

**UNIVERZITET U BEOGRADU – FARMACEUTSKI FAKULTET
NASTAVNO-NAUČNOM VEĆU FARMACEUTSKOG FAKULTETA
KOMISIJI ZA POSLEDIPLOMSKU NASTAVU – DOKTORSKE STUDIJE**

Odlukom Nastavno-naučnog veća Univerzitet u Beogradu - Farmaceutskog fakulteta br. 875/1, donetoj na sednici Veća održanoj 16.05.2019. godine, imenovana je Komisija za ocenu i odbranu završene doktorske disertacije dipl. farm. Relje V. Suručića pod naslovom:

Hemijska i farmakološka karakterizacija etarskih ulja biljnih vrsta *Seseli gracile* Waldst. & Kit. i *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae)

Komisiju čine:

1. Dr Nada Kovačević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
2. Dr Tatjana Kundaković-Vasović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet, mentor
3. Dr Slobodan Milovanović, redovni profesor, Univerzitet u Istočnom Sarajevu - Medicinski fakultet
4. Dr Svjetlana Stoisavljević-Šatara, redovni profesor, Univerzitet u Banjoj Luci - Medicinski fakultet

Na osnovu analize priložene dokumentacije, Komisija podnosi sledeći

I Z V E Š T A J

A. PRIKAZ SADRŽAJA DOKTORSKE DISERTACIJE

Doktorska disertacija dipl. farm. Relje V. Suručića pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija etarskih ulja biljnih vrsta *Seseli gracile* Waldst. & Kit. i *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae)**“ napisana je na 209 strana i sadrži 61 sliku, 24 tabele i 272 navoda literature. Tekst disertacije je podeljen u sledeća poglavlja: Uvod, Cilj, Materijal i metode, Rezultati, Diskusija, Zaključci, Literatura i Prilog. Pored navedenog, doktorska disertacija sadrži: Zahvalnicu, sažetak na srpskom i engleskom jeziku, Sadržaj doktorske disertacije, dok se na kraju nalaze Biografija kandidata, Izjava o autorstvu, Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada i Izjava o korišćenju, i te strane nisu numerisane.

U **Uvodu** su predstavljene informacije o rodu *Seseli* L., vrstama ovog roda, njihovoj rasprostranjenosti i vrstama koje su zastupljene u flori Evrope i Srbije. Botanički su, detaljnije, opisane dve vrste koje su i bile predmet ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije: *S. gracile* Waldst. & Kit. i *S. pallasii* Besser. Dat je prikaz najznačajnijih sekundarnih metabolita koji su izolovani iz različitih vrsta ovog roda (kumarini, hormoni, seskviterpenska jedinjenja, poliacetileni, fenilpropani, flavonoidi i etarska ulja). Uvodni deo disertacije se završava sa detaljnim prikazom bioloških i farmakoloških aktivnosti ekstrakata i etarskih ulja biljaka ovog roda. Ovo poglavlje napisano je na 69 strana i sadrži 8 slika i 3 tabele.

Cilj doktorske disertacije je hemijska i farmakološka karakterizacija etarskih ulja dve *Seseli* vrste rasprostranjene u flori Srbije, koje do sada nisu bile detaljno ispitivane. Hemijska karakterizacija obuhvata kvalitativnu i kvantitativnu analizu etarskih ulja izolovanih iz različitih delova/organa ispitivanih biljnih vrsta. Farmakološka karakterizacija obuhvata skrining odabranih aktivnosti i to: antiradikalne, antimikrobne, spazmolitičke, vazorelaksantne i inhibitorne aktivnosti angiotenzin-konvertujućeg enzima (ACE). Ovo poglavlje je napisano na 1 stranici.

U poglavlju **Materijal i metode** dati su detaljni podaci o prikupljenom biljnom materijalu. Takođe, opisane su teorijske osnove, procedure, oprema, analitički protokoli i materijali koji su analizirani, odnosno koji su testirani na odabrane farmakološke aktivnosti. Pored detaljnog predstavljanja eksperimentalnog dela, u ovom poglavlju su nabrojane i opisane primenjene metode statističke analize. Ovo poglavlje je napisano na 8 strana i sadrži 1 sliku.

Rezultati analiza i eksperimenata urađenih u okviru ove disertacije predstavljani su u poglavlju **Rezultati** na 62 strane. Ovo poglavlje sadrži 19 tabela i 18 slika.

U poglavlju **Diskusija** Kandidat je svoje rezultate uporedio sa odgovarajućim relevantnim literaturnim navodima drugih autora. Diskusija je napisana na 30 strana i sadrži 12 slika.

Poglavlje **Prilog** obuhvata 29 stranica, sadrži 22 slike i 2 tabele i predstavlja dopunu rezultata.

U poglavlju **Zaključci** detaljno su navedeni zaključci koji su proistekli iz rezultata eksperimentalnog rada; napisani su na 6 stranica.

U poglavlju **Literatura** dat je spisak literaturnih navoda (272) prema pravilima vankuverskog stila navođenja.

B. OPIS POSTIGNUTIH REZULTATA

U okviru ove doktorske disertacije, kandidat Relja Suručić je uradio detaljnu analizu etarskih ulja izolovanih iz dve vrste roda *Seseli* koje su zastupljene u istočnoj Srbiji, *S. pallasii* i *S. gracile*. Etarska ulja su izolovana klasičnom metodom destilacije vodenom parom iz osušenog biljnog materijala.

Kada se radi o *S. pallasii*, najviši prinos etarskog ulja dobijen je iz uzoraka ploda (1,1-1,3%). Prinosi etarskog ulja iz herbe (0,1-0,3%), korena (0,1-0,2%) i rizoma (0,1%) značajno je manji.

Najdominantnija komponenta etarskog ulje iz uzoraka ploda *S. pallasii* je α -pinen (82,2-87,4%), dok u uljima herbe dominiraju β -pinen (1,1-4,6%) i limonen (1,6-3,8%), odnosno seskviterpenska jedinjenja kariofilen oksid (3,2-5,6 %), spatulenol (1,1-3,1%) i kariofilen (1,4-2,7%). Sadržaj nekih seskviterpenskih jedinjenja (npr. germakren D) varira u različitim uzorcima etarskih ulja, a slično je i sa prisustvom poliacetilen falkarinola (0-7,6%). U etarskim uljima koja su izolovana iz podzemnih organa *S. pallasii*, značajno je manje monoterpenskih jedinjenja (5-20%) nego u plodu i herbi, a najzastupljeniji sastojci su n-undekan (16,5-29,8%), n-oktanal (2,2-10,4%), decenal (0,9-4%) i falkarinol (0,7-11,2%).

Klaster analiza je pokazala veću sličnost etarskih ulja dobijenih iz nadzemnih delova (ploda i herbe) u odnosu na etarska ulja izolovano iz podzemnih biljnih organa (rizoma i korena). PCA analiza uzoraka etarskih ulja izolovanih iz *S. pallasii* preko redukovanog prostora od dve glavne komponente, objasnila je 94,68% varijacija u hemijskom sastavu svih testiranih uzoraka etarskih ulja. Na biplot grafiku PCA analize, jasno je uočljivo grupisanje uzoraka etarskih ulja prema biljnim organima iz kojih su izolovani. Na dendogramu UPGMA analize vidi se odvajanje testiranih uzoraka na dva velika klastera od kojih jedan sadrže uzorke nadzemnih, a drugi podzemnih biljnih organa. Dalje razvrstavanje uzoraka etarskih ulja, dobijeno je u odnosu na biljni organ iz koga su izolovana i fenofazu biljnog razvoja.

U slučaju druge ispitivane vrste, najveći prinos etarskog ulja *S. gracile* je dobijen iz ploda (4,03%), potom slede cvast (2-2,09%), herba (0,37-1,56%) i koren (0,66-0,89%).

U etarskom ulju nadzemnih delova *S. gracile* dominiraju monoterpenski ugljovodonici (45-93%). Najzastupljenije pojedinačne komponente etarskog ulja herbe i cvasti *S. gracile* su: terpinolen (6,1-57,5%), γ -terpinen (3,3-24,2%) i *p*-cimen (1,3-25,2%). U etarskom ulju ploda, najzastupljeniji su terpinolen (26,8%) i γ -terpinen (24,2%), ali u približnom odnosu. Etarsko ulje ploda u značajnom procentu sadrži i sledeća

jedinjenja: β -pinen (7,6%), δ -kadinen (5,9%), limonen (4,5%) i *p*-cimen (4,1 %). U etarskom ulju podzemnih organa *S. gracile* najzastupljenije je poliacetilensko jedinjenje falkarinol (38,8-87%), a u značajnijim procentima još su zastupljena sledeća jedinjenja: *n*-oktanal (0,5-10,1%), (E,E)-2,4 dekadienal (0,5-8,8%), α -kurkumen (1,5-6,2%), (E,Z)-2,4 dekadienal (0,2-4,2%) i β -kurkumen (2,1-3,2%).

Klaster analiza je pokazala veću sličnost sastava etarskih ulja izolovanih iz nadzemnih delova u odnosu na podzemne biljne delove *S. gracile*.

U okviru ove disertacije ispitivana je i *in vitro* antimikrobna, antiradikalska, spazmolitička, vazorelaksantna i ACE-inhibitorna aktivnost etarskih ulja obe vrste. ACE inhibitorna aktivnosti sastojaka testiranih etarskih ulja procenjena je i *in silico* metodom molekularnog dokinga, koja je dala uvid u mogući doprinos pojedinačnih komponenti ukupnoj aktivnosti testiranih uzoraka ulja.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja izolovanih iz korena, herbe i ploda *S. pallasii*, odnosno etarskih ulja izolovanih iz korena, herbe i cvasti *S. gracile*, testirana je mikrodilucionom metodom na devet standardnih sojeva bakterija (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *M. flavus*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa*) i dva soja gljivica *C. albicans*.

Osetljivost testiranih mikroorganizama je veća na delovanje uzoraka etarskog ulja izolovanog iz *S. pallasii*; testirani uzorci etarskih ulja su pokazali aktivnost na sledeće mikroorganizme: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i oba soja *C. albicans*. Najbolju antimikrobnu aktivnost su pokazali uzorci etarskog ulja ploda na *S. aureus* (MIK=6,25 μ g/ml) i *M. luteus*, kao i etarsko ulje herbe na *B. subtilis*. Etarsko ulje korena je ispoljilo umerenu antimikrobnu aktivnost na *S. aureus* (MIK=50 μ g/ml), na Gram (-) *E. coli* (MIK=50 μ g/ml) i *P. aeruginosa* (MIK=50 μ g/ml); antifungalna aktivnost je bila slaba (MIK=100 μ g/ml). Kada se radi o *S. gracile*, najbolju aktivnost je ispoljilo etarsko ulje korena na *S. aureus* (MIK=62,5 μ g/ml).

Antiradikalska aktivnost etarskih ulja korena, herbe i ploda *S. pallasii* i *S. gracile* je testirana DPPH metodom. U poređenju sa standardom L-askorbinskom kiselinom, svi testirani uzorci etarskih ulja su pokazali slabiju antiradikalisku aktivnost. Veći kapacitet za neutralizaciju slobodnih radikala su pokazali uzorci etarskog ulja izolovani iz *S. gracile*. Uzorci ulja iz korena i herbe su doveli do 50% neutralizacije

radikala u koncentracija 72,9 i 78,6 $\mu\text{g/ml}$ navedenim redom, dok je aktivnost etarskog ulja ploda bila nešto slabija ($\text{IC}_{50} = 204,5 \mu\text{g/ml}$). Etarska ulja izolovana iz *S. pallasii* su pokazala slab antiradikalni potencijal sa IC_{50} vrednostima od 10,47-39,83 mg/ml.

Testirana je spazmolitička aktivnost etarskih ulja korena i herbe *S. pallasii* i *S. gracile*, u eksperimentalnom modelu na izolovanom ileumu pacova kontrahovanog dodatkom rastvora KCl (80 mM). Testirani uzorci etarskih ulja izolovanih iz herbe obe biljne vrste su ispoljili dozno-zavisnu spazmolitičku aktivnost. Vrednost IC_{50} za etarsko ulje herbe *S. gracile* iznosila je 271,4 nl/ml. Etarska ulja korena su ispoljila slabiju mogućnost za relaksaciju kontrahovanog ileuma, pa je tako 50% efekta relaksacije etarsko ulje korena *S. pallasii* uzrokovalo u koncentraciji od 719,75 nl/ml, dok je uzorak korena *S. gracile* u maksimalnoj testiranoj koncentraciji (1000 nl/ml) uzrokovalo tek 36,33% relaksantnog efekta. Može se zaključiti da su testirani uzorci etarskih ulja koji su sadržali više monoterpenskih jedinjenja, obe ispitivane vrste, ispoljili bolju spazmolitičku aktivnost.

Vazorelaksantna aktivnost etarskih ulja herbe i korena obe ispitivane vrste je testirana na eksperimentalnom modelu na mezenteričnoj arteriji pacova kontrahovanom fenilefrinom (10^{-6} M). Etarska ulja izolovana iz *S. pallasii* su ispoljila dobru vazorelaksantnu aktivnost, pa je tako etarsko ulje herbe 50% relaksantnog efekta uzrokovalo u koncentraciji od 3,10 nl/ml, a etarsko ulje iz korena u koncentraciji od 26,53 nl/ml. Etarska ulja izolovana iz *S. gracile* su ispoljila daleko niži potencijal za vazorelaksaciju. Etarsko ulje herbe je u koncentraciji od 466,96 nl/ml uzrokovalo 50% efekta vazorelaksacije, a etarsko ulje korena u maksimalnoj testiranoj koncentraciji (1000 nl/ml) je, u korišćenom model sistemu, uzrokovalo 47,5% efekta vazorelaksacije.

ACE inhibitorni potencijal etarskih ulja korena, herbe i ploda ispitivan je *in silico* i *in vitro* metodom. Metodom molekularnog dokinga je ispita potencijal sastojaka etarskih ulja da sa ACE grade snažnije komplekse od standardnih supstanci (kaptoprila), na osnovu čega je procenjena i mogućnost odabranih uzoraka etarskih ulja da inhibiraju aktivnost ACE. Rezultati analize molekularnog dokinga su pokazali da 26 sastojaka etarskog ulja izolovano iz *S. pallasii*, ima sposobnost da gradi komplekse sa

ACE; ovi kompleksi su podjednake stabilnosti ili stabilniji od onih koje postiže kaptopril. Prema udelu tih sastojaka u uzorcima etarskog ulja koji su odabrani za dalju *in vitro* analizu, očekivani redosled ACE inhibitorne aktivnosti etarskih ulja u odnosu na biljni organ iz koga su izolovani je sledeći: herba > koren > plod. Rezultati analize molekularnog dokinga, izdvojila su 11 sastojaka etarskih ulja *S. gracile* koji imaju sposobnost da grade komplekse sa ACE; ovi kompleksi su iste stabilnosti ili su stabilniji koje postiže kaptopril. Očekivani redosled ACE inhibitornih aktivnosti odabranih etarskih ulja *S. gracile* prema biljnom organu iz koga su izolovani je sledeći: herba > koren > plod. Rezultati analize molekularnog dokinga, preko stabilnosti kompleksa koje sastojci grade sa ACE i hemijskih interakcija koje se pri tome javljaju, posebno izdvajaju seskviterpenska jedinjenja zbog njihovog potencijalnog ACE inhibitornog delovanja.

ACE inhibitorna aktivnost ispitivana *in vitro* metodom je pokazala da testirani uzorci etarskih ulja *S. pallasii* mogu dovesti do dozno-zavisne inhibicije ACE. Najizraženiju ACE inhibitornu aktivnost je ispoljilo etarsko ulje korena sa $IC_{50}=0,18$ mg/ml, a zatim etarska ulja herbe ($IC_{50}=0,33$ mg/ml) i ploda ($IC_{50}=0,75$ mg/ml). U *in vitro* testu ACE inhibitorne aktivnosti, ispitivani uzorci *S. gracile* su ispoljili slab ACE inhibitorni potencijal. Nijedan od testiranih uzoraka nije doveo do 50% inhibicije aktivnosti enzima. Najviši stepen inhibicije je registrovan kod etarskog ulja ploda (36,4%), a zatim slede etarska ulja korena (25,7%) i herbe (21,0%).

C. UPOREDNA ANALIZA REZULTATA KANDIDATA SA PODACIMA IZ LITERATURE

Rod *Seseli* je jedan od najvećih rodova u okviru familije Apiaceae i obuhvata između 125 i 140 vrsta rasprostranjenih širom sveta. Biljke roda *Seseli* rastu na svim kontinentima sa umerenom kontinentalnom klimom i povoljno raspoređenim padavinama u toku godine (1). Za mnoge vrste ovog roda ima podataka sastojcima i njihovoj farmakološkoj aktivnosti, odnosno potencijalima za primenu u terapiji (2-8). Cilj ove disertacije je bio da detaljnije prouči dve vrste zastupljene u flori Istočne Srbije u pogledu sastava i farmakološkog delovanja etarskih ulja.

Uparedna analiza hemijskog sastava etarskih ulja izolovanih iz nadzemnih biljnih delova *S. gracile* i *S. pallasii*, pokazala je sličnosti u smislu dominantne hemijske klase (monoterpeni ugljovodonici), ali i razlike kada su u pitanju pojedinačne najzastupljenije komponente (terpinolen, odnosno α -pinen). U tom smislu, veće su sličnosti ispitivanih vrsta sa drugim *Seseli* vrstama nego međusobno. Prema kvalitativnom profilu, etarsko ulje nadzemnih delova *S. pallasii* pokazuje sličnosti sa *S. rigidum* i *S. campestre*; α -pinen je najzastupljenija komponenta njihovih etarskih ulja (9, 10). Dominantni sastojci etarskog ulja *S. gracile* su terpinolen, γ -terpinen i *p*-cimen. U značajnijem procentu γ -terpinen je zastupljen i u nadzemnim delovima *S. petraeum* i *S. globiferum* (11, 12). Terpinolen je, uglavnom, manje prisutan u etarskom ulju *Seseli* vrsta; *S. gracile* je jedina vrsta ovog roda kod koje je ovaj monoterpen najzastupljenija komponenta etarskog ulja nadzemnih delova. I pored ovih očiglednih razlika u glavnim komponentama etarskih ulja ispitivanih vrsta, postoji njihova povezanost preko biosintetskih puteva. Otkriće Rohmera i Arigonija da izoprenske jedinice pored mevalonatnim mogu biti sintetisane i drugim nezavisnim i prostorno odvojenim biosintetskim putem (metileritritol fosfatnim putem), ukazala je na veću povezanost pojedinih monoterpenih jedinjenja.

Kada se govori o sastavu etarskog ulja izolovanog iz plodova obe ispitivane vrste, uočljiva je dominacija sastojaka monoterpenne prirode (>90 %). Po sastavu etarskih ulja ploda, *S. pallasii* je sličan sa vrstama *S. campestre* i *S. rigidum* kod kojih je α -pinen, takođe, najzastupljenija komponenta. Etarska ulja *S. globiferum*, *S. libanotis*, *S. resinosum* i *S. tortuosum* karakteriše prisustvo monoterpenih ugljovodonika, ali sa drugim dominantnim komponentama. U etarskom ulju ploda *S. gracile* najzastupljeniji su terpinolen (26,8 %) i γ -terpinen (24,2%), ali u približnom odnosu. Kao i u slučaju herbe ove vrste, u literaturi nema podataka da plod neke *Seseli* vrste ima terpinolen kao glavnu komponentu etarskog ulja, ali je γ -terpinen prisutan u značajnoj količini i u etarskom ulju plodova *S. petraeum*, *S. globiferum* i *S. rigidum* (9, 11, 12).

O sastavu etarskih ulja izolovanih iz rizoma i korena *Seseli* vrsta nema puno podataka. Činjenica je da ova ulja sadrže najveću količinu neterpenih sastojaka. Poliacetilen falkarinol predstavlja glavnu komponentu etarskog ulja podzemnih organa *S. gracile*, kao što je slučaj i kod vrste *S. rigidum* iz Bugarske i Srbije (13, 14).

Statistička analiza je ukazala da, na sastav etarskog ulja, najveći uticaj imaju organi biljaka iz kojih je ulje izolovano. Takođe, najveća varijabilnost sastava u različitim uzorcima ispitivanih etarskih ulja, povezana je sa njihovim glavnim komponentama. Ovakvi rezultati su uobičajeni kada se radi o aromatičnim biljkama, pa su zato i bili očekivani i za vrste ispitivane u okviru ove disertacije.

Kada govorimo o istraživanja sprovedenih za procenu antioksidativnog kapaciteta etarskih ulja izolovanih iz različitih predstavnika roda *Seseli*, najčešće je ispitivana njihova sposobnost neutralizacije *DPPH* radikala. Etarska ulja izolovana iz vrsta ovog roda, uopšteno, poseduju nisku antiradikalnu aktivnost. Bolju *DPPH* antiradikalnu aktivnost pokazali su uzorci sa višim sadržajem monoterpena, pa je tako najvišu aktivnost pokazalo etarsko ulje ploda *S. rigidum* ($IC_{50}=217,84$ mg/ml) sa 82,8% sadržaja monoterpenskih jedinjenja, dok je najniža aktivnost zabeležena za etarsko ulje korena *S. rigidum* ($IC_{50}=302,40$ mg/ml) sa svega 22,9% monoterpenskih jedinjenja i značajnim prisustvom poliacetilenla falkarinola (15).

Što se tiče dve vrste koje su bile predmet ispitivane u okviru ove disertacije, a naročito posle analize sadržaja etarskog ulja, očekivani su bolji rezultati i veća antiradikalna aktivnost. Ipak, potvrđeno je pravilo da ulja bogata monoterpenima ispoljavaju bolju antioksidativnu aktivnost. Rezultati izvedenih eksperimenata su pokazali da etarsko ulje izolovano iz nadzemnih delova vrste *S. gracile* pokazuje bolju *DPPH* antiradikalnu aktivnost i u odnosu etarskog ulja izolovanog iz korena iste vrste, ali i u odnosu na uzorke etarskih ulja *S. pallasii*. Već je ranije potvrđena antiradikalna aktivnost ciklični monoterpeni, terpinolen i γ -terpinen, a kako su oni dominantni sastojci etarskih ulja izolovani iz nadzemnih delova *S. gracile* ovakvi rezultati su i očekivani (16).

Ako se pogledaju literaturni podaci, najveći broj istraživanja biološkog delovanja etarskih ulja izolovanih iz vrsta roda *Seseli*, odnosi se na proveru antimikrobne aktivnosti. Etarska ulja različitih organa vrsta ovog roda, pokazuju antimikrobno delovanje. Tako, ulje izolovano iz korena *S. rigidum* pokazalo je značajnu antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus* i *E. faecalis* (MIK = 6,25-25,00 μ g/ml), a zabeležen je i značajan antimikrobni efekat i na meticilin-rezistentne sojeve *S. aureus* (MIK = 6,25-50,00 μ g/ml). S obzirom da se etarsko ulje korena skoro u potpunosti sastoji od falkarinola (88,8%), smatra se da ovaj poliacetilen najviše doprinosi dokazanom antimikrobnom delovanju (9). Etarska ulja

herbe *S. gummiferum* subsp. *corymbosum* i *S. gummiferum* subsp. *gummiferum* pokazala su dobru antimikrobnu aktivnost na sojeve *S. aureus*, *B. subtilis* i *B. cereus*. U istom istraživanju potvrđena je i dobra antimikrobna aktivnost etarskog ulja *S. resinosum* na *S. aureus* (17). Slični su i podaci o delovanje etarskih ulja herbe *S. montanum* subsp. *tommasinii*, *S. annuum*, *S. globiferum*, *S. andronakii* i *S. libanotis* (18).

Ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja u okviru ove doktorske disertacije, ukazuju na bolju aktivnost etarskih ulja *S. pallasii*; testirani uzorci etarskih ulja su pokazali aktivnost na sledeće mikroorganizme: *S. aureus*, *S. epidermidis*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* i oba soja *C. albicans*. Najbolju antimikrobnu aktivnost su pokazali uzorci etarskog ulja ploda (najzastupljeniji sastojak je α -pinen) na *S. aureus* (MIK=6,25 $\mu\text{g/ml}$) i *M. luteus*, kao i etarsko ulje herbe (najzastupljeniji sastojak je α -pinen) na *B. subtilis*. Etarsko ulje korena (najzastupljeniji sastojci su neterpenske prirode) ispoljilo je umerenu antimikrobnu aktivnost na *S. aureus* (MIK=50 $\mu\text{g/ml}$), na Gram (-) *E. coli* (MIK=50 $\mu\text{g/ml}$) i *P. aeruginosa* (MIK=50 $\mu\text{g/ml}$). Kada se radi o *S. gracile*, najbolju aktivnost je ispoljilo etarsko ulje korena (najzastupljeniji sastojak je neterpen; falkarinol) na *S. aureus* (MIK=62,5 $\mu\text{g/ml}$). Ovakvo delovanje podseća na podatke o aktivnosti etarskog ulja korena *S. rigidum* (9).

Nema literaturnih podataka o ispitivanju spazmolitičnog delovanja etarskih ulja izolovanih iz vrsta *Seseli*, ali postoje podaci o potvrđenom spazmolitičkom delovanju monoterpenskih jedinjenja, kao što je α -pinen koji je često glavna komponenta etarskih ulja *Seseli* vrsta, pa i *S. pallasii* (19). Takođe, pokazano je da terpinolen (najzastupljenija komponenta etarskog ulja herbe *S. gracile*) poseduje sposobnost inhibicije serotonin-indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova (20). Dostupni su i podaci o aktivnosti γ -terpinen (druge najzastupljenija komponenta etarskog ulja herbe *S. gracile*); ovo jedinjenje je ispoljilo antispazmotsku aktivnost u eksperimentu na izolovanom jejunumu zeca (21). Još jedan od glavnih sastojaka etarskog ulja *S. gracile*, *p*-cimen, je pokazao dobru spazmolitičku aktivnost na karbahol-indukovanim kontrakcijama sa IC_{50} vrednošću od 9,85 $\mu\text{g/ml}$ (22).

Zbog svega navedenog, u okviru ove doktorske disertacije, proveravana je spazmolitička aktivnost odabranih uzoraka etarskih ulja herbe i korena *S. pallasii* i *S. gracile* na modelu izolovanog ileuma pacova, prekontrahovanog dodatkom

rastvora KCl (80 mM). Testirani uzorci etarskih ulja izolovanih iz herbe obe biljne vrste ispoljili su dozno-zavisnu spazmolitičku aktivnost sa vrednostima $IC_{50}=271,4$ nI/ml (*S. gracile*). Etarska ulja korena su ispoljila slabiju mogućnost za relaksaciju kontrahovanog ileuma (*S. pallasii* $IC_{50}=719,75$ nI/ml). Može se zaključiti da su testirani uzorci etarskih ulja koji su sadržali više monoterpenkih jedinjenja, obe ispitivane vrste, ispoljili bolju spazmolitičku aktivnost; ovo se moglo i pretpostaviti na osnovu literaturnih podataka.

Istraživanja su pokazala da neka etarska ulja, koja relaksiraju glatku prekontrahovani glatki mišić digestivnog trakta, mogu iste efekte ostvariti i na prekontrahovanu glatku muskulaturu krvnih sudova, uzrokujući vazorelaksaciju (23). Takođe, mnogi monoterpeni su pokazali značajne kardiovaskularne efekte koji se delimično dovode u vezu sa efektom vazorelaksacije. *p*-Cimen, mirtenol i α -terpineol primenjeni intravenski imali su hipotenzivni efekat kod ne-anesteziranih pacova (7).

Vazorelaksantna aktivnost etarskih ulja herbe i korena obe ispitivane vrste testirana je na eksperimentalnom modelu na mezenteričnoj arteriji pacova kontrahovanom fenilefrinom (10^{-6} M). Etarska ulja izolovana iz *S. pallasii* su ispoljila dobru vazorelaksantnu aktivnost, pa je tako etarsko ulje herbe 50% relaksantnog efekta uzrokovalo u koncentraciji od 3,10 nI/ml. Svi ostali testirani uzorci ispoljili su znatno slabiji efekat vazorelaksacije.

U literaturi se mogu naći podaci o umerenoj ACE inhibitornoj aktivnosti etarskog ulja ploda crnog bibera (*Piper guineense*) koje u svom sastavu, kao glavne komponente, sadrži monoterpene β -pinen (41,24%), 1,8-cineol (17,22%), α -pinen (13,63%), γ -terpinen (5,68%). Ovo etarsko ulje se tradicionalno koristi u terapiji dijabetesa i hipertenzije (24). Sličan efekat, umerenu ACE inhibitornu aktivnost ($IC_{50}=150,00$ μ g/ml), ispoljilo je i etarsko ulje izolovano iz *Thymus algeriensis*; dominantni sastojci (74,34%) ovog etarskog ulja su monoterpenka jedinjenja (25). Takođe, *in vivo* testovima potvrđeno je da etarsko ulje nadzemnih delova *S. sibiricum* uzrokuje pad krvnog pritiska, vazokonstrikciju i stimulaciju disanja. Ovo etarsko ulje inhibira aktivnost glatkih mišića, a na srčani mišić deluje negativno inotropno i hronotropno (6).

Zbog ovakvih podataka, u okviru ove doktorske disertacije izvršen je skrining ACE inhibitorne aktivnosti odabranih uzoraka etarskih ulja *S. gracile* i *S. pallasii*. Konkretnoj analizi prethodila je *in silico* analiza primenom metode molekularnog

dokinga. Utvrđeno je da etarska ulja obe ispitivane vrste sadrže značajan broj sastojaka koji imaju sposobnost da grade kompleks sa ACE; ovi kompleksi su podjednake stabilnosti ili stabilnije od onih koje postiže kaptopril su (26 sastojaka u etarskim uljima *S. pallasii*, 11 sastojaka u etarskim uljima *S. gracile*). U nastavku, ACE inhibitorna aktivnost ispitivana *in vitro* metodom pokazala je da testirani uzorci etarskih ulja *S. pallasii* mogu dovesti do dozno-zavisne inhibicije ACE. Najizraženiju ACE inhibitornu aktivnost ispoljilo je etarsko ulje korena sa $IC_{50}=0,18$ mg/ml, a zatim etarska ulja herbe ($IC_{50}=0,33$ mg/ml) i ploda ($IC_{50}=0,75$ mg/ml). U *in vitro* testu ACE inhibitorne aktivnosti, ispitivani uzorci *S. gracile* su ispoljili slab ACE inhibitorni potencijal.

Literatura

1. Pimenov, M., Leonov, M.V. The Asian Umbelliferae Biodiversity Database (ASIUM) with particular reference to South-West Asian taxa. *Turkish Journal of Botany*. 2004;28(1):139-45.
2. Evergetis, E., Haroutounian, S.A. The Umbelliferae (Apiaceae) of Dioscorides annotated in codex Neapolitanus Graecus #1. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;175:549-66.
3. Zhou, J., Xie, G., Yan, X. Isolated Compounds T—Z, References, TCM Plants and Congeners, in *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications*. Berlin Heidelberg: Springer Verlag 2011.
4. Sahranavard, S., Ghafari, S., Mosaddegh, M. Medicinal plants used in Iranian traditional medicine to treat epilepsy. *Seizure*. 2014;23(5):328-32.
5. Carretero Accame, M.E., Gómez-Serranillos Cuadrado, M.P., Ortega Hernández-Agero, M.T., Palomino Ruiz-Poveda, O.M. Medicinal Plants used in Folk Medicine for Digestive Diseases in Central Spain, in: Rai M., Acharya D., Rios J.L., (editors) *Ethnomedicinal Plants: Revitalizing of Traditional Knowledge of Herbs*. Enfield, NH: Science Publishers; 2011.
6. Jamwal, K.S., Sethi, O.P., Chopra, I.C. Pharmacodynamical effects of a volatile fraction isolated from *Seseli sibiricum* (Benth.). *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*. 1963;143:41-51.
7. Santos, M.R.V., Moreira, F.V., Fraga, B.P., Souza, D.P.d., Bonjardim, L.R., Quintans-Junior, L.J. Cardiovascular effects of monoterpenes: a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2011;21(4):764-71.
8. Stankov Jovanović, V., Simonović, S., Ilić, M., Marković, M., Mitić, V., Đorđević, A., Nikolić-Mandić, S. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Seseli pallasii* Besser. (syn *Seseli varium* Trev.) *Essential Oils Records of Natural Products*. 2016;10(3):277-86.
9. Marčetić, M., Božić, D., Milenković, M., Lakušić, B., Kovačević, N. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of different parts of *Seseli rigidum*. *Natural product communications*. 2012;7(8):1091-4.
10. Kaya, A., Demirci, B., Hüsnü, K., Baser, K.H.C. Composition of the essential oil of *Seseli campestre* Besser. Growing in the Northwest Anatolia. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2010;7(2):161-6.
11. Tosun, A., Kürkçüoğlu, M., Dogan, E., Duman, H., Başer, K.H.C. Essential oil composition of *Seseli petraeum* M. Bieb. and *Seseli andronakii* Woron. growing in Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. 2006;21(2):257-9.

12. Stojković, D., Glamočlija, J., Soković, M., Grubišić, D., Petrović, S., Kukić, J., Ristić, M. Chemical composition, antimicrobial and antiradical properties of the essential oils of *Seseli globiferum* fruits. *Natural product communications*. 2008;3(11):1935-8.
13. Todorova, M., Trendafilova, A., Dimitrov, D. Essential Oil Composition of *Seseli rigidum* Waldst. from Bulgaria. *Proceeding of the Bulgarian Academy of Sciences*. 2013;66(7).
14. Marčetić, M.D., Lakušić, B.S., Lakušić, D.V., Kovačević, N.N. Variability of the root essential oils of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae) from different populations in Serbia. *Chemistry & Biodiversity*. 2013;10(9):1653-66.
15. Stankov-Jovanović, V.P., Ilić, M.D., Mitić, V.D., Mihajilov-Krstev, T.M., Simonović, S.R., Nikolić Mandić, S.D., Tabet, J.C., Cole, R.B. Secondary metabolites of *Seseli rigidum*: Chemical composition plus antioxidant, antimicrobial and cholinesterase inhibition activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;111:78-90.
16. Choi, H.-S. Functional properties, in: Sawamura M., (editor) *Citrus Essential Oils: Flavor and Fragrance*. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons; 2011.
17. Tosun, A. Antimicrobial activity screening of some *Seseli* L. species growing in Turkey. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*. 2004;33(3):151-5.
18. Janačković, P., Soković, M., Vujisić, L., Vajs, V., Vucković, I., Krivosej, Z., Marin, P.D. Composition and antimicrobial activity of *Seseli globiferum* essential oil. *Natural product communications*. 2011;6(8):1163-6.
19. Sadraei, H., Asghari, G.R., Hajhashemi, V., Kolagar, A., Ebrahimi, M. Spasmolytic activity of essential oil and various extracts of *Ferula gummosa* Boiss. on ileum contractions. *Phytomedicine*. 2001;8(5):370-6.
20. Riyazi, A., Hensel, A., Bauer, K., Geissler, N., Schaaf, S., Verspohl, E.J. The effect of the volatile oil from ginger rhizomes (*Zingiber officinale*), its fractions and isolated compounds on the 5-HT₃ receptor complex and the serotonergic system of the rat ileum. *Planta Medica*. 2007;73(4):355-62.
21. Astudillo, A., Hong, E., Bye, R., Navarrete, A. Antispasmodic activity of extracts and compounds of *Acalypha phleoides* Cav. *Phytotherapy Research*. 2004;18(2):102-6.
22. Rivero-Cruz, I., Duarte, G., Navarrete, A., Bye, R., Linares, E., Mata, R. Chemical composition and antimicrobial and spasmolytic properties of *Poliomintha longiflora* and *Lippia graveolens* essential oils. *Journal of Food Science*. 2011;76(2):C309-17.
23. Rasheed, H.M., Khan, T., Wahid, F., Khan, R., Shah, A.J. Chemical Composition and Vasorelaxant and Antispasmodic Effects of Essential Oil from *Rosa indica* L. Petals. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015:1-9.
24. Oboh, G., Ademosun, A.O., Odubanjo, O.V., Akinbola, I.A. Antioxidative properties and inhibition of key enzymes relevant to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from black pepper. *Advances in Pharmacological Sciences*. 2013;2013:926047.
25. Zouari, N., Fakhfakh, N., Zouari, S., Bougatef, A., Karray, A., Neffati, M., Ayadi, M.A. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of Tunisian *Thymus algeriensis* Boiss. et Reut. (Lamiaceae). *Food and Bioproducts Processing*. 2011;89(4):257-65.

D. OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO DOKTORSKE DISERTACIJE

Radovi publikovani u naučnim časopisima međunarodnog značaja (M20):

1. **Suručić Relja**, Kundaković Tatjana, Drakul Dragana, Lakušić Branislava, Milovanović Slobodan, Kovačević Nada. Variations in chemical composition, vasorelaxant and angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of essential oil from aerial parts of *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae), *Chemistry & Biodiversity*, 2017, Vol. 14, br. 5: e1600407 (M22)
2. Marčetić Mirjana, **Suručić Relja**, Kovačević Nada, Lakušić Dmitar, Lakušić Branislava. Essential oil composition of different parts of endemic species *Seseli gracile* Waldst. & Kit. (Apiaceae) from natural and cultivated conditions; *Journal of the Serbian Chemical Society*, 2017, Vol. 82, No 7-8: 815-824 (M23)

3.

Saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (M34):

1. **Suručić Relja**, Kovačević Nada, Lakušić Branislava, Drakul Dragana, Milovanović Slobodan. Composition, antispasmodic and vasomodulatory activity of essential oil from the aerial parts of *Seseli varium* Trev. (Apiaceae), The 18th international congress Phytopharm 2014, Saint Petersburg, Russia, 07/2014

Saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampana u izvodu (M64):

1. **Suručić Relja**, Pavlović-Drobac Milica, Lakušić Branislava, Kovačević Nada. Hemijski sastav etarskog ulja korena i nadzemnih delova *Seseli varium* Trev., II Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem Banjaluka 11/2011
2. **Suručić Relja**, Kovačević Nada, Lakušić Branislava, Milenković Marina, Krivokuća Marija, Antimikrobna aktivnost etarskog ulja *Seseli varium* Trev. VI Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd 10/2014
3. **Suručić Relja**, Kovačević Nada, Lakušić Branislava, Ispitivanje angiotenzin konvertujući enzim (ACE) inhibitorne aktivnosti etarskog ulja izolovanog iz korijena *Seseli pallasii* Besser, III Kongres farmaceuta Bosne i Hercegovine sa međunarodnim učešćem, Sarajevo 05/2015

E. ZAKLJUČAK - OBRAZLOŽENJE NAUČNOG DOPRINOSA DOKTORSKE DISERTACIJE

Na osnovu uvida u dostavljeni materijal, Komisija je zaključila da doktorska disertacija pod nazivom „Hemijska i farmakološka karakterizacija etarskih ulja biljnih vrsta *Seseli gracile* Waldst. & Kit. i *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae)“ kandidata dipl. farm. Relje Suručića jeste rezultat rada kandidata i predstavlja originalan naučni doprinos boljem poznavanju hemijske kompozicije i farmakološkog potencijala etarskih ulja dve ispitivane biljne vrste: *Seseli gracile* i *Seseli pallasii*.

U okviru doktorske disertacije kandidata dipl. farm. Relje V. Suručića izvršena je hemijska i farmakološka karakterizacija dve ispitivane biljne vrste. Hemijska karakterizacija obuhvatila je kvalitativnu i kvantitativnu analizu etarskih ulja različitih biljnih organa *S. gracile* i *S. pallasii* (ukupno 22 etarska ulja obe ispitivane vrste, i to 8 etarskih ulja podzemnih organa, 8 etarskih ulja herbi, 4 ulja ploda i 2 ulja cvasti).

Rezultati ispitivanja urađenih u okviru ove doktorske disertacije, potvrdili su da etarska ulja izolovana iz *S. gracile* i *S. pallasii* ispoljavaju značajne *in vitro* farmakološke aktivnosti koje se mogu povezati sa tradicionalnom upotrebom različitih vrsta devesilja u terapiji digestivnih i kardiovaskularnih poremećaja. Dobijeni rezultati, takođe, predstavljaju dobar osnov za buduća ispitivanja ovih aktivnosti u *in vivo* modelima, kao i za detaljnija ispitivanja mehanizama preko kojih se ove aktivnosti odvijaju, te sastojaka koji su glavni nosioci ovih aktivnosti.

Treba naglasiti da su svi podaci dobijeni za ispitivanje endemične vrste *S. gracile* potpuno novi za nauku i da izolovana etarska ulja imaju specifičan sastav, različit u odnosu na ostale vrste roda *Seseli*.

Iz rezultata rada u okviru ove doktorske disertacije, do sada su publikovana dva rada u časopisima kategorije M20, a 4 saopštenja štampana u izvodu predstavljena su na međunarodnom naučnom skupu (1) i nacionalnim naučnim skupovima (3).

Provera originalnosti doktorske disertacije dipl. farm. Relje Suručića, izvršena je u Univerzitetskoj biblioteci „Svetozar Marković“. Za proveru originalnosti korišćen je programa iThenticate. U izveštaju Biblioteke je navedeno da je program iThenticate registrovao 15% preklapanja sa 256 izvora; preklapanja imaju pojedinačni udeo manji od 1%. Najveći broj preklapanja se odnosi na „crossref.“ i registrovan je u delu Literatura. U delu Rezultati i Diskusija nema obeleženih preklapanja. U skladu sa *Pravilnikom o*

postupku provjere originalnosti doktorskih disertacija koje se brane na Univerzitetu u Beogradu, dobijeni rezultati provjere ukazuju na originalnost navedene doktorske disertacije i kada se radi o dobijenim rezultatima, diskusiji o njihovoj značajnosti, kao i celokupnom tekstu disertacije.

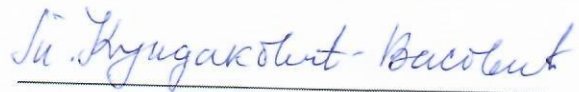
F. MIŠLJENJE I PREDLOG

Na osnovu svega izloženog, Komisija je zaključila da je kandidat dipl. farm Relja V. Suručić realizovao postavljene ciljeve istraživanja i da dobijeni rezultati imaju naučni doprinos u oblasti sekundarnih metabolita biljaka i farmakognozije.

Komisija sa velikim zadovoljstvom predlaže Nastavno-naučnom veću Univerziteta u Beogradu-Farmaceutskog fakulteta da prihvati pozitivan izveštaj o završenoj doktorskoj disertaciji pod nazivom „**Hemijska i farmakološka karakterizacija etarskih ulja biljnih vrsta *Seseli gracile* Waldst. & Kit. i *Seseli pallasii* Besser (Apiaceae)**“ i kandidatu dipl. farm. Relji V. Suručiću odobri javnu odbranu po dobijanju saglasnosti Veća naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu.



Mentor - Prof. dr Nada Kovačević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet



Mentor - Prof. dr Tatjana Kundaković-Vasović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Farmaceutski fakultet

Članovi komisije



Prof. dr Slobodan Milovanović, redovni profesor
Univerzitet u Istočnom Sarajevu-Medicinski fakultet



Svjetlana Stoisavljević-Šatara, redovni profesor
Univerzitet u Banjoj Luci-Medicinski fakultet