

NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU

UNIVERZITETA U BEOGRADU – FARMACEUTSKOG FAKULTETA

KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKE STUDIJE – DOKTORSKE STUDIJE

Na osnovu člana 28. Statuta Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta i predloga Komisije za poslediplomske studije – doktorske studije, Nastavno-naučno veće Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta na sednici održanoj 12. 04. 2018. godine, donelo je odluku o imenovanju Komisije za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Stevana Samardžića, pod naslovom:

„Uporedno hemijsko i farmakološko ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti predstavnika roda *Filipendula* Miller u Srbiji”.

Komisija u sastavu:

1. Dr Zoran Maksimović (mentor), vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
2. Dr Maja Tomić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
3. Dr Marina Milenković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
4. Dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet
5. Dr Jelena Živković, naučni saradnik, Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd

pregledala je priloženu disertaciju i podnosi Nastavno-naučnom veću Farmaceutskog fakulteta u Beogradu sledeći

IZVEŠTAJ

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Uporedno hemijsko i farmakološko ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti predstavnika roda *Filipendula* Miller u Srbiji**” napisana je na 184 strane, sadrži 83 slike i 28 tabela. Pregled literature sadrži 239 navoda.

Tekst disertacije je podeljen na sedam poglavlja: Uvod, Cilj, Materijali i metode, Rezultati i diskusija, Zaključak, Literatura i Dodatak. Na početku rada je priložen Sažetak/Abstract. Na kraju rada u okviru Dodatka nalazi se Biografija kandidata, Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjava o korišćenju.

Uvod je napisan na 27 strana (1–27) i sastoji se iz 11 celina. U okviru ovog poglavlja doktorske disertacije predstavljene su botaničke karakteristike i areali rasprostranjenja familije Rosaceae, roda *Filipendula* Miller i vrsta *Filipendula vulgaris* Moench i *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Dati su podaci o hemijskim karakteristikama i biosintezi sekundarnih metabolita zastupljenih u vrstama *F. vulgaris* i *F. ulmaria*. Obradeni su sastojci polifenolne prirode (flavonoidi, tanini, fenolkarboksilne kiseline) i komponente isparljive frakcije dobijene destilacijom biljnog materijala vodenom parom. Iznet je literaturni pregled ispitivanja antiinflamatorne, antimikrobne, citotoksične, antitumorske, antioksidantne, hepatoprotektivne, renoprotektivne, gastroprotektivne i diuretičke aktivnosti ekstrakata pomenutih vrsta. Navedeni su podaci o zabeleženoj etnomedicinskoj primeni *F. ulmaria* i *F. vulgaris*, zvaničnoj primeni *F. ulmaria* i oficinalnim biljnim drogama *F. ulmaria*.

Cilj rada je napisan na jednoj strani (27). Jasno je definisan i obuhvata preliminarnu procenu:

- 1) opravdanosti tradicionalne primene i novih mogućnosti za primenu cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria*,
- 2) farmakološke aktivnosti pojedinih sastojaka cvasti *F. vulgaris* i njihovog značaja za definisanje specifičnog kvaliteta biljnih droga *Filipendulae vulgaris flos* i *Filipendulae ulmariae flos*,
- 3) mogućnosti da vrste *F. vulgaris* i *F. ulmaria* budu biološki izvori potencijalno oficinalne biljne droge *Filipendulae flos*.

Poglavlje **Materijali i metode** napisano je na 31 strani (28–58). U ovom delu su prikazani podaci o prikupljanju biljnog materijala i postupku izrade ispitivanih ekstrakata (lioofilizovanih infuza cvasti, LIC). Date su metode izolovanja i određivanja strukture

sekundarnih metabolita cvasti *F. vulgaris*. Takođe su navedeni uslovi hromatografske (HPLC-UV) analize hemijskog sastava LIC. Opisani su principi, postupci, procedure i oprema koji su korišćeni za ispitivanje antioksidantne, antiinflamatorne, antiagregacione, antihiperalgezijske, antiedematozne, gastroprotektivne i citotoksične aktivnosti, kao i akutne toksičnosti LIC.

Sve korišćene metode su odgovarajuće i u skladu sa zahtevima savremenog naučnoistraživačkog rada, pa su njihovom primenom dobijeni rezultati na osnovu kojih je moguće doneti relevantne zaključke.

Rezultati i diskusija su prikazani na 98 strana (59–156) sa osam tabela i 70 slika. Tekst je jasan i direktno povezan sa prikazanim rezultatima. Kroz diskusiju dobijenih rezultata kandidat je uporedio svoje rezultate sa rezultatima drugih autora. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze, koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u skladu sa rezultatima većine drugih autora koji imaju isti naučni interes.

U poglavlju **Zaključci** (157–160) navedeni su najznačajniji zaključci koji su u skladu sa dobijenim rezultatima i navedenim ciljevima istraživanja.

U poglavlju **Literatura** (161–184) navedeno je 239 referenci koje su citirane harvardskim stilom.

Poglavlje **Dodatak** sadrži administrativne delove: Biografiju kandidata, Izjavu o autorstvu, Izjavu o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada i Izjavu o korišćenju.

B) OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

Cilj istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je ispitivanje dve biljne vrste koje pripadaju rodu *Filipendula* (Rosaceae), a koje su zastupljene u flori Srbije.

Vrsta *F. ulmaria* je najznačajniji predstavnik ovog roda. Javlja se u spontanoj flori Srbije. Prema monografijama Evropske agencije za lekove, cvast i herba *F. ulmaria* se koriste kao sirovine za izradu tradicionalnih biljnih lekovitih proizvoda. Vrsta *F. vulgaris* je samonikla višegodišnja zeljasta biljka čija je primena u tradicionalnoj medicini takođe zabeležena.

Istraživanje se može podeliti u dve celine. U okviru prvog dela opisan je postupak izolovanja sekundarnih metabolita iz cvasti *F. vulgaris* i urađena je hemijska analiza LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*. Drugu celinu predstavlja farmakološko ispitivanje LIC ispitivanih

Filipendula vrsta i pojedinih sastojaka cvasti *F. vulgaris*. U okviru ovog dela, ispitana je njihova antioksidantna, antiinflamatorna, antiagregaciona, antihiperlgezijska, antiedematozna, gastroprotektivna i citotoksična aktivnost, kao i akutna toksičnost.

Dobijeni rezultati hemijskog i farmakološkog ispitivanja upoređeni su međusobno, kao i sa literaturnim podacima koji su dostupni za obe ispitivane biljne vrste.

Iz cvasti *F. vulgaris* je primenom tečno-tečne ekstrakcije, stubne hromatografije, preparativne tankoslojne hromatografije i reverzno-fazne visokoeфикаsne tečne hromatografije izolovano 13 polifenolnih jedinjenja čija je struktura određena poređenjem literaturnih i snimljenih NMR (^1H i ^{13}C), MS i UV spektralnih podataka. Izolovano je osam flavonolnih heterozida (kemferol 4'-*O*-glukozid, kvercetin 4'-*O*-glukozid, astragalin, astragalin 2''-*O*-galat, izokvercitrin, izokvercitrin 2''-*O*-galat, hiperozid, hiperozid 2''-*O*-galat), dva elagna tanina (telimagrandin I, telimagrandin II), jedna fenolkarboksilna kiselina (galna kiselina), njen derivat (metilgalat) i jedan fenolni heterozid (gaulterin).

Kvalitativna i kvantitativna analiza LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* je izvršena visokoeфикаsnom tečnom hromatografijom sa UV detekcijom, metodom eksternog standarda. Određen je saržaj 11 flavonoida, dva tanina, tri fenolkarboksilne kiseline i jednog fenolnog heterozida. Spireozid je bio kvantitativno dominantan flavonoid u svim ispitivanim uzorcima (55,67 mg/g LIC *F. vulgaris*; 56,27 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 46,17 mg/g LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.). Pored ovog jedinjenja, takođe su detektovani drugi glikozidi kvercetina i kemferola. Uočena je značajna sličnost flavonoidnih profila, međutim galoilovani heterozidi hiperozida, izokvercitrina i astragalina nisu detektovani u uzorcima *F. ulmaria*, već samo u uzorku *F. vulgaris*. Sadržaj telimagrandina I je bio relativno visok (98,86 mg/g LIC *F. vulgaris*; 124,43 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 157,75 mg/g LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.), dok je telimagrandin II bio prisutan u manjoj količini. Galna kiselina (10,22 mg/g LIC *F. vulgaris*; 10,96 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 11,15 mg/g LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.) je bila najzastupljenija fenolkarboksilna kiselina. Takođe su detektovane elagna i salicilna kiselina. Sadržaj gaulterina iznosio je 36,65 mg/g LIC *F. vulgaris*, 60,22 mg/g LIC *F. ulmaria* (Zlatibor 2014. god.) i 91,62 mg/g LIC *F. ulmaria* (Kopaonik 2016. god.).

Antioksidantna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i kvantitativno dominantnog flavonoida spireozida je procenjena *in vitro* korišćenjem DPPH, FRAP i 2-dezoksiriboza testa. U cilju potpunijeg sagledavanja antioksidantnog potencijala takođe je testirana njihova sposobnost da *in vitro* umanje oksidativni stres u serumu indukovano dodatkom *terc-*

butilhidroperoksida (egzogene prooksidantne supstance). Testirani preparati su pokazali značajnu sposobnost neutralisanja DPPH radikala ($IC_{50} = 8,45-10,20 \mu\text{g/mL}$) i redukcije kompleksa feri jona (FRAP vrednost = $4,46-7,72 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$), uporedivu sa delovanjem referentne supstance L-askorbinske kiseline. Ispitivani ekstrakti nisu dostigli 50% inhibicije produkcije OH^\bullet radikala. Spireozid je ispoljio značajnu aktivnost (DPPH test, $IC_{50} = 19,54 \mu\text{g/mL}$; 2-Dezoksiriboza test, $IC_{50} = 5,1 \mu\text{g/mL}$; FRAP test, FRAP vrednost = $15,02 \text{ mmol Fe}^{2+}/\text{g}$). LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i spireozid su smanjili indukovani oksidativni stres u humanom serumu (povećali su vrednosti parametra totalni antioksidativni status, a smanjili vrednost parametra prooksidativno-antioksidativni balans), međutim, ispoljeni efekat je najčešće bio manje izražen od delovanja dobro poznatog antioksidansa Trolox-a (hidrosolubilnog ekvivalenta vitamina E). Nasuprot tome, pri većim koncentracijama LIC i spireozida je došlo do povećanja vrednosti parametra totalni oksidativni status. Donošenje zaključka o antioksidantnom delovanju biljnih izolata u humanom serumu zahteva dodatna istraživanja.

Antiinflamatorna aktivnost i antiagregacioni potencijal preparata *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i izolovanih flavonoidnih heterozida su utvrđeni *ex vivo* praćenjem inhibicije produkcije eikozanoida (prostaglandina E_2 , PGE_2 ; 12-hidroksieikozatetraenske kiseline, 12-HETE; tromboksana B_2 , TXB_2) u humanim trombocitima. Aktivnost ekstrakata ($IC_{50} = 0,961-4,401 \text{ mg/mL}$ LIC *F. vulgaris*, $IC_{50} = 3,415-6,768 \text{ mg/mL}$ LIC *F. ulmaria*) je bila manja od aktivnosti kontrolnih supstanci (acetilsalicilne kiseline i kvercetina). Među jedinjenjima, najizraženiju sposobnost inhibicije produkcije PGE_2 je pokazao astragalin 2''-O-galat ($IC_{50} = 141,1 \mu\text{g/mL}$), dok je spireozid najpotentnije suprimirao sintezu 12-HETE ($IC_{50} = 4,69 \mu\text{g/mL}$).

Antihiperalgezijska i antiedematozna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* ispitana je *in vivo* u modelu inflamacije šape pacova indukovane intraplantarnim injektovanjem karagenina. Oralno primenjeni ekstrakti (100–300 mg/kg) su statistički značajno i dozno-zavisno smanjili bolnu preosetljivost: $ED_{50} \pm \text{SEM}$ vrednosti su pri maksimalnom efektu iznosile $172,2 \pm 6,2 \text{ mg/kg}$ za LIC *F. vulgaris* i $164,8 \pm 15,4 \text{ mg/kg}$ za LIC *F. ulmaria*. Testirani biljni izolati su bili efikasni u dozama koje odgovaraju tradicionalno korišćenim dozama za humanu primenu. Nasuprot tome, antiedematozno dejstvo LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (100–300 mg/kg) nije uočeno. Dobijeni rezultati podržavaju zabeleženu etnomedicinsku primenu *F. vulgaris* i *F. ulmaria* za ublažavanje bola.

Preliminarnim ispitivanjem akutne toksičnosti u miševa je pokazano da tokom perioda praćenja od dve nedelje, nakon oralne primene velikih doza (2000 mg/kg) LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, ne dolazi do promena u ponašanju životinja koje bi indikovale postojanje toksičnosti.

Gastroprotektivana aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* je ispitana u modelu gastričnog ulkusa/gastritisa indukovano apsolutnim etanolom. Oštećenje želudačne sluzokože je izraženo gastričnim skorom (GDS, engl. *gastric damage score*). Pokazano je da testirani ekstrakti (100–300 mg/kg, *p.o.*) smanjuju nastanak mukoznih lezija (GDS = 3,4–4, LIC *F. vulgaris*; GDS = 1,4–2,9, LIC *F. ulmaria*). Spireozid (50 mg/kg, *p.o.*, GDS = 3,6) i telimagrandin II (40 mg/kg, *p.o.*, GDS = 3,7) su takođe ispoljili aktivnost, pa se može zaključiti da su ova jedinjenja barem delom odgovorna za opisani zaštitni efekat LIC.

LIC *F. vulgaris* ($IC_{50} = 45,82\text{--}54,17 \mu\text{g/mL}$) i LIC *F. ulmaria* ($IC_{50} = 41,73\text{--}59,44 \mu\text{g/mL}$) su delovali citotoksično na ćelijske linije tumora grlića materice (HeLa), kolona (LS) i pluća (A549). Spireozid u testiranim koncentracijama nije bio aktivan. Hiperozid je delovao slabije od ispitivanih ekstrakata ($IC_{50} = 83,95\text{--}97,35 \mu\text{g/mL}$), dok je galna kiselina ispoljila jače citotoksično delovanje ($IC_{50} = 3,91\text{--}17,76 \mu\text{g/mL}$).

Dobijeni rezultati opravdavaju tradicionalno korišćenje cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* kod bolnih stanja i gastričnog ulkusa. Povoljan bezbednosni profil, ustanovljen preliminarnom procenom akutne toksičnosti, takođe podržava zabeleženu etnomedicinsku upotrebu. Dodatno, pokazano citotoksično delovanje otvara nove mogućnosti za primenu, međutim, neophodna su dalja ispitivanja da bi se precizno definisao potencijal cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* u ovoj oblasti. Testirani ekstrakti imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i inhibicije sinteze eikozanoida, pa se može pretpostaviti da su ovi mehanizmi barem delom u osnovi dokumentovanih farmakoloških efekata. Utvrđeno je da aktivnost ispoljavaju flavonoidi (spireozid, hiperozid, astragalin 2''-*O*-galat, smeša hiperozid 2''-*O*-galata i izokvercitrin 2''-*O*-galata), fenolkarboksilna kiselina (galna kiselina) i tanin (telimagrandin II), što ukazuje da su ova jedinjenja potencijalni markeri specifičnog kvaliteta ispitivanih biljnih droga. Uzevši u obzir sličnost hemijskih i farmakoloških profila testiranih preparata, opravdan je nastavak istraživanja sa ciljem da se proceni mogućnost da biljna droga *Filipendulae flos* dobije status oficinalne biljne droge čiji bi biološki izvor bile dve vrste, *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

C) UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Iz cvasti *F. vulgaris* primenom različitih hromatografskih tehnika izolovano je osam flavonolnih heterozida (glikozida kvercetina i kemferola), dva elagna tanina (telimagrandini I i II), jedna fenolkarboksilna kiselina (galna kiselina), njen derivat (metilgalat) i jedan fenolni heterozid (gaulterin). Sva jedinjenja (sa izuzetkom astragalin 2''-*O*-galata, izokvercitrin 2''-*O*-galata, metilgalata i gaulterina) su ranije identifikovana u *F. vulgaris* (Baczek i sar., 2012; Olennikov i Kruglova, 2013; Pukalskienė i sar., 2015).

HPLC-UV analiza je pokazala da su LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* bogati polifenolnim jedinjenjima (flavonoidima, taninima, fenolkarboksilnim kiselinama). Ovi rezultati su u saglasnosti sa ranijim studijama u kojima su ispitivani različiti ekstrakti cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris* (Baczek i sar., 2012; ESCOP, 2003; Gniewosz i sar., 2014; Olennikov i Kruglova, 2013; Pukalskienė i sar., 2015). Izokvercitrin 2''-*O*-galat i astragalin 2''-*O*-galat su po prvi put detektovani u ekstraktu *F. vulgaris*.

Pokazana dobra anti-DPPH i Fe³⁺-redukujuća svojstva LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* odgovaraju literaturnim podacima. Naime, pokazano je da različiti ekstrakti *F. ulmaria* mogu neutralisati superoksidni jon, vodonik-peroksid, DPPH, hidroksilni i ABTS^{•+} radikal (Calliste i sar., 2001; Katanić i sar., 2015; Olennikov i sar., 2016; Sroka i Cisowski, 2005); dok je za metanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* demonstrirana značajna antioksidantna aktivnost u DPPH i FRAP testu, kao i testu inhibicije lipidne peroksidacije (Maksimović i sar., 2007). Izloženi rezultati predstavljaju prvo ispitivanje antioksidantne sposobnosti preparata (LIC) relevantnog sa aspekta tradicionalne primene. Utvrđena aktivnost kvantitativno dominantnog flavonolnog heterozida spireozida podržana je eksperimentalnim rezultatima drugih autora (Gao i sar., 2010; Miliauskas i sar., 2004; Ramos i sar., 2006; Suh i sar., 1999). Zaštitni efekat testiranih biljnih izolata, nakon indukovanja oksidativnog stresa u humanom serumu egzogenim oksidansom *tert*-butilhidroperoksidom, prvi put je ispitan u okviru ove doktorske disertacije.

Sposobnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* da inhibiraju produkciju eikozanoida (PGE₂, 12-HETE, TXB₂) u humanim trombocitima bila je manja od aktivnosti kontrolnih supstanci (acetilsalicilne kiseline i kvercetina). U prethodnim *in vitro* studijama, sprovedenim na izolovanim ciklooksigenazama (COX-1 i COX-2) ili mikrozomima semenih vezikula goveda, nekoliko različitih ekstrakata *F. ulmaria* je inhibiralo biosintezu PGE₂ (ESCOP, 2003;

Katanić i sar., 2016). Efekat ekstrakata *F. ulmaria* na formiranje 12-HETE i TXB₂, i ekstrakata *F. vulgaris* na sintezu PGE₂, 12-HETE i TXB₂ nije ranije ispitivan. Pokazana sposobnost testiranih flavonoida da inhibiraju produkciju PGE₂ podržana je literaturnim navodima prema kojima su heterozidi kvercetina (kvercetin 4'-O- α -L-ramnopiranozil-3-O- β -D-alopiranozid, izokvercitrin) i kemferola (kemferol 7-O- β -6'-acetilglukopiranozid, kemferol 7-O- β -glukopiranozil-3-O- β -glukopiranozid, kemferol 3-O- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozid, astragalin) inhibitori COX-1, s obzirom da su navedena jedinjenja strukturno slična ispitivanim flavonoidima – poseduju isti aglikon (Dongmo i sar., 2007; Francis i sar., 2004; Li i sar., 2008; Vanisree i sar., 2008; Vareed i sar., 2007). Rutin, izokvercitrin, hiperozid i kvercitrin su inhibirali 12-LOX dobijenu iz pluća pacova (Schneider i Bucar, 2005). Ovaj podatak je u skladu sa uočenom aktivnošću spireozida (potentan inhibitor formiranja 12-HETE), jer su svi navedeni sekundarni metaboliti heterozidi kvercetina koji se razlikuju po mestu vezivanja šećerne komponente i/ili njenoj prirodi.

Antihiperalgzijska aktivnost oralno primenjenih LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* je potvrđena u modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom. Literaturni podaci o sposobnosti *F. ulmaria* da smanje bolnu preosetljivost i otok su oskudni, dok u slučaju *F. vulgaris* potpuno nedostaju. Pokazano je da metanolni ekstrakti nadzemnog dela i korena *F. ulmaria* ispoljavaju analgetičko (*hot plate test*) i antiedematozno delovanje (test karageninom indukovane akutne inflamacije) (Katanić i sar., 2016).

Preliminarnim ispitivanjem akutne toksičnosti u miševa je pokazano da nakon oralne primene velikih doza (2000 mg/kg) LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* ne dolazi do promena u ponašanju životinja koje bi indikovale postojanje toksičnosti. Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da su preparati *F. ulmaria* relativno bezbedni za primenu. LD₅₀ intraperitonealno primenjenog 5% vodenog rastvora polučvrstog etanolnog ekstrakta *F. ulmaria* iznosila je 1770 mg/kg. Isti rastvor, primenjen intravenski u kunića, karakterisala je niža LD₅₀ (75,7 mg/kg). Slični rezultati su dobijeni za dekokt (1:20) *F. ulmaria*: LD₅₀ iznosile su 535 mg/kg (*i.p.*, mužjaci miša), 1050 mg/kg (*i.p.*, ženke miša) i 141,5 mg/kg (*i.v.*, kunići). Toksikološka ispitivanja na pacovima i kunićima su pokazala da preparati cvasti *F. ulmaria* ne utiču na funkciju jetre (ESCOP, 2003). U eksperimentu na larvama mušice *Drosophila melanogaster* je pokazano da metanolni ekstrakti korena i nadzemnog dela *F. vulgaris* i korena *F. ulmaria* ne deluju genotoksično, dok je ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria*, zavisno od koncentracije, ispoljio slabu genotoksičnu aktivnost (Matić i sar., 2015).

Gastroprotektivna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i izolovanih jedinjenja (spireozida, telimagrandina II) je demonstrirana u modelu gastričnog ulkusa/gastritisa indukovanog apsolutnim etanolom. Prema raspoloživim literaturnim podacima, predstavljeni rezultati su prvi eksperimentalni dokaz kapaciteta *F. vulgaris* da prevenira oštećenje želudačne sluzokože indukovano etanolom. Utvrđena aktivnost LIC *F. ulmaria* je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima su ispitivani različiti preparati ove biljne vrste. Naime, pokazano je da su dekokti cvasti *F. ulmaria* efikasni u različitim animalnim modelima gastričnog ulkusa (ESCOPE, 2003). Demonstrirano protektivno dejstvo izolovanog tanina telimagrandina II je podržano činjenicom da su molekuli sa relativnom strukturnom sličnošću (pedunkulagin, korilagin), pri aplikaciji u sličnim dozama, ispoljili aktivnost u miševa tretiranih apsolutnim alkoholom (de Jesus i sar., 2012; Khennouf i sar., 2003; Klein-Júnior i sar., 2017). Efektivnost spireozida je u skladu sa prethodno primećenom osobinom nekih flavonoidnih heterozida da preveniraju oštećenja želudačne sluzokože (de Lira Mota i sar., 2009).

LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* su delovali citotoksično na ćelijske linije tumora grlića materice (HeLa), kolona (LS) i pluća (A549). Spireozid u testiranim koncentracijama nije bio aktivan. Hiperozid je delovao slabije od ispitivanih ekstrakata, dok je galna kiselina ispoljila jače citotoksično delovanje. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa zapažanjima iz prethodnih studija u kojima je pokazano da preparati *F. ulmaria in vitro* deluju citotoksično i/ili antiproliferativno na C26 ćelije kolorektalnog karcinoma miša (Mărgăoan i sar., 2016), B16 ćelije melanoma miša (Calliste i sar., 2001), humanu tumorsku ćelijsku liniju pluća NCI-H460 (Lima i sar., 2014) i humane Raji ćelije limfoblastoma (Spiridonov i sar., 2005), dok u životinja antagonizuju kancerogeno dejstvo radioaktivnog zračenja, etilnitrozouree, 7,12-dimetilbenz[a]antracena i suprimiraju rast transplantiranih tumora (sarkoma-180 i „Lewis” karcinoma) (Bespalov i sar., 2017a, 2017b; ESCOP, 2003). Vodenoetanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je delovao citotoksično na humane Raji ćelije limfoblastoma (Spiridonov i sar., 2005). U prezentovanom eksperimentu spireozid se može smatrati neaktivnim, međutim u ranijim istraživanjima je ispoljio aktivnost protiv humanih ćelijskih linija karcinoma kolona (HCT116) (Park i sar., 2014), oralnog skvamoznog karcinoma (SCC-9) (Browning i sar., 2005) i inhibirao rast ćelija mijeloma miša (sp2/0-Ag14) (Furusawa i sar., 2006). Pokazana aktivnost galne kiseline je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora, prema kojima je navedeno jedinjenje delovalo protiv humanih ćelija glioma, nazofaringealnog karcinoma, karcinoma grlića materice, karcinoma pluća, kolorektalnog i renalnog adenokarcinoma

(Loizzo i sar., 2009; Lu i sar., 2010; Pang i sar., 2017; Zhao i Hu, 2013). Takođe, prethodno je prijavljeno inhibitorno dejstvo hiperozida na ćelije kancera pluća i kolorektalnog kancera (Lü, 2016; Zhang i sar., 2017).

Literatura

- Baczek, K., Cygan, M., Przybyl, J.L., Kosakowska, O., Weglarz, Z., 2012. Seasonal variation of phenolics content in above- and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Herba Pol.* 58, 24–32.
- Bespalov, V.G., Alexandrov, V.A., Semenov, A.L., Kovan'ko, E.G., Ivanov, S.D., Vysochina, G.I., Kostikova, V.A., Baranenko, D.A., 2017a. The inhibitory effect of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) on radiation-induced carcinogenesis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 394–401.
- Bespalov, V.G., Alexandrov, V.A., Vysochina, G.I., Kostikova, V.A., Baranenko, D.A., 2017b. The inhibiting activity of meadowsweet extract on neurocarcinogenesis induced transplacentally in rats by ethylnitrosourea. *J. Neurooncol.* 131, 459–467.
- Browning, A.M., Walle, U.K., Walle, T., 2005. Flavonoid glycosides inhibit oral cancer cell proliferation — role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1037–1041.
- Calliste, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., Duroux, J.-L., 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3321–3327.
- de Jesus, N.Z.T., Falcão, H. de S., Gomes, I.F., Leite, T.J. de A., Lima, G.R. de M., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., Silva, M.S. da, Athayde-Filho, P.F. de, Batista, L.M., 2012. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3203–3228.
- de Lira Mota, K.S., Dias, G.E.N., Pinto, M.E.F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14, 979–1012.
- Dongmo, A.B., Miyamoto, T., Yoshikawa, K., Arihara, S., Lacaille-Dubois, M.-A., 2007. Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities. *Planta Med.* 73, 1202–1207.
- ESCOP, 2003. ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd ed. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, Georg Thieme Verlag, Thieme New York, Exeter, Stuttgart, New York.
- Francis, J.A., Rumbelha, W., Nair, M.G., 2004. Constituents in easter lily flowers with medicinal activity. *Life Sci.* 76, 671–683.
- Furusawa, M., Tsuchiya, H., Nagayama, M., Tanaka, T., Oyama, M., Ito, T., Inuma, M., Takeuchi, H., 2006. Cell growth inhibition by membrane-active components in brownish scale of onion. *J. Health Sci.* 52, 578–584.

- Gao, D.-F., Xu, Min, Yang, C.-R., Xu, Mei, Zhang, Y.-J., 2010. Phenolic antioxidants from the leaves of *Camellia papyrifera* hu. J. Agric. Food Chem. 58, 8820–8824.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., Kraśniewska, K., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z., 2014. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. Food Control 37, 351–361.
- Katanić, J., Boroja, T., Mihailović, V., Nikles, S., Pan, S.-P., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mitrović, S., Bauer, R., 2016. *In vitro* and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. J. Ethnopharmacol. 193, 627–636.
- Katanić, J., Boroja, T., Stanković, N., Mihailović, V., Mladenović, M., Kreft, S., M. Vrvic, M., 2015. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Food Funct. 6, 1164–1175.
- Khenouf, S., Benabdallah, H., Gharzouli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T.-H., Yoshida, T., Gharzouli, A., 2003. Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. J. Agric. Food Chem. 51, 1469–1473.
- Klein-Júnior, L.C., Silva, L.M. da, Boeing, T., Somensi, L.B., Beber, A.P., Rocha, J.A.R., Henriques, A.T., Andrade, S.F., Cechinel-Filho, V., 2017. The protective potential of *Phyllanthus niruri* and corilagin on gastric lesions induced in rodents by different harmful agents. Planta Med. 83, 30–39.
- Li, X., Liu, Z., Zhang, X., Wang, L., Zheng, Y., Yuan, C., Sun, G., 2008. Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*. Molecules 13, 1530–1537.
- Lima, M.J., Sousa, D., Lima, R.T., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Vasconcelos, M.H., 2014. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim inhibit the proliferation of the NCI-H460 tumour cell line. Ind. Crops Prod. 59, 149–153.
- Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., Rashed, K., Menichini, Federica, Frega, N.G., Menichini, Francesco, 2009. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. Plant Foods Hum. Nutr. 64, 264.
- Lü, P., 2016. Inhibitory effects of hyperoside on lung cancer by inducing apoptosis and suppressing inflammatory response via caspase-3 and NF-κB signaling pathway. Biomed. Pharmacother. 82, 216–225.
- Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., Katakowski, M., Chopp, M., To, S.-S.T., 2010. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. Eur. J. Pharmacol. 641, 102–107.
- Maksimović, Z., Petrović, S., Pavlović, M., Kovačević, N., Kukić, J., 2007. Antioxidant activity of *Filipendula hexapetala* flowers. Fitoterapia 78, 265–267.
- Mărgăoan, R., Zăhan, M., Mărghitaş, L.A., Dezmirean, D.S., Erler, S., Bobiş, O., 2016. Antiproliferative activity and apoptotic effects of *Filipendula ulmaria* pollen against C26 mice colon tumour cells. J. Apic. Sci. 60, 135–144.

- Matić, S., Katanić, J., Stanić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, V., Boroja, T., 2015. *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* 174, 287–292.
- Miliauskas, G., Beek, T.A. van, Venskutonis, P.R., Linssen, J.P.H., Waard, P. de, 2004. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 253–261.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., 2016. Meadowsweet teas as new functional beverages: Comparative analysis of nutrients, phytochemicals and biological effects of four *Filipendula* species. *Molecules* 22, 16.
- Olennikov, D.N., Kruglova, M.Y., 2013. A new quercetin glycoside and other phenolic compounds from the genus *Filipendula*. *Chem. Nat. Compd.* 49, 610–616.
- Pang, J.-H.S., Yen, J.-H., Wu, H.-T., Huang, S.-T., 2017. Gallic acid inhibited matrix invasion and AP-1/ETS-1-Mediated MMP-1 transcription in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1354.
- Park, S.-H., Kim, H.J., Yim, S.-H., Kim, A.-R., Tyagi, N., Shen, H., Kim, K.K., Shin, B.A., Jung, D.-W., Williams, D.R., 2014. Delineation of the role of glycosylation in the cytotoxic properties of quercetin using novel assays in living vertebrates. *J. Nat. Prod.* 77, 2389–2396.
- Pukalskienė, M., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., 2015. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. *J. Funct. Foods* 15, 233–242.
- Ramos, F.A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T., Takeuchi, M., 2006. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3551–3557.
- Schneider, I., Bucar, F., 2005. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytother. Res.* 19, 263–272.
- Spiridonov, N.A., Konovalov, D.A., Arkhipov, V.V., 2005. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phytother. Res.* 19, 428–432.
- Sroka, Z., Cisowski, W., 2005. The anti-ROS activity of various plant extracts. *Adv. Clin. Exp. Med.* 14, 423–433.
- Suh, H.J., Lee, J.M., Cho, J.S., Kim, Y.S., Chung, S.H., 1999. Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Res. Int.* 32, 659–664.
- Vanisree, M., Alexander-Lindo, R.L., DeWitt, D.L., Nair, M.G., 2008. Functional food components of *Antigonon leptopus* tea. *Food Chem.* 106, 487–492.
- Vareed, S.K., Schutzki, R.E., Nair, M.G., 2007. Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits. *Phytomedicine* 14, 706–709.
- Zhang, Y., Dong, H., Zhang, J., Zhang, L., 2017. Inhibitory effect of hyperoside isolated from *Zanthoxylum bungeanum* leaves on SW620 human colorectal cancer cells via induction of the p53 signaling pathway and apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 16, 1125–1132.
- Zhao, B., Hu, M., 2013. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol. Lett.* 6, 1749–1755.

D) OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20)

Samardžić, S., Arsenijević, J., Božić, D., Milenković, M., Tešević, V., Maksimović, Z., 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. J. Ethnopharmacol. 213, 132–137.

Samardžić, S., Tomić, M., Pecikoza, U., Stepanović-Petrović, R., Maksimović, Z., 2016. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation. J. Ethnopharmacol. 193, 652–656.

E) ZAKLJUČAK – OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija pod nazivom „**Uporedno hemijsko i farmakološko ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti predstavnika roda *Filipendula* Miller u Srbiji**”, kandidata dipl. farm. Stevana Samardžića poseduje sve odlike naučnoistraživačkog rada. Kroz terenski rad i laboratorijski eksperimentalni rad, prikupljeni su podaci, obrađeni odgovarajućim statističkim metodama, sto je omogućilo izvođenje odgovarajućih zaključaka. Dobijeni podaci i izvedeni zaključci su upoređeni sa podacima iz literature.

Naučni doprinos doktorske disertacije kandidata je hemijska i farmakološka karakterizacija LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* – preparata relevantnih sa aspekta tradicionalne primene. Hemijskom analizom je utvrđeno da LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* sadrže značajnu količinu polifenolnih sastojaka, među kojima dominiraju flavonoidi, tanini i fenolkarboksilne kiseline. U farmakološkim ispitivanjima, osmišljenim tako da pomognu u proceni opravdanosti zabeležene etnomedicinske upotrebe, pokazano je da testirani preparati deluju antihiperalgezijski u modelu inflamacije u pacova, gastroprotektivno u modelu gastričnog ulkusa/gastritisa izazvanog primenom apsolutnog etanola u pacova, takođe inhibiraju sintezu eikozanoida u humanim trombocitima *ex vivo* i ispoljavaju *in vitro* antioksidantnu aktivnost. Nakon akutne aplikacije velikih doza LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* ne dolazi do pojave znakova toksičnosti u miševa. Dokumentovanjem citotoksičnih svojstava LIC proširena su

saznanja o potencijalnim mogućnostima primene LIC u medicini. Testiranjem biološke aktivnosti utvrđeno je da neka od izolovanih jedinjenja (spireozid, hiperozid, astragalin 2''-O-galat, smeša hiperozid 2''-O-galata i izokvercitrin 2''-O-galata, telimagrandin II, galna kiselina) učestvuju u ukupnom efektu ekstrakata, pa su nabrojani sekundarni metaboliti predloženi kao potencijalni markeri specifičnog kvaliteta cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*. Pozivajući se na rezultate koji su demonstrirali sličnost hemijskih i farmakoloških profila ispitivanih preparata, kandidat je preliminarno izneo predlog da biljna droga *Filipendulae flos* dobije status oficinalne biljne droge i da njen biološki izvor budu vrste *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

Sumirano, eksperimentalni rezultati doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Stevana Samardžića formiraju bazu prekliničkih dokaza koji podržavaju zabeleženu tradicionalnu primenu cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i time doprinose racionalnoj primeni ispitivanih biljnih vrsta. Predstavljeni podaci takođe su značajni u pogledu definisanja kvaliteta ispitivanih biljnih sirovina. Opisani rezultati opravdavaju nastavak i produblјivanje sprovedenih istraživanja.

Do sada nije proučavan preparat (infuz) *F. ulmaria* i *F. vulgaris* čija je upotreba zabeležena u narodnoj medicini, niti participacija njegovih sastojaka u dokumentovanim farmakološkim efektima. Rezultati koji predstavljaju deo ove doktorske disertacije su novi i prezentovani su naučnoj javnosti kroz dve publikacije u časopisima međunarodnog značaja kategorije M21a i M21.

Kolega Samardžić je, radom u okviru doktorske disertacije, potvrdio da je kompetentan istraživač, sposoban da samostalno, ali i kroz timski rad, definiše odgovarajući naučni problem, odabere i primeni odgovarajuću, savremenu metodologiju koja može obezbediti relevantne i tačne podatke i kritički proceni njihov naučni značaj i vrednost.

Na osnovu svega iznetog, Komisija predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod naslovom „**Uporedno hemijsko i farmakološko ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti predstavnika roda *Filipendula* Miller u Srbiji**” i kandidatu dipl. farm. Stevanu Samardžiću odobri javnu odbranu doktorske disertacije po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.

Članovi Komisije:

Dr Zoran Maksimović, vanredni profesor, mentor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Maja Tomić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Marina Milenković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Jelena Živković, naučni saradnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd

Beograd, 08. 06. 2018. god.