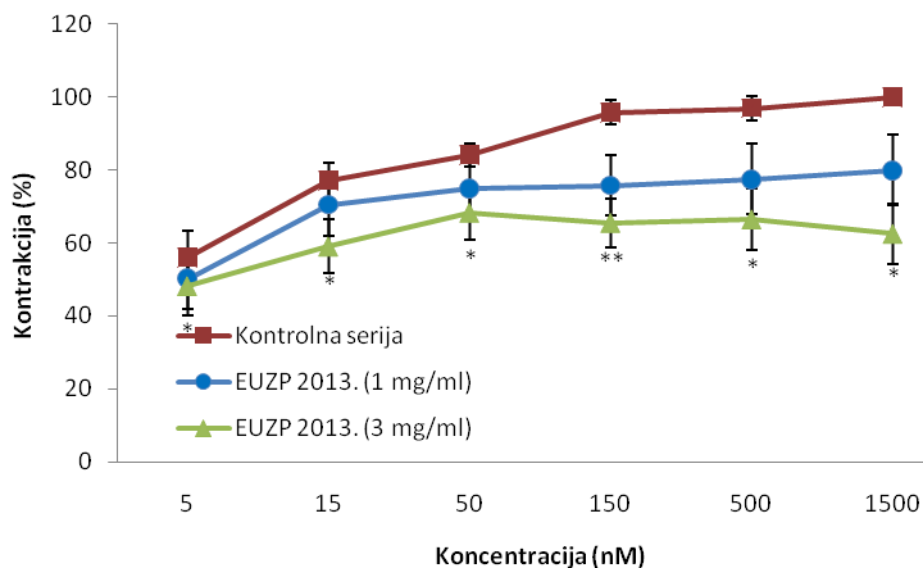
Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim godinama je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta (Slike 5.31, 5.32 i 5.33).

Najbrojnije i najviše statistički značajne razlike su u slučaju uzoraka iz 2012. godine. Inhibicija kontrakcija stimuliranih ACh-om u prisustvu etarskog ulja u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL, statistički je značajno veća u odnosu na kontrolu za gotovo sve koncentracije ACh ($p < 0,05$, $p < 0,001$).



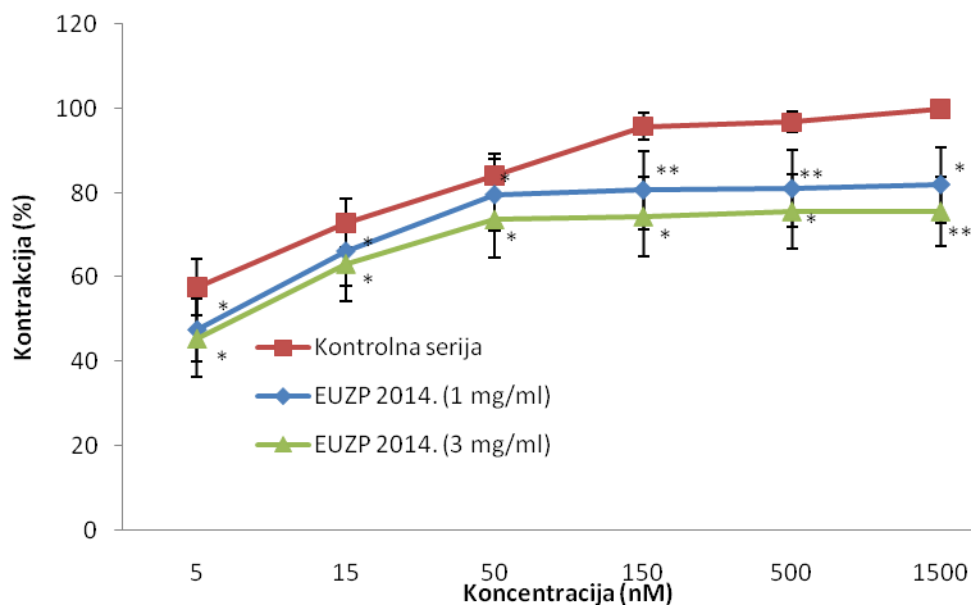
Slika 5.31. Inhibitorni uticaj etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2012. godine (EUZP 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.32. Inhibitorni uticaj etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2013. godine (EUZP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

-p<0,01,*-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.33. Inhibitorni uticaj etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2014. godine (EUZP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05,**-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U naredne četiri tabele date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova stimulisanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL u odnosu na kontrolu, za različite koncentracije ACh, kao i rezultati poređenja između godina u kojima su pripremani uzorci.

Tabela 5.6. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	57,37	56,79	53,37	46,76	53,74	49,93^{a*}	72,33	38,02^{a*}	43,56
15	78,02	81,81	77,61	69,10	76,31	67,85	73,89	49,16^{a*}	60,69
50	90,20 ^{b*}	96,27	88,51	80,70	78,69	79,45	74,59	49,78^{a*}	67,41
150	91,12 ^{b*}	97,66	91,79	90,99	79,94	81,27	75,65	50,81^{a**}	67,97
500	97,22	98,34	95,47	91,12	81,88	84,62	78,13	51,32^{a**}	69,54
1500	100,00	100,00	100,00	91,94	83,65	88,10	79,09	52,62^{a**}	70,66

a – vs 2012

* – p<0,05, ** – p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Na osnovu podataka u prethodnoj tabeli uočava se da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, ostvarena u 2013. godine i u dominantnom broju slučajeva statistički je značajno veća no u 2012. godini sa nivoima značajnosti datim u tabeli.

Tabela 5.7. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu 80 % metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	59,16	55,92	58,81	50,30	45,61	51,84	48,72	40,53^{a**c***}	48,10
15	79,72	75,73	79,02	70,82	70,61	70,57	66,96	49,75^{a**c***}	68,44
50	90,52	91,56	86,56^{b*}	80,81	74,75	81,22	78,35	50,25^{ac***}	78,01
150	96,30	97,31	93,07^{b*}	81,34	76,48	88,22	77,33	51,46^{a***c**}	81,24
500	99,09	99,10	96,55^{a*b**}	82,89	78,13	90,30	77,90	52,23^{a***c**}	82,29
1500	100,00	100,00	100,00	85,56	82,00	92,10	81,85	54,03^{a***c**}	84,79

a – vs 2012, b – vs 2013, c – vs 2014

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Na osnovu podataka u prethodnoj tabeli uočava se da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, ostvarena u 2013. godini za većinu koncentracija ACh. Inhibicija u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL statistički je značajno veća u 2013. godini i u odnosu na inhibicije u 2012. i 2014. godini sa visokim nivoima statističke značajnosti datim u tabeli.

Tabela 5.8. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu vodenog ekstrakta zrelog ploda morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	57,20^{c**}	50,96	54,47	59,40	44,40^{c*}	50,72	51,39	43,31^{c*}	49,39
15	67,27^{c***}	68,82	76,24	64,15	61,71^{c*}	67,44	62,46	57,94^{c*}	63,52
50	75,48^{c**}	83,58	86,91	75,97	75,02^{c*}	78,65	71,11	62,63	74,61
150	81,74^{c*}	94,92	98,19	77,84	77,96	89,44	74,54	64,85	75,92
500	90,84	97,56	98,88	84,49	78,63	89,81	78,78	65,96	76,20
1500	100,00	100,00	100,00	97,20	81,35^{a**}	90,64	91,47	67,53^{a*}	77,03

a – vs 2012, c – vs 2014

* – p<0,05, ** – p<0,01, (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Na osnovu podataka u prethodnoj tabeli uočava se da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, ostvarena u 2013. godini za skoro sve koncentracije ACh.

Tabela 5.9. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2012, 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh			1 mg/mL ekstrakta			3 mg/mL ekstrakta		
	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.	2012.	2013.	2014.
5	51,80	55,95^{c*}	57,67	25,73^{b**c***}	50,13	47,57	14,62^{b**c***}	48,24	45,50
15	76,38	77,02	72,93	26,53^{b**c***}	70,63	66,15	15,63^{b**c***}	59,02	73,19
50	85,56	84,15	84,13	28,70^{b**c***}	74,93	79,49	19,59^{b**c***}	68,20	73,68
150	94,46	95,79	95,78	30,12^{b**c***}	75,84	80,61	21,38^{b**c***}	62,46	74,36
500	95,42	97,00	96,81	33,67^{b**c***}	77,47	80,95	25,13^{b**c***}	65,46	75,58
1500	100,00	100,00	100,00	38,57^{b*c***}	80,00	81,91	26,61^{b**c***}	66,37	75,56

b – vs 2013, c – vs 2014

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Na osnovu podataka u prethodnoj tabeli uočava se da je najveća inhibicija kontrakcija indukovanih ACh, ostvarena u 2012. godini za skoro sve koncentracije ACh sa visokim nivoima statističke značajnosti za sve koncentracije ACh u odnosu na 2014. ($p < 0,001$), kao i u odnosu na 2013. godinu ($p < 0,01$).

U Tabeli 5.10. date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja zrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja. Najveća inhibicija ostvarena je u prisustvu uzoraka u koncentraciji od 0,1 i 0,3 mg/mL ($p < 0,05$).

Tabela 5.10. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja zrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja

Metanolni ekstrakt zrelog ploda morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1 mL	ACh+0,3 mL
5	55,84± 2,16	50,14± 3,49	41,30± 2,91
15	79,15± 2,32	71,09± 4,57	57,91± 7,74
50	91,47± 7,58	79,61± 1,02	63,13± 8,30
150	93,60± 6,66	82,99± 9,18	63,96± 8,94
500	96,81± 3,92	85,15± 8,46	65,37± 9,53
1500	100,00± 0,00	87,47± 7,43	66,52± 9,49
Metanolni ekstrakt zrelog ploda morača ekstrahovan u 80% metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1 mL	ACh+0,3 mL
5	57,96± 1,78	49,25± 3,25	45,78± 4,56
15	78,16± 2,13	70,67± 0,13	61,72± 8,39
50	89,11± 4,73 ^{d*}	78,97± 6,22	70,56± 9,89
150	95,20± 2,86	82,78± 8,10	71,70± 8,06
500	97,96± 1,49	84,60± 9,13	72,50± 8,01
1500	100,00± 0,00	87,28± 8,67	75,33± 9,15
Vodeni ekstrakt zrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1 mL	ACh+0,3 mL
5	54,21± 3,13	49,51± 4,62	48,03± 4,21
15	70,78± 4,79	64,43± 2,88	61,97± 3,53
50	81,99± 5,88	75,88± 2,46	69,45± 6,16
150	93,59± 8,92	82,53± 8,44	71,21± 6,03
500	96,74± 4,39	84,28± 9,63	72,62± 8,98
1500	100,00± 0,00	88,24± 8,42	76,12± 9,36
Etarsko ulje zrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	ACh	ACh+0,1 mL	ACh+0,3 mL
5	55,14± 3,02	41,14± 13,41	36,12± 18,67
15	75,41± 2,26	54,44± 14,27	55,55± 12,92
50	84,61± 0,82	66,37± 13,72	59,51± 12,78
150	95,41± 2,96	67,49± 13,41	58,47± 14,31
500	96,47± 2,69	68,97± 12,52	60,82± 10,60
1500	100,00± 0,00	71,32± 11,54 ^{abc*}	61,44± 12,94

Vrednosti u tabeli su prikazane kao X ± SD (Me)

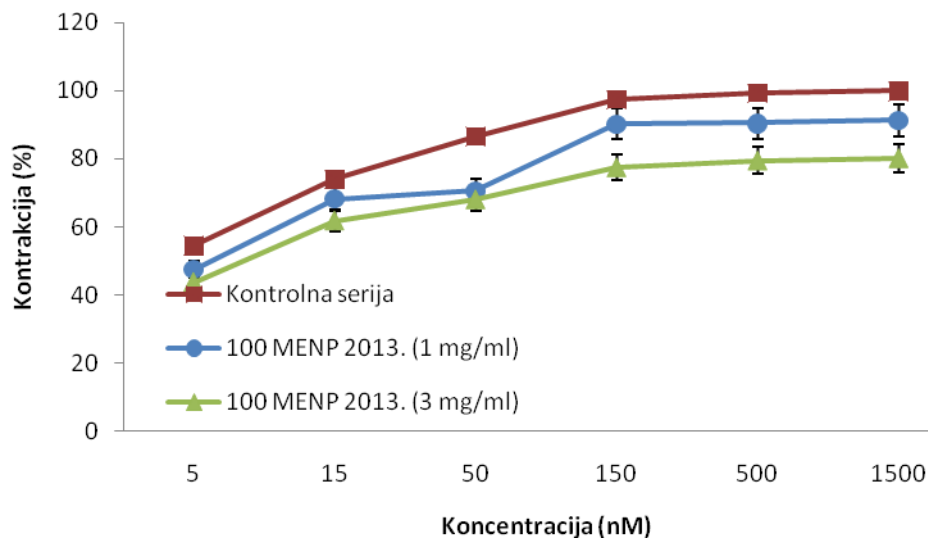
^a – vs metanolni 100% ekstrakt, ^b – vs metanolni 80% ekstrakt, ^c – vs vodeni ekstrakt, ^c – vs ekstrakt etarskog ulja

* – p<0,05 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka, Man-Vitnijev test)

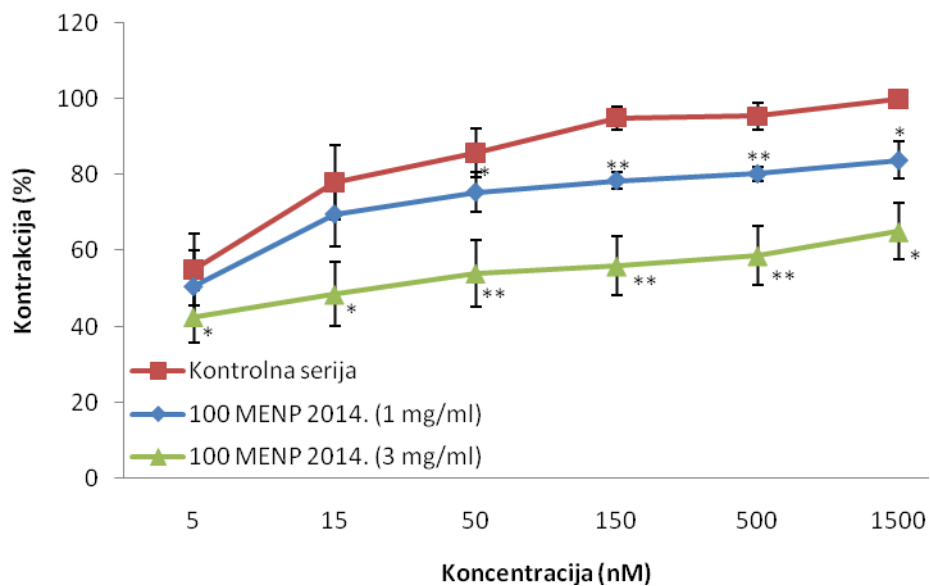
5.1.7. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom

5.1.7.1. Uticaj metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu

Stepen inhibicije ACh indukovanih kontrakcija ileuma pacova u svim ispitivanim uzorcima je najveći kod primene 3 mg/mL ekstrakta. (Slike 5.34 i 5.35). Pokazano je da postoje statistički značajne razlike u inhibiciji kontrakcija stimulisanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji 1 mg/mL, kao i u prisustvu ekstrakta u koncentraciji 3 mg/mL.



Slika 5.34. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2013. godine (100 MENP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

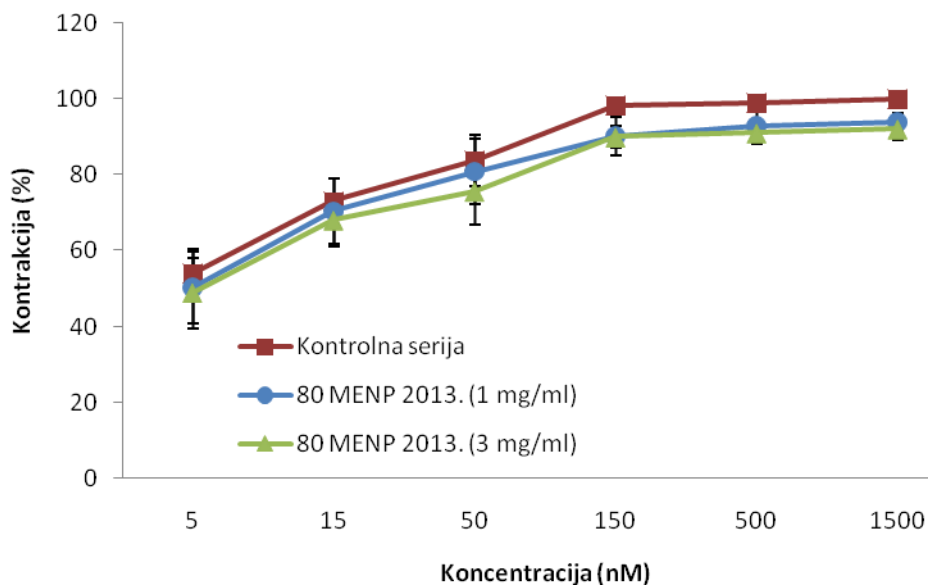


Slika 5.35. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2014. godine (100 MENP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

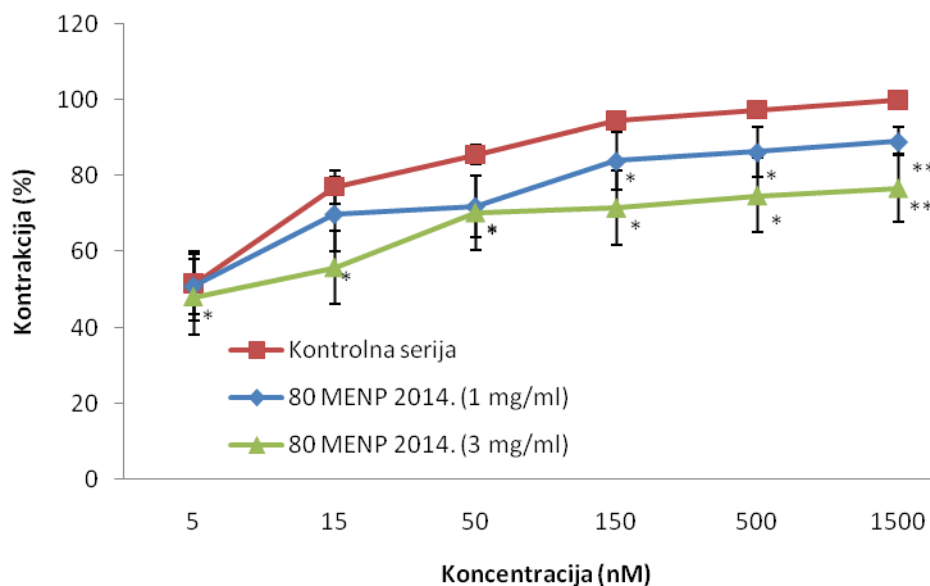
*-p<0,05, **-p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.7.2. Uticaj metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu

Na osnovu podataka iz 2013. i 2014. godine evidentno je da u prisustvu ekstrakta u koncentraciji 1 mg/mL, a pogotovo u koncentraciji 3 mg/mL dolazi do značajne inhibicije kontrakcija stimulisanih ACh-om sa statističkom značajnošću u uzorcima iz 2014. godine (Slike 5.36 i 5.37).



Slika 5.36. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta nezrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2013. godine (80 MENP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

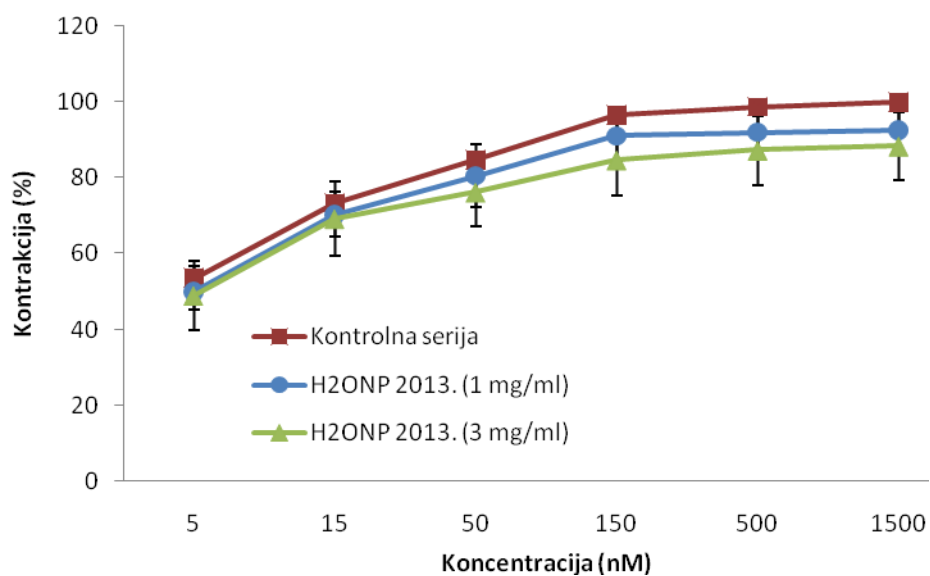


Slika 5.37. Inhibitorni uticaj metanolnog ekstrakta nezrelog ploda morača ekstrahovanog u 80% metanolu iz 2014. godine (80 MENP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

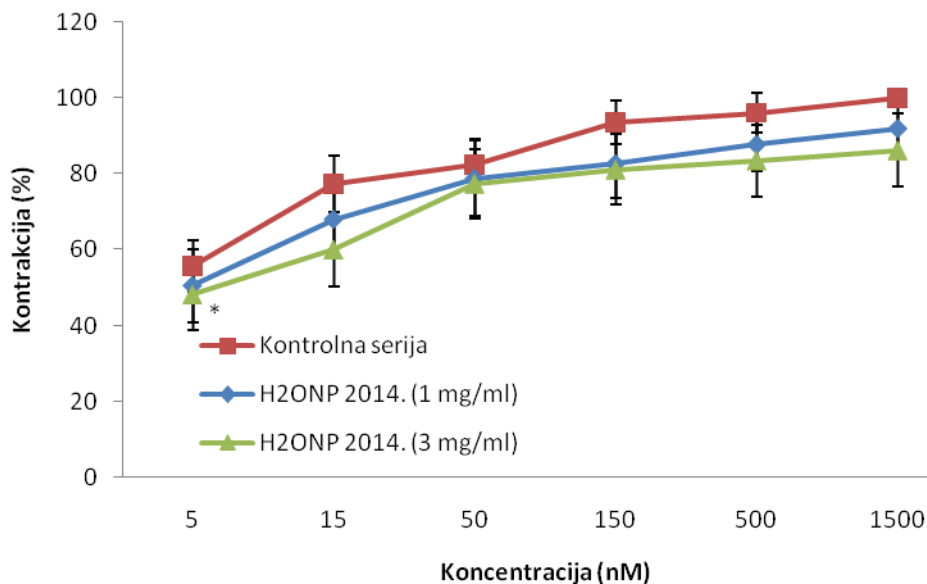
*- $p < 0,05$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzorak)

5.1.7.3. Uticaj vodenog ekstrakta nedozrelog ploda morača

Dodavanje ekstrakata u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL, dovodi do statistički značajne inhibicije kontrakcija stimuliranih ACh-om u 2014. godini ($p < 0,05$) (Slike 5.38 i 5.39).



Slika 5.38. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta nedozrelog ploda morača iz 2013. godine (H₂ONP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

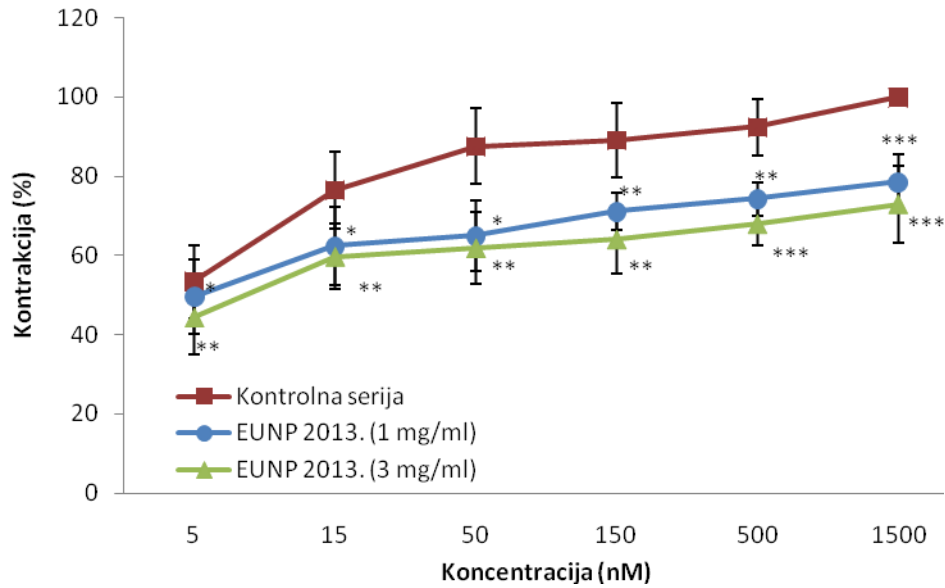


Slika 5.39. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta nedozrelog ploda morača iz 2014. godine (H₂ONP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

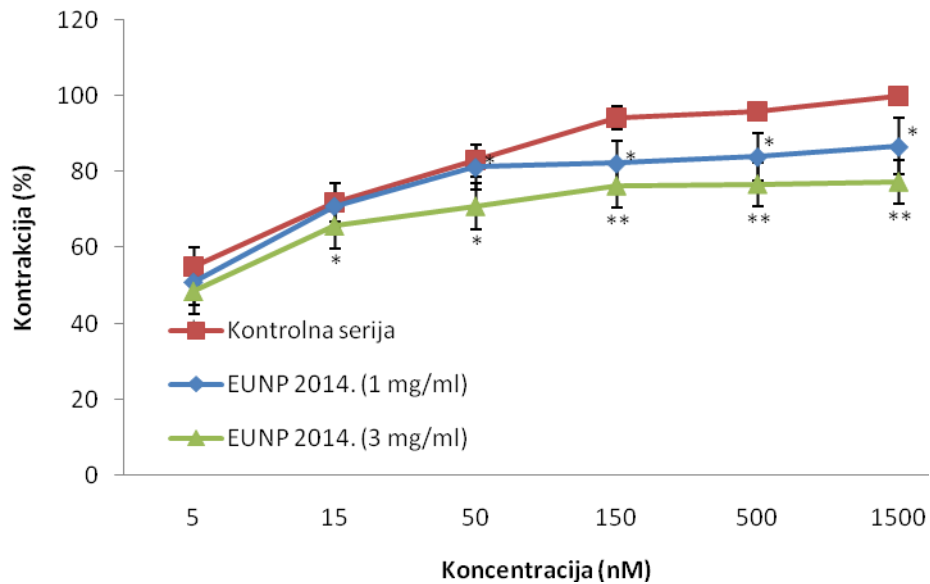
5.1.7.4. Uticaj etarskog ulja nedozrelog ploda morača

Najveća inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om je u prisustvu etarskog ulja u koncentraciji od 3 mg/mL (Slike 5.40 i 5.41). Statistički značajne inhibicije u prisustvu 1 mg/mL i 3 mg/mL etarskog ulja u odnosu na ACh prisutne su i 2013. i 2014. godine, ali su brojnije i većeg nivoa statističke značajnosti 2013. godine i to za sve koncentracije ACh.



Slika 5.40. Inhibitorni uticaj etarskog ulja nedozrelog ploda morača iz 2013. godine (EUNP 2013.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01, ***-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)



Slika 5.41. Inhibitorni uticaj etarskog ulja nedozrelog ploda morača iz 2014. godine (EUNP 2014.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*-p<0,05, **-p<0,01, (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U naredne četiri tabele date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova stimulisanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača (100 % metanolni, 80 % metanolni i vodeni) iz 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL u odnosu na kontrolu, za različite koncentracije ACh, kao i rezultati poređenja između godina u kojima su pripremani uzorci.

Tabela 5.11. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu 100 % metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača iz 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh		1 mg/mL ekstrakta		3 mg/mL ekstrakta	
	2013.	2014.	2013.	2014.	2013.	2014.
5	54,38	55,02	47,47	61,55	43,72	42,61
15	73,95	78,02	68,21	69,70	61,80	48,58
50	86,57	85,80	70,53	75,50	68,02	54,10
150	97,52	95,01	90,29	78,57	77,43	56,00
500	99,3	95,44	90,48	80,33	79,45	58,74
1500	100	100,00	91,27	83,87	80,14	65,05

Srednja vrednosti inhibicije kontrakcija stimulisanih ACh-om u prisustvu 1 mg/mL i 3 mg/mL 100% metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača veća je 2014. no 2013. godine.

Tabela 5.12. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu 80 % metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača iz 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh		1 mg/mL ekstrakta		3 mg/mL ekstrakta	
	2013.	2014.	2013.	2014.	2013.	2014.
5	53,90	51,49	50,31	50,95	48,92	48,06
15	73,06	77,05	70,46	69,67	68,06	55,86
50	83,78	85,57	80,90	71,99	75,63	70,34
150	98,17	94,48	90,18	83,95	90,00	71,59^{b*}
500	98,90	97,33	92,96	86,29	91,03	74,90^{b*}
1500	100,00	100,00	93,94	89,08	92,11	76,80

b – vs 2013.

* – p<0,05, (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om veće su 2014. no 2013. godine u prisustvu i 1 mg/mL i 3mg/mL 80% metanolnog ekstrakta nezrelog ploda morača.

Tabela 5.13. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu vodenog ekstrakta nedozrelog ploda morača iz 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh		1 mg/mL ekstrakta		3 mg/mL ekstrakta	
	2013.	2014.	2013.	2014.	2013.	2014.
5	53,47	55,72	50,05	50,50	48,91	48,30
15	73,42	77,38	70,42	68,03	69,22	60,12
50	84,74	82,51	80,62	78,83	76,19	77,47
150	96,57	93,54	91,18	82,69	84,71	81,21
500	98,74	96,01	92,12	87,79	87,28	83,58
1500	100,00	100,00	92,70	92,04	88,37	86,25

Inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om veće su 2013. no 2014. godine u prisustvu 3 mg/mL 80% metanolnog ekstrakta nezrelog ploda morača, ali nema statistički značajnih razlika.

Tabela 5.14. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu etarskog ulja nedozrelog ploda morača iz 2013. i 2014. godine u koncentraciji od 1 mg/mL i 3 mg/mL- rezultati analize između godina

Konc. (nM)	ACh		1 mg/mL etarskog ulja		3 mg/mL etarskog ulja	
	2013.	2014.	2013.	2014.	2013.	2014.
5	53,38	55,06	49,64^{c*}	50,87	44,27^{c*}	48,50
15	76,49	72,02	62,39	70,99	59,66	65,75
50	87,53	82,99	64,98	71,26	61,81	70,93
150	89,10	94,21	71,16^{c*}	82,27	64,00	76,34
500	92,40	95,98	74,32^{c*}	84,01	67,92	76,73
1500	100,00	100,00	78,58	86,72	72,95	77,34

c – vs 2014.

* – p<0,05, ** – p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

Inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om veće su 2013. no 2014. godine.

U Tabeli 5.15. date su srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja nedozrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja. Najveće vrednosti inhibicije su u prisustvu etarskog ulja nedozrelog ploda morača (za koncentraciju 0,1 mg/mL) i metanolnog ekstrakta ekstrahovanog u apsolutnom metanolu (za koncentraciju 3 mg/mL). Ove vrednosti inhibicije kontrakcija indukovanih ACh-om su statistički značajno veće nego u prisustvu vodenog i 80% metanolnog ekstrakta nedozrelog ploda morača ($p < 0,05$).

Tabela 5.15. Srednje vrednosti % kontrakcija ileuma pacova indukovanih ACh-om u prisustvu ekstrakata i etarskog ulja nedozrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja

Metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	Ach	Ach+0,1 mL	Ach+0,3 mL
5	54,71± 0,45	49,01± 2,18	43,17± 0,78 ^{c*}
15	75,99± 2,88	68,96± 1,05	55,19± 9,35 ^{c*}
50	86,19± 0,54	73,01± 3,51	58,59± 9,84 ^{c*}
150	95,64± 2,73	81,50± 6,14	61,36± 9,82 ^{c*}
500	96,40± 3,38	82,87± 5,29	63,92± 9,56 ^{c*}
1500	100,00± 0,00	85,72± 5,41	68,82± 8,22 ^{c*}
Metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača ekstrahovan u 80% metanolu u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	Ach	Ach+0,1 mL	Ach+0,3 mL
5	53,69± 0,30	50,50± 0,64	48,49± 0,60
15	73,24± 0,25	70,20± 0,32	62,54± 9,44
50	84,26± 0,68	76,31± 6,10	73,27± 4,13
150	95,53± 2,52	85,73± 7,12	76,85± 7,15
500	97,78± 1,07	88,19± 6,53	79,51± 7,48
1500	100,00± 0,00	90,47± 3,96	81,18± 8,54
Vodeni ekstrakt nedozrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	Ach	Ach+0,1 mL	Ach+0,3 mL
5	54,55± 1,65	50,07± 0,61	46,29± 2,85
15	76,94± 0,63	65,21± 3,99	59,89± 0,32
50	85,02± 3,55	71,99± 9,79	69,04± 10,42
150	94,55± 4,69	85,52± 8,79	82,38± 9,26
500	96,92± 4,33	89,23± 6,51	84,81± 9,55
1500	100,00± 0,00	92,26± 6,80	86,95± 9,24
Etarsko uljaje nedozrelog ploda morača u trogodišnjem periodu ispitivanja			
Koncentracija (nM)	Ach	Ach+0,1 mL	Ach+0,3 mL
5	54,22± 1,19	50,26± 0,87	46,39± 2,99
15	74,26± 3,16	66,69± 6,07	62,70± 4,30
50	85,26± 3,21	68,12± 4,44 ^{b*}	66,37± 6,45
150	91,01± 8,41	75,33± 7,49 ^{b*}	69,29± 9,59
500	93,75± 5,72	77,96± 6,80 ^{b*c**}	71,69± 6,92
1500	100,00± 0,00	81,63± 7,81 ^{bc*}	74,83± 7,96

Vrednosti u tabeli su prikazane kao X ± SD (Me)

^b– vs metanolni 80% ekstrakt, ^c– vs vodeni ekstrakt

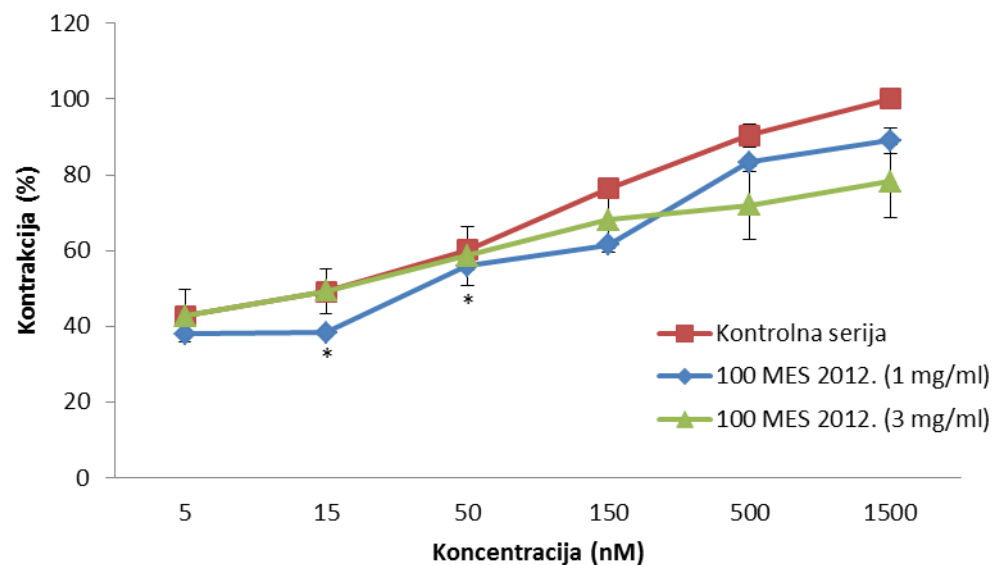
* – p<0,05, ** – p<0,01 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.8. Uticaj ekstrakata stabljike morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane acetilholinom

5.1.8.1. Uticaj metanolnog ekstrakta stabljike morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu

Postoji statistički značajna inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 1 i 3 mg/mL, kako za koncentraciju ACh od 15 nM ($p < 0,01$), tako i za koncentraciju od 150 nM ($p < 0,05$).

Za koncentracije ACh od 500 i 1500 nM dobijaju se očekivani rezultati koji ukazuju na inhibiciju kontrakcija stimulisanih ACh-om, iako nisu utvrđene statistički značajne razlike u odnosu na ACh (Slika 5.42).

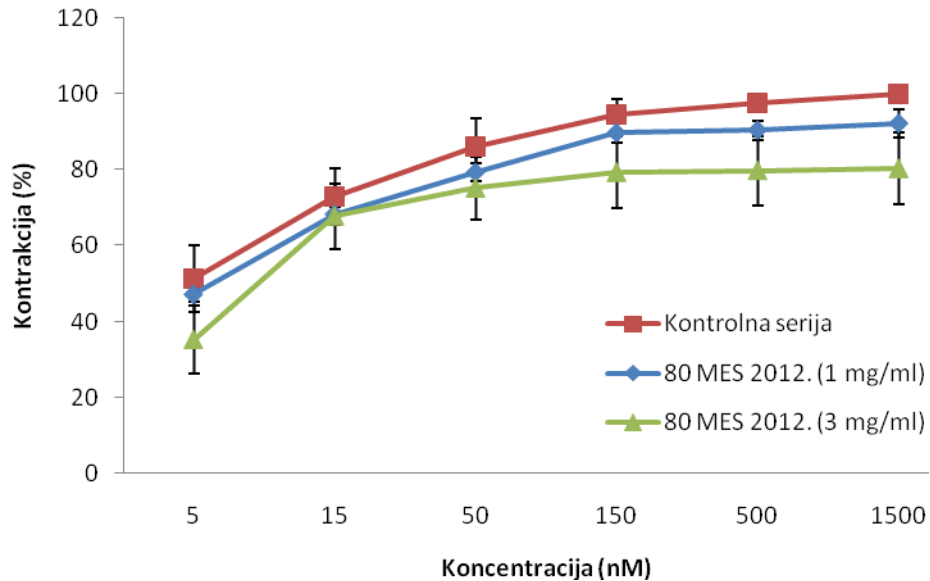


Slika 5.42. Inhibitorni uticaj 100 % metanolnog ekstrakta stabljike morača iz 2012. godine (100 MES 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

*- $p < 0,05$, (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.8.2. Uticaj metanolnog ekstrakta stabljike morača ekstrahovanog u 80% metanolu

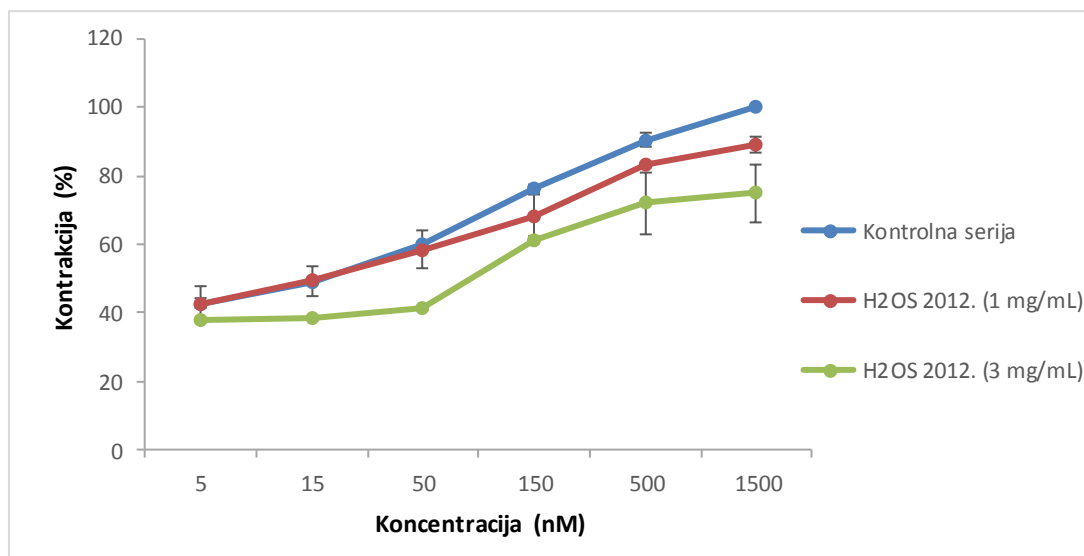
Najveća inhibicija kontrakcija stimulisanih ACh-om je u prisustvu ekstrakta u koncentraciji 3 mg/mL, ali nema statistički značajnih razlika u odnosu na koncentraciju ekstrakta (Slika 5.43).



Slika 5.43. Inhibitorni uticaj 80 % metanolnog ekstrakta stabljike morača iz 2012. godine (80 MES 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

5.1.8.3. Uticaj vodenog ekstrakta stabljike morača

Evidentno je da su u prisustvu vodenog ekstrakta i u koncentraciji od 1 mg/mL i od 3 mg/mL inhibirane kontrakcije stimulisane ACh-om, ali smanjenje nije statistički značajno (Slika 5.44).



Slika 5.44. Inhibitorni uticaj vodenog ekstrakta stabljike morača iz 2012. godine (H₂OS 2012.) na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

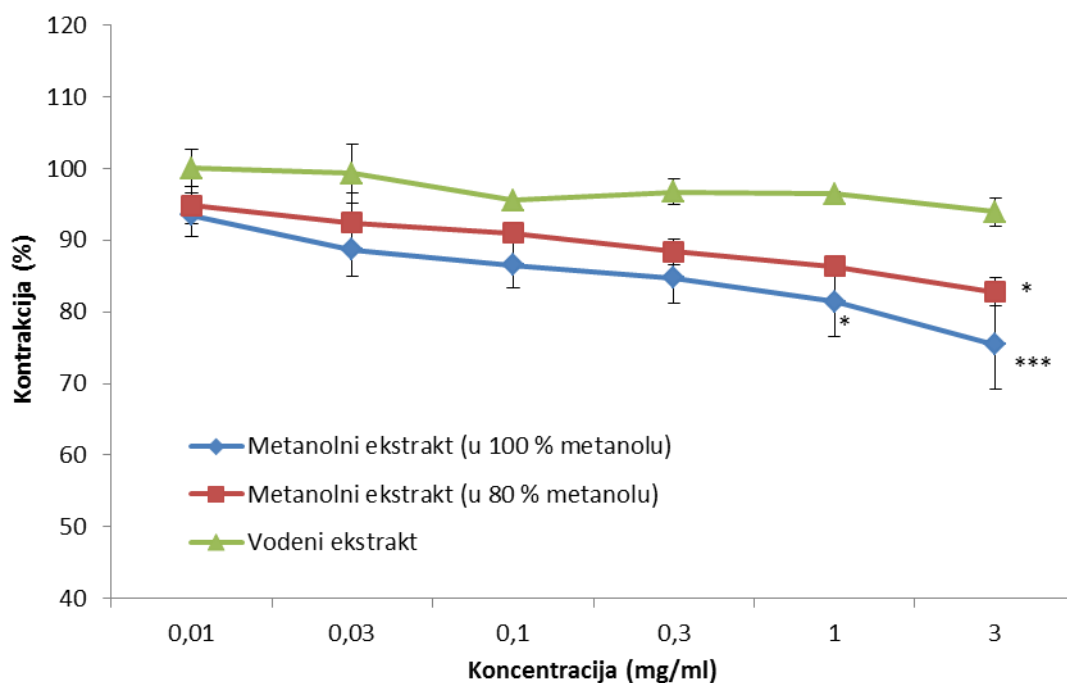
5.1.9. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata lista morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida

5.1.9.1. Ekstrakti lista morača iz 2012. godine

Analizom varijanse u okviru ispitivanih ekstrakata utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije kod 100% i 80% metanolnih ekstrakata ($p < 0,001$ i $p < 0,05$, respektivno). Post Hoc analizom u okviru ispitivanih tipova ekstrakata, poređenjem različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je da su kod svih tipova ekstrakata najveće inhibicije pri najvećim koncentracijama ekstrakata. Statistički značajne razlike inhibicija između koncentracija najbrojnije su kod 100% metanolnog ekstrakta, i to između najveće i najniže koncentracije i najniže tri koncentracije, s tim da nivo razlike raste što je razlika u koncentracijama niža ($p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$), dok kod 80% metanolnog ekstrakta postoji samo razlika između najviše i najniže koncentracije ($p < 0,05$).

Poređenjem inhibicija kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida za određene koncentracije između različitih ekstrakata, Studentovim t-testom, utvrđene su statistički značajno više inhibicije 100% metanolnog u odnosu na vodeni ekstrakti za sve koncentracije osim najniže, dok je za 80% metanolni ekstrakt u odnosu na vodeni utvrđena statistički značajna razlika za koncentraciju od 1 mg/mL.

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $75,43 \pm 6,3\%$ sa $EC_{50} = 8,15 \pm 0,22$ mg/mL. Najslabiji efekat je pokazao vodeni ekstrakt (Slika 5.45).



Slika 5.45. Inhibitorni efekat ekstrakata lista morača iz 2012. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

*- $p < 0,5$, ***- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

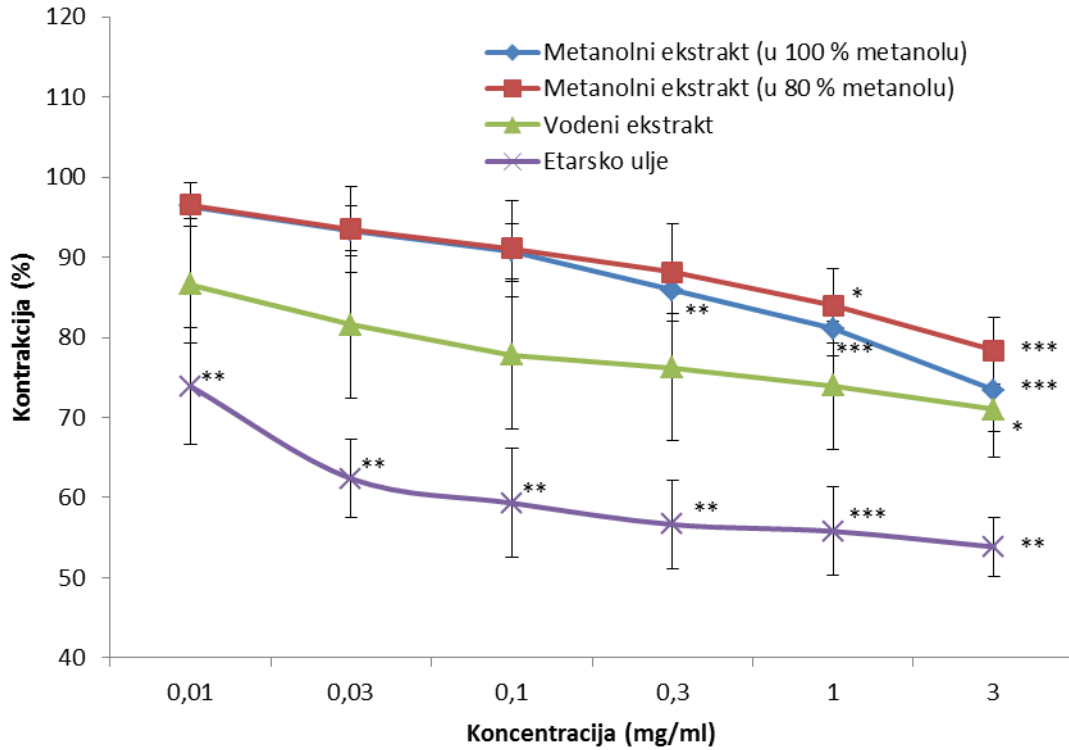
5.1.9.2. Etarsko ulje i ekstrakti lista morača iz 2013. godine

U okviru primenjenih ekstrakata, inhibicija raste sa povećanjem njihove koncentracije, a analizom varijanse utvrđena je statistički značajna zavisnost vrednosti inhibicije od koncentracije kod 100% i 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,001$) i vodenog ekstrakta ($p < 0,05$).

Izdvađa se, kao najznačajnija statistički veća vrednost inhibicije kod 100% metanolnog ekstrakta u koncentraciji od 3 mg/mL u odnosu na sve niže koncentracije ($p < 0,001$).

Analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između ispitivanih tipova ekstrakata u okviru određenih koncentracija. Post Hoc analizom je utvrđeno da su inhibicije pri svim koncentracijama statistički značajno više kod etarskog ulja u odnosu na tri ostala tipa ekstrakata ponaosob. Jedino nepostojanje statistički značajne razlike je pri najnižoj koncentraciji uzoraka.

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $53,85 \pm 3,7\%$ sa $EC_{50} = 3,56 \pm 0,03$ mg/mL (Slika 5.46).



Slika 5.46. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata lista morača iz 2013. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

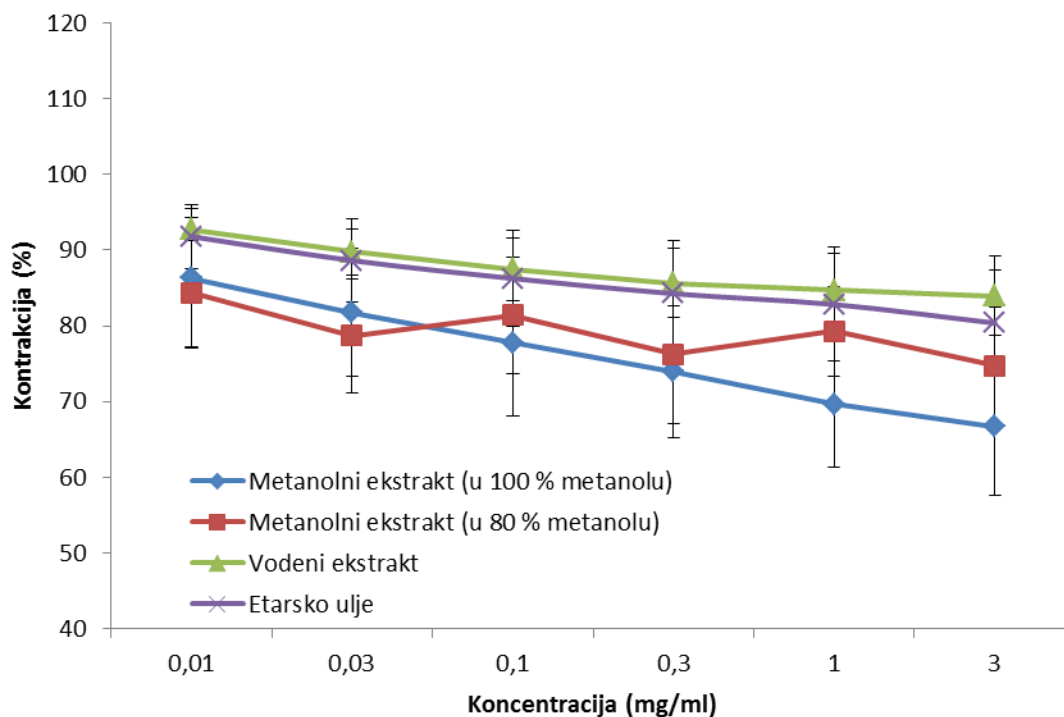
*-p<0,5, **-p<0,01, ***-p<0,001 (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.9.3. Etarsko ulje i ekstrakti lista morača iz 2014. godine

U okviru svih uzoraka inhibicija kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida raste sa povećanjem njihove koncentracije, ali ni analizom varijanse, kao ni sledstvenom Post Hoc analizom nije potvrđena statistički značajna razlika vrednosti tih inhibicija između koncentracija.

Takođe, evidentno je da su inhibicije najveće kod 100% metanolnog ekstrakata za koncentracije od 0,1, 0,3, 1 i 3 mg/mL, a kod 80% metanolnog ekstrakta za koncentracije od 0,01 i 0,03 mg/mL, ali analizom varijanse, kao ni sledstvenom Post Hoc analizom nisu nađene statistički značajne razlike između uzoraka iz 2014. godine.

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $66,70 \pm 9,0\%$ sa $EC_{50} = 5,88 \pm 0,11$ mg/mL (Slika 5.47).



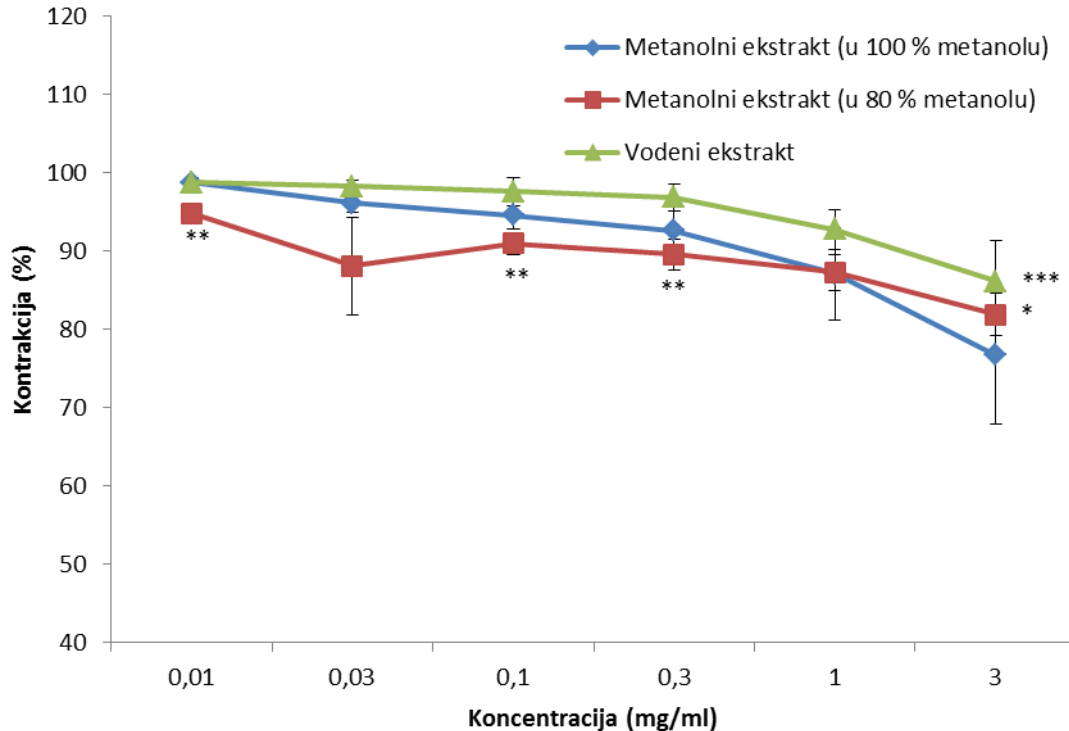
Slika 5.47. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata lista morača iz 2014. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

5.1.10. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida

5.1.10.1. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2012. godine

U slučaju uzoraka ekstrakata zrelog ploda morača iz 2012. godine utvrđeno je da inhibicija kontrakcija stimuliranih rastvorom kalijum-hlorida raste sa porastom koncentracije sva tri tipa ekstrakata, a Analizom varijanse u okviru ispitivanih ekstrakata utvrđena je statistički značajna razlika vrednosti inhibicije kod 80% metanolnog ($p < 0,05$) i vodenog ($p < 0,001$) ekstrakta. Post Hoc analizom u okviru ovih tipova ekstrakata utvrđeno je da kod 80% metalnog ekstrakta statistički značajno veća inhibicija pri koncentraciji 3mg/mL no pri 0,01mg/mL ($p < 0,05$). Kod vodenih ekstrakata pri maksimalnoj koncentraciji je postignuta inhibicija statistički značajno veća u odnosu na koncentraciju od 0,01mg/mL ($p < 0,001$), kao i u odnosu na koncentracije od 0,03, 0,1 i 0,3 mg/mL ($p < 0,01$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma stimulirane rastvorom kalijum-hlorida na $76,70 \pm 8,9\%$ sa $EC_{50} = 6,87 \pm 0,06$ mg/mL (Slika 5.48).



Slika 5.48. Inhibitorski efekat ekstrakata zrelog ploda morača iz 2012. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

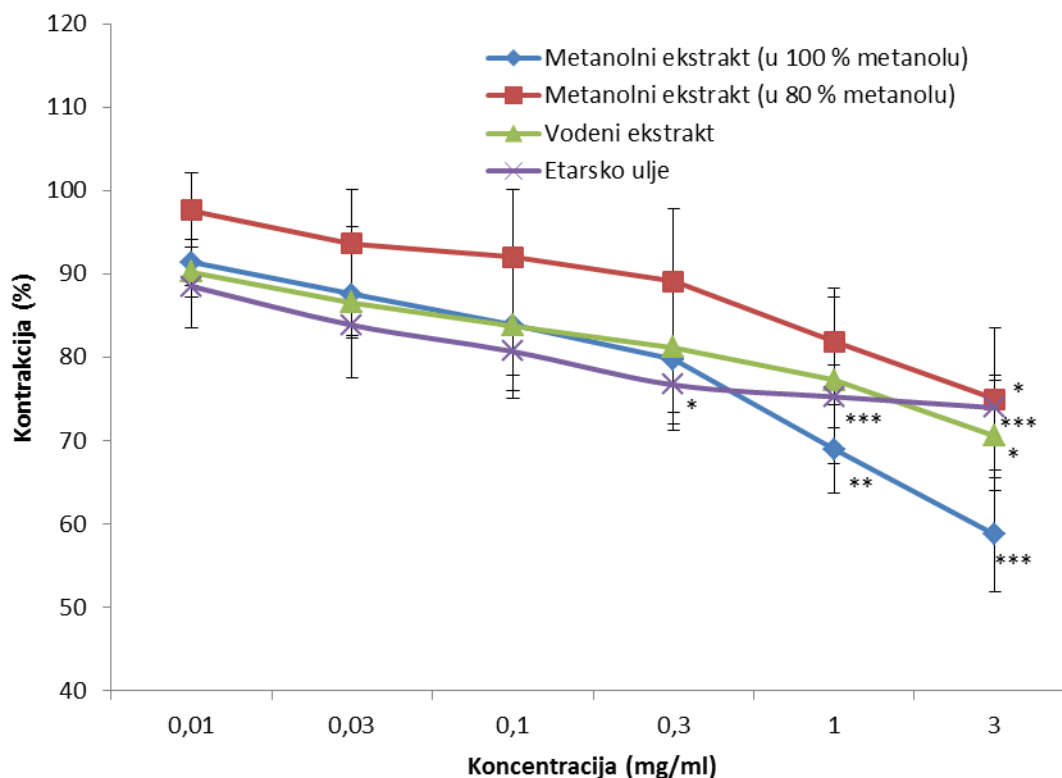
*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.10.2. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2013. godine

Kod svih primenjenih uzoraka, inhibicija kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida raste sa povećanjem njihove koncentracije, a najveće inhibicije ostvarene su etarskim uljem u koncentraciji od 0,01, 0,03, 0,1 i 0,3 mg/mL, a 100% metanolnim ekstraktom u koncentraciji od 1 i 3 mg/mL. Analizom varijanse je kod etarskog ulja i 100% metanolnog ekstrakta utvrđena statistički značajna razlika maksimalnog nivoa između korišćenih koncentracija ($p < 0,001$), ali ona je postojala i kod 80% metanolnog i vodenog ekstrakta na nivou statističke značajnosti od $p < 0,05$.

Analizom varijanse je pri maksimalnoj koncentraciji od 3 mg/mL utvrđena statistički značajna razlika između tipova ekstrakata ($p < 0,05$) pri čemu je inhibicija 100% metanolnog ekstrakta statistički značajno viša no 80% metanolnog ili etarskog ulja ($p < 0,05$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida $58,75 \pm 6,8\%$ sa $EC_{50} = 3,63 \pm 0,04$ mg/mL (Slika 5.49).



Slika 5.49. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača iz 2013. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

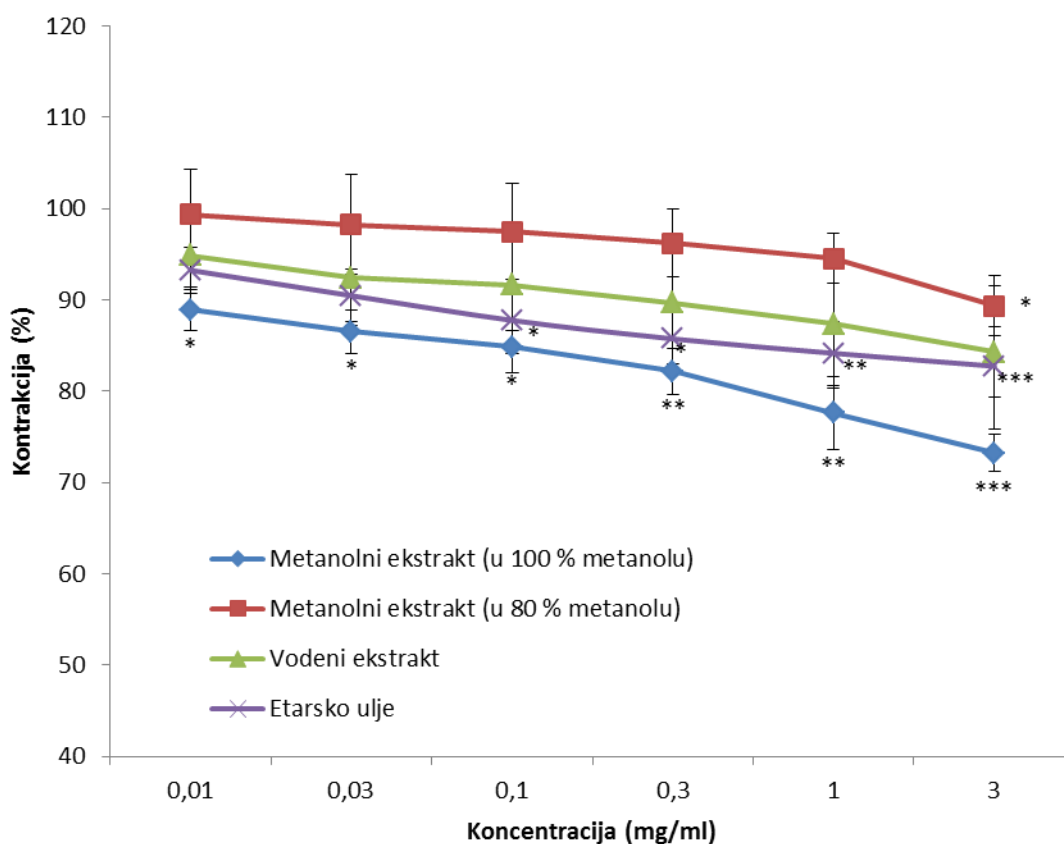
*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.10.3. Etarsko ulje i ekstrakti zrelog ploda morača iz 2014. godine

Kod svih tipova uzoraka inhibicija kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida raste sa povećanjem njihove koncentracije. Analizom varijanse utvrđena je statistički značajna razlike vrednosti inhibicije u odnosu na koncentracije kod 100% metanolnog ekstrakta, etarskog ulja ($p < 0,001$) i 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,05$). Post Hoc analizom utvrđene su statistički značajne razlike između pojedinih koncentracija ponaosob i to kod 100% metanolnog ekstrakta i kod etarskog ulja sa nivoima značajnosti (Slika 5.50)

Analizom varijanse, takođe je utvrđena statistički značajna razlika vrednosti inhibicije između tipova uzoraka koja je za koncentracije 0,01, 0,03 i 0,1 mg/mL $p < 0,05$, a kod svih viših koncentracija na nivou statističke značajnosti od $p < 0,01$. Najviše inhibicije su kod 100% metanolnog ekstrakta, a posle njih sledi etarsko ulje. Post Hoc analizom utvrđeno je da su prvenstveno ove inhibicije statistički značajno veće od onih kod 80% metanolniog ekstrakta.

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizio kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $73,20 \pm 2,0\%$ sa $EC_{50} = 7,79 \pm 0,11$ mg/mL.



Slika 5.50. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata zrelog ploda morača iz 2014. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

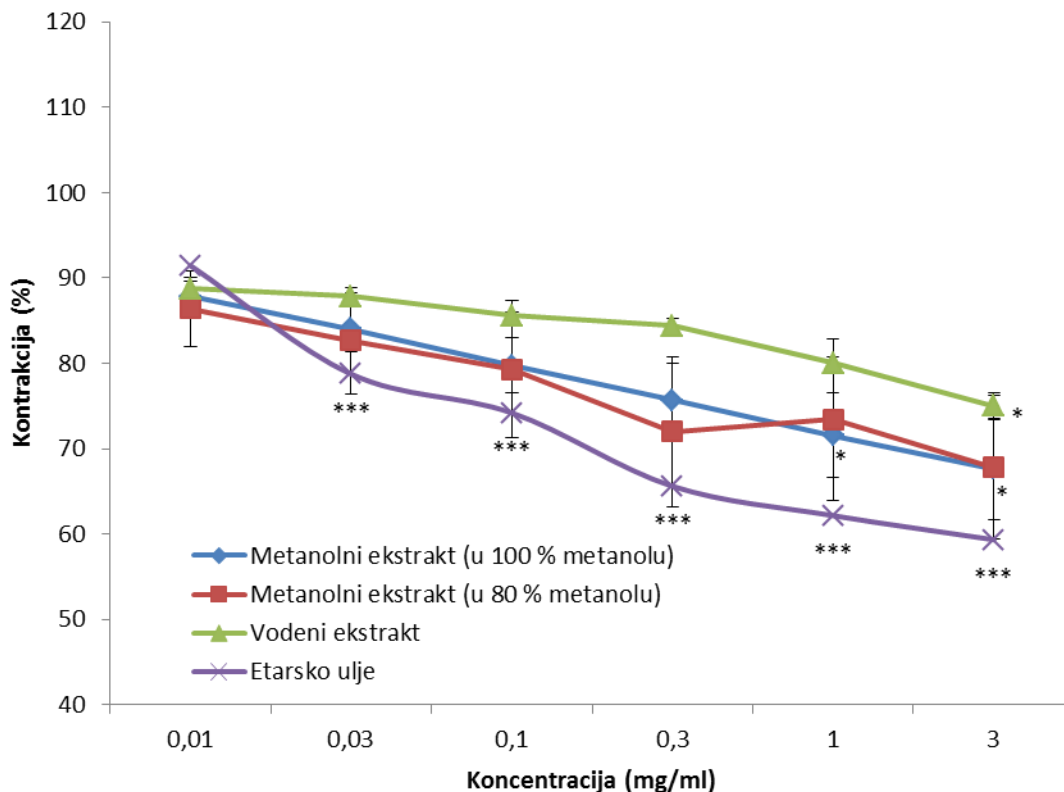
*- $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.11. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida

5.1.11.1. Etarsko ulje i ekstrakti nedozrelog ploda morača iz 2013. godine

Kod svih tipova uzoraka sa porastom koncentracije dolazi do povećanja inhibicije kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida. Analizom varijanse u okviru ispitivanih uzoraka utvrđena je statistički značajna razlika inhibicije u odnosu na koncentraciju kod etarskog ulja sa maksimalnim nivoom statističke značajnosti od ($p < 0,001$), ali i kod 100% metanolnog i vodenog ekstrakta ($p < 0,05$). Post Hoc analizom u okviru ispitivanih uzoraka, poređenjem različitih koncentracija ponaosob, utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika koje su najprisutnije kod etarskog ulja (Slika 5.51).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $59,34 \pm 1,36\%$ sa $EC_{50} = 3,80 \pm 0,17$ mg/mL.



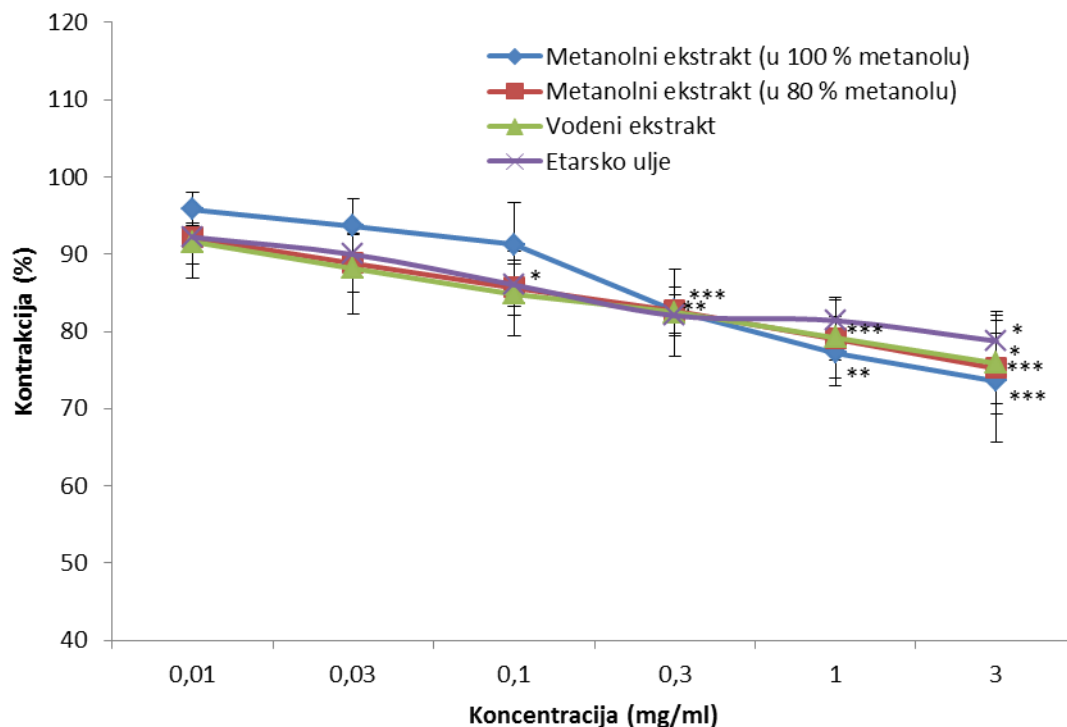
Slika 5.51. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača iz 2013. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

*- $p < 0,5$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.11.2. Etarsko ulje i ekstrakti nedozrelog ploda morača iz 2014. godine

Kod svih uzoraka sa porastom koncentracije dolazi do povećanja inhibicije kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida. Analizom varijanse u okviru ispitivanih ekstrakata utvrđena je statistički značajna razlika inhibicije u odnosu na koncentraciju kod 100% i 80% metanolnog ekstrakta sa maksimalnim nivoom statističke značajnosti od ($p < 0,001$), a kod vodenog ekstrakta i etarskog ulja sa nižim nivoom značajnosti ($p < 0,05$). Post Hoc analizom u okviru ispitivanih tipova ekstrakata, poređenjem različitih koncentracija ponaosob utvrđeno je postojanje statistički značajnih razlika (Slika 5.52).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $73,57 \pm 7,9\%$ sa $EC_{50} = 6,16 \pm 0,24$ mg/mL.



Slika 5.52. Inhibitorni efekat etarskog ulja i ekstrakata nedozrelog ploda morača iz 2014. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

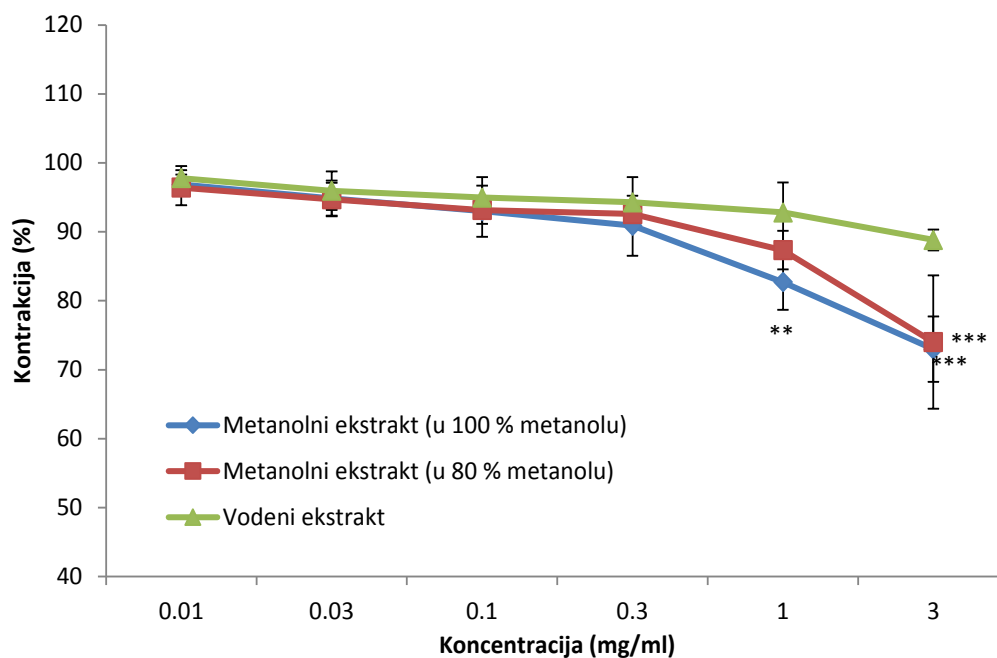
5.1.12. Uticaj ekstrakata stabljike morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalijum hlorida

5.1.12.1. Ekstrakti stabljike morača iz 2012. godine

Ekstrakte stabla morača imali smo samo u 2012. godini i to obe vrste metalnolnih i vodeni, Kod sva tri tipa uzorka evidentan je porast inhibicije kontrakcija stimulisanih rastvorom kalijum-hlorida sa porastom koncentracije, a analizom varijanse je dokazana statistički značajna razlika između nevedenih koncentracija kod 100% i 80% metanolnog ekstrakta ($p < 0,001$), a Post Hoc analizom i statistički značajne razlike između koncentracija ponaosob (Slika 5.53).

Pri koncentraciji od 0,01 i 0,03mg/mL najveću inhibiciju ostvario je 80% metanolni ekstrakt, a pri svim ostalih koncentracijama 100% metanolni ekstrakti. Jedina statistički značajna razlika utvrđena je pri koncentraciji od 3 mg/mL između 100% metanolnog i vodenog ekstrakta ($p < 0,05$).

U ispitivanoj grupi najbolji efekat je pokazao 100% metanolni ekstrakt koji je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije ileuma stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $72,97 \pm 4,7\%$ sa $EC_{50} = 5,88 \pm 0,05$ mg/mL.

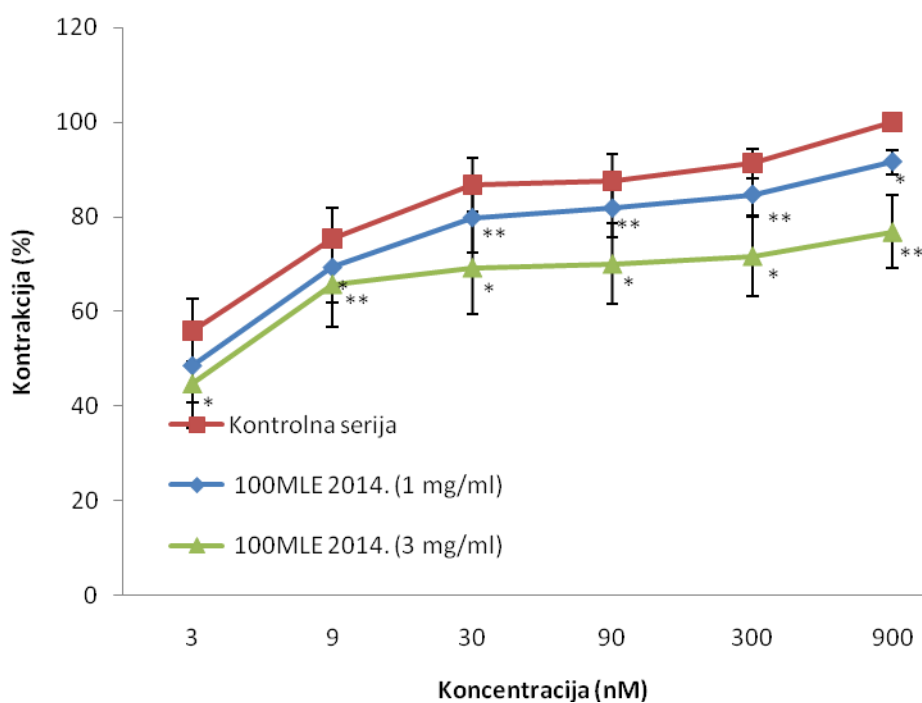


Slika 5.53. Inhibitorni efekat ekstrakata stabljike morača iz 2012. godine na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM)

** $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

5.1.13. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom kalcijum-hlorida

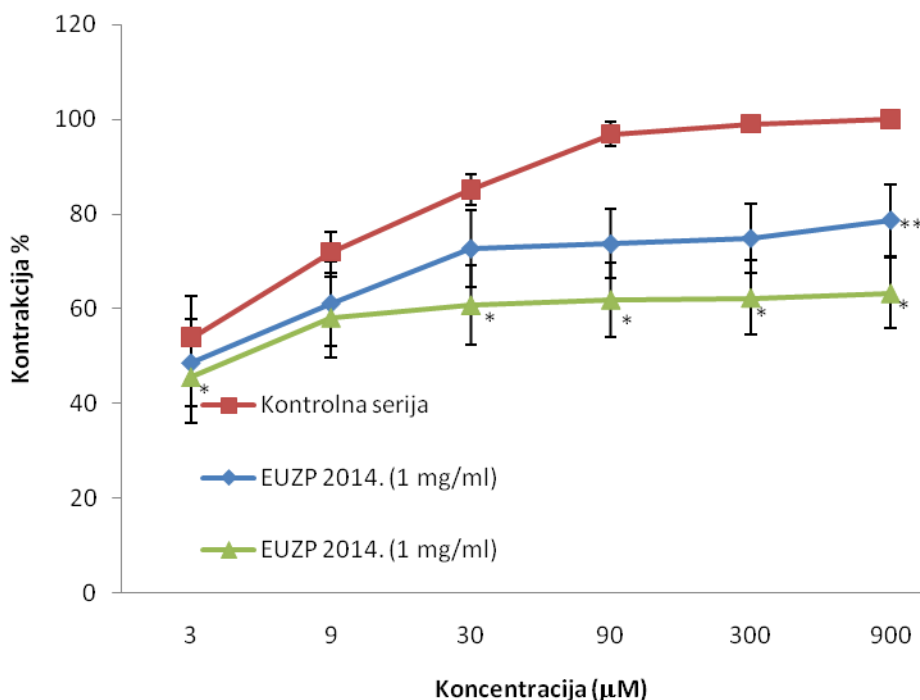
Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanijh kontrakcija ileuma pacova u toj godini.



Slika 5.54. Inhibitorni efekat metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2014. godine (100 MLE 2014.) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalcijum-hlorida

*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U odnosu na kontrolnu seriju utvrđene su statistički značajno veće vrednosti inhibicije u prisustvu etarskog ulja u koncentraciji 1 mg/mL za sve osim za najnižu koncentraciju rastvora kalcijum-hlorida, a u prisustvu etarskog ulja u koncentraciji od 3 mg/mL za sve koncentracije rastvora kalcijum-hlorida (Slika 5.54).



Slika 5.55. Inhibitorni efekat etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2014. godine (EUZP 2014.) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom kalcijum-hlorida

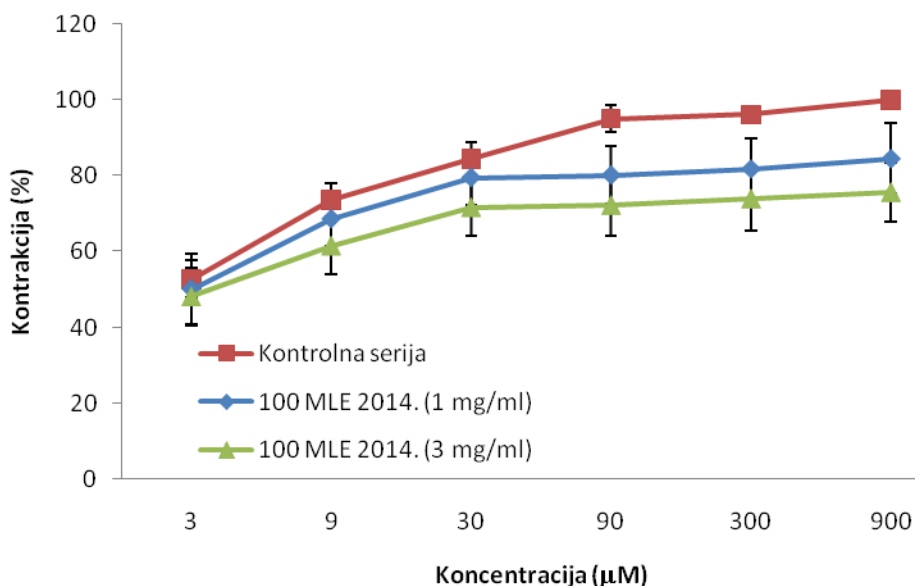
*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U odnosu na kontrolnu seriju utvrđene su statistički značajno veće vrednosti inhibicije kontrakcija izazvanih rastvorom kalcijum-hlorida u prisustvu 1 mg/mL ekstrakta za maksimalnu koncentraciju rastvora CaCl_2 (10 µM), a u prisustvu 3 mg/mL ekstrakta za sve koncentracije rastvora CaCl_2 ($p < 0,05$), izuzev za 0,1 µM (Slika 5.55).

U koncentraciji od 1 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt lista morača je snizio kontrakcije izazvane rastvorom kalcijum-hlorida na $91,52 \pm 2,55\%$, a etarsko ulje zrelog ploda morača u istoj koncentraciji na $78,66 \pm 7,51\%$. U koncentraciji od 3 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt je snizio kontrakcije izazvane rastvorom kalcijum-hlorida na $76,79 \pm 7,66\%$, a etarsko ulje u istoj koncentraciji na $63,25 \pm 7,39\%$.

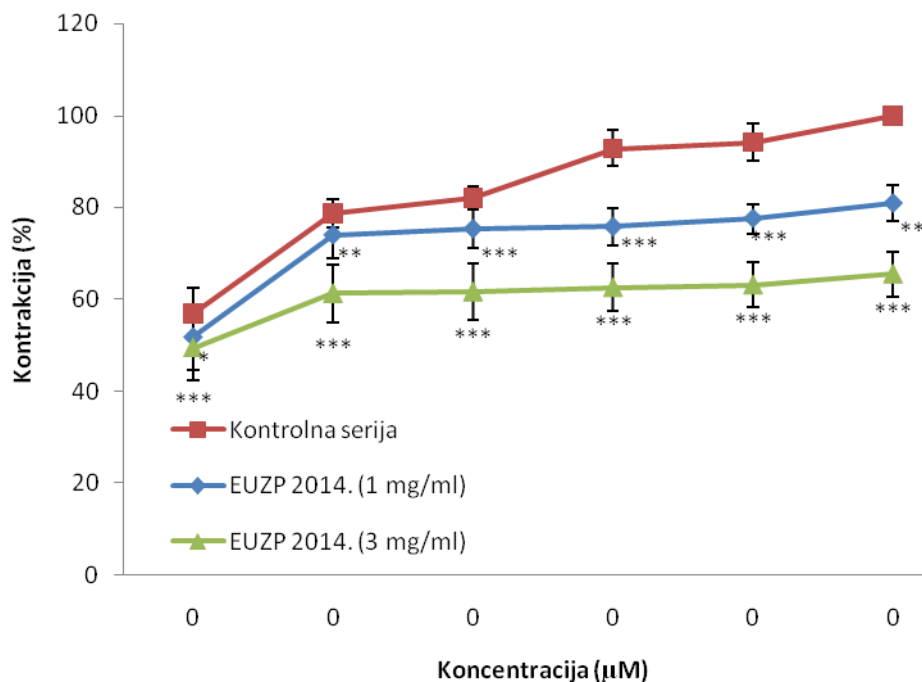
5.1.14. Uticaj etarskog ulja i ekstrakata morača na kontrakcije ileuma pacova izazvane rastvorom barijum-hlorida

Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanijih kontrakcija ileuma pacova u toj godini.



Slika 5.56. Inhibitorni efekat metanolnog ekstrakta lista morača ekstrahovanog u apsolutnom metanolu iz 2014. godine (100 MLE 2014.) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom barijum-hlorida

Iako je evidentno da inhibicija kontrakcija izazvanih rastvorom barijum-hlorida raste u prisustvu ekstrakta u koncentraciji 1mg/mL i 3 mg/mL, Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka nismo uspeli da utvrdimo postojanje statistički značajnih razlika između inhibicija (Slika 5.56).



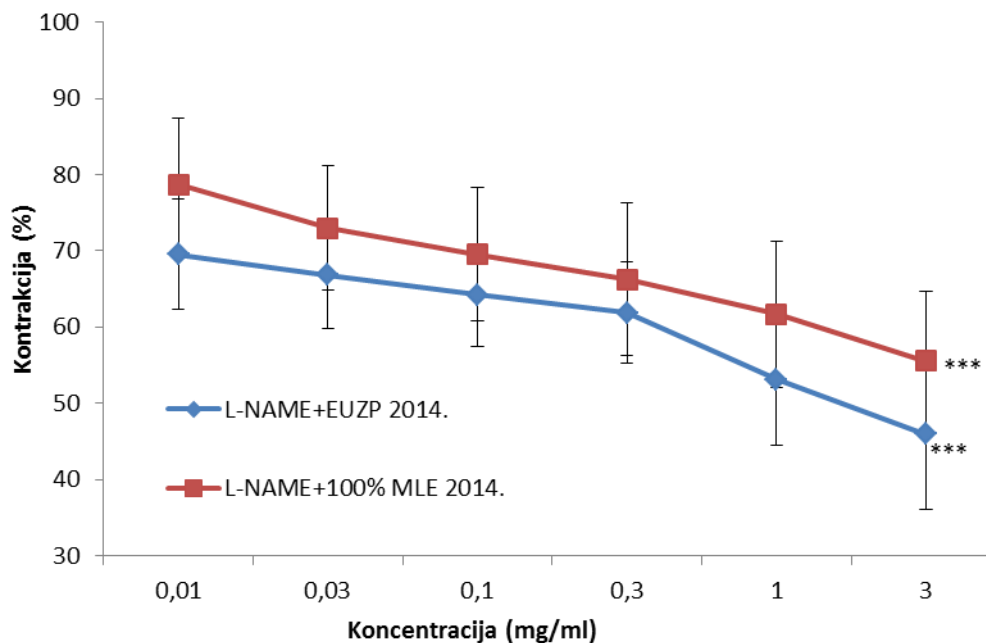
Slika 5.57. Inhibitorni efekat etarskog ulja zrelog ploda morača iz 2014. godine (EUZP 2014) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova stimulisane rastvorom barijum-hlorida

*- $p < 0,5$, **- $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$ (Studentov t-test nezavisnih uzoraka)

U odnosu na kontrolnu seriju utvrđene su statistički značajno veće vrednosti inhibicije kontrakcija izazvanih rastvorom barijum-hlorida u prisustvu etarskog ulja u koncentraciji od 1 mg/mL za sve koncentracije rastvora. U prisustvu etarskog ulja u koncentraciji od 3 mg/mL ostvarene su statistički značajno veće inhibicije u odnosu na kontrolnu seriju ($p < 0,001$) za sve koncentracije rastvora barijum hlorida, ali i u odnosu na 1 mg/mL etarskog ulja za sve koncentracije (Slika 5.57).

U koncentraciji od 1 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt lista morača je snizio kontrakcije izazvane rastvorom barijum-hlorida na $84,54 \pm 9,28\%$, a etarsko ulje zrelog ploda morača u istoj koncentraciji na $80,84 \pm 3,90\%$. U koncentraciji od 3 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt je snizio kontrakcije izazvane rastvorom barijum-hlorida na $75,61 \pm 7,86\%$, a etarsko ulje u istoj koncentraciji na $65,49 \pm 4,91\%$.

5.1.15. Procena kontraktilnosti ileuma pacova u uslovima primena etarskog ulja i ekstrakta morača i blokatora azot-oksida sinteze (L-NAME)



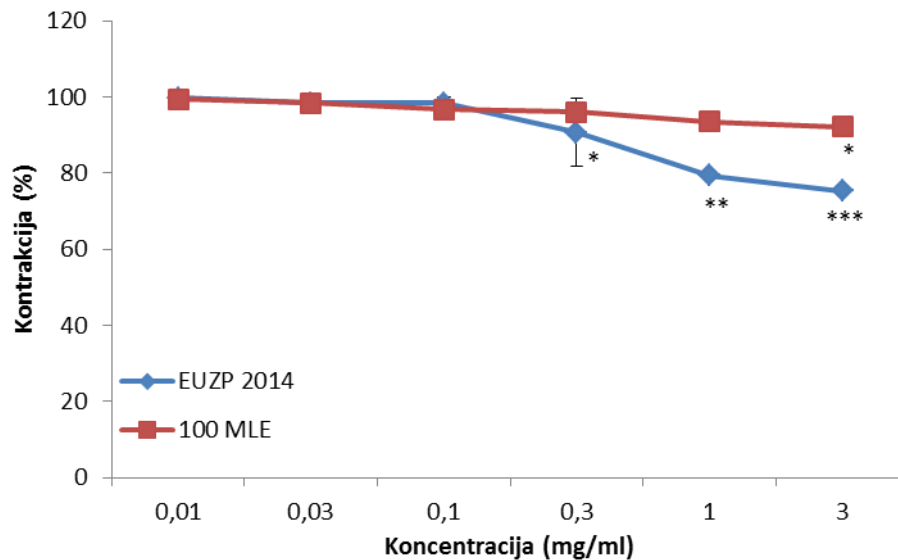
Slika 5.58. Efekat etarskog ulja i ekstrakta morača na kontrakcije izolovanog ileuma pacova u prisustvu L-NAME

***- $p < 0,001$

Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanijh kontrakcija ileuma pacova u toj godini.

I 100% metanolni ekstrakt lista morača i etarsko ulje zrelog ploda u prisustvu L-NAME značajno su inhibirali kontrakcije ileuma pacova. U koncentraciji od 1 mg/mL ekstrakt je snizio kontrakcije na $61,72 \pm 9,59$ % sa EC_{50} od $4,6 \pm 0,12$ mg/mL, a etarsko ulje na $53,14 \pm 8,73$ % sa EC_{50} od $3,6 \pm 0,03$ mg/mL. U koncentraciji od 3 mg/mL, ekstrakt je snizio kontrakcije na $55,52 \pm 9,21$ % sa EC_{50} od $3,75 \pm 0,04$ mg/mL, a etarsko ulje na $45,94 \pm 9,9$ % sa EC_{50} od $2,61 \pm 0,10$ mg/mL (Slika 5.58).

5.1.16. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na spontane kontrakcije izolovane traheje pacova



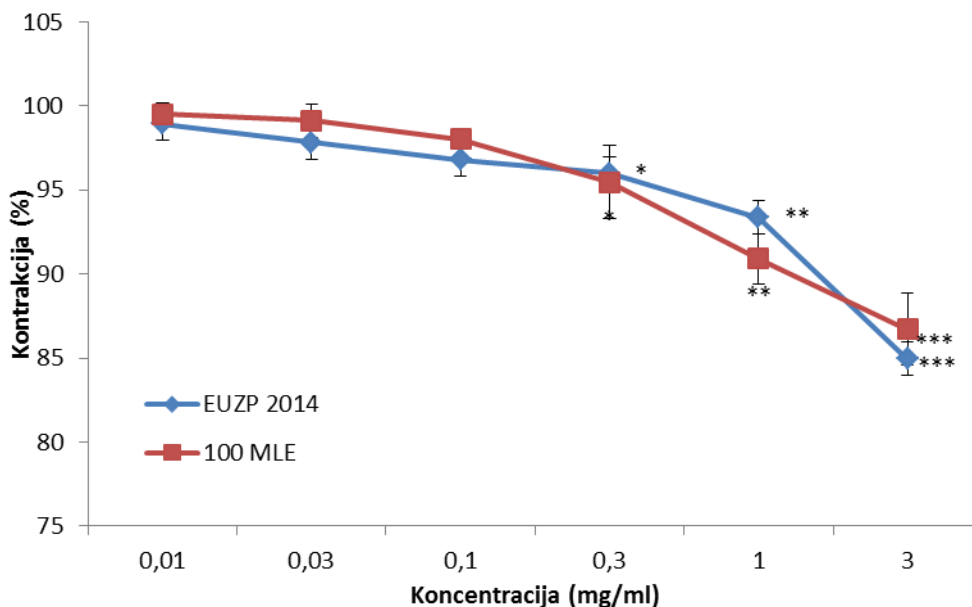
Slika 5.59. Efekat etarskog ulja i ekstrakta morača na spontane kontrakcije izolovane traheje pacova

*- $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, ***- $p < 0,001$

Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanih kontrakcija ileuma pacova u toj godini.

I 100 % metanolni ekstrakt lista morača i etarsko ulje zrelog ploda u su inhibirali kontrakcije traheje pacova, ali su efekti ekstrakta znatno slabiji u odnosu na etarsko ulje. U koncentraciji od 1 mg/mL ekstrakt je snizio kontrakcije na $93,52 \pm 0,25\%$, a etarsko ulje na $79,4 \pm 0,40\%$. U koncentraciji od 3 mg/mL, ekstrakt je snizio kontrakcije na $92,16 \pm 1,24\%$, a etarsko ulje na $75,34 \pm 0,54\%$ (Slika 5.59).

5.1.17. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane acetilholinom



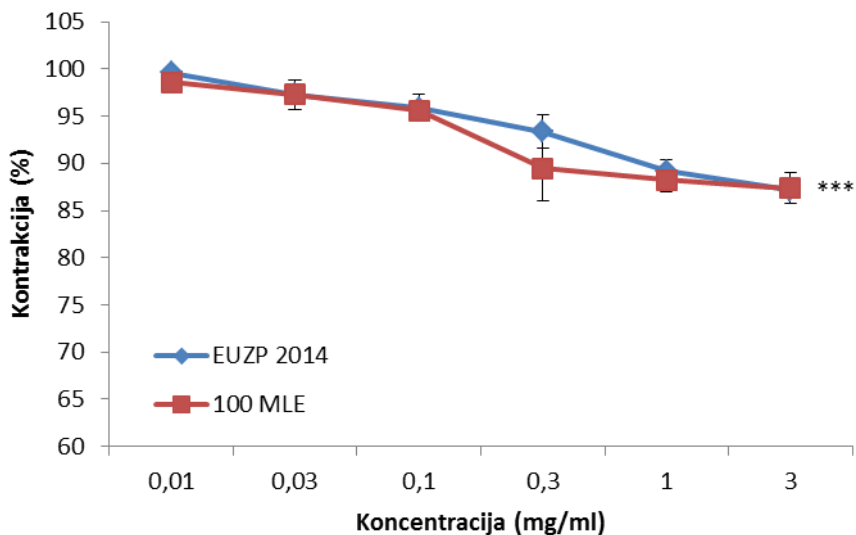
Slika 5.60. Efekat etarskog ulja i ekstrakta morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane acetilholinom

*-p<0,5, **p<0,01, ***-p<0,001

Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanijh kontrakcija ileuma pacova u toj godini.

I 100 % metanolni ekstrakt lista morača i etarsko ulje zrelog ploda u su inhibirali kontrakcije traheje pacova stimulisane ACh (1500 nM). U koncentraciji od 1 mg/mL ekstrakt je snizio kontrakcije na $90,91 \pm 1,48\%$, a etarsko ulje na $93,365 \pm 3,99\%$. U koncentraciji od 3 mg/mL, ekstrakt je snizio kontrakcije na $86,71 \pm 2,16\%$, a etarsko ulje na $84,95 \pm 2,41\%$ (Slika 5.60).

5.1.18. Uticaj ekstrakta i etarskog ulja morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane rastvorom kalijum-hlorida



Slika 5.61. Efekat etarskog ulja i ekstrakta morača na kontrakcije izolovane traheje pacova izazvane rastvorom kalijum-hlorida

***- $p < 0,001$

Za ovo ispitivanje pratili smo efekte jednog ekstrakta i jednog etarskog ulja morača iz 2014. godine koji su nam dali najveću relaksaciju spontanijih kontrakcija ileuma pacova u toj godini.

I 100% metanolni ekstrakt lista morača i etarsko ulje zrelog ploda u su inhibirali kontrakcije traheje pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida (80 mM). U koncentraciji od 1 mg/mL ekstrakt je snizio kontrakcije $88,25 \pm 1,28\%$, a etarsko ulje na $89,17 \pm 1,21\%$. U koncentraciji od 3 mg/mL, ekstrakt je snizio kontrakcije na $87,39 \pm 1,57\%$, a etarsko ulje na $87,13 \pm 0,30\%$ (Slika 5.61).

5.2. PRINOSI MORAČA

Prinosi predstavljaju količinu ekstrakta ili etarskog ulja koja je dobijena ekstrakcijom biljnog materijala.

Najveći prinos je dao vodeni ekstrakt lista morača iz 2012. godine (25,8 %), a najmanji etarsko ulje lista morača iz 2014. godine (0,4 %).

U tabeli 5.16 su dati prinosi ekstrakata i etarskog ulja morača u 2012., 2013. i 2014. godini.

Tabela 5.16. Prinosi ekstrakata i etarskog ulja morača u 2012., 2013. i 2014. godini

2012.		STABLO	LIST	ZREO PLOD
	100 ME	3,7%	10,2%	4,07%
	80ME	5,45%	15,8%	7,13%
	H ₂ O	8,72%	25,8%	11,07%
	EU	/	1,33%	4,07%
2013.		LIST	PLOD	NEDOZREO PLOD
	100 ME	4,95%	4,1%	4,77%
	80ME	10,2%	9,8%	5,23%
	H ₂ O	23,13%	9,5%	13,46%
	EU	1,2%	7,33%	4,33%
2014.		LIST	PLOD	NEDOZREO PLOD
	100 ME	4,65%	5%	3,15%
	80ME	4,05%	5,1%	4,8%
	H ₂ O	8,05%	6,65%	7,55%
	EU	0,4%	5,4%	4,6%

5.3. SADRŽAJ UKUPNIH POLIFENOLA I TANINA U EKSTRAKTIMA MORAČA

Sadržaj ukupnih polifenola i tanina određen je u ekstraktima lista, stabla, zrelog i nedozrelog ploda morača. Analizirani su ekstrakti dobijeni apsolutnim metanolom (M), 80% metanolom (80% M) i vodom (H₂O).

U Tabeli 5.17 prikazan je sadržaj ukupnih polifenola u različitim ekstraktima lista, nedozrelog, zrelog ploda i stabla morača.

Tabela 5.17. Sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima morača izražen u mg ekvivalenata galne kiseline na g ekstrakta (mg GAE/g)

	100ME	80ME	H₂O
LIST	88,65±11,51 ^{aA}	89,79±5,85 ^{aA,B}	54,53±2,58 ^{bA}
NEDOZREO PLOD	83,78±2,70 ^{aA}	96,71±2,94 ^{bB}	56,30±2,28 ^{cA}
ZREO PLOD	82,82±4,93 ^{aA}	68,66±7,71 ^{a,bC}	57,11±8,32 ^{bA}
STABLO	64,49±4,58 ^{aB}	81,13±8,04 ^{bA}	36,70±3,10 ^{cB}
100ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 80ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u 80% metanolu, H ₂ O-vodeni ekstrakt a,b,c Mala različita slova u redu označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između različitih ekstrakata istog biljnog organa A, B, C Velika različita slova u koloni označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između istih tipova ekstrakata različitih biljnih organa			

Iz Tabele 5.17. se vidi da najveći sadržaj ukupnih polifenola ima 80% metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača (96,71±2,94 mg GAE/g), dok je najmanji sadržaj ukupnih polifenola u vodenom ekstraktu stabla morača (36,70±3,10 mg GAE/g).

U 100% metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih polifenola opada u sledećem nizu: list>nedozreo plod>zreo plod>stablo.

U 80 % metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih polifenola opada u sledećem nizu: nedozreo plod>list>stablo>zreo plod.

U vodenim ekstraktima najviše ukupnih polifenola imao je zreo plod, zatim nedozreo plod, zatim list, a najmanje stablo morača.

Tabela 5.18. Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima morača izražen u mg ekvivalenata galne kiseline na g ekstrakta (mg GAE/g)

	100ME	80ME	H₂O
LIST	36,19±1,12 ^{aA}	34,69±3,61 ^{aA}	22,22±2,32 ^{bA}
NEDOZREO PLOD	35,03±2,27 ^{aA}	40,82±1,38 ^{bB}	22,28±1,58 ^{cA}
ZREO PLOD	41,08±4,53 ^{aA}	26,53±2,07 ^{bC}	9,99±1,58 ^{cB}
STABLO	20,57±3,56 ^{aB}	24,91±0,60 ^{bC}	5,44±0,34 ^{cC}
100ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 80ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u 80% metanolu, H ₂ O-vodeni ekstrakt			
a,b,c Mala različita slova u redu označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između različitih ekstrakata istog biljnog organa			
A, B, C Velika različita slova u koloni označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između istih tipova ekstrakata različitih biljnih organa			

Iz Tabele 5.18. se vidi da najveći sadržaj ukupnih tanina ima 100% metanolni ekstrakt zrelog ploda morača (41,08±4,53 mg GAE/g), dok je najmanji sadržaj ukupnih tanina u vodenom ekstraktu stabla morača (5,44±0,34 mg GAE/g).

U 100% metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih polifenola opada u sledećem nizu: zreo plod>list>nedozreo plod >stablo.

U 80 % metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih polifenola opada u sledećem nizu: nedozreo plod>list >zreo plod>stablo.

U vodenim ekstraktima najviše ukupnih polifenola imao je nedozreo plod, zatim list, zatim zreo plod, a najmanje stablo morača.

5.4. SADRŽAJ FLAVONOIDA I FENOLNIH KISELINA U EKSTRAKTIMA MORAČA

Iz Tabele 5.19 se vidi da najveći sadržaj ukupnih flavonoida ima 100% metanolni ekstrakt lista morača ($31,23 \pm 3,27 \mu\text{g RUE/mg}$), dok je najmanji sadržaj ukupnih flavonoida u vodenom ekstraktu lista morača ($0,93 \pm 0,03 \mu\text{g RUE/mg}$).

U 100% metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih flavonoida opada u sledećem nizu: list > nedozreo plod > stablo > zreo plod.

U 80 % metanolnim ekstraktima sadržaj ukupnih polifenola opada u sledećem nizu: nedozreo plod > list > zreo plod > stablo.

U vodenim ekstraktima najviše ukupnih polifenola imao je nedozreo plod, zatim stablo, zatim zreo plod, a najmanje list morača.

Tabela 5.19. Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima morača izražen u μg rutin-ekvivalenta na mg ekstrakta ($\mu\text{g RUE/mg}$)

	100ME	80ME	H₂O
LIST	$31,23 \pm 3,27^{aA}$	$15,35 \pm 0,80^{bA}$	$0,93 \pm 0,03^{cA}$
NEDOZREO PLOD	$27,97 \pm 0,17^{aA}$	$25,23 \pm 0,56^{bB}$	$4,53 \pm 0,15^{cB}$
ZREO PLOD	$11,65 \pm 0,72^{aB}$	$8,98 \pm 0,03^{bC}$	$1,70 \pm 0,05^{cC}$
STABLO	$28,43 \pm 0,43^{aA}$	$4,28 \pm 0,13^{bD}$	$2,30 \pm 0,30^{cD}$
100ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 80ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u 80% metanolu, H ₂ O-vodeni ekstrakt			
a,b,c Mala različita slova u redu označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između različitih ekstrakata istog biljnog organa			
A, B, C Velika različita slova u koloni označavaju statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) između istih tipova ekstrakata različitih biljnih organa			

Tabela 5.20. Sadržaj flavonoida i fenonih kiselina u ekstraktima morača izražen u procentima

		100MEZP	100MENP	100MLE	100MES	80MEZP	80MENP	80MLE	80MES
1	Derivat galne kiseline	0,10±0,005	0,06±0,001	/	/	0,40±0,02	/	/	/
2	Derivat galne kiseline	0,71±0,007	/	/	/	0,71±0,02	/	/	/
3	Hlorogenska kiselina	1,03±0,08	2,01±0,02	2,30±0,08	1,42±0,10	1,70±0,05	3,60±0,20	2,70±0,20	2,31±0,07
4	4-kafenoilhina kiselina	/	/	0,09±0,01	0,06±0,005	/	0,05±0,002	0,10±0,01	0,10±0,02
5	Derivat galne kiseline	0,50±0,02	/	/	/	0,30±0,02	/	/	/
6	1,3-dikafenoilhina kiselina	/	0,31±0,04	0,51±0,07	0,33±0,01	0,22±0,01	0,41±0,06	0,64±0,07	0,61±0,07
7	heterozid kvercetina	/	0,51±0,02	/	/	/	0,73±0,04	/	/
8	rutin	2,01±0,07	4,92±0,07	4,63±0,08	1,82±0,05	2,11±0,02	5,58±0,04	3,69±0,04	2,20±0,03
9	mikuelianin	/	0,92±0,02	2,02±0,04	2,05±0,05	0,74±0,02	1,22±0,04	1,55±0,05	2,12±0,02
10	1,5-dikafenoilhina kiselina	0,40±0,002	0,90±0,02	1,42±0,05	1,34±0,07	0,70±0,05	1,11±0,06	1,30±0,03	1,68±0,04
11	Heterozid luteolina	/	/	0,31±0,02	/	/	/	0,33±0,01	0,21±0,01
12	1,4-dikafenoilhina kiselina	/	/	0,42±0,04	0,24±0,03	/	0,20±0,05	0,43±0,05	0,33±0,02
13	Ruzmarinska kiselina	1,50±0,10	3,22±0,21	4,60±0,20	1,92±0,60	2,41±0,11	5,95±0,12	4,78±0,44	4,10±0,05
14	Derivat kafene kiseline	/	0,32±0,03	0,30±0,02	0,08±0,03	0,21±0,03	0,40±0,06	0,45±0,03	0,31±0,02

100MEZP-metanolni ekstrakt zrelog ploda ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 100MENP-metanolni ekstrakt nedozrelog ploda ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 100MLE-metanolni ekstrakt lista ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 100MES-metanolni ekstrakt stabljike ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 80MEZP-metanolni ekstrakt zrelog ploda ekstrahovan u 80% metanolu, 80MENP- metanolni ekstrakt nedozrelog ploda ekstrahovan u 80% metanolu, 80MLE-metanolni ekstrakt lista ekstrahovan u 80% metanolu, 80MES-metanolni ekstrakt stabljike ekstrahovan u 80% metanolu

Iz Tabele 5.20. se može uočiti da je najzastupljeniji flavonoid u svim uzorcima rutin. Najzastupljeniji je u 80% metanolnom ekstraktu nedozrelog ploda morača ($5,58 \pm 0,04\%$), a najmanje ga ima u 100% metanolnom ekstraktu stabla morača ($1,82 \pm 0,05\%$).

Od fenolnih kiselina, najzastupljenija u svim uzorcima je ruzmarinska kiselina. Najviše je ima u 80% metanolnom ekstraktu nedozrelog ploda morača ($5,95 \pm 0,12\%$), a najmanje u metanolnom ekstraktu zrelog ploda morača ($1,50 \pm 0,10\%$).

5.5. HEMIJSKI SASTAV ETARSKOG ULJA MORAČA

Analizom etarskog ulja zrelog, nedozrelog ploda i lista morača identifikovano je ukupno 30 jedinjenja od kojih je najzastupljeniji *trans*-anetol sa 84,05 % u etarskom ulju lista, 83,87% u etarskom ulju zrelog ploda i 61,61% u etarskom ulju nedozrelog ploda. Takođe su, u značajnijem procentu, zastupljeni i estragol (4,65% u ulju lista morača, 7,08% u ulju zrelog ploda i 26,6% u ulju nedozrelog ploda morača) i fenhon (1,28% u ulju lista, 5,41% u ulju zrelog ploda i 6,26% u ulju nedozrelog ploda morača).

Nedozreo plod morača sadrži manji procenat *trans*-anetola u odnosu na zreo plod, a značajno veći procenat estragola i fenhona. Veći broj isparljivih jedinjenja i kvalitativno i kvantitativno je identifikovano u etarskom ulju nedozrelog ploda morača (27 jedinjenja od toga 5 u tragovima) nego u etarskom ulju zrelog ploda (23 jedinjenja od toga 13 u tragovima).

Etarsko ulje lista morača sadrži veći procenat *trans*-anetola od etarskog ulja nedozrelog i zrelog ploda morača, dok su estragol i fenhon u ovom ulju zastupljeni u nižem procentu nego u ulju zrelog i nedozrelog ploda. U etarskom ulju lista morača identifikovano je ukupno 22 jedinjenja, od toga su dva prisutna u tragu.

U Tabeli 5.21. je prikazan hemijski sastav etarskog ulja lista, zrelog i nedozrelog ploda morača (*Foeniculum vulgare* Miller).

Tabela 5.21. Hemijski sastav etarskog ulja lista, zrelog i nedozrelog ploda morača (*Foeniculum vulgare* Miller)

	RT	RI	Jedinjenje	Etarsko ulje lista morača	Etarsko ulje zrelog ploda morača	Etarsko ulje nedozrelog ploda morača
1	9,728	926,1	α -pinen	0,43	1,26	0,85
2	10,243	942,2	kamfen	-	t	0,05
3	11,096	968,7	sabinen	-	t	0,19
4	11,213	972,4	β -pinen	-	t	0,07
5	11,686	987,1	mircene	0,11	0,28	0,24
6	12,178	1002,2	α -felandren	4,42	0,29	0,46
7	12,902	1022,9	<i>o</i> -cimen	0,39	t	0,45
8	13,040	1026,8	limonen	0,41	0,40	0,38
9	13,055	1027,7	β -felandren	0,37	0,30	0,3
10	13,138	1029,6	1,8-cineol	t	0,25	0,28
11	13,351	1035,7	(<i>Z</i>)- β -ocimen	0,21	t	-
12	14,138	1058,3	γ -terpinen	0,41	0,38	1,37
13	14,443	1066,9	<i>cis</i> -sabinen hidrat	-	t	0,04
14	15,219	1089,1	fenhon	1,28	5,41	6,26
15	15,589	1099,6	linalool	-	-	0,05
16	17,236	1147,0	kamfor	-	t	0,21
17	18,391	1180,2	terpinen-4-ol	-	t	0,06
18	18,865	1193,7	α -terpineol	-	t	0,03
19	19,175	1202,8	metil-kavikol (estragol);	4,65	7,08	26,6
20	20,333	1237,1	<i>exo</i> -fenhil-acetat;	0,15		-
21	20,978	1256,3	<i>cis</i> -anetol	0,16	t	0,05
22	21,063	1258,9	<i>p</i> -anis aldehyd	t	t	0,21
23	22,215	1293,1	<i>trans</i> -anetole	84,05	83,87	61,61
24	22,625	1305,5	timol	0,13	t	0,24
25	26,886	1440,6	α - <i>trans</i> -bergamoten	0,09	-	-
26	27,314	1454,6	<i>endo</i> - fenhil - izovalerat	0,21	-	t
27	27,377	1456,8	<i>exo</i> -fenhil-izovalerat	0,35	-	t
28	27,851	1472,4	<i>endo</i> -fenhil valerat	1,07	-	t
29	28,029	1478,2	<i>exo</i> -fenhi valerat	0,31	-	t
30	28,336	1488,4	germakren D	0,4	t	t

5.6. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

Antioksidativna aktivnost (AO) određivana uz DPPH-radikal imala je vrednosti IC_{50} od 35,66 do 344,82 $\mu\text{g/mL}$ za ekstrakte. Najbolju IC_{50} vrednost pokazao je 80% metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača ($40,87 \pm 0,32 \mu\text{g/mL}$), a najslabiju vodeni ekstrakt lista morača ($344,82 \pm 9,43 \mu\text{g/mL}$).

Od ekstrakata najbolju inhibiciju lipidne peroksidacije u emulziji β -karoten/linolna kiselina pokazao je 80% ekstrakt zrelog ploda morača ($IC_{50}=228,13 \pm 5,08 \mu\text{g/mL}$), a najslabiju vodeni ekstrakt zrelog ploda morača ($IC_{50}=433,93 \pm 6,64 \mu\text{g/mL}$).

Od etarskog ulja najbolju inhibiciju lipidne peroksidacije u emulziji β -karoten/linolna kiselina pokazalo je etarsko ulje lista morača ($IC_{50}=0,36 \pm 0,05 \mu\text{L/mL}$), a najslabiju etarsko ulje zrelog ploda morača ($IC_{50}=1,54 \pm 0,18 \mu\text{L/mL}$).

Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata i etarskog ulja morača, kao i pozitivna kontrola sa askorbinskom i ruzmarinskom kiselinom prikazani su u tabelama 5.22., 5.23. i 5.24.

Tabela 5.22. Antioksidativna aktivnost ekstrakata i etarskog ulja morača (IC₅₀ µg/mL; IC₅₀ µL/mL)

	100ME		80% ME		H ₂ O		ETARSKO ULJE	
	DPPH	β-karoten	DPPH	β-karoten	DPPH	β-karoten	DPPH	β-karoten
LIST	43,31±2,56 ^{aA}	233,13±9,11 ^{aA}	42,52±1,20 ^{aA}	397,80±6,51 ^{bA}	344,82±9,43 ^{bA}	418,10±5,76 ^{cA}	0,00 ^{cA}	0,36±0,05 ^{dA}
NEDOZRE O PLOD	40,63±2,42 ^{aA}	311,67±6,55 ^{aB,C}	40,87±0,32 ^{bB}	211,00±9,59 ^{bB}	176,56±5,60 ^{cB}	385,03±5,01 ^{bB}	0,00 ^{dA}	0,70±0,08 ^{cB}
ZREO PLOD	83,58±0,69 ^{aB}	299,70±8,61 ^{aB}	49,89±0,40 ^{bC}	228,13±5,08 ^{bC}	187,49±8,14 ^{cB}	433,93±6,64 ^{cC}	0,00 ^{dA}	1,54±0,18 ^{dC}
STABLO	95,66±0,73 ^{aC}	320,83±8,37 ^{aC}	46,79±0,69 ^{bD}	356,4±4,47 ^{bD}	177,40±10,24 ^{cB}	383,83±4,12 ^{cB}	/	/

100ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u apsolutnom metanolu, 80% ME-metanolni ekstrakt ekstrahovan u 80% metanolu, H₂O-vodeni ekstrakt, IC₅₀-koncentracija ekstrakta ili ulja koja inhibira 50 % aktivnosti DPPH slobodnog radikala ili sprečava obezbojavanje 50% β-karotena

a,b,c Mala različita slova u redu označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između različitih ekstrakata istog biljnog organa

A, B, C Velika različita slova u koloni označavaju statistički značajnu razliku (p<0,05) između istih tipova ekstrakata različitih biljnih organa

Tabela 5.23. Pozitivna kontrola za DPPH sa ruzmarinskom (RK) i askorbinskom (AK) kiselinom

pozitivna kontrola	µg/mL
RK	6,09 ± 0,48
AK	4,74 ± 0,34

Tabela 5.24. Pozitivna kontrola za β-karoten sa ruzmarinskom (RK) i askorbinskom (AK) kiselinom

pozitivna kontrola	µg/mL
RK	32,55±1,62
AK	22,95±1,52

5.7. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA I ETARSKOG ULJA MORAČA

Ispitivani ekstrakti i etarska ulja su pokazali slabiju antimikrobnu aktivnost protiv različitih Gram (+) i Gram (-) bakterija, Testirane koncentracije ekstrakata su bile od 0,10-100 mg/mL, a testirane koncentracije ulja su bile 0,05-50 µL/mL.

Najbolje MIC/MBC koncentracije su dobijene od 100% metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača (6,25/25,00 mg/mL protiv sojeva *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*), dok vodeni ekstrakt lista morača nije pokazao nikakvu antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih sojeva G (+) i G (-) bakterija.

Etarsko ulje nedozrelog ploda morača je imalo najbolju MIC koncentraciju (3,13 µL/mL) protiv sojeva *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*.

Rezultati antimikrobne aktivnosti ekstrakata i etarskog ulja morača prikazani su u tabelama 5.25. i 5.26.

Tabela 5.25. Minimalna inhibitorna (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija u mg/mL ekstrakta morača i antibiotika na Gram (+) i Gram (-) bakterijske sojeve

	G(+) (MIC/MBC mg/mL)			G(-) MIC/MBC (mg/mL)							
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (iz ispljuvka)	<i>Staphylococcus aureus</i> (iz grla)	<i>Enterococcus faecalis</i> (iz stolice)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (iz ispljuvka)	<i>Escherichia coli</i> (iz grla)	<i>Morganella morganii</i> (iz grla)	<i>Escherichia coli</i> (iz stolice)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (iz stolice)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (iz stolice)	<i>Proteus mirabilis</i> (iz stolice)	
VRSTE EKSTRAKATA	List M	100,00/>100,00	25,00/100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	25,00/50,00	100,00/>100,00	50,00/100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00
	List M 80%	25,00/50,00	25,00/50,00	25,00/25,00	100,00/>100,00	50,00/50,00	50/>100,00	50,00/50,00	50,00/>100,00	50,00/>100,00	100,00/>100,00
	List vodeni	25,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00
	Plod nedozreli M	100,00/>100,00	25,00/50,00	50,00/50,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	25,00/25,00	50,00/>100,00	50,00/>100,00	25,00/50,00	50,00/50,00
	Plod nedozreli M 80%	50,00/>100,00	12,50/12,50	25,00/25,00	100,00/>100,00	50,00/50,00	12,50/25,00	50,00/50,00	50,00/50,00	50,00/50,00	50,00/50,00
	Plod nedozreli vodeni	50,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	50,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00
	Plod zreli M	6,25/25,00	6,25/25,00	25,00/25,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	12,50/12,50	50,00/50,00	25,00/25,00	50,00/>100,00	100,00/>100,00
	Plod zreli M 80%	12,50/25,00	6,25/25,00	25,00/50,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	25,000/25,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00
KONTROLA	Chlorampheniol (MIC/MBC u µg/mL)	7,80/7,80	1,90/1,90	7,80/7,80	1,90/3,90	1,90/3,90	0,90/1,90	3,90/3,90	3,90/7,80	7,80/7,80	7,80/7,80

Tabela 5.26. Minimalna inhibitorna (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija u $\mu\text{L}/\text{mL}$ etarskog ulja morača i antibiotika na Gram (+) i Gram (-) bakterijske sojeve

		G(+) (MIC/MBC mg/mL)			G(-) MIC/MBC (mg/mL)						
IZOLOVANI BAKTERIJSKI SOJEVI I IZVOR IZOLATA		<i>Streptococcus pneumoniae</i> (iz ispljuvka)	<i>Staphylococcus aureus</i> (iz grla)	<i>Enterococcus faecalis</i> (iz stolice)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (iz ispljuvka)	<i>Escherichia coli</i> (iz grla)	<i>Morganella morganii</i> (iz grla)	<i>Escherichia coli</i> (iz stolice)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (iz stolice)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (iz stolice)	<i>Proteus mirabilis</i> (iz stolice)
VRSTE ULJA	Plod zreli vodeni	12,50/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	50,00/>100,00	50,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00	100,00/>100,00
	List	25,00/>50,00	25,00/>50,00	50,00/>50,00	25,00/>50,00	6,25/>50,00	25,00/>50,00	12,50/>50,00	50,00/>50,00	12,50/>50,00	12,50/>50,00
	Plod nedozreli	12,50/>50,00	25,00/>50,00	50,00/>50,00	12,50/>50,00	3,13/>50,00	12,50/>50,00	3,13/>50,00	50,00/>50,00	6,25/>50,00	3,13/>50,00
	Plod zreli	12,50/>50,00	12,50/>50,00	50,00/>50,00	12,50/>50,00	6,25/>50,00	12,50/>50,00	6,25/>50,00	50,00/>50,00	6,25/>50,00	6,25/>50,00
KONTROLA	Chlorampheniol (MIC/MBC u $\mu\text{g}/\text{mL}$)	7,80/7,80	1,90/1,90	7,80/7,80	1,90/3,90	1,90/3,90	0,90/1,90	3,90/3,90	3,90/7,80	7,80/7,80	7,80/7,80

6. DISKUSIJA

6.1. FITOKONSTITUENTI MORAČA

U uvodnom delu je navedeno da se morač od davnina zbog svog karakterističnog i prijatnog mirisa koristi kao dodatak različitim jelima i napicima. U različitim delovima sveta morač se koristio i za lečenje brojnih stanja i oboljenja.

Polifenoli, flavonoidi i isparljiva jedinjenja kao što su *trans*-anetol, estragol i fenhon su opisani u literaturi kao glavni fitohemijski sastojci ove biljke.

Roby i sar (2013) su ispitivali sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima ploda morača, pri čemu su dobili rezultate da je njihov najveći sadržaj u metanolnom ekstraktu ploda morača. Dua i sar (2013) su, takođe, ispitivanjem sadržaja ukupnih polifenola u različitim ekstraktima morača dokazali da ih najviše ima u 80 % metanolnom ekstraktu ploda morača, što je u skladu sa našim rezultatima koji pokazuju da je najveći sadržaj ukupnih polifenola u 80% metanolnom ekstraktu nedozrelog ploda morača ($96,71 \pm 2,94$ mg GAE/g), s tim što je njihov sadržaj kod navedenih autora bio drastično niži ($16,506 \pm 0,32$ mg GAE/g). Kod Confortija i sar (2006) ukupan sadržaj polifenola u moraču je bio 100 mg GAE/g. Razlike u ovim vrednostima mogu biti posledica različite efikasnosti rastvarača u rastvaranju endogenih jedinjenja.

Faudale i sar (2008) su ispitivali najzastupljenija fenolna jedinjenja u moraču iz različitih delova Evrope. Od fenolnih kiselina to su bile hlorogenska kiselina, neohlorogenska kiselina, kriptohlorogenska kiselina, ruzmarinska kiselina, 1,3-dikafenoilhina kiselina, 1,4-dikafenoilhina kiselina, 1,3-dikafenoilhina kiselina što je u skladu sa našim rezultatima. Rutin je flavonoid koji je najzastupljeniji u svim delovima biljke što je u skladu sa rezultatima koji su dobili Faudale i sar (2008) i Parejo i sar (2004). Takođe, identifikovan je i mikvelianin u svim ekstraktima osim u metanolnom ekstraktu zrelog ploda morača ekstrahovanom u apsolutnom metanolu. Roby i sar (2013) su objavili da su kvercetin i apigenin najzastupljeniji flavonoidi u moraču. Naši rezultati pokazuju značajno prisustvo kvercetina u svim ekstraktima morača, međutim apigenin nije detektovan što može biti posledica njegove nestabilnosti i osetljivosti metode na druga jedinjenja (Justesen i sar, 1998).

Hemijskom analizom sve tri vrste etarskog ulja identifikovano je ukupno 30 jedinjenja od kojih je najzastupljeniji *trans*-anetol sa 84,05% u etarskom ulju lista, 83,87% u etarskom ulju zrelog ploda i 61,61% u etarskom ulju nedozrelog ploda. Takođe su, u značajnijem procentu, zastupljeni i estragol (od 4,65 do 26,6%) i fenhon (1,28 do 6,26%) što je u skladu sa istraživanjem koje su radili Guillén i Manzanos (1996) kod kojih su najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju ploda, lista i stabljike bili *trans*-anetol (68,6 do 75%), fenhon (8,4 do 14,7%) i estragol (5,09 do 9,10%). Damjanović i sar (2005) su objavili da je iz etarskog ulja ploda morača izolovanog hidrodestilacijom identifikovano 19 isparljivih jedinjenja, od kojih su najzastupljenija *trans*-anetol (62%), fenhon (20,3%) i estragol (4,9%). Diao i sar (2014) su objavili da je u etarskom ulju ploda morača identifikovano 28 jedinjenja od kojih su najzastupljenija *trans*-anetol (68,53 %), estragol (10,42%), limonen (6,24%) i fenhon (5,45%). Mimica-Dukic i sar (2003) su, takođe, ispitivali prisustvo isparljivih jedinjenja u etarskom ulju ploda morača i *trans*-anetol (74,18%), fenhon (11,32%), estragol (5,29%), limonen (2,53%) i α -pinen (2,77%) su identifikovani kao najzastupljenija jedinjenja. Po Ozcan-u i sar (2006) najzastupljenija jedinjenja u etarskom ulju gorkog morača (*F. vulgare* spp. *piperitum*) koji raste u Turskoj su estragol (61,08% i 40,49%), fenhon (23,46% i 16,90%) i limonen (8,68% i 17,66%). Varijacije u sadržaju hemijskih jedinjenja u etarskom ulju morača iz različitih zemalja je, verovatno, posledica različitih agroklimatskih uslova, stadijuma zrelosti i adaptacionog metabolizma biljke. Telci i sar (2009) su zaključili da se sadržaj ovih jedinjenja u etarskom ulju menja sa stadijumom zrelosti morača tj, da opada sa sazrevanjem biljke. U našem istraživanju, nedozreo plod morača je sadržao manji procenat *trans*-anetola u odnosu na zreo plod, ali je sadržao značajno veći procenat i estragola i fenhona, a veći broj isparljivih jedinjenja i kvalitativno i kvantitativno je identifikovano u etarskom ulju nedozrelog ploda morača (27 jedinjenja od toga 5 u tragovima) nego u etarskom ulju zrelog ploda (23 jedinjenja, od toga toga 13 u tragovima).

6.2. SPAZMOLITIČKA I BRONHODILATORNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

Jedan od faktora koji utiče na funkcionisanje digestivnog sistema i pravilno varenje i apsorpciju sastojaka hrane je intestinalna pokretljivost. Koordinaciju kontrakcija glatkih mišića vrše kompleksni mehanizmi, koji uključuju brojne receptore za različite ekscitatorne ili inhibitorne supstance (Blackshaw i sar, 2007).

Pregledom literature, utvrđeno je da postoji malo podataka o dejstvu etarskog ulja i ekstrakata morača na glatku muskulaturu tankog creva. S obzirom na to da je poznato da se morač od davnina koristi kod raznih poremećaja gastrointestinalnog trakta (nadutost, gasovi, infantilne kolike), očekivano je bilo da će ispitivani uzorci ispoljiti spazmolitički efekat. Takođe, poznato je da flavonoidi, kojima je morač bogat, poseduju spazmolitički efekat, te je to bio još jedan razlog za ispitivanje ovog efekta morača.

Etarska ulja morača su ostvarila veoma potentnu inhibitornu aktivnost u svim eksperimentalnim modelima, pri čemu su najjače inhibisane kontrakcije izazvane Ach. Ova činjenica navodi na zaključak da etarsko ulje svoje efekte ostvaruje pre svega uticajem na muskarinske receptore, ali se ovaj spazmolitički efekat ne može pripisati samo antiholinergičkom delovanju, pošto ispoljava relaksantne efekte i na spontane i na kontrakcije izazvane kalijum-hloridom.

Naše ispitivanje je pokazalo da je najzastupljenije jedinjenje u etarskom ulju lista, nedozrelog i zrelog ploda morača *trans*-anetol. Imaseki (1962) je ispitivao efekte *trans*-anetola na kontraktilnost tankog creva miševa i ustanovljeno je da je ostvaren relaksantni efekat na motilitet creva, ali primenom većih koncentracija *trans*-anetola (preko 50 mg/l), te se spazmolitičko delovanje etarskog ulja morača može makar delimično objasniti spazmolitičkim delovanjem *trans*-anetola. Takođe, podaci u literaturi su pokazali da anetol izaziva relaksaciju glatke muskulature izolovanog ileuma zamorca (Reiter i Brondet, 1985) i skeletne muskulature (Albuquerque i sar, 1995).

I metanolni ekstrakti ekstrahovan 80% metanolom i apsolutnim metanolom ispoljili relaksantno delovanje u svim eksperimentalnim modelima, pa se može pretpostaviti da ekstrakti svoj spazmolitički efekat ostvaruju različitim mehanizmima. Inhibitorni efekat na spontane

kontrakcija ekstrakti verovatno ispoljavaju usled prisustva fenolnih jedinjenja. Flavonoidi i fenolne kiseline su najbrojnije grupe fenolnih jedinjenja. Poznato je da kvercetin *in vitro* izaziva relaksaciju tankog creva, stimulisanog primenom kalijum-hlorida (Lozoya i sar, 1994). Takođe je poznato je da su ova jedinjenja antagonisti kalcijumskih kanala i da ispoljavaju antiholinergičku aktivnost (Gilani i sar, 2006).

Inhibitorni efekat ulja i ekstrakata morača na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane ACh-om verovatno je posledica blokade muskarinskih receptora. Poznato je da su u gastrointestinalnom traktu najzastupljeniji M₂ i M₃ podtipovi muskarinskih receptora, pri čemu je M₂ podtip nekoliko puta zastupljeniji od podtipa M₃. Poznato je da ACh izaziva kontrakcije na izolovanom ileumu pre svega preko M₃ receptorskog puta koji podrazumeva hidrolizu fosfoinozitola i mobilizaciju intraćelijskog Ca²⁺ (Ehlert i sar, 1999), kao i otvaranja voltažno-zavisnih Ca²⁺-kanala L-tipa i ulaska Ca²⁺ u ćeliju (Zhang i sar, 2005). Ovo ukazuje na postojanje voltažno-zavisnih kanala L-tipa u tankom crevu pacova (El Bardai i sar, 2004).

Inhibitorni efekat ekstrakata na kontrakcije izazvane KCl-om može se objasniti blokadom voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala L-tipa i otvaranjem kalijumovih kanala. Kontraktilnost glatke muskulature nastaje usled depolarizacije membrane glatkih mišića koja je uzrokovana visokim koncentracijama K⁺-jona. Kalijum u visokoj koncentraciji otvara voltažno zavisne Ca²⁺-kanale L-tipa, ekstraćelijski Ca²⁺ ulazi u ćeliju i izaziva kontrakciju glatkih mišića (Godfrain, 1986). Kako su ekstrakti morača izazivali inhibiciju kontrakcija izazvanih K⁺, možemo zaključiti da je spazmolitičko dejstvo nastupilo usled dejstva ekstrakta na Ca²⁺-voltažno zavisne kanale L-tipa što dovodi do smanjenja koncentracije Ca²⁺ i relaksacije glatkih mišića creva. Navedeni mehanizam predstavlja najčešći način delovanja biljnih ekstrakta (Gilani, 2006; Branković, 2009), jer do kontrakcija glatkih mišića izolovanog ileuma dolazi usled povećanja koncentracije Ca²⁺ jona u citoplazmi.

Može se zaključiti da je metanolni ekstrakt ostvario jače spazmolitičko delovanje prema spontanim kontrakcijama, kao i prema kontrakcijama izazvanim ACh i KCl u odnosu na vodeni ekstrakt. Fenolna jedinjenja, kojima se može pripisati relaksantni efekat u ispitivanim modelima prisutna su u svim testiranim ekstraktima, pri čemu je njihova zastupljenost bila višestruko veća u metanolnim (80 i 100%) nego u vodenom ekstraktu. Analizirajući dobijene rezultate i zastupljenost u mg GAE/g ovih jedinjenja u 100% metanolnom ekstraktu (od 64,49±4,58 u ekstraktu stabla do 88,65±11,51 u ekstraktu lista), 80% metanolnom ekstraktu (od 68,66±7,71 u

ekstraktu zrelog ploda do $96,71 \pm 2,94$ u ekstraktu nedozrelog ploda) i vodenom ekstraktu (od $36,70 \pm 3,10$ u ekstraktu stabla do $57,11 \pm 8,32$ u ekstraktu zrelog ploda), može se pretpostaviti da su upravo ova jedinjenja u značajnoj meri odgovorna za aktivnost ekstrakata.

Ispitali smo i efekte etarskog ulja i ekstrakta morača na kalcijum-hloridom stimulisanu kontrakciju ileuma pacova kako bismo ispitali da li ovi uzorci dominantno ispoljavaju svoje spazmolitičke efekte preko voltažno-zavisnih Ca^{2+} -kanala.

Oba uzorka koja smo koristili su pokazala značajnu inhibiciju Ca^{2+} stimulisanih kontrakcija. U koncentraciji od 3 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt je snizio kontrakcije izazvane kalcijum-hloridom na $76,79 \pm 7,66\%$, a etarsko ulje u istoj koncentraciji na $63,25 \pm 7,39\%$ što je dokaz dejstva uzoraka na smanjenje aktivnosti voltažno zavisnih Ca^{2+} -kanala L tipa. Ispitali smo i efekte etarskog ulja i ekstrakta morača na barijum-hloridom stimulisanu kontrakciju ileuma pacova. Barijum-hlorid je neselektivni blokator K^+ -kanala (Liu i sar, 2001). On uzrokuje depolarizaciju membrane i kontrakciju glatkih mišića ileuma. Svoj efekat, verovatno, ostvaruje povećanjem koncentracije Ca^{2+} , mobilizacijom intracelularnog Ca^{2+} . Međutim, došlo je i do značajne inhibicije kontrakcija stimulisanih $BaCl_2$ -om dejstvom ekstrakta i etarskog ulja morača. U koncentraciji od 3 mg/mL, 100% metanolni ekstrakt je snizio kontrakcije izazvane $BaCl_2$ na $75,61 \pm 7,86\%$, a etarsko ulje u istoj koncentraciji na $65,49 \pm 4,91\%$ što ukazuje da se spazmolitičko dejstvo ekstrakta i etarskog ulja ove biljke ne može pripisati samo uticajem na voltažno zavisne Ca^{2+} -kanale L tipa, već i dejstvom na K^+ -kanale čime se sprečava povećanje koncentracije intracelularnog Ca^{2+} mobilizacijom iz depoa.

Ispitivanje spazmolitičkih efekata ekstrakta i etarskog ulja pacova u prisustvu L-NAME tankog creva pacova je pokazalo da u njegovom prisustvu ne dolazi do statistički značajne promene spazmolitičkog efekta uzoraka što ukazuje da NO nema ulogu u ispoljavanju spazmolitičke aktivnosti ekstrakata i etarskog ulja morača.

Najšire prihvaćeno delovanje NO u crevu je uticaj NO na relaksaciju glatkih mišića (Sanders, 1992).

Tonus bronhijalne glatke muskulature regulišu brojni inhibitorni ili stimulišući faktori. Pošto postoje podaci o tradicionalnoj primeni morača za lečenje bronhijalne astme (Boskabady i Khatami, 2003) sprovedeno je ispitivanje uticaja ekstrakata i etarskog ulja morača na kontrakciju izolovane traheje pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da etarsko ulje zrelog

ploda morača i ekstrakt lista morača dobijen apsolutnim metanolom ispoljavaju relaksantni efekat i umanjuju kontraktilnost glatkih mišića traheje.

Relaksantni efekti etarskog ulja zrelog ploda morača su bili više izraženi u odnosu na ekstrakt lista morača dobijen apsolutnim metanolom. Jači inhibitorni efekti etarskog ulja zrelog ploda morača su verovatno posledica prisustva veće količine biološki aktivnih sastojaka. Dobijene rezultate potvrđuju podaci u literaturi. Boskabady i sar (2004) su naveli da ulje, vodeni i etanolni ekstrakti nadzemnog dela morača umanjuju kontraktilnost izolovane traheje zamorca.

Relaksacija glatkih mišića može nastati usled smanjenja koncentracije jona kalcijuma u citoplazmi i /ili inhibicijom interreakcije aktinskih i miozinskih molekula (Adelstein i sar, 1978; Kuriyama i sar, 1982). Radi ispitivanja potencijalnog mehanizma relaksantnog dejstva morača, osim na spontane kontrakcije, praćen je uticaj etarskog ulja zrelog ploda morača i ekstrakta lista morača dobijen apsolutnim metanolom na acetilholinom i KCl stimulisane kontrakcije glatke muskulature traheje.

Parasimpatički deo autonomnog nervnog sistema, odnosno n.vagus inervišu bronhijalne glatke mišiće. Poznato je da muskarinski receptori imaju značajnu ulogu u patogenezi bronhijalnog spazma, odnosno njihova aktivacija dovodi do kontrakcije bronhijalnih glatkih mišića (Tattersfield i sar, 2002). Antagonisti muskarinskih receptora se zbog toga koriste za lečenje ne samo bronhijalne astme, već i bronhitisa i hroničnih opstruktivnih plućnih oboljenja (Barnes i Hansel, 2004).

Etarsko ulje zrelog ploda morača i ekstrakt lista morača dobijen apsolutnim metanolom proporcionalno primenjenoj koncentraciji inhibisali su acetilholinom izazvane kontrakcije traheje pacova. Inhibitorni efekat na kontrakcije indukovane acetilholinom verovatno je posledica uticaja biološki aktivnih sastojaka morača na muskarinske receptore u bronhijalnoj muskulaturi. Acetilholinom stimulisane kontrakcije glatkih mišića traheje nastaju usled povećanja koncentracije jona kalcijuma u citoplazmi, odnosno aktivacije M_1 muskarinskih receptora, a zatim stimulacije Gq proteina i fosfolipaze C, što uzrokuje nastanak inozitol 1,4,5 tri-fosfata koji stimuliše oslobađanje jona kalcijuma iz sarkoplazmatskog retikuluma (Felder, 1995). Usled povećanja koncentracije jona kalcijuma u citoplazmi, stimuliše se ulazak jona kalcijuma iz ekstraćelijske tečnosti (Berridge i sar, 1989; Berridge, 1991).

Kontrakcije izolovane traheje indukovane rastvorom kalijum-hlorida nastaju usled povećanja koncentracije jona kalcijuma u citoplazmi glatkomišićnih ćelija, što je posledica

aktivacije voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala (Gilani i sar, 2007). Etarsko ulje zrelog ploda morača i ekstrakt lista morača dobijen apsolutnim metanolom, proporcionalno primenjenoj koncentraciji i statistički značajno umanjuju kontraktilnost glatke muskulature traheje, tako da dobijeni efekti mogu nastati usled uticaja na aktivnost voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala i ulazak jona kalcijuma u mišićne ćelije.

Dobijeni rezultati pokazuju da etarsko ulje zrelog ploda morača i ekstrakt lista morača dobijen apsolutnim metanolom relaksantno dejstvo na glatku muskulaturu izolovane traheje ostvaruju uticajem na holinergičke receptore i kalcijumske kanale, što može biti posledica prisustva flavonoida, jer ti sastojci morača poseduju antiholinergičku aktivnost i inhibišu kalcijumske kanale (Gao i sar, 2016).

6.3. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

Antioksidansi koji se javljaju u prirodi mogu da imaju protektivnu ulogu od oštećenja izazvanim oksidativnim stresom, te smo zato i ispitivali kakav antioksidativni potencijal imaju etarsko ulje i ekstrakti morača.

Ekstrakti (metanolni, ekstrahovani u 80% i apsolutnom metanolu i vodeni) su pokazali statistički značajne razlike u sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i inhibicije lipidne peroksidacije, bilo da se radilo o DPPH-metodi ili sistemu β -karoten/linolna kiselina. Razlike su bile očekivane zbog varijacija u sadržaju sekundarnih metabolita.

Anwar (2009) je proučavajući antioksidativnu aktivost pokazao da 80% metanolni ekstrakt ploda morača pokazuje najbolju sposobnost hvatanja slobodnih radikala, bolju od 100% metanolnog i etanolnih ekstrakta, što je u skladu sa našim rezultatima gde je 80% ekstrakt nedozrelog ploda pokazao najbolju DPPH aktivnost ($IC_{50}=40,87\pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$). Vodeni ekstrakt je pokazao slabiju sposobnost u hvatanju slobodnih radikala u odnosu na metanolne ekstrakte, što je u skladu sa sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida u ovim ekstraktima. Faudale (2008) je ispitivala antioksidativnu aktivnost morača iz različitih zemalja i zaključila da antioksidativni potencijal zavisi od sadržaja ukupnih polifenola, što je u skladu sa našim rezultatima, gde su najveću DPPH aktivnost pokazali ekstrakti sa najvećim sadržajem ukupnih polifenola. Oktay (2003) je pokazao da i etanolni i vodeni ekstrakti morača pokazuju značajnu antioksidativnu aktivnost, ali da, zbog većeg sadržaja sekundarnih metabolita, etanolni ekstrakt pokazuje bolju aktivnost.

Antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata se može donekle objasniti prisustvom dve kiseline: hlorogenske i dikafenolihine. Smatra se da one svoju aktivnost ostvaruju inhibicijom stvaranja novih kiseoničnih vrsta (Upadhyay i sar, 2013). Olszewska (2012) je ispitivala antioksidativni potencijal hlorogenske kiseline.

Lipidina peroksidacija je lančana reakcija koja je inicirana delovanjem reaktivnih oblika kiseonika. Usled ove reakcije nastaju lipidni peroksidi, a njihovom daljom razgradnjom nastaju toksični aldehidi manje molekulske mase od kojih je najpoznatiji malonil-dialdehid (MDA).

Lipidna oksidacija je uzrok gubitka boje i ukusa mesa, pogoršanja njegove teksture, kvaliteta i gubitka hranljivih sastojaka u njemu (Min i sar, 2005).

Što se tiče naših rezultata, etarsko ulje i ploda i lista morača je pokazalo odličnu aktivnost zaštite od lipidne peroksidacije ($IC_{50}=0,36\pm 0,05$ do $1,54\pm 0,18$ $\mu\text{l/mL}$), što je u skladu sa rezultatima koje su objavili Garga (2009) i Ruberto (2000).

Ekstrakti morača su pokazali slabiju aktivnost zaštite od lipidne peroksidacije u odnosu na etarsko ulje. Najbolje rezultate nam je dao 80% metanolni ekstrakt nedozrelog ploda morača što je u skladu sa sadržajem sekundarnih metabolita u ovom ekstraktu.

6.4. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST ETARSKOG ULJA I EKSTRAKATA MORAČA

Postoje publikovane studije o antimikrobnoj aktivnosti etarskog ulja i ekstrakta morača. Uglavnom su ispitivani efekti ulja i ekstrakata ploda morača protiv Gram (-) i Gram (+) bakterija.

Gotovo sva izolovana etarska ulja pokazuju slabiju ili jaču antimikrobnu aktivnost. Usled lipofilnog karaktera, najčešće se komponente etarskog ulja inkorporiraju u membranu mikroorganizma i inhibiraju transport elektrona u procesu fosforilacije.

Podaci o antimikrobnoj aktivnosti morača su različiti. Lo Cantore (2004) je ukazao na slabu osetljivost *E. coli* na etarsko ulje morača. Anwar (2008), tekođe, navodi osrednju antimikrobnu aktivnost morača. Ozcan (2006) je naveo da etarska ulja morača pokazuju inhibitorski efekat na rast širokog spektra bakterija *Bacillus*. Gulfraz (2008) je objavio da etarsko ulje morača pokazuje bolju antimikrobnu aktivnost od metanolnog i etanolnog ekstrakta. Roby (2013) je ispitivao antimikrobne efekte različitih ekstrakata ploda morača protiv Gram (-) i Gram (+) bakterija i metanolni ekstrakt je pokazao bolju antimikrobnu aktivnost od ostalih ekstrakata. Shrivastava i Bhargava (2012) su ispitivali antibakterijski efekat različitih ekstrakata lista i cvasti morača i dokazana je značajna osetljivost *E. coli* na metanolni ekstrakt cveta morača, dok je *Staphylococcus aureus* pokazao veću osetljivost na hloroformni ekstrakt morača. Dua (2013) je dokazao da metanolni ekstrakt ploda morača značajno inhibiše rast bakterija *Staphylococcus aureus* i *Bacillus pumilus*. Cetin (2010) je ispitivala antimikrobne efekte etarskog ulja i ekstrakata morača i dokazala je da etarsko ulje, usled značajnog prisustva *trans*-anetola pokazuje značajnu antimikrobnu aktivnost, veću od ekstrakata.

Što se tiče naših rezultata, najbolje MIC/MBC koncentracije su dobijene kod 100% metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača (MIC/MBC-6,25/25,00 mg/mL protiv sojeva *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*), dok vodeni ekstrakt lista morača nije pokazao nikakvu antimikrobnu aktivnost.

Etarsko ulje nedozrelog ploda morača je imalo najbolju MIC koncentraciju (3,13 µL/mL) protiv sojeva *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*. Ostali uzorci su pokazali slabiju

antimikrobnu aktivnost, što je u skladu sa publikovanim podacima o evidentnim razlikama u antimikrobnoj aktivnosti morača.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata dobijenih ispitivanjem etarskog ulja, metanolnih ekstrakata (ekstrahovanih u apsolutnom i 80% metanolu) i vodenih ekstrakata različitih nadzemnih delova morača (*Foeniculum vulgare* Miller) mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Etarsko ulje i ekstrakti morača su ispoljili značajan relaksantni efekat na spontane kontrakcije glatke muskulature ileuma pacova. Jači spazmolitički efekat su ostvarila etarska ulja od ekstrakata. Najbolje dejstvo na spontane kontrakcije je imalo etarsko ulje lista morača iz 2012. godine koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo spontane kontrakcije ileuma na $50,65 \pm 9,2\%$.
2. Etarsko ulje i ekstrakti morača su ispoljili značajan inhibitorni efekat na kontrakcije ileuma pacova stimulisane acetilholinom. I ovde su etarska ulja pokazala jači spazmolitički efekat. Najveći inhibitorni efekat je pokazalo etarsko ulje zrelog ploda morača iz 2012. godine koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije stimulisane acetilholinom na $26,61 \pm 5,30\%$.
3. Etarsko ulje i ekstrakti morača su ispoljili značajan inhibitorni efekat na kontrakcije ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida. Etarska ulja su pokazala jači spazmolitički efekat. Najveći inhibitorni efekat je pokazalo etarsko ulje lista morača iz 2013. godine koje je u koncentraciji od 3 mg/mL snizilo kontrakcije stimulisane rastvorom kalijum-hlorida na $53,85 \pm 3,7\%$.
4. Etarsko ulje zrelog ploda morača i metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu iz 2014. godine su ispoljili značajan inhibitorni efekat i na kontrakcije ileuma pacova stimulisane rastvorom barijum-hlorida i na kontrakcije ileuma pacova stimulisane rastvorom kalcijum-hlorida, što ukazuje da se spazmolitičko dejstvo ekstrakta i etarskog ulja ove biljke ne može pripisati samo uticajem na voltažno zavisne Ca^{2+} -kanale L tipa, već i dejstvom na K^{+} -kanale čime se sprečava povećanje koncentracije intracelularnog Ca^{2+} mobilizacijom iz depoa.

5. Ispitivanje spazmolitičkih efekata ekstrakta i etarskog ulja pacova u prisustvu L-NAME je pokazalo da u njegovom prisustvu ne dolazi do statistički značajne promene spazmolitičkog efekta uzoraka što ukazuje da azot-monoksid nema ulogu u ispoljavanju spazmolitičke aktivnosti ekstrakata i etarskog ulja morača.
6. Etarsko ulje zrelog ploda morača i metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu iz 2014. godine su ispoljili relaksantni efekat na spontane kontrakcije glatke muskulature traheje pacova. Jači spazmolitički efekat je ostvarilo etarsko ulje koje je u koncentraciji od 3 mg/mL smanjilo spontane kontrakcije traheje na $75,34 \pm 0,54\%$.
7. Etarsko ulje zrelog ploda morača i metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu iz 2014. godine su ispoljili inhibitorni efekat na kontrakcije ileuma pacova stimulisane acetilholinom. Slične efekte su ostvarili i ulje i ekstrakt, koji su u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirali kontrakcije traheje pacova na $86,71 \pm 2,16\%$, odnosno na $84,95 \pm 2,41\%$.
8. Etarsko ulje zrelog ploda morača i metanolni ekstrakt lista morača ekstrahovan u apsolutnom metanolu iz 2014. godine su ispoljili inhibitorni efekat na kontrakcije ileuma pacova stimulisane rastvorom kalijum-hlorida. Slične efekte su ostvarili i ulje i ekstrakt, koji su u koncentraciji od 3 mg/mL inhibirali kontrakcije traheje pacova na $87,39 \pm 1,57\%$, odnosno na $87,13 \pm 0,30\%$.
9. Postoje razlike u ispoljavanju spazmolitičkih efekata etarskog ulja i ekstrakata tokom godina. Analizom svih uzoraka, najbolje efekte su ispoljili uzorci iz 2013. godine. S obzirom na to da je biljni materijal tokom sve 3 godine sakupljan sa istog lokaliteta, može se zaključiti da ova biljna vrsta pokazuje značajnu osjetljivost na promene klimatskih uslova tokom određenog vremenskog razdoblja.
10. Postoje razlike u ispoljavanju spazmolitičkih efekata etarskog ulja i ekstrakata različitih nadzemnih delova morača. Analizom svih uzoraka, najbolje efekte su ispoljili uzorci lista morača.

11. Postoji značajna razlika u sadržaju ukupnih polifenola i flavonoida između metanolnih i vodenog ekstrakta. Ova jedinjenja su u većoj količini ekstrahovana metanolnim rastvaračima u odnosu na vodu.
12. Metanolni ekstrakti lista i nedozrelog ploda morača su ispoljili dobru antioksidativnu aktivnost mehanizmom hvatanja slobodnih radikala. Najbolju DPPH aktivnost je pokazao ekstrakt nedozrelog ploda morača ekstrahovan u 80% metanolu ($IC_{50}=40,87\pm 0,32$ $\mu\text{g/mL}$).
13. Etarska ulja morača su pokazala snažnu inhibiciju lipidne peroksidacije u emulziji β -karoten/linolna kiselina. Najbolji efekat je pokazalo etarsko ulje lista morača ($IC_{50}=0,36\pm 0,05$ $\mu\text{L/mL}$). Ekstrakti morača nisu pokazali značajnu inhibiciju lipidne peroksidacije.
14. Ispitivani ekstrakti i etarska ulja su pokazali slabiju antimikrobnu aktivnost protiv različitih Gram (+) i Gram (-) bakterija.
15. Najbolje MIC/MBC koncentracije su dobijene od 100% metanolnog ekstrakta zrelog ploda morača (6,25/25,00 mg/mL protiv sojeva *Streptococcus pneumoniae* i *Staphylococcus aureus*), dok vodeni ekstrakt lista morača nije pokazao nikakvu antimikrobnu aktivnost protiv ispitivanih sojeva G (+) i G (-) bakterija. Etarsko ulje nedozrelog ploda morača je imalo najbolju MIC koncentraciju (3,13 $\mu\text{L/mL}$) protiv sojeva *Escherichia coli* i *Proteus mirabilis*.

8. LITERTURA

Abdul-Ghani AS, Amin R. 1988. The vascular action of aqueous extracts of *Foeniculum vulgare* leaves. J Ethnopharmacol 24(2-3):213-8.

Adelstein RS, Conti MA, Hathaway DR, Klee CB. 1978. Phosphorylation of smooth muscle myosin light chain kinase by the catalytic subunit of adenosine 3': 5'-monophosphate-dependent protein kinase. J Biol Chem 253:8347-50.

Agarwal R, Gupta SK, Agarwal SS, Srivastava S, Saxena R. 2008. Oculohypotensive effects of *Foeniculum vulgare* in experimental models of glaucoma. Indian J Physiol Pharmacol 52:77-83.

Akgül A, Bayrak A. 1988. Comparative volatile oil composition of various parts from Turkish bitter fennel (*Foeniculum vulgare* var. *vulgare*). Food Chem 30(4):319-23.

Albuquerque AA, Soreason AL, Leal CJH. 1995. Effect of essential oil of *Croton zehntneri* and of anethole and estragole on skeletal muscle. J Ethnopharmacol 49:41-9.

Al-Shboul OA. 2013. The importance of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. Saudi J Gastroenterol 19(1):3-15.

Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. Flavour Fragr J 24(4):170-6.

Aruoma OI. 1996. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. J Am Oil Chem Soc 73:1617-25.

Aruoma OI. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. Mutat Res:9-20:523-524.

Aschcroft FM. 2000. Ion Channels and Disease. San Diego, California: Academic Press.

Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. 2014. *Foeniculum vulgare* Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. Biomed Res Int:842674.

Bandaruk Y, Mukai R, Terao J. 2014. Cellular uptake of quercetin and luteolin and their effects on monoamine oxidase-A in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Toxicol Rep 1:639-49.

Barnes PJ, Hansel TT. 2004. Prospects for new drugs for chronic obstructive pulmonary disease. Lancet 364:985–96.

Barros L, Carvalho AM, Ferreira ICFR. 2010. The nutritional composition of fennel (*Foeniculum vulgare*): shoots, leaves, stems and inflorescences.” LWT: Food Science and Technology 43(5):814–8.

Barros L, Ferreira MJ, Queiros B, Ferreira ICFR, Baptista P. 2007. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. Food Chem 103:413–9.

Berridge MJ.1993. Inositol trisphosphate and calcium signaling. Nature 361:315-325.

Benković V, Horvat Knežević A, Dikić D, Lisičić D, Orsolčić N, Bašić I, Kosalec I, Kopjar N. 2008. Radioprotective effects of propolis and quercetin in γ -irradiated mice evaluated by the alkaline comet assay. Phytomedicine 15:851–8.

Berridge MJ. 1991. Cytoplasmic calcium oscillation: a two pool model. Cell Calcium 12:63-72.

Berridge MJ, Irwin RF. 1989. Inositol phosphates and cell signalling. Nature 341:197- 205.

Besco E, Braccioli E, Vertuani S, Ziosi P, Brazzo F, Bruni R, Sacchetti G, Manfredini S. 2007. The use of photochemiluminescence for the measurement of the integral antioxidant capacity of baobab products. *Food Chem* 102:1352-6.

Bigović D, Branković S, Kitić D, Radenković M, Janković T, Šavikin K, Živanović S. 2010. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules* 15(5):3391-401.

Bigović D. 2013. Karakterizacija suvih ekstrakata cvasti smilja, *Helichrysum plicatum* DC, i ispitivanje njihove antioksidativne, citotoksične, spazmolitičke i antimikrobne aktivnosti. Doktorska disertacija, Beograd: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.

Blackshaw LA, Brookes SJ, Grundy D, Schemann M. 2007. Sensory transmission in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil* 19(1):1-19.

Borrelli F, Borbone N, Capasso R, Montesano D, De Marino S, Aviello G, Aprea G, Masone S, Izzo AA. 2009. Potent relaxant effect of a *Celastrus paniculatu* extract in the rat and human ileum. *J Ethnopharmacol* 122:434-8.

Boskabady MH, Khatami A. 2003. Relaxant effect of *Foeniculum vulgare* on isolated guinea pig tracheal chains. *Pharmaceutical Biol* 41:211-5.

Boskabady MH, Khatami A, Nazari A. 2004. Possible mechanism(s) for relaxant effects of *Foeniculum vulgare* on guinea pig tracheal chains. *Pharmazie* 59(7):561-4.

Bowman WC. 2006. Neuromuscular block. *Br J Pharmacol* 147:S277-86.

Branković S, Kitić D, Radenković M, Veljković S, Golubović T. 2009. Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect of the essential oil of *Calamintha glandulosa* Šilic on the isolated rat ileum. *Gen Physiol Biophys. Special Issue* 28:174-8.

Branković S, Kitić D, Radenković M, Veljković S, Janković T, Šavikin K, Zdunic G. 2011. Spasmolytic activity of the ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* Boiss & Heldr on the isolated rat ileum contractions. *J Med Food* 14(5):495-8.

Catel-Ferreira M, Tnani H, Hellio C, Cosette P, Lebrun L. 2015. Antiviral effects of polyphenols: development of bio-based cleaning wipes and filters. *J Virol Methods* 212:1-7.

Cetin B, Ozer H, Cakir A, Polat T, Dursun A, Mete E, Oztürk E, Ekinci M. 2010. Antimicrobial activities of essential oil and hexane extract of Florence fennel (*Foeniculum vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell.) against foodborne microorganisms. *J Med Food* 13(1):196-204.

Chang CL, Zhang LJ, Chen RY, Kuo YLM, Huang JP, Huang HC, Lee KH, Wu YC, Kuo YH. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory phenylpropanoid derivatives from *Calamus quiquestinervius*. *J Nat Prod* 73:1482–8.

Chang YY, Yang DJ, Chiu CH, Lin YL, Chen JW, Chen YC. 2013. Antioxidative and anti-inflammatory effects of polyphenol-rich litchi (*Litchi chinensis* Sonn.)-flower-water-extract on livers of high-fat-diet fed hamsters. *J Funct Food* 5:44-53.

Choi E, Hwang J. 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. *Fitoterapia* 75(6):557–65.

Chong FW, Chakravarthi S, Nagaraja HS, ThanikAChalam PM, Lee N. 2009. Expression of transforming growth factor - β and determination of apoptotic index in histopathological sections for assessment of the effects of apigenin (4',5',7'- trihydroxyflavone) on cyclosporine A induced renal damage. *Malays J Pathol* 31(1):35–43.

Conforti F, Statti G, Uzunov D, Menichini F. 2006. Comparative chemical composition and antioxidant activities of wild and cultivated *Laurus nobilis* L. leaves and *Foeniculum vulgare* subsp. *piperitum* (Ucria) coutinho seeds. *Biol Pharm Bull* 29(10):2056-64.

Conner DE. 1993. Naturally occurring compounds. U: Davidson P, Branen AL, urednici, Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, Inc. s 441-68

Corazziari E. 2004. Definition and epidemiology of functional gastrointestinal disorders. Best Pract Res Clin Gastroenterol 18:613-31.

Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. 2006. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Blackwell Publishing.

Damjanović B, Lepojević Ž, Živković V, Tolić A. 2005. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: comparison with hydrodistillation. Food Chem 92(1):143–9.

Denisov ET, Afanasev IB. 2005. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology, USA: CRC Press Taylor & Francis Group.

Diao W, Hu Q, Zhang H, Xu J. 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Food Control 35(1):109–16.

Díaz-Maroto MC, Díaz-Maroto Hidalgo IJ, Sánchez-Palomo E, Pérez-Coello MS. 2005. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. J Agric Food Chem 53(13):5385-9.

Drossman DA, Morris CB, Hu Y, Toner BB, Diamant N, Whitehead WE, et al. 2007. Characterization of health related quality of life (HRQOL) for patients with functional bowel disorder (FBD) and its response to treatment. Am J Gastroenterol 102(7): 1442–53.

Drossman DA. 2006. The functional functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. Gastroenterology 130:1377-90.

Dua A, Garg G, Mahajan R. 2013. Polyphenols, flavonoids and antimicrobial properties of methanolic extract of fennel (*Foeniculum vulgare* Miller). Eur J Exp Biol 3(4):203-8.

Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. 2016. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. Pharmacol Res 112:4-29.

Ehlert FJ, Sawyer GW, Esqueda EE. 1999. Contractile role of M2 and M3 muscarinic receptors in gastrointestinal smooth muscle. Life Sci 64(6-7):387-94.

El Bardai S, Hamaide MC, Lyoussi B, Quetin-Laclereq J, Morel N, Wibom M. 2004. Marrubenol interacts with the phenylalkylamine binding site of the L-type Ca-channel. Eur J Pharmacol 492:269-72.

El Bardai S, Lyoussi B, Wibom M, Morel N. 2001. Pharmacological evidence of hypotensive activity of *Marrucium vulgare* and *Foeniculum vulgare* in spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens 23(4):329-43.

El-Soud NA, El-Laithy N, El-Saeed G et al. 2011. Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil in streptozotocin-induced diabetic rats. MJMS 4(2):139-46.

Eun-Mi C, Jae-Kwan H. 2004. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. Fitoterapia 75(6):557-65.

Fang L, Qi M, Li T, Shao Q, Fu R. 2006. Headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of volatile compounds from *Foeniculum vulgare* Mill. J Pharm Biomed Anal 41(3):791-7.

Farhadi A, Bruninga K, Fields J, Keshavarzian A. 2001. Irritable bowel syndrome: an update on therapeutic modalities. Expert Opin Investig Drugs 10:1211-22.

Farrugia G. 1999. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. Annu Rev Physiol 1999 61:45-84.

Faudale M, Viladomat F, Bastida J, Poli F, Codina C. 2008. Antioxidant activity and phenolic composition of wild, edible, and medicinal fennel from different Mediterranean countries. *J Agric Food Chem* 56(6):1912–20.

Felder CC. 1995. Muscarinic acetylcholine receptors: signaltransduction through multiple effectors. *FASEB J* 9:619-25.

Firuzi O, Mladenka P, Petrucci R, Marrosu G, Saso L. 2004. Hypochlorite scavenging activity of flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 56:801–7.

Forster HB, Niklas H, Lutz S. 1980. Antispasmodic effects of some medicinal plants. *Planta Medica* 40(4):309–19.

Furness JB. 2006. *The Enteric Nervous System*. U: Massachusetts USA: Blackwell Publishing Inc.

Gao J, Zhang J, Qu Z, Zhou H, Tong Y, Liu D, Yang H, Wenyuan Gao. 2016. Study on the mechanisms of the bronchodilator effects of *Folium Eriobotryae* and the selected active ingredient on isolated guinea pig tracheal strips. *Pharm Biol* 54(11):2742-52.

Garga C, Khan SA, Ansari SH, Suman A, Garg M. 2009. Chemical composition, therapeutic potential and perspectives of *Foeniculum vulgare*. *Pharmacognosy Rev* 3(6):346-52.

Gilani A, Khan A, Ghayur M, Ali S, Herzig J. 2006. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K⁺-channel activation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:365–73.

Gilani AH, Shah AJ, Janbaz KH, Ahmad SP, Ghayur MN. 2007. Studies on antihypertensive and antispasmodic activities of *Andropogon muricatus* Retz. *Can J Physiol Pharmacol* 85:911-7.

Godfrain T. 1986. Calcium entry blockade and excitation contraction coupling in the cardiovascular system (with an attempt of pharmacological classification). *Acta Pharmacol* 58(Suppl 2):5-30.

Gojković-Bukarica Lj, Kažić T. 2004. Jonski kanali i kanalopatije. U: *Klinička kardiovaskularna farmakologija*. Kažić T, Ostojić M, urednici. 4. izdanje. Beograd: Integra:37-56.

Gross M, Lewinsohn E, Tadmor Y, Bar E, Dudai N, Cohen Y, Friedman J. 2009. The inheritance of volatile phenylpropenes in bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*. Apiaceae) chemotypes and their distribution within the plant. *Biochem Syst Ecol* 37(4):308-16.

Grover S, Malik CP, Hora A, Kushwaha HB. 2013. Botany, cultivation, chemical constituents and genetic diversity in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.): A review. *IJCRLS* 2(2):128–39.

Guilled MD, Manzanons MJ. 1996. A study of several parts the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interests. *Food Res Int* 29:85–8.

Guillèn MD, Manzanos MJ. 1996. A study of several parts of the plant *Foeniculum vulgare* as a source of compounds with industrial interest. *Food Research International* 29(1):85–8.

Gulfraz M, Mehmood S, Minhas N, Jabeen N, Kausar R, Jabeen K, Arshad G. 2008. Composition and antimicrobial properties of essential oil of *Foeniculum vulgare*. *Afr J Biotechnol* 7(24):4364–8.

Habauzit V, Milenković D, Morand C. 2014. Vascular protective effects of fruit polyphenols. U: Watson R, Preedy VR, Zibadi S, urednici. *Polyphenols in human health and disease*, Vol 2, London: Elsevier.

Hagerman A, Mueller-Harvey I, Makkam HPS. 2000. Quantification of tannins in tree foliage-a laboratory manual. Vienna: FAO/IAEA Working document IAEA.

Halayko AJ, Tran T, Ji SY, Yamasaki A, Gosens R. 2006. Airway smooth muscle phenotype and function: Interactions with current asthma therapies. *Curr Drug Targets* 7:525–40.

Hanani M, Farrugia G, Komuro T. 2005. Intercellular coupling of interstitial cells of Cajal in the digestive tract. *Int Rev Cytol* 242:249–82.

Himpens B, Missiaen L, Casteels R. 1995. Ca²⁺ homeostasis in vascular smooth muscle. *J Vasc Res* 32:207-19.

Holm AN, Rich A, Sarr MG, Farrugia G. 2000. Whole cell current and membrane potential regulation by a human smooth muscle mechanosensitive calcium channel. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1155-61.

Huang DJ, Ou BX, Prior RL. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53:1841-56.

Huang WW, Chiu YJ, Fan MJ, Lu HF, Yeh HF, Li KH, Chen PY, Chung JG, Yang JS. 2010. Kaempferol induced apoptosis via endoplasmic reticulum stress and mitochondria-dependent pathway in human osteosarcoma U-2 OS cells. *Mol Nutr Food Res* 54:1585-95.

Imaseki K. 1962. Studies on effect of essential oils and their components on isolated intestines of mice. *Jpn J Pharmacol* 82:1326-8.

Iriti M, Varoni EM. 2014. Cardioprotective effects of moderate red wine consumption: Polyphenols vs. ethanol. *J Appl Biomed* 12:193-202.

Ivković B. 2013. Dizajniranje, sinteza i biološka aktivnost aminoalkoksi derivata fenilpropiofenona. Doktorska disertacija, Beograd: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet.

Jamwal NS, Kumar S, Rana AC. 2013. Phytochemical and pharmacological review on *Foeniculum vulgare* Vol. 4:327–41.

Josifović M. 1973. Flora SR Srbije V. Srpska akademija nauka i umetnosti, Beograd.

Justesen U, Knuthsen P, Leth T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 799:101–10.

Karakašević B. 1977. Mikrobiologija i parazitologija, Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga.

Katavic PL, Lamb K, Navarro H, Prisinzano TE. 2007. Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and preliminary structure-activity relationships. *J Nat Prod* 70(8): 1278–82.

Kaur GJ, Arora DS. 2009. Antibacterial and phytochemical screening of *Anethum graveolens*, *Foeniculum vulgare* and *Trachyspermum ammi*. *BMC Complement Altern Med* 9:30.

Kobori M. 2014. Dietary quercetin and other polyphenols: attenuation of obesity. U: Watson RR, Preedy VR, Zibadi S, urednici. Polyphenols in human health and disease Vol. 1, London: Elsevier.

Koleva II, Van Beek TA, Linssen JPH, Groot A, Evstatieva LN. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: A comparative study on three testing methods. *Phytochem Analysis* 13:8-17.

Komuro T. 2006. Structure and organization of interstitial cells of Cajal in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 576:653–8.

Kontogiorgis C, Deligiannidou GE, Hadjipavlou-Litina D, Lazari D, Papadopoulos A. 2016. Antioxidant protection: The contribution of proper preparation of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) beverage. *Ind Crops Prod* 79:57–62.

Koppula S, Kumar H. 2013. *Foeniculum vulgare* Mill (Umbelliferae) attenuates stress and improves memory in Wister rats. *Trop J Pharm Res* 2013;12(4):553–558.

Koraćević D, Bjelaković G, Đorđević VB, Nikolić J, Pavlović DD, Kocić G. 2003. Biohemija, Beograd. Srbija: Savremena administracija.

Kostić M, Zlatković B, Miladinović B, Živanović S, Mihajilov-Krstev T, Pavlović D, Kitić D. 2015. Rosmarinic acid levels, phenolic contents, antioxidant and antimicrobial activities of the extracts from *Salvia verbenaca* L, obtained with different solvents and procedures. J Food Biochem 39:199-208.

Kovačević N. 2004. Osnovi farmakognozije, Beograd: Srpska školska knjiga.

Krishnaiah D, Sarbatly S, Nithyanandam R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. Food Bioprod Process 3:217–33.

Kuriyama H, Ito Y, Suzuki H, Kitamura K, Itoh T. 1982. Factors modifying contraction-relaxation cycle in vascular smooth muscles. Am J Physiol 243:H641–62.

Lamaison JL, Carnat A. 1990. Teneurs en Principaux Flavonoides des Fleurs de *Crataegus monogyna* Jacq et de *Crataegus laevigata* (Poiret D. C) en Fonction de la Vegetation. Pharm Acta Helv 65:315–20.

Leal LK, Costa MF, Pitombeira M, Barroso VM, Silveira ER, Canuto KM, Viana GS. 2006. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. Life Sci 79(1):98-104.

Lin Y, Shi R, Wang, Shen HM. 2008. Luteolin, a flavonoid with potentials for cancer prevention and therapy. Curr Cancer Drug Targets 8(7):634–46.

Lisková J, Douglas TE, Beranová J, Skwarczyńska A, Božić M, Samal SK, Modrzejewska Z, Gorgieva S, Kokol V, Bacáková L. 2015. Chitosan hydrogels enriched with polyphenols: Antibacterial activity. Cell adhesion and growth and mineralization. Carbohyd Polimer 129:135-42.

Liu M, Li X, Liu Y, Cao B. 2013. Regulation of flavanone 3-hydroxylase gene involved in the flavonoid biosynthesis pathway in response to UV-B radiation and drought stress in the desert plant *Reaumuria soongorica*. *Plant Physiol Biochem* 73:161-7.

Liu S, Hu HZ, Ren J, Gao C, Gao N, Lin Z, Xia Y, Wood JP. 2001. Pre- and postsynaptic inhibition by nociceptin in guinea pig small intestinal myenteric plexus in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281:G 237-G 246.

Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore. 2004. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J Agric Food Chem* 52(26):7862-6.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Phcog Rev* 4:118–26.

Loizzo MR, Said A, Tundis R, Rashed K, Statti GA, Hufner A, Menichini F. 2007. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). *Phytother Res* 21:32-6.

Lowgagon O. 1999. Asthma and asthma-like disorders. *Respiratory Medicine* 93, 851–5.

Lozoya X, Meckes M, Abou-Zaid M, Tortoriello J, Nozzolillo C, Arnason JT. 1994. Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of a spasmolytic principle. *Arch Med Res* 25(1):11-5.

Lyford GL, Farrugia G. 2003. Ion channels in gastrointestinal smooth muscle and interstitial cells of Cajal. *Curr Opin Pharmacol* 3(6):583-7.

Lyster DJK, Bywater RAR, Taylor GS, Watson MJ. 1992. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on non-cholinergic junction potentials in the circular muscle of the guinea pig ileum. *J Auton Nerv Syst* 41:187-96.

Mahmood T, Anwar F, Abbas M, Saari N. 2012. Effect of maturity on phenolics (phenolic acids and flavonoids) profile of strawberry cultivars and mulberry species from Pakistan. *Int J Mol Sci* 13:4591-607.

Manonmani R, Abdul Khadir VM. 2011. Antibacterial screening on *Foeniculum vulgare* Mill. *Int J Pharma Bio Sci* 2(4):390–4.

Miguel MG. 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. *Flavour Fragr J* 25:291-312.

Mihailov-Krstev T. 2009. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L. Doktorska disertacija, Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet.

Mimica-Dukić N, Kujundzić S, Soković M, Couladis M. 2003. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill obtained by different distillation conditions. *Phytother Res* 17(4):368-71.

Min B, Ahn DU. 2005. Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products- A review. *Food Sci Biotechnol* 14:152–63.

Mulvihill EE, Huff MW. 2010. Antiatherogenic properties of flavonoids: implications for cardiovascular health. *Can J Cardiol* 26:17A-21A.

Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. 2002. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32(5):386-93.

Naga Kishore R, Anjaneyulu N, Naga Ganesh M, Sravya N. 2012. Evaluation of anxiolytic activity of ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* in mice model. *Int J Pharm Pharm Sci* 4(3):584–6.

Nassar MI, Aboutabl EA, Makled YA, El-Khrisy EA, Osman AF. 2010. Secondary metabolites and pharmacology of *Foeniculum vulgare* Mill. Subsp. *Piperitum*. Rev Latinoam Quím 38(2): 103-12.

Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. 1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: Reference interval and effects of life-style factors. Clin. Chem 43:1209–14.

Nielsen SE, Young JF, Daneshvar B, Lauridsen ST, Knuthsen P, Sandström B, Dragsted LO. 1999. Effect of parsley (*Petroselinum crispum*) intake on urinary apigenin excretion, blood antioxidant enzymes and biomarkers for oxidative stress in human subjects. Br J Nutr 81(6):447-55.

Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. 2001. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biol Pharm Bull 24:1202–5.

Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu ÖI. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. LWT-Food Science and Technology 36:263–71.

Olszewska MA, Presler A, Michel P. 2012. Profilic of phenolic compounds and antioxidant activity of dry extracts from the selected sorbus species. Molecules 17(3):3093-113.

Orhan IE, Özçelik B, Kartal M, Kan Y. 2012. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. Turk J Biol 36(3):239-46.

Oshima T, Miwa H. 2015. Epidemiology of functional gastrointestinal disorders in Japan and in the world. J Neurogastroenterol Motil 21:320-9.

Ostad SN, Soodi M, Shariffzadeh M, Khorshidi N, Marzban H. 2001. The effect of fennel essential oil on uterine contraction as a model for dysmenorrhea, pharmacology and toxicology study. *J Ethnopharmacol* 76(3):299–304.

Ou Y, Gibbons SJ, Miller SM, Strega PR, Rich A, Distad MA, Ackerman MJ, Rae JL, Szurszewski JH, Farrugia G. 2002. SCN5A is expressed in human jejunal circular smooth muscle cells. *Neurogastroenterol Motil* 14:477-86.

Ouédraogo M, Da FL, Fabré A, Konaté K, Dibala CI, Carreyre H, Thibaudeau S, Coustard J-M, Vandebrouck C, Bescond J, Belemtougri RG. 2013. Evaluation of the bronchorelaxant, genotoxic, and antigenotoxic effects of *Cassia alata* L. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013(4):162651. doi: 10.1155/2013/162651.

Oulmouden F, Ghalim N, El Morhit M, Benomar H, Daoudi EM, Amrani S. 2011. Hypolipidemic and anti-atherogenic effect of aqueous extract of fennel (*Foeniculum vulgare*) extract in an experimental model of atherosclerosis induced by Triton WR-1339. *Eur J Sci Res* 52(1):91-9.

Ozbek H, Uğraş S, Dülger H et al. 2003. Hepatoprotective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil. *Fitoterapia* 74(3):317–9.

Ozcan MM, Sağdıç O, Ozkan G. 2006. Inhibitory effects of spice essential oils on the growth of *Bacillus* species. *J Med Food* 9(3):418-21.

Qu Z, Zhang J, Gao W, Guo H, Liu C. 2014. Bidirectional effects of methanol extract of Wei-Chang-An pill on gastrointestinal transit and the spasmolytic activity on isolated rat jejunum 155(1):203-12.

Padma P, Khosa RL. 2002. Anti-stress agents from natural origin. *J Nat Remedies* 2(1):21–7.

Palsson OS, Whitehead WE. 2013. Psychological treatments in functional gastrointestinal disorders: A primer for the gastroenterologist. *Clin Gastroenterol Hepatol* 11:208-16.

Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, Codina C. 2004. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 52(12):3679–87.

Parisi OI, Pucci F, Rastuccia D, Farina G, Iemma F, Picci N. 2014. Polyphenols and their formulations: different strategies to overcome the drawbacks associated with their poor stability and bioavailability. U: Watson R, Preedy VR and Zibadi S, urednici. *Polyphenols in Human Health and Disease Vol.1*. London: Elsevier.

Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TSK, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. 2008. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res* 31:1303-11.

Patterson LM, Zheng H, Ward SM, Berthoud HR. 2001. Immunohistochemical identification of cholecystokinin A receptors on interstitial cells of Cajal, smooth muscle, and enteric neurons in rat pylorus. *Cell Tissue Res* 305:11–23.

Perez A, Gonzalez-Manzano S, Jimenez R, Perez-Abud R, Haro JM, Osuna A, Santos-Buelga C, Duarte J, Perez-Vizcaino F. 2014. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. *Pharmacol Res* 89:11-8.

Pradhan M, Sribhuwaneswari S, Karthikeyan D, Minz S, Sure P, Chandu AN, Mishra U, Kamalakannan K, SaravanankumarA, Sivakumar T. 2008. *In-vitro* cytoprotection activity of *Foeniculum vulgare* and *Helicteres isora* in cultured human blood lymphocytes and antitumouractivity against B16F10 melanoma cell line. *RJPT* 1(4):450-2.

Prior RL, Cao GH. 1999. *In vivo* antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 27:1173-81.

PuttACharya S, Trailovic SM, Robertson AP, Thompson DP, Woods DJ, Martin RJ. 2013. Derquantel and abamectin: Effects and interactions on isolated tissues of *Ascaris suum*. Mol Biochem Parasitol 188:79–86.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. 2012. Pharmacology. International edition, 7th edition. London: Churchill Livingstone.

Rather MA, Dar BA, Sofi SN, Bhat BA, Qurishi MA. 2016. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arab J Chem 9(2):S1574-83.

Reiter M, Brandt W. 1985. Relaxant effects on tracheal and ileal smooth muscles of the guinea-pig. Drug Res 35:408-14.

Robertson AP i Martin RJ. 2007b. Mode of action of levamisole and pyrantel, anthelmintic resistance, E153 and Q57. Parasitology 134:1093-104.

Roby MHH, Sarhan MA, Selim, KA, Khalel KI. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). Ind Crops Prod 44:437–45.

Rømert P, Mikkelsen HB. 1998. c-Kit immunoreactive interstitial cells of Cajal in the human small and large intestine. Histochem Cell Biol 109:195–202.

Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJ. 2000. Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. Planta Med 66(8):687–93.

Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira CV, Aoyama H, Peppelenbosch MP. 2010. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. Cell Death Dis 1(e19):1–11.

Ruiz E, Padilla E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. 2006. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. *Eur J Pharmacol* 529(1-3):79-83.

Rumessen JJ, Mikkelsen HB, Qvortrup K, Thuneberg L. 1993. Ultrastructure of interstitial cells of Cajal in circular muscle of human small intestine. *Gastroenterology* 104:343–50.

Sanders K, Koh S, Ward S. 2006. Interstitial cells of cajal as pacemakers in the gastrointestinal tract. *Annu Rev Physiol* 68:307–43.

Sanders KM, Ward SM. 1992. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 262:G379-G392.

Sartorrato A, MACHado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 35:275-80.

Savić D. 1993. Hemijsko ispitivanje etarskog ulja, alkana i masnih kiselina *Satureja fukarekii* Šilić i *Satureja adamovicii* Šilić . Magistarska teza, Niš: Univerzitet u Nišu, Filozofski fakultet.

Sedighi M, Rafieian-Kopaei M, Noori-Ahmadabadi M, Godarzi I, Baradaran A. 2014. In vitro impact of hydro-alcoholic extract of *Rosa damascena* Mill. on rat ileum contractions and the mechanisms involved. *Int J Prev Med* 5(6):767-75.

Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA. 2011. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. *Molecules* 16(2):1366–77.

Shahzad M, Sherry L, Rajendran R, Edwards CA, Combet E, Ramage G. 2014. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Ag* 44:269-73.

Sharma V, Joseph C, Ghosh S, Agarwal A, Mishra MK, Sen E. 2007. Kaempferol induces apoptosis in glioblastoma cells through oxidative stress. *Mol Cancer Ther* 6(9):2544-53.

Shiba Y, Kinoshita T, Chuman H, Taketani Y, Takeda E, Kato Y, Naito M, Kawabata K, Ishisaka A, Terao J, Kawai Y. 2008. Flavonoids as substrates and inhibitors of myeloperoxidase: molecular actions of aglycone and metabolites. *Chem Res Toxicol* 21:1600–9.

Shrivastava N, Bhargava R. 2102. Antibacterial potential of selected medicinal plants against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biol Ind* 1(1):133–5.

Shukla S, Gupta S. 2010. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *J Agric Food Chem* 27(6):962–78.

Si D, Wang Y, Zhou YH, Guo Y, Wang J, Zhou H, Li ZS, Fawcett JP. 2009. Mechanism of CYP2C9 inhibition by flavones and flavonols. *Drug Metab Dispos* 37 (3): 629–34.

Somlyo AP, Somlyo AV. 2000. Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522:177-85.

Strege PR, Holm AN, Rich A, Miller SM, Ou Y, Sarr MG, Farrugia G. 2003. Cytoskeletal modulation of sodium current in human jejunal circular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284:C60-6.

Strege PR, Ou Y, Rich A, Lei S, Gibbons SJ, Sarr MG, Szurszewski JH, Farrugia G. 2003. Sodium current and its effect on the slow wave in human intestinal interstitial cells of Cajal. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 285 (6):G1111-21.

Strohl AW, Rouse H, Fisher DB. 2001. *Microbiology*, Philadelphia: Lipincott Williams and Wilkins.

Suzuki H, Ward SM, Bayguinov YR, Edwards FR, Hirst GDS. 2003. Involvement of intramuscular interstitial cells in nit-ergic inhibition in mouse gastric antrum. *J Physiol* 546:751-63.

Tanira MO, Shah AH, Mohsin A, Ageel AM, Qureshi S. 1996. Pharmacological and toxicological investigations on *Foeniculum vulgare* dried fruit extract in experimental animals. *Phytother Res* 10(1):33-6.

Tattersfield AE, Knox AJ, Britton JR, Hall IP. 2002. Asthma. *Lancet* 360:1313-22.

Taupin P. 2009. Apigenin and related compounds stimulate adult neurogenesis. Mars. Inc. The Salk Institute for Biological Studies: WO2008147483. *Expert Opin Ther Pat* 19(4):523-7.

Telci I, Demirtas I, Sahin A. 2009. Variation in plant properties and essential oil composition of sweet fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) fruits during stages of maturity. *Ind Crops Prod* 30(1):126-30.

Tognolini M, Ballabeni V, Bertoni S, Bruni R, Impicciatore M, Barocelli E. 2007. Protective effect of *Foeniculum vulgare* essential oil and anethole in an experimental model of thrombosis. *Pharm Res* 56(3) 254-60.

Trailović SM, Nedeljković J. 2011. Central and peripheral neurotoxic effects of ivermectin in rats. *J Vet Med Sci* 73(5): 591-9.

Tripathi P, Tripathi R, Patel RK, Pancholi SS. 2013. Investigation of antimutagenic potential of *Foeniculum vulgare* essential oil on cyclophosphamide induced genotoxicity and oxidative stress in mice. *Drug Chem Toxicol* 36(1):35-41.

Upadhyay R, Mohan Rao LJ. 2013. An outlook on chlorogenic acids-occurrence, chemistry, technology, and biological activities. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53 (9):968-84.

Vanderwinden JM. 1999. Role of interstitial cells of Cajal and their relationship with the enteric nervous system. *Eur J Morphol* 37:250-6.

Vannucchi MG, De Giorgio R, Faussone-Pellegrini MS. 1997. NK1 receptor expression in the interstitial cells of Cajal and neurons and tachykinins distribution in rat ileum during development. *J Comp Neurol* 383:153–62.

Venigalla M, Gyengesi E, Münch G. 2015. Curcumin and Apigenin-novel and promising therapeutics against chronic neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 10(8):1181–5.

Venkataranganna MV, Anturlikar SD, Gopumadhavan S, Prakash NS, Rafiq M, Murthy GS, Mitra SK. 2002. Antispasmodic activity of SJ-200 (Himcospaz) an herbal preparation. *Pharm Biol* 40(6):416-21.

Viola H, Wasowski C, Levi De Stein M, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Paladini AC. 1995. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med* 61(3):213–6.

Wang XY, Paterson C, Huizinga JD. 2003. Cholinergic and nitrergic innervation of ICC-DMP and ICC-IM in the human small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 15:531–43.

Webb RC. 2003. Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27(1-4):201-6.

WuVCH, Qiu X, Bushway A, Harper L. 2008. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. *LWT-Food Sci Technol* 41:1834-41.

Xu Z. 2012. Important antioxidant phytochemicals in agricultural food products. U: Xu Z, Howard LR, Urednici. *Analysis of antioxidant-rich phytochemicals*. Oxford: John Wiley&Sons, Inc.

Yoshioka M, Tamada T. 2005. Aromatic factors of anti-platelet aggregation in fennel oil. *Biog Amines* 19(2):89-96.

Yu SF, Shun CT, Chen TM, Chen YH. 2006. 3-O-beta-D-glucosyl-(1-->6)-beta-D-glucosyl-kaempferol isolated from *Sauropus androgenus* reduces body weight gain in Wistar rats. *Biol Pharm Bull* 29:2510-13.

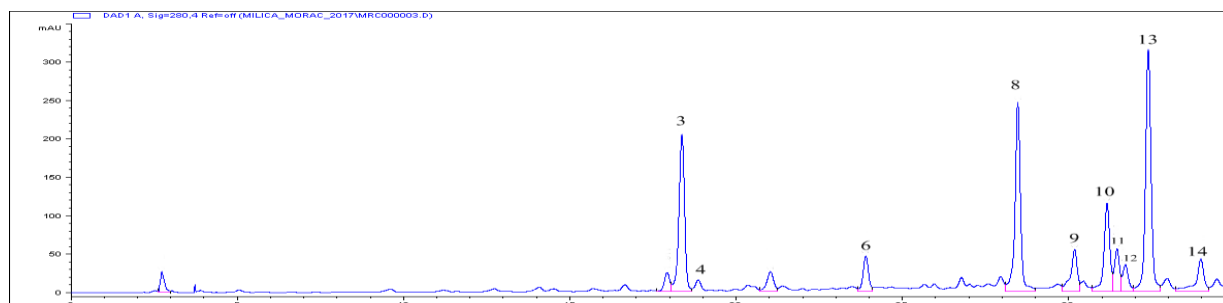
Zhang Y, Kim K, Zhang W, Guo Y, Kim, S, Lü J. 2012. Galbanic acid decreases androgen receptor abundance and signaling and induces G1 arrest in prostate cancer cells. *Int J Cancer* 130(1): 200-212.

Zhang Y, Liu D, 2011. Flavonol kaempferol improves chronic hyperglycemia-impaired pancreatic beta-cell viability and insulin secretory function. *Eur J Pharmacol* 670:325-32.

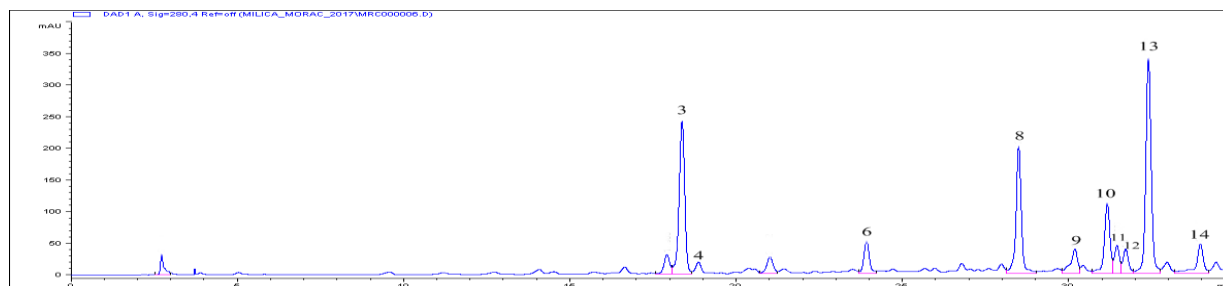
Zhao G, Qin GW, Wang J, Chu WJ, Guo LH. 2010. Functional activation of monoamine transporters by luteolin and apigenin isolated from the fruit of *Perilla frutescens* (L.) Britt. *Neurochem Int* 56(1):168-76.

PRILOG 1

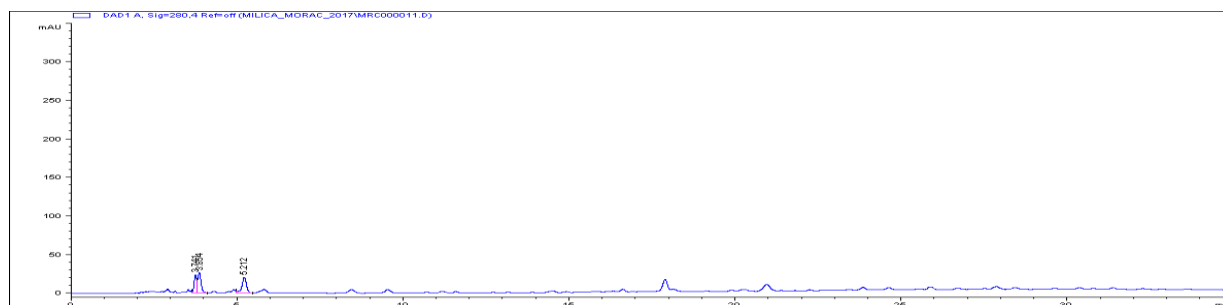
HPLC hromatogrami flavonoida i fenolnih kiselina u ekstraktima morača (*Foeniculum vulgare* Miller)



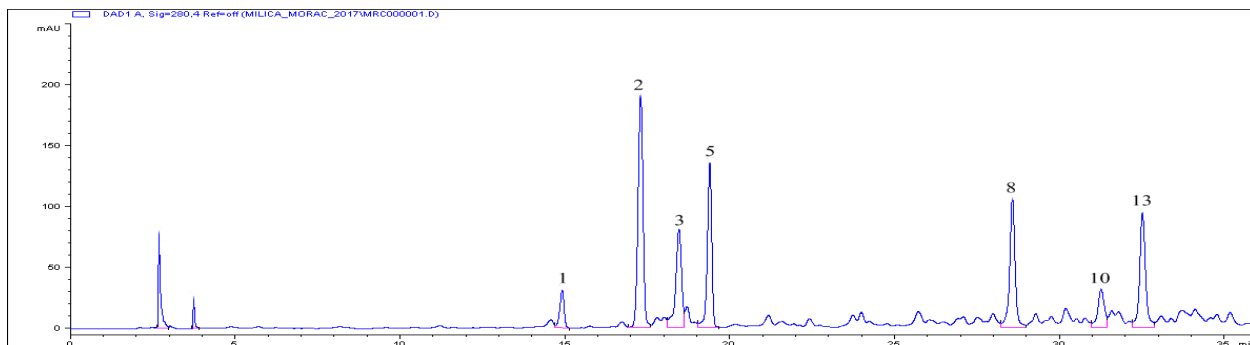
Slika 1. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu lista morača ekstrahovanom u 100% metanolu (3-HK, 4-KK, 6-1,3-DKK, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 11-HL, 12-1,4-DKK, 13-RK, 14-DKK)



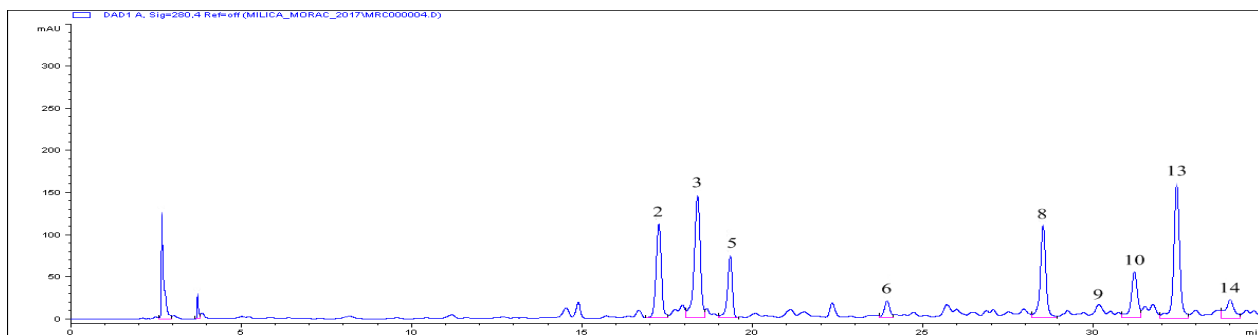
Slika 2. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu lista morača ekstrahovanom u 80% metanolu (3-HK, 4-KK, 6-1,3-DKK, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 11-HL, 12-1,4-DKK, 13-RK, 14-DKK)



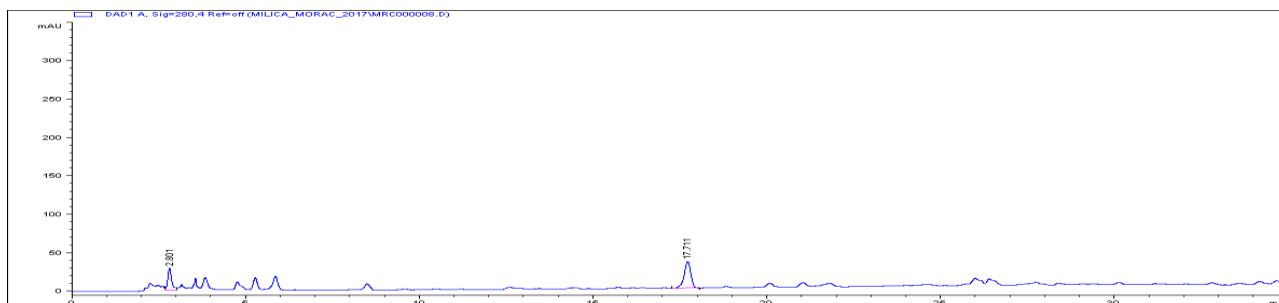
Slika 3. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu lista morača



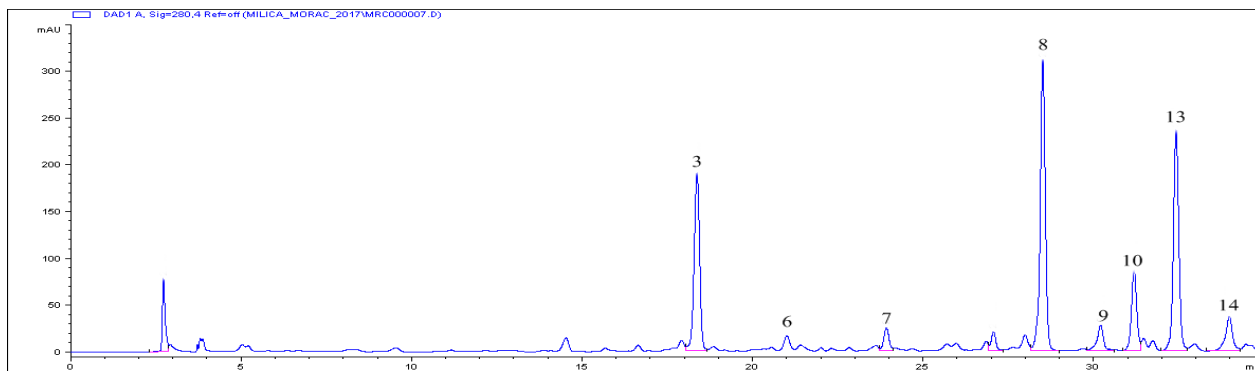
Slika 4. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu zrelog ploda morača ekstrahovanom u 100% metanolu (1-DGK, 2-DGK, 3-HK, 5-DGK, 8-Rt, 10-1,5-DKK, 13-RK)



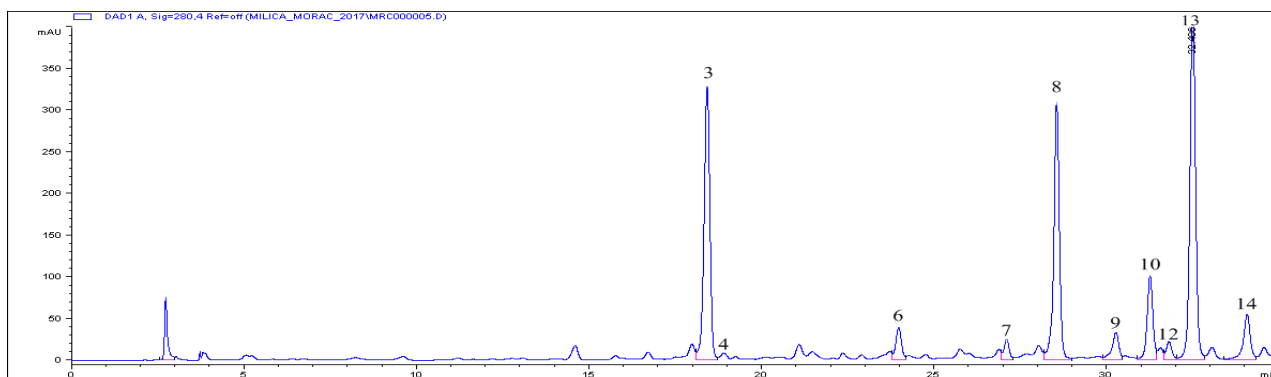
Slika 5. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu zrelog ploda morača ekstrahovanom u 80% metanolu (2-DGK, 3-HK, 5-DGK, 6-1,3-DKK, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 13-RK, 14-DKK)



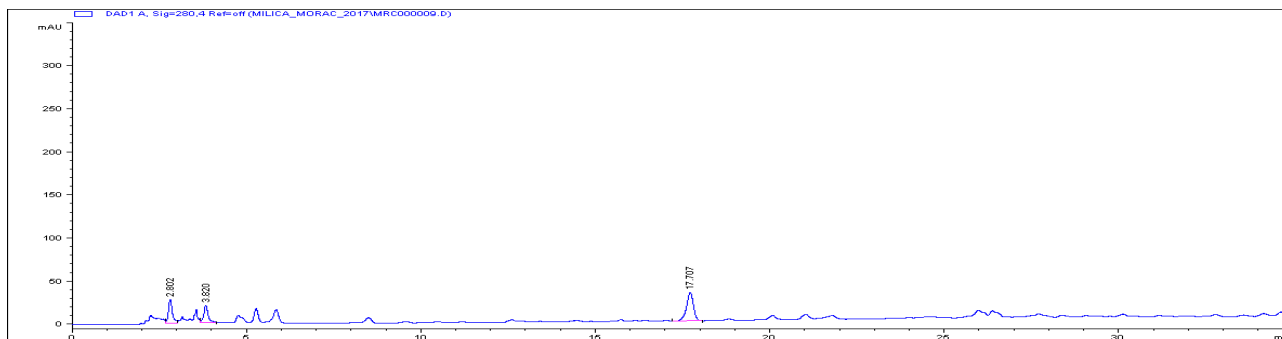
Slika 6. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu zrelog ploda morača



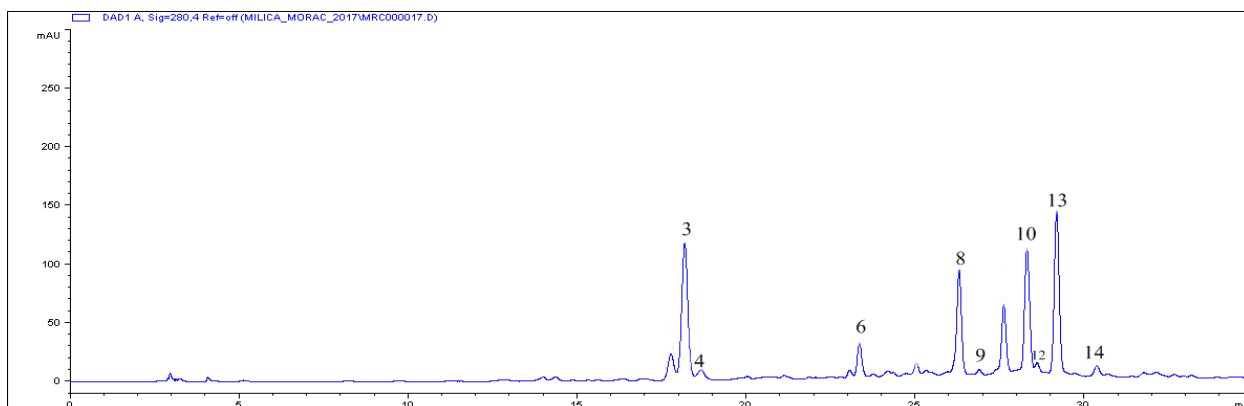
Slika 7. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu nedozrelog ploda morača ekstrahovanom u 100% metanolu (3-HK, 6-1,3DKK, 7-HQ, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 13-RK, 14-DKK)



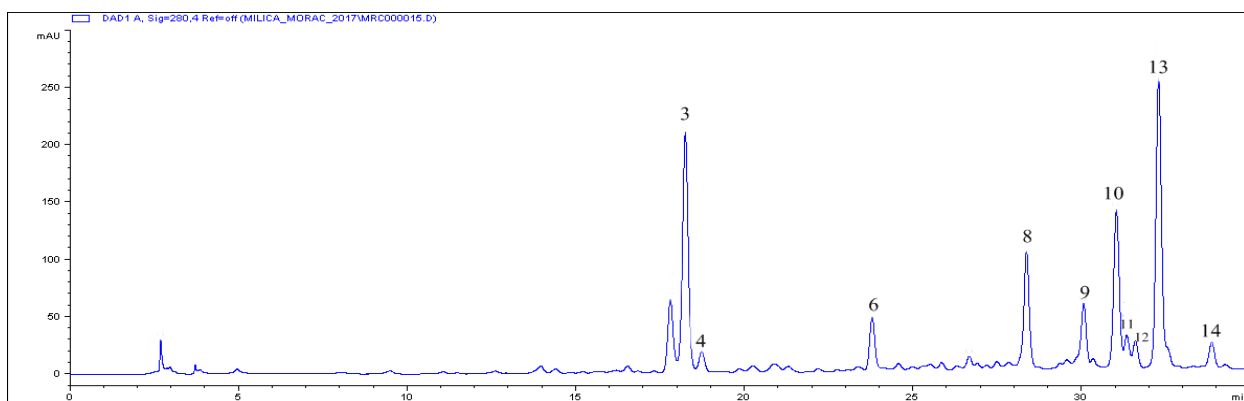
Slika 8. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu nedozrelog ploda morača ekstrahovanom u 80% metanolu (3-HK, 4-4-KK, 6-1,3DKK, 7-HQ, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 12-1,4-DKK, 13-RK, 14-DKK)



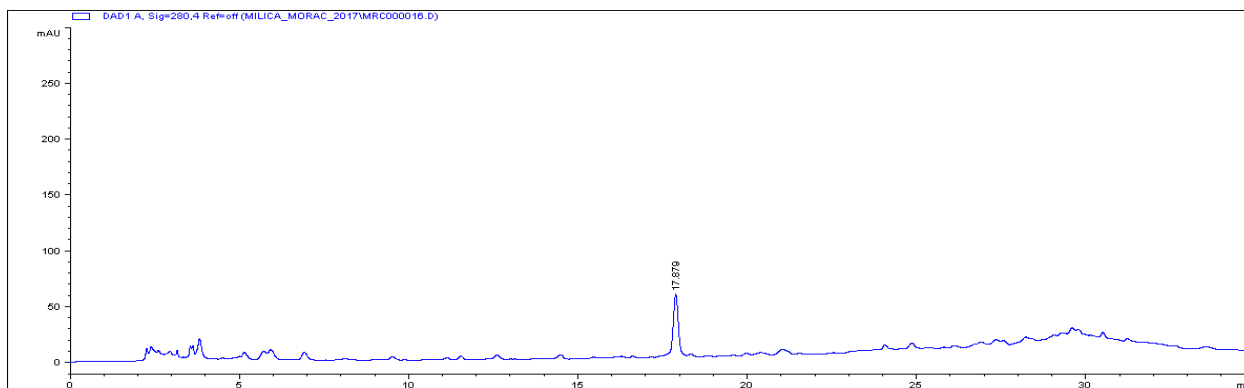
Slika 9. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu zrelog ploda morača



Slika 10. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu stabla morača ekstrahovanom u 100% metanolu (3-HK, 4-4-KK, 6-1,3DKK, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 12-1,4-DKK, 13-RK, 14-DKK)



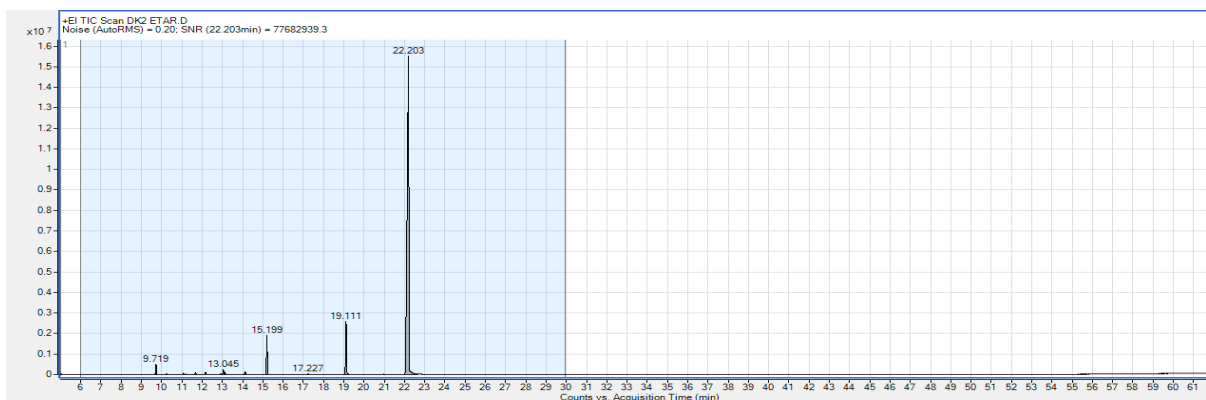
Slika 11. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u metanolnom ekstraktu stabla morača ekstrahovanom u 80% metanolu (3-HK, 4-4-KK, 6-1,3DKK, 8-Rt, 9-M, 10-1,5-DKK, 11-HL, 12-1,4-DKK, 13-RK, 14-DKK)



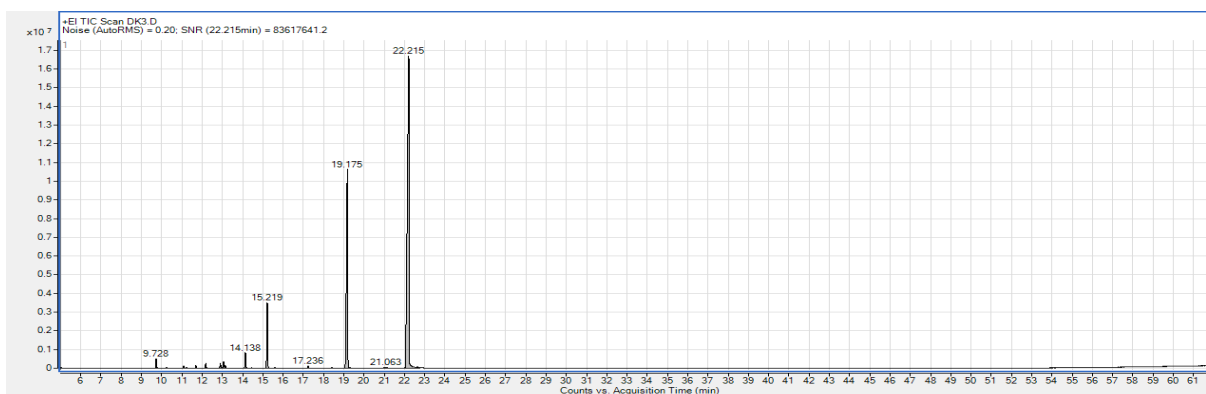
Slika 12. HPLC hromatogram flavonoida i fenolnih kiselina u vodenom ekstraktu stabla morača

PRILOG 2

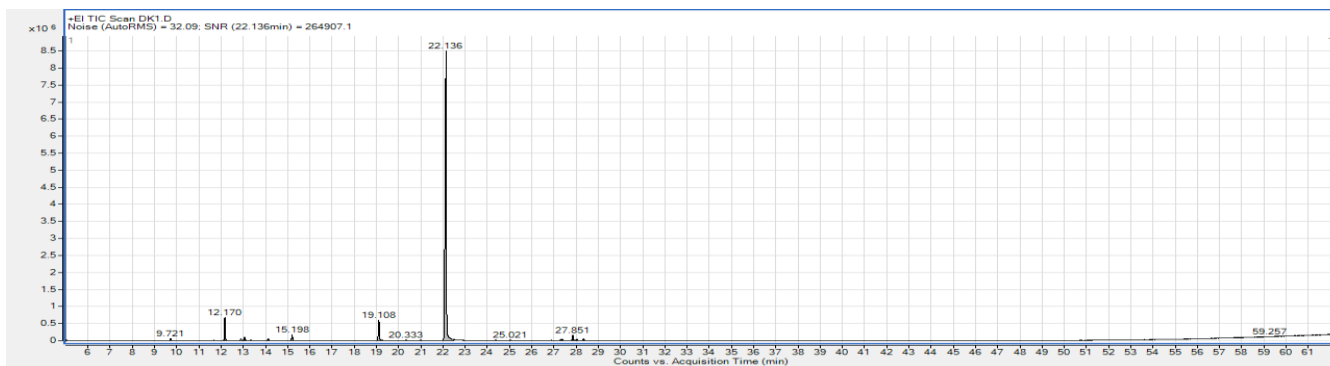
GC hromatogrami jedinjenja u etarskom ulju morača (*Foeniculum vulgare* Miller)



Slika 1. GC hromatogram jedinjenja u etarskom ulju zrelog ploda morača (15,2-fenhon, 19,11-estragol, 22,20-trans-anetole)



Slika 2. GC hromatogram jedinjenja u etarskom ulju nedozrelog ploda morača (15,2-fenhon, 19,11-estragol, 22,20-trans-anetole)



Slika 3. GC hromatogram jedinjenja u etarskom ulju lista morača (22,20-trans-anetole)

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Marija S. Gočmanac-Ignjatović rođena je 26. 5.1980. godine u Prokuplju. Osnovnu i srednju školu je završila u Prokuplju, a Medicinski fakultet u Nišu gde i sada živi i radi. Udata je i majka je dvoje dece.

Podaci o dosadašnjem obrazovanju,

Osnovnu školu „Nikodije Stojanović-Tatko” završila je u Prokuplju 1995. godine sa odličnim uspehom. 1999. godine završila je Gimnaziju u Prokuplju takođe sa odličnim uspehom. Po završenoj gimnaziji upisala je 1999. godine studije medicine na Medicinskom fakultetu u Nišu i diplomirala 2006. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom 8,68. Obavila je obavezan lekarski staž u trajanju od šest meseci i položila stručni ispit 2007. godine. Doktorske studije upisala je školske 2008/09. godine iz oblasti molekularne medicine. U toku doktorskih studija položila sve ispite predviđene nastavnim planom i programom sa prosečnom ocenom 9,85.

Profesionalna karijera

Dr Marija Gočmanac-Ignjatović je od početka školske 2009/2010. godine učestvuje u izvođenju praktične nastave na UNO Fiziologija. Prvi put je zasnovala radni odnos na Medicinskom fakultetu u Nišu 1. 11. 2010. godine u zvanju saradnika u nastavi na predmetu Fiziologija. Reizabrana je u isto zvanje 2012. godine, dok je 2013. godine izabrana u zvanje asistenta na predmetu Fiziologija. U isto zvanje je reizabrana 2017. godine. Član je Srpskog lekarskog društva (Sekcija za fiziologiju).