



UNIVERZITET U NIŠU  
MEDICINSKI FAKULTET



**Milica N. Kostić**

**HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKI  
PROFIL EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2019.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF MEDICINE



**Milica N. Kostić**

**CHEMICAL COMPOSITION AND  
PHARMACOLOGICAL PROFILE OF  
*Salvia sclarea* L. EXTRACTS**

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2019

## Podaci o doktorskoj disertaciji

Mentor: **Prof. dr Dušanka Kitić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

Naslov: HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKI PROFIL EKSTRAKATA  
*Salvia sclarea* L.

Rezime:

Ova doktorska disertacija predstavlja skup istraživanja koja imaju za cilj dobijanje relevantnih podataka o sadržaju aktivnih jedinjenja i farmakološkim efektima ekstrakata muskatne žalfije, *Salvia sclarea* L. U tradicionalnoj medicini *S. sclarea* je poznata kao aromatična i lekovita biljna vrsta koja se najčešće koristi kod različitih digestivnih, respiratornih i menstrualnih tegoba, upalnih procesa, kašlja, gingivitisa, afti, stomatitisa, itd. Njena lekovitost do sada nije u potpunosti istražena, te će ovi rezultati pružiti značajan doprinos savremenoj fitoterapiji.

Kao biljni materijal korišćeni su nadzemni delovi muskatne žalfije koji su sakupljeni u periodu 2011-2014. godine u Malči, okolini Niša. Sakupljeni biljni materijal je podvrgnut morfološko-anatomskoj karakterizaciji i ekstrakciji. Pripremljeno je po deset ekstrakata iz svake godine ekstrakcijom etanolom i metanolom različitih koncentracija, tehnikama maceracije, ultrazvuka i digestije.

Morfološko-anatomska analiza nadzemnih organa *S. sclarea* i elemenata biljne droge (*Salviae sclareae herba*) ukazuje na prisustvo dva funkcionalna tipa trihoma: žlezdani i nežlezdani. Zastupljeni su jednoćelijski i višećelijski nežlezdani trihomi kao i kapitatni i peltatni žlezdani trihomi, sa većim brojem podtipova. Hemijskim ispitivanjima je utvrđeno da ekstrakti sadrže značajne količine ukupnih fenola, tanina, flavonoida i derivata hidroksicimetne kiseline. HPLC analizom identifikovano je i kvantifikovano sedam jedinjenja u svim ekstraktima: ruzmarinska i kafena kiselina, apigenin, luteolin, salvigenin, apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozid. Dominantno jedinjenje u svim ekstraktima bila je ruzmarinska kiselina.

Farmakološka ispitivanja su obuhvatala definisanje antioksidativnih, antimikrobnih, antiinflamatornih i spazmolitičkih efekata ekstrakata. Svi ekstrakti muskatne žalfije su pokazali značajne antiradikalske, a naročito antilipoperoksidne potencijale. Ekstrakti su efikasnije uticali na rast Gram (+) u odnosu na Gram (-) bakterije i bili bolji bakteriostatski nego baktericidni agensi. Posebno je od značaja dobar efekat na bakteriju *Staphylococcus aureus*. Na modelu eksperimentalno (lipopolisaharidom) indukovane parodontopatije na pacovima pokazan je istaknut antiinflamatorni efekat etanolnog ekstrakta, pripremljen 80% etanolom metodom ultrazvučne ekstrakcije. Ispitivani ekstrakti su ispoljili značajne relaksantne efekte na spontane i indukovane kontrakcije glatke muskulature izolovanog

ileuma i traheje pacova. Hemijska karakterizacija ekstrakata *S. sclarea* je pokazala da se razlike u njihovom sastavu odražavaju na ispoljavanje farmakoloških aktivnosti.

Ispitivanja ekstrakata muskatne žalfije treba usmeriti na dalje *in vivo* i na kliničke studije kako bi se sagledala njihova potencijalna primena kao efikasnih lekovitih preparata.

Naučna oblast:

Farmaceutske nauke

Naučna  
disciplina:

Farmakognozija

Ključne reči:

*Salvia sclarea* L., ekstrakti, morfološke i anatomske karakteristike, polifenoli, fenolne kiseline, flavonoidi, antioksidativna aktivnost, antimikrobna aktivnost, antiinflamatorna aktivnost, spazmolitička aktivnost

UDK:

615.322:635.74

CERIF  
klasifikacija:

B 740

Tip licence  
Kreativne  
zajednice:

**CC BY-NC-ND**



## Data on Doctoral Dissertation

Doctoral  
Supervisor:

**Dr. Dušanka Kitić**, full professor, Faculty of Medicine, University of Niš

Title:

CHEMICAL COMPOSITION AND PHARMACOLOGICAL  
PROFILE OF *Salvia sclarea* L. EXTRACTS

Abstract:

This doctoral dissertation is a set of studies aimed at obtaining relevant data on the content of active compounds and the pharmacological effects of the clary sage extract, *Salvia sclarea* L. In traditional medicine, *S. sclarea* is known as an aromatic and medicinal plant species most commonly used in various digestive, respiratory and menstrual disorders, inflammatory processes, cough, gingivitis, aphthae, stomatitis, etc. Its healing properties have not been fully investigated thus far, so these results will provide a significant contribution to modern phytotherapy.

The above-ground parts of clary sage, used as plant material, were collected in the period 2011-2014 in Malča, near Niš. The collected plant material was subjected to morphological-anatomical characterization and extraction. Ten extracts were prepared from each year by the extraction with various concentrations of ethanol and methanol using maceration, ultrasound and digestion techniques.

The morphological and anatomical analysis of the above-ground organs of *S. sclarea* and the elements of the drug (*Salviae sclareae herba*) indicates the presence of two functional types of trichomes: non-glandular and glandular. Unicellular and multicellular glandular trichomes, as well as capitate and peltate glandular trichomes, with a larger number of subtypes are present. Chemical investigations determined significant amounts of total phenols, tannins, flavonoids and hydroxycinnamic acid derivatives in the extracts. HPLC analysis identified and quantified seven compounds in all extracts: rosmarinic and caffeic acid, apigenin, luteolin, salvigenin, apigenin- and luteolin-7-*O*-glucoside. The dominant compound in all the extracts was rosmarinic acid.

Pharmacological studies involved the definition of antioxidant, antimicrobial, anti-inflammatory and spasmolytic effects of the extracts. All clary sage extracts showed significant antiradical, especially antilipoperoxidant, potentials. The extracts influenced the growth of Gram (+) bacteria more effectively than Gram (-) and were better bacteriostatic than bactericidal agents. Especially important is the good effect on *Staphylococcus aureus*. An experimentally (lipopolysaccharide) induced periodontitis on rats showed a

significant anti-inflammatory effect of the ethanol extract, prepared with 80% ethanol by ultrasound extraction. The investigated extracts exhibited significant relaxant effects on spontaneous and induced contractions of smooth muscles of the isolated ileum and trachea of the rats. The chemical characterization of *S. sclarea* extracts showed that the differences in their composition reflected the manifestation of pharmacological activities.

Further research into clary sage extracts should be directed towards *in vivo* and clinical studies so as to examine their potential application as effective medicinal preparations.

Scientific  
Field:

Pharmaceutical sciences

Scientific  
Discipline:

Pharmacognosy

Key Words:

*Salvia sclarea* L., extracts, morphological and anatomical characteristics, polyphenols, phenolic acids, flavonoids, antioxidant activity, antimicrobial activity, anti-inflammatory activity, spasmolytic activity

UDC:

615.322:635.74

CERIF  
Classification:

B 740

Creative  
Commons  
License Type:

**CC BY-NC-ND**

## ZAHVALNICA

Realizacija ove doktorske disertacije ne bi bila moguća da nije bilo velike pomoći i saradnje grupe ljudi kojima se najiskrenije zahvaljujem:

**Prof. dr Dušanki Kitić**, mentoru, za bezrezervnu profesionalnu i prijateljsku podršku, na poverenju, znanju, savetima i strpljivosti, bez čijeg angažovanja, ideja i sugestija izrada doktorske disertacije ne bi bila moguća.

**Prof. dr Suzani Branković**, za sveobuhvatnu pomoć i podršku tokom pisanja doktorske disertacije, a naročito oko procene spazmolitičkih efekata.

**Prof. dr Bojanu Zlatkoviću**, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, na neprocenjivoj stručnoj pomoći oko determinacije biljnog materijala i morfološko-anatomske karakterizacije.

**Prof. dr Tatjani Jevtović-Stoimenov**, za nesebičnu pomoć u realizaciji eksperimentalnog rada sa životinjama i biohemijskom tumačenju dobijenih rezultata.

Naučnom savetniku **dr Katarini Šavikin**, sa Instituta za proučavanje lekovitog bilja "dr Josif Pančić", na brojnim korisnim sugestijama tokom istraživanja, i na proceni i oceni doktorske disertacije.

**Prof. dr Tatjani Mihajilov-Krstev**, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, za nesebičnu pomoć oko ispitivanja antimikrobne aktivnosti.

**dr Slavoljubu Živanoviću** za svesrdnu pomoć oko analize hemijskog sastava.

**dr Milici B. Petrović**, na prijateljstvu i neprocenjivoj pomoći tokom zajedničkog eksperimentalnog rada sa životinjama iz oblasti stomatologije.

**Doc. dr Aleksandru Petroviću i dr Marku Joviću** na velikoj pomoći oko patohistološke analize tokom eksperimentalnog rada sa životinjama.

**Prof. dr Miloradu Cakiću i doc. dr Jeleni Zvezdanović**, sa Tehnološkog fakulteta u Leskovcu, na veoma korisnim smernicama za identifikaciju pojedinih jedinjenja.

Dragim koleginicama **dr Bojani Miladinović, Milici Milutinović i dr Dragani Pavlović**, za pomoć u izvođenju mnogih eksperimenata, korisne sugestije, znanje i prijateljstvo.

Laborantu **Dragani Janković** za veliku pomoć u laboratoriji i **Maji Jovanović**, doktorandu Prirodno-matematičkog fakulteta, na tehničkoj pomoći u laboratoriji Departmana za biologiju i ekologiju.

Veliku zahvalnost dugujem svojim prijateljima, a najveću svojoj porodici, majci, bratu i mom Milošu, na neizmernoj podršci, ljubavi i strpljenju, i ocu koji više nije među nama i kome posvećujem ovaj rad.

Sva istraživanja u okviru doktorske disertacije su finansijski podržana i realizovana zahvaljujući projektima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, broj III 41018 i III 46013, i Internom projektu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu, br. 25.

Milica Kostić

## LISTA SKRAĆENICA

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)	DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
Ach – acetilholin	DUOX – dualna oksidaza
AH – antioksidans - donor vodonika	e – jednoslojni epidermis
AK – askorbinska kiselina	EC <sub>50</sub> – efektivna koncentracija ekstrakta koja ispoljava 50% aktivnosti
ANOVA – analiza varijanse	Na <sub>2</sub> -EDTA – dinatrijum-etilendiamintetraacetat
ATCC – American type culture collection	eh – mehanički trihom
ATP – adenzin trifosfat	ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay
BEOU – Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu	eNOS – endothelial nitric oxide synthase (endotelna azot oksid sinataza)
BDNF – brain-derived neurotrophic growth factor	EM – ekstrakt pripremljen koncentrovanim etanolom metodom maceracije
BHA – butilhidroksianizol	EU – ekstrakt pripremljen koncentrovanim etanolom metodom ultrazvuka
BHT – butilhidroksitoluen	E80U – ekstrakt pripremljen 80% etanolom metodom ultrazvuka
BKL – $\beta$ -karoten/linolna kiselina	E80T – ekstrakt pripremljen 80% etanolom metodom digestije
CAE – ekvivalent kafene kiseline	E60U – ekstrakt pripremljen 60% etanolom metodom ultrazvuka
CaM – kalmodulin	E60T – ekstrakt pripremljen 60% etanolom metodom digestije
cAMP – ciklični adenzin monofosfat	ER – endoplazmatski retikulum
cGMP – ciklični guanozin monofosfat	FAL – fenilalanin amonijaliza
CE – katehin ekvivalent	FDA – Food and Drug Administration (Uprava za hranu i lekove)
CFU – colony forming units (jedinica formiranja kolonija bakterija)	FGIP – funkcionalni gastrointestinalni poremećaji
CH – cinamat 4-hidroksilaza	FRAP – ferric reducing antioxidant power ili ferric reducing ability of plasma (Fe-redukujuća sposobnost plazme)
cl – kolenhim	GABA – <i>gama</i> -aminobuterna kiselina
CLSI – Clinical & laboratory standards institute	
CNS – centralni nervni sistem	
cu – kutikula	
CUPRAC – cupric reducing antioxidant capacity	
DAD – "diode array" detektor	
DAG – diacilglicerol	
DMSO – dimetilsulfoksid	
diTPS – diterpenska sintaza	
DNK – dezoksiribonukleinska kiselina	

GAE – ekvivalent galne kiseline  
 GALAE – galantamin ekvivalent  
 GGPP – (E, E, E)-geranilgeranil-difosfat  
 gh – peltatni trihom  
 GPS – global positioning system  
 Gs – stimulatívni G protein  
 HDL – lipoprotein visoke gústine  
 HFPD – hidroksifenilpiruvat dioksigenaza  
 HFPR – hidroksifenilpiruvat reduktaza  
 HIV – virus humane imunodefícijske  
 HE – hematoksilin-eozin  
 Hlor. – hloramfenikol  
 HOPB – hronična opstruktívna boleest pluća  
 HPLC – high performance liquid chromatography  
 (tečna hromatografíja visokih performansi)  
 HRP – horseradish peroxidase (peroksidaza rena)  
 IC<sub>50</sub> – koncentracíja ekstrakta koja inhibira 50%  
 slobodnih radikala  
 Ig – imunoglobulin  
 IL – interleukin  
 IP3 – inozitol trifosfat  
 IP3R – inozitol trifosfat receptor  
 KVS – kardio-vaskularni sistem  
 L-DOPA – L-3,4-dihidroksifenilalanin  
 LD<sub>50</sub> – srednja letalna doza  
 LDL – lipoprotein niske gústine  
 le – epidermis naličja  
 LE – luteolin ekvivalent  
 L-NAME – N $\omega$ -nitro-L-arginin metil ester  
 LPS – lipopolisaharid  
 MBC – minimalna baktericidna koncentracíja  
 MDA – malonil-dialdehid  
 MFC – minimalna fungicidna koncentracíja  
 MHB – Mueller-Hinton bujon  
 MIC – minimalna inhibitorna koncentracíja  
 MLC – miozin lakog lanca  
 MLCK – kinaza lakog lanca miozina  
 MM – ekstrakt pripremljen apsolutnim etanolom  
 metodom maceracije  
 MU – ekstrakt pripremljen apsolutnim etanolom  
 metodom ultrazvuka  
 M80M – ekstrakt pripremljen 80% metanolom  
 metodom maceracije  
 M80U – ekstrakt pripremljen 80% metanolom  
 metodom ultrazvuka  
 MRSA – meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus*  
 MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum  
 bromid  
 NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat  
 NF- $\kappa$ B – nuklearni faktora *kapaB*  
 Nis. – nistatin  
 NOS – azot oksid sinataza  
 ORAC – oxygen radical absorbance capacity (kapacitet  
 apsorpcije kiseoničnih radikala)  
 p – parenhim  
 PARP – poly (ADP-ribose) polymerase  
 PE – ekvivalent pirokatehola  
 PGE2 – prostaglandin E2  
 ph – floem  
 Ph. Eur. 9,0 – Deveta Evropska farmakopeja  
 Ph. Jug. IV – Četvrta Jugoslovenska farmakopeja  
 PKA – protein kinaza A

PLC – fosfolipaza C	ue – epidermis lica
pp – palisadno tkivo	UK – United Kingdom
pr – srž	URSDA – United States recommended daily allowance (preporučene dnevne doze u Sjedinjenim Američkim Državama)
PVPP – polivinilpolipirolidon	UV – ultraljubičast
r – Pirsonov koeficijent korelacije	UV-Vis – ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija
RANKL – receptor activator of nuclear factor <i>kappa</i> B ligand (receptorski aktivator za nuklearni faktor <i>kappa</i> B ligand)	VRE - vancomycin-resistant <i>Enterococci</i> ( <i>enterokoke</i> otporne na vankomicin)
RE – ekvivalent rutina	v/v – volumen/volumen
RHMZ – Republički Hidrometeorološki zavod Srbije	WAM – well-being, activity, mood (blagostanje, aktivnost, raspoloženje)
RK – ruzmarinska kiselina	4KL – hidroksicinamat koenzim A ligaza
RNK – ribonukleinska kiselina	5HT – 5-hidroksi triptamin
ROS – reaktivne kiseonične vrste	$\alpha$ -TOK – $\alpha$ -tokoferol
S – standard	
s – grupa sklereida	
SAD – Sjedinjene Američke Države	
sc – stoma	
SDB – saburo-dekstrozni bujon	
sp – sunderasti parenhim	
SR – sarkoplazmatski retikulum	
SRK – sintaza ruzmarinske kiseline	
Str. – streptomycin	
SZO – Svetska Zdravstvena Organizacija	
t – traheja	
TAT – piridoksal-fosfat zavisne transaminaze tirozin- amino-transferaza	
TE – Trolox ekvivalent	
TLC – tankoslojna hromatografija	
TNF- $\alpha$ – faktor tumorske nekroze <i>alfa</i>	
TTC – tetrazolijum hlorid	
UDHK – ukupni derivati hidroksicimetne kiseline	

# SADRŽAJ

<b>1.</b>	<b>UVOD</b>	.....	1
<b>1.1.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	.....	2
<b>2.</b>	<b>OPŠTI DEO</b>	.....	4
<b>2.1.</b>	<b>FAMILIJA LAMIACEAE LINDL.</b>	.....	4
2.1.1.	Rod <i>Salvia</i> L.	.....	5
2.1.2.	<i>Salvia sclarea</i> L.	.....	6
<b>2.2.</b>	<b><i>Salvia sclarea</i> L. U TRADICIONALNOJ MEDICINI</b>	.....	11
<b>2.3.</b>	<b>POLIFENOLI</b>	.....	13
2.3.1.	Fenolne kiseline	.....	19
2.3.1.1.	Ruzmarinska kiselina	.....	20
2.3.1.2.	Kafena kiselina	.....	24
2.3.2.	Flavonoidi	.....	26
2.3.2.1.	Luteolin	.....	28
2.3.2.2.	Apigenin	.....	29
2.3.2.3.	Salvigenin	.....	30
2.3.3.	Tanini	.....	31
<b>2.4.</b>	<b>EKSTRAKTI</b>	.....	33
<b>2.5.</b>	<b>DOSADAŠNJA ISPITIVANJA HEMIJSKOG SASTAVA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	38
<b>2.6.</b>	<b>ANTIOKSIDANTI</b>	.....	50
<b>2.7.</b>	<b>MIKROORGANIZMI</b>	.....	54
2.7.1.	Gram-pozitivne bakterije	.....	56
2.7.2.	Gram-negativne bakterije	.....	62
2.7.3.	Jednoćelijske gljive – kvasci	.....	67
<b>2.8.</b>	<b>INFLAMACIJA</b>	.....	68
2.8.1.	Parodontopatija	.....	70
<b>2.9.</b>	<b>GASTROINTESTINALNI SISTEM</b>	.....	75
2.9.1.	Glatki mišići gastrointestinalnog sistema	.....	76
2.9.2.	Kontrola funkcije gastrointestinalnog sistema	.....	79
<b>2.10.</b>	<b>RESPIRATORNI SISTEM</b>	.....	82
2.10.1.	Glatki mišići traheje	.....	83
<b>2.11.</b>	<b>DOSADAŠNJA ISPITIVANJA FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	84
2.11.1.	Klinička efikasnost biljne vrste <i>Salvia sclarea</i> L.	.....	100
<b>3.</b>	<b>MATERIJAL I METODE</b>	.....	104
<b>3.1.</b>	<b>BILJNI MATERIJAL I KARAKTERISTIKE STANIŠTA</b>	.....	104
<b>3.2.</b>	<b>MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (<i>Salviae sclareae herba</i>)</b>	.....	105
<b>3.3.</b>	<b>IZRADA EKSTRAKATA</b>	.....	106
<b>3.4.</b>	<b>HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	107

3.4.1.	Određivanje sadržaja ukupnih fenola	.....	107
3.4.2.	Određivanje sadržaja ukupnih tanina	.....	108
3.4.3.	Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida	.....	108
3.4.4.	Određivanje sadržaja ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline	.....	109
3.4.5.	Određivanje hemijskog sastava HPLC analizom	.....	109
<b>3.5.</b>	<b>ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA</b>	.....	<b>110</b>
	<i>Salvia sclarea</i> L.		
3.5.1.	Određivanje antioksidativne aktivnosti u DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sistemu	.....	110
3.5.2.	Određivanje antioksidativne aktivnosti u $\beta$ -karoten/linolna kiselina sistemu	.....	111
<b>3.6.</b>	<b>ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA</b>	.....	<b>112</b>
	<i>Salvia sclarea</i> L.		
3.6.1.	Mikrobiološki sojevi	.....	112
3.6.2.	Mikrodiluciona metoda	.....	112
<b>3.7.</b>	<b>ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNOG EFEKTA ETANOLNOG EKSTRAKTA <i>Salvia sclarea</i> L. U LIPOPOLISAHARIDOM IZAZVANOJ PARODONTOPATIJI PACOVA</b>	.....	<b>113</b>
3.7.1.	Eksperimentalni dizajn sa životinjama	.....	113
3.7.2.	Histopatološka analiza	.....	114
3.7.3.	Merenje faktora inflamacije (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , i IL-6) u gingivalnom tkivu pacova	.....	115
<b>3.8.</b>	<b>ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA</b>	.....	<b>115</b>
3.8.1.	Eksperimentalne životinje	.....	116
3.8.2.	Izolovanje i postavljanje ileuma pacova	.....	116
3.8.3.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na spontane kontrakcije ileuma pacova	.....	117
3.8.4.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova	.....	117
3.8.5.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova	.....	117
3.8.6.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova	.....	118
3.8.7.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na barijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova	.....	118
3.8.8.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalcijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova	.....	119
3.8.9.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na kontrakcije ileuma pacova indukovane blokatorom azot-oksida sinteze (L-NAME)	.....	119
<b>3.9.</b>	<b>ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA IZOLOVANOJ TRAHEJI PACOVA</b>	.....	<b>120</b>
3.9.1.	Eksperimentalne životinje	.....	120
3.9.2.	Izolovanje i postavljanje traheje pacova	.....	120
3.9.3.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova	.....	121
3.9.4.	Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije traheje pacova	.....	121



<b>3.10.</b>	<b>STATISTIČKA ANALIZA</b>	.....	122
<b>4.</b>	<b>REZULTATI</b>	.....	123
<b>4.1.</b>	<b>MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (<i>Salviae sclareae herba</i>)</b>	.....	123
4.1.1.	Morfološke karakteristike droge	.....	123
4.1.2.	Anatomske karakteristike droge – analiza indumentuma	.....	127
<b>4.2.</b>	<b>PRINOSI EKSTRAKCIJE</b>	.....	135
<b>4.3.</b>	<b>SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	136
<b>4.4.</b>	<b>SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTIMA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	138
<b>4.5.</b>	<b>SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	140
<b>4.6.</b>	<b>SADRŽAJ UKUPNIH DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE U EKSTRAKTIMA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	141
<b>4.7.</b>	<b>HPLC KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	142
<b>4.8.</b>	<b>ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKTA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	149
4.8.1.	Antioksidativna aktivnost ekstrakata u DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sistemu	.....	149
4.8.2.	Antioksidativna aktivnost ekstrakata u $\beta$ -karoten/linolna kiselina sistemu	.....	150
<b>4.9.</b>	<b>ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	152
<b>4.10.</b>	<b>ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST ETANOLNOG EKSTRAKTA <i>Salvia sclarea</i> L.</b>	.....	158
4.10.1.	Efekti ekstrakta na histopatološke karakteristike parodontopatije kod pacova	.....	158
4.10.2.	Efekti ekstrakta na koncentraciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i IL-6 u gingivalnom tkivu u indukovanoj parodontopatiji pacova	.....	159
<b>4.11.</b>	<b>SPAZMOLITIČKI EFEKTI EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA</b>	.....	162
4.11.1.	Efekti ekstrakata na spontane kontrakcije ileuma	.....	162
4.11.2.	Efekti ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma	.....	165
4.11.3.	Efekti ekstrakata na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma	.....	168
4.11.4.	Efekti ekstrakata na histaminom indukovane kontrakcije ileuma	.....	174
4.11.5.	Efekti ekstrakata na barijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma	.....	175
4.11.6.	Efekti ekstrakata na kalcijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma	.....	177
4.11.7.	Efekti ekstrakata na kontrakcije ileuma pacova indukovane blokatorom azot- oksid sintetaze (L-NAME)	.....	179
<b>4.12.</b>	<b>SPAZMOLITIČKI EFEKTI EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA IZOLOVANOJ TRAHEJI PACOVA</b>	.....	180
4.12.1.	Efekti ekstrakata na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova	.....	180
4.12.2.	Efekti ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije traheje pacova	.....	183
<b>5.</b>	<b>DISKUSIJA</b>	.....	187
<b>5.1.</b>	<b>MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (<i>Salviae sclareae herba</i>)</b>	.....	187
<b>5.2.</b>	<b>EKSTRAKCIJA BILJNOG MATERIJALA</b>	.....	190
<b>5.3.</b>	<b>SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA, TANINA, FLAVONOIDA I</b>	.....	193

	<b>DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE U EKSTRAKTIMA</b>	
	<i>Salvia sclarea</i> L.	
5.4.	HPLC KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.	197
5.5.	ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.	200
5.6.	ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L.	206
5.7.	ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST ETANOLNOG EKSTRAKTA <i>Salvia sclarea</i> L.	212
5.8.	SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA ILEUMU PACOVA	214
5.9.	SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA <i>Salvia sclarea</i> L. NA TRAHEJI PACOVA	220
6.	<b>ZAKLJUČAK</b>	223
7.	<b>LITERATURA</b>	227
8.	<b>PRILOG</b>	276
	<b>BIOGRAFIJA AUTORA</b>	290

## 1. UVOD

Tradicionalna medicina je oduvek igrala ključnu ulogu u prevenciji i lečenju brojnih patoloških stanja. Podaci Svetske Zdravstvene Organizacije (SZO) ukazuju da između 70-95% populacije zemalja u razvoju trenutno koristi lekovite biljne vrste kao lekovita sredstva. Velika dostupnost biljnih sirovina, pristupačna cena, jednostavno uzgajanje i prerada, i retke neželjene reakcije najčešće leže u objašnjenju ovih podataka (Alimpić, 2016). Međutim, i u mnogim industrijski razvijenim državama npr. Nemačkoj, Kanadi, Francuskoj ili Italiji upotreba lekovitih preparata biljnog porekla je značajna. Smatra se da 70-90% ovog stanovništva upotrebljava tradicionalne biljne preparate u okviru komplementarne, alternativne tj. nekonvencionalne medicine (Robinson i Zhang, 2011).

Razvoj novih proizvoda iz prirodnih izvora rapidno raste. Studije koje pokazuju efikasnost i značaj lekovitih biljnih vrsta se sprovode u mnogim zemljama širom sveta i obuhvataju široki spektar razvojnih faza (Palhares i sar., 2015).

Lekovite biljne vrste uglavnom imaju tradicionalnu istoriju upotrebe sa jakim ulogom u kulturnom nasleđu (Tapsell i sar., 2006). Tradicionalna medicina, za razliku od konvencionalne, odgovara sistemu lečenja sa multi-komponentnim pristupom jer se zasniva na upotrebi različitih farmakološki aktivnih jedinjenja sa terapijskim efektima koji mogu biti potvrđeni i klinički, ali i kroz iskustvo i znanje nastalo tokom duge istorije lečenja bolesti. Strategija razvoja novih biljnih lekova u savremenoj fitoterapiji reverznim inženjeringom tradicionalne biljne medicine predstavlja tzv. obrnutu farmakologiju. Obrnuta farmakologija podrazumeva proučavanje aktivnih jedinjenja zasnovano na tradicionalnoj upotrebi biljnih lekova ill formulacija, pa se stoga najveći broj istraživanja ovih vrsta upravo i odnosi na potvrđivanje njihove tradicionalne upotrebe (Ahn, 2017).

Biljne vrste familije Lamiaceae nalaze široku primenu u tradicionalnoj medicini, a za mnoge od njih su potvrđene i značajne farmakološke aktivnosti (Kitić, 2006). Aromatične vrste ove familije su poznate i kao odlični začini, prirodni konzervansi i korigensi ukusa i mirisa (Carović-Stanko i sar., 2016). Najbrojnije vrste familije Lamiaceae pripadaju rodu žalfija, *Salvia* L., čiji se predstavnici mogu naći u farmakopejama mnogih zemalja širom sveta. Spektar tradicionalne upotrebe *Salvia* vrsta u narodnoj medicini je izuzetno širok. Najčešće se koriste kao karminativi, spazmolitici, antiseptici, adstringensi, insekticidi, kao lekovi protiv znojenja i groznice, kao sredstva za ispiranje usta kod inflamatornih procesa u ustima i grlu, za zarastanje

rana na koži, u nezi kose, protiv reumatizma, impotencije, u lečenju mentalnih disfunkcija, nerveze, itd. Najpoznatija, najkorišćenija i najviše ispitana biljna vrsta roda *Salvia* L. je *Salvia officinalis* L. U poslednje vreme se sve veća pažnja poklanja i drugim vrstama ovog roda (Baricevic i Bartol, 2000). Jedna od takvih je i muskatna žalfija, *Salvia sclarea* L., čija se tradicionalna upotreba i farmakološka aktivnost beleži u stručnoj i naučnoj literaturi. Stoga je predmet naučnog istraživanja ove doktorske disertacije usmeren na dalje ispitivanje njenih farmakoloških aktivnosti, tačnije njenih ekstrakata, kao i na hemijsku karakterizaciju istih.

*S. sclarea* je u tradicionalnoj medicini najčešće poznata kao sredstvo za ublažavanje digestivnih i menstrualnih tegoba, kao i kod različitih inflamacija respiratornog sistema, poliartritis, reumatizma itd. (Dweck, 2000; Koutsaviti i sar., 2016; Lawrence, 1994; Peana i Moretti, 2002). Široko se kultiviše u svrhu ekstrakcije i izolovanja etarskog ulja širom sveta, a naročito u Francuskoj, Bugarskoj, Sjedinjenim Američkim Državama i zemljama bivšeg Sovjetskog Saveza. U zemljama jugositočne Evrope, Mediterana, centralne Azije, Kavkaza, Iranu i Avganistanu poznata je kao lekovita, aromatična, ornamentalna, medonosna i začinska biljna vrsta. Njeni cvetni ekstrakti se široko koriste kao arome za sokove i alkoholna pića, u proizvodnji slatkiša, dezerta, peciva, želatina, pudinga, začina i salata (Kaur i sar., 2015; Mamadaliyeva i sar., 2017; Yalcin i sar., 2011). Cela biljka, a naročito cvasti muskatne žalfije se odlikuju istaknutim mirisom zbog čega je od značaja u industriji kozmetičkih preparata i parfema, i kao aromatizer u proizvodnji likera i cigareta (Cai i sar., 2006; Carrubba i sar., 2002; Saharkhiz i sar., 2009).

U 9. Evropskoj farmakopeji (2017) oficinalno je etarsko ulje muskatne žalfije, *Salviae sclareae aetheroleum*. U monografiji se po definiciji ovo ulje dobija postupkom hidrodestilacije svežih ili osušenih stabljika u cvetu, i predstavlja bezbojnu, svetlo žutu ili braonkasto-žutu tečnost vrlo karakterističnog mirisa. Pored ove, još nekoliko droga roda *Salvia* prisutno je u 9. Evropskoj farmakopeji, a to su: *Salviae officinalis folium*, *Salviae trilobae folium*, *Salviae milthiorrhizae radix et rhizoma*, kao i *Salviae tinctura* (Ph. Eur. 9,0, 2017).

## 1.1. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Polazeći od korišćenja u tradicionalnoj medicini, ovom doktorskom disertacijom bi se naučno potvrdila farmakološka efikasnost biljne vrste *Salvia sclarea* L., muskatne žalfije, čija lekovitost do sada nije u potpunosti istražena, i time pružio njen potencijalni doprinos

savremenoj fitoterapiji. Cilj istraživanja je bio definisati hemijski sastav i ispitati potencijalne farmakološke efekte ekstrakata nadzemnog dela *S. sclarea* koji su dobijeni različitim rastvaračima i ekstrakcionim tehnikama. Specifični ciljevi disertacije su bili:

- morfološko-anatomska karakterizacija nadzemnih organa biljke,
- ekstrakcija biljnog materijala,
- određivanje ukupnih fenola, tanina, flavonoida i derivata hidroksicimene kiseline u ekstraktima,
- hemijska karakterizacija ekstrakata tečnom hromatografijom visokih performansi (HPLC),
- određivanje antioksidativnog potencijala ekstrakata u dva test Sistema,
- određivanje antimikrobne aktivnosti ekstrakata,
- ispitivanje antiinflamatornog efekta ekstrakta na eksperimentalno-indukovanoj parodontopatiji pacova,
- ispitivanje uticaja ekstrakata na spontane kontrakcije glatke muskulature ileuma pacova,
- ispitivanje uticaja ekstrakata na acetilholinom i kalijum-hloridom stimulisane kontrakcije ileuma pacova,
- ispitivanje uticaja ekstrakata na kontrakcije ileuma stimulisane barijum-hloridom, kalcijum-hloridom i histaminom,
- ispitivanje uticaja kontraktilnost muskulature ileuma pacova u uslovima primene ekstrakata i blokatora azot-oksida sinteze, N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estra (L-NAME),
- ispitivanje uticaja ekstrakata na karbokolom i kalijum-hloridom stimulisane kontrakcije traheje pacova,
- procena uticaja različitih ekstrakcionih tehnika i rastvarača na hemijski sastav i ispoljavanje odabranih farmakoloških aktivnosti i
- ispitivanje razlika u hemijskom sastavu i ispoljavanju odabranih farmakoloških aktivnosti između ekstrakata čiji su biljni materijali sakupljeni u četiri uzastopne godine (2011-2014) uz procenu uticaja klimatskih faktora.

## 2. OPŠTI DEO

### 2.1. FAMILIJA LAMIACEAE LINDL.

Familija Lamiaceae (usnatice) obuhvata jednogodišnje i višegodišnje zeljaste biljne vrste, polužbunaste, a ponekad i žbunaste biljke. Usnatice su klasifikovane prema Erdtmanu (1945) u dve potfamilije: Lamioideae i Nepetoideae, dok su Harley i saradnici (2004) familiju podelili u sedam potfamilija: Ajugoideae Kostel., Lamioideae Harley, Nepetoideae (Dumort.) Luerss., Prostantheroideae Luerss., Scutellarioideae (Dumort.) Caruel, Symphorematoideae Briq. i Viticoideae Briq. Jedna od njihovih glavnih morfoloških karakteristika je četvorouglasta stabljika. Listovi su naspramno raspoređeni i obično su nedeljeni. Cvetovi su dvopolni, pri čemu se cvetni omotač sastoji iz 5 sraslih čašičnih i 5 kruničnih listića. Krunica je cevasta, dvousnata, simpetalna i zigomorfna. Cvetove oprašuju insekti, pa je zato krunica kod njih najčešće obojena upadljivim bojama. Andreceum čine dva ili četiri prašnika (dva duža i dva kraća) dok je gineceum sinkarpan i čine ga dva oplodna listića. Plod je merikarpijum koji se raspada na četiri orašice. Etarska ulja, odgovorna za aromu ovih biljnih vrsta, lokalizovana su egzogeno, u žlezdanim trihomima nadzemnih organa (Jančić, 2002; Randelović, 2008). Pored žlezdanih trihoma na površini se mogu sresti i nežlezdani, mehanički trihomi sa ulogom da štite biljne organe od smrzavanja, isušivanja, solarne radijacije ili od herbivornih insekata (Al Sheef, 2015; Mauricio i Rauscher, 1997; Werker, 2000).

Familiji Lamiaceae pripada oko 250 rodova i preko 7000 biljnih vrsta, što je čini jednom od najbrojnijih i najznačajnijih familija biljaka (Thorne, 1992). Biljne vrste ove familije odlikuju se, pre svega, prisustvom etarskog ulja u različitim biljnim organima, kao i prisustvom monoterpena, diterpena, fenolnih jedinjenja, iridoida i flavonoida, koji predstavljaju njihove sekundarne metabolite. Značaj ovih biljnih vrsta ogleda se u tome što su se mnoge od njih od davnina koristile u terapijske svrhe, ali su takođe poznate i kao začinsko bilje i kao važne sirovine u kozmetičkoj industriji. Zbog svoje lepote, veliki broj njih se uzgaja i kao ukrasno bilje. Najbrojniji rod u okviru ove familije je rod *Salvia* L. (900-1000), potom *Scutellaria* L. (360), *Coleus* Lour. (325), *Plectranthus* L'Her (300), *Hyptis* Jacq. (280), *Teucrium* L. (250), *Thymus* L. (220) i *Nepeta* L. (200). U flori Srbije zastupljeno je 30 rodova usnatice sa 147 biljnih vrsta (Jančić, 2002; Naghibi i sar., 2005; Randelović 2008; Venkateshappa i Sreenath; 2013; Walker, 2004).

### 2.1.1. Rod *Salvia* L.

Rodu *Salvia* L. pripada 900-1000 biljnih vrsta, rasprostranjenih širom sveta od Dalekog istoka, preko Evrope, pa sve do južnih predela Afrike. Posebno su zastupljene u tropskim i subtropskim oblastima obe hemisfere, a mnoge od njih nastanjuju i oblast Sredozemlja. Ovaj rod pripada tribusu Mentheae u okviru familije Lamiaceae, ali se od ostalih predstavnika razlikuje po strukturi prašnika. Dok većina ostalih vrsta poseduje četiri prašnika, žalfije sadrže dva, pri čemu svaki ima dve poluantere (thecae), koje su razdvojene izduženom spojnicom, konektivom. Prva klasifikacija *Salvia* vrsta predstavljena je 1848. godine kada je Bentham izvršio podelu na dvanaest sekcija. Tridesetak godina kasnije (1876) ova klasifikacija je modifikovana, pa je organizacija roda bila sledeća: podrod *Salvia* L., podrod *Sclarea* (Moench) Benth., podrod *Calosphace* (Benth.) Raf. i podrod *Leonia* (Llav & Lex.) Benth. Naziv *Salvia* potiče od latinskog glagola „*salvare*“, što znači spasiti, a ako se imaju u vidu brojni dokazi o upotrebi biljnih vrsta ovog roda još od davnina u različite lekovite svrhe kao što su: lečenje različitih infekcija, uključujući i dizenteriju, zaustavljanje krvarenja, lečenje neplodnosti žena, poboljšanje opšteg stanja organizma, pa čak i u pružanju pomoći kod zmijskih ujeda, onda se može reći da je ovaj naziv s punim pravom nastao. U anglosaksonskoj literaturi koristi se naziv Sage, a kod nas su *Salvia* vrste, najpoznatije kao različite vrste žalfija (Diklić, 1974; Kintzios, 2000; Marin i sar., 1996; Venkateshappa i Sreenath, 2013; Walker, 2004).

U flori Srbije zastupljeno je četrnaest vrsta roda *Salvia* (Diklić, 1974). Od 2005. godine kao novi takson uvršćena je i petnaesta, *S. verbenaca* (Zlatković i sar., 2005). Ove biljne vrste su jednogodišnje ili višegodišnje, zeljaste, polužbunaste, žbunaste i aromatične zbog prisustva etarskog ulja. Listovi su jajasti, srcasti ili kopljasti i mogu biti nedeljeni ili perasto deljeni, testerasto nazubljeni ili nenazubljeni, prizemni često sakupljeni u rozetu, sa mrežastom nervaturom. Priperci su većinom jasno diferencirani, jajasti i različito obojeni. Cvetovi su često vrlo veliki, većinom sa dobro razvijenom drškom, složeni po dva ili više u prividne pršljenove, svi zajedno grupisani u proste ili razgranate, guste ili isprekidane prividne klasove ili grozdove. Kod većine vrsta se pored njih sreću i manji, ženski cvetovi. Čašica je zvonasta ili cevasta i dvousnata. Gornja usna je sa tri zupca ili je cela, a donja je dvozuba ili dvorežnjevita. Krunica je takođe dvousnata, na vrhu proširena i sa kruničnom cevi različitog oblika. Gornja usna krunice je uspravna, uglavnom jako ispupčena, cela ili na vrhu usečena, dok je donja duža, proširena, trorežnjevita. Srednji režanj je dvorežnjevit i mnogo veći od bočnih. Prisutna su dva fertilna

prašnika. Unutrašnji prašnici se razvijaju kao staminodije ili se ne razvijaju, a prednji su većinom sa vrlo izduženim končastim konektivom koji je člankovito, pokretno ili nepokretno vezan za prašnički konac. Od dva kraka konektiva jedan je duži, prav naviše sa prašnicom na vrhu, dok je kraći kašikasto proširen, okrenut naniže. Polenova zrnca su eliptična i poseduju šest uzdužnih nabora. Stubić je vrlo dugačak sa jednakim ili nejednakim granama žiga. Plodići su jajasto - trouglasti do četvorouglasti, glatki (Diklić, 1974).

### 2.1.2. *Salvia sclarea* L.

Sistematska pripadnost (Tatić i Blečić 1984; Moon i sar., 2008):

- Regnum (carstvo): Plantae
- Phylum (razdeo): Magnoliophyta
- Classis (klasa): Magnoliopsida
- Subclassis (potklasa): Asteridae
- Ordo (red): Lamiales
- Familia (familija): Lamiaceae Lindl.
- Subfamilia (potfamilija): Nepetoideae (Dumort.) Luerss.
- Tribus (pleme): Mentheae Dumort.
- Subtribus (potpleme): Salviinae Endl.
- Genus (rod): *Salvia* L.
- Species (vrsta): *Salvia sclarea* L.; homotipski sinonimi: *S. vulgaris* Mill., *Aethiopsis sclarea* (L.) Opiz.; heterotipski sinonimi: *S. haematodes* Scop., *S. coarctata* Vahl, *S. simsiana* Schult., *S. calostachya* Gand., *S. sclarea* var. *calostachya* (Gand.) Nyman, *S. turkestanica* Noter, *S. sclarea* var. *turkestaniana* Mottet, *S. lucana* Cavara & Grande, *S. pamirica* Gand., *S. altilabrosa* Pan ([https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name\\_id=183819](https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name_id=183819))

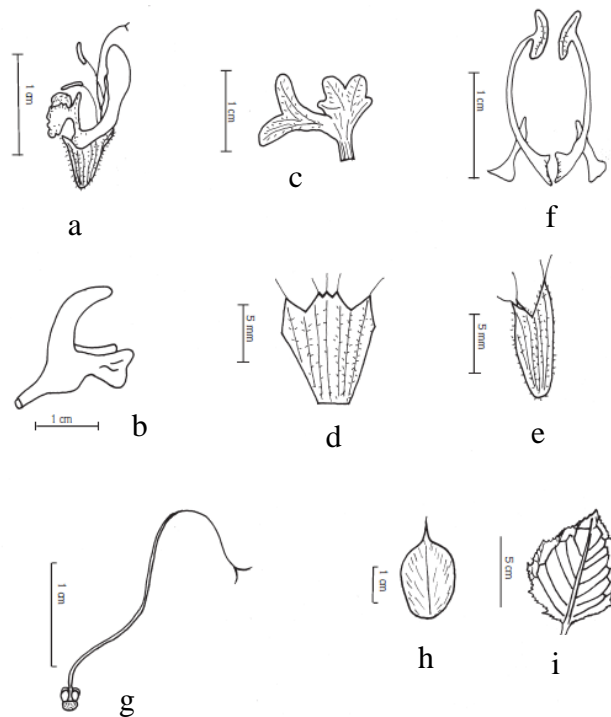
*Salvia sclarea*, muskatna žalfija ili mečje uvo (Slika 2.1.1 – 2.1.6), višegodišnja je, retko dvogodišnja, biljka mirisa na balzam. Raste na sušnim, toplim, često kamenitim obroncima, u vinogradima i pored puteva. Javlja se u termofilnoj šumi grabića – *Carpinetum orientalis serbicum*. Rasprostranjena je u sredozemnoj oblasti, od Transkavkazije, Irana, Sirije pa do južne Francuske i severne Afrike. U Evropi se javlja u mediteranskom i submediteranskom području.



U Srbiji je rasprostranjena u istočnom i jugoistočnom delu i Kosovu i Metohiji. U ostalim regionima zemlje gaji se kao ukrasna biljna vrsta (Diklić, 1974; Sarić, 1989). Glavni koren dugačak je 15-70 cm, prekriven bledobraon korom. Stabljika je uspravna, četvorouglasta, visine 20-120 cm sa kratim bočnim sterilnim izdancima u pazuhu listova, a u predelu cvasti je metličasto razgranata. Vršni delovi stabljike obrasli su žlezdanim dlakama, u kojima se nalazi etarsko ulje, dok su niži delovi stabljike ogoljeni ili takođe obrasli žlezdanim dlakama, koje čitavoj stabljici daju sivobelu boju (Slika 2.1.6). Listovi su prve godine u prizemnoj rozeti, a sledeće najvećim delom raspoređeni duž stabljike u tri do pet parova. Prosti su, široko-ovalni ili ovalno-izduženi, po obodu nazubljeni, na vrhu kratko zašiljeni ili tupi, a pri osnovi srcasto usečeni. Postavljeni su naspramno na lisnim drškama dužine 3-9 cm. Nervatura je mrežasta, sa jasno uočljivim glavnim nervom. Lice i naličje lista obrasli su žlezdanim narandžastim, i mehaničkim dlakama (Slika 2.1.5). Priperci su sedeći, jajasto-srcasti sa šiljatim vrhom pri čemu su donji zeljasti, nenazbuljeni, mnogo duži od cvetova, a gornji opnasti, dugački kao cvetovi, crvene do purpurne boje, pokriveni dlakama duž oboda ili na naličju duž nerava, kao i sa narandžastim žlezdama. Cvetovi, 2-2,5 cm, se nalaze na cvetnim drškama dužine 2-3 mm pokrivenim dlakama. Po četiri do šest cvetova je složeno u prividne pršljenove, postavljene u vršnom delu stabljike gradeći gust ili rastresit, 40 cm dugačak, prividno metličasto razgaranat grozd. Čašica i krunica su dvousnate. Čašica, 10-12 mm, je obrasla mehaničkim i žlezdanim dlakama, zvonasta, sa pet istaknutih i osam slabije izraženih nerava. Gornja usna čašice ima jedan srednji, mali, šiljati zubac i dva lancetasta bočna. Donja usna ima dva slična zupca odvojena urezom. Krunica je veličine 20-30 mm, lila, ružičaste ili beličaste boje. Gornja usna je ljubičasta, srpasta, na vrhu malo usečena, a donja krem boje, proširena, trorežnjevita pri čemu je srednji režanj na vrhu proširen, nazubljen i široko obrnuto jajast. Krunična cev je prava, malo duža od čašice. Prašnički konci su dugi oko 2 mm, a prašnice su ljubičaste. Stubić je ljubičast i duži je od krunice (Slika 2.1.4). Plod je orašica (2 mm), jajasto-trouglasta, kestenjaste boje ili tamno pegava (Diklić, 1974; Ozdemir i Senel, 1999).



**Slika 2.1.1.** *Salvia sclarea* L., šematski prikaz (Ozdemir i Senel, 1999)

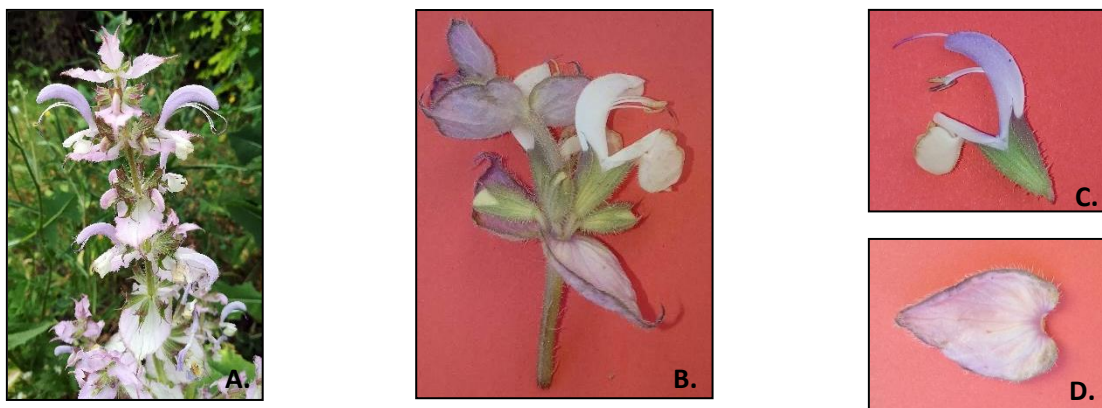


**Slika 2.1.2.** *Salvia sclarea* L., šematski prikaz cveta i lista (Ozdemir i Senel, 1999)

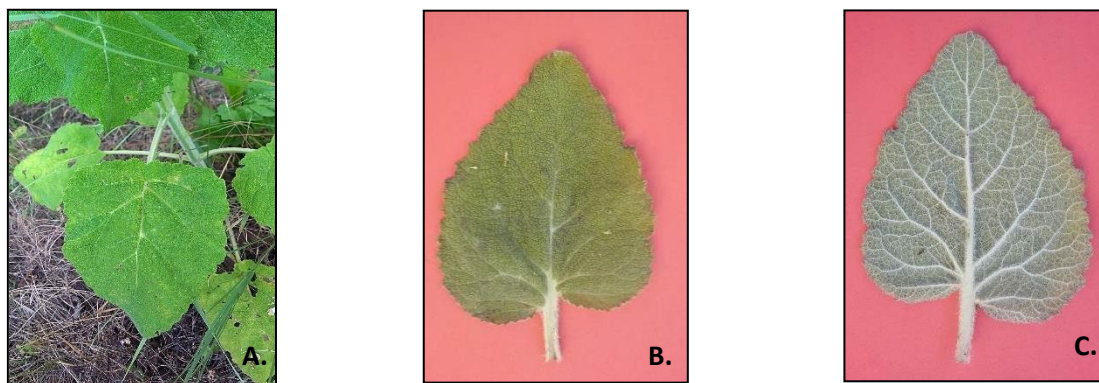
- a) bočni izgled cveta;
- b), c) krunica;
- d), e) čašica
- f) prašnici;
- g) tučak;
- h) brakteja;
- i) list



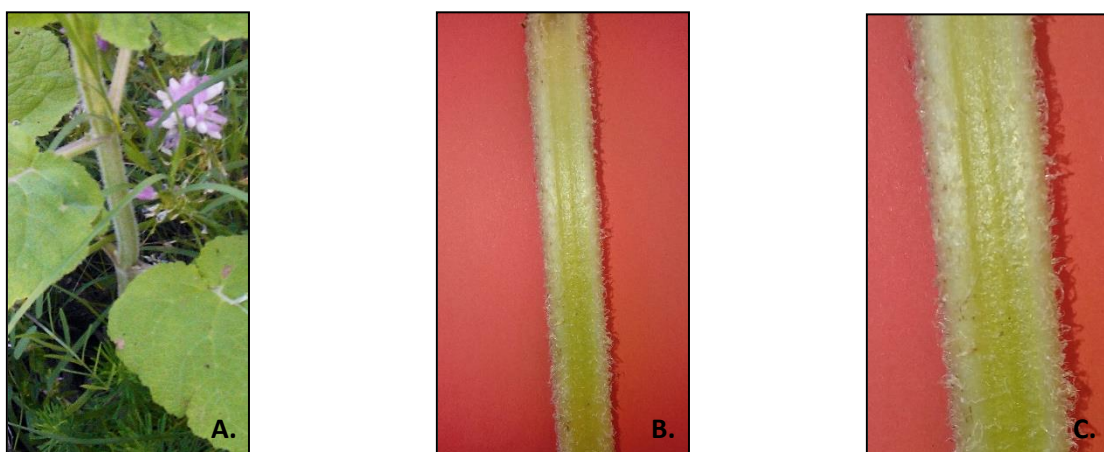
**Slika 2.1.3.** *Salvia sclarea* L., opšti izgled biljke (A, B, C)



Slika 2.1.4. *Salvia sclarea* L. A – cvast, B – cvetovi sa braktejama, C – cvetni omotač,  
D – brakteja

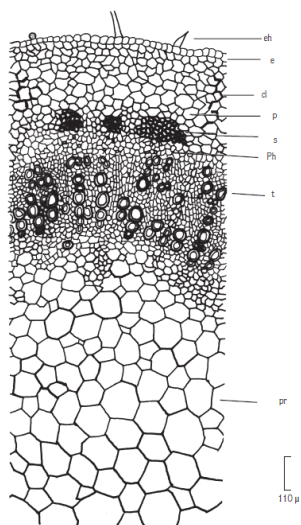


Slika 2.1.5. *Salvia sclarea* L. list; A i B – lice, C – naličje



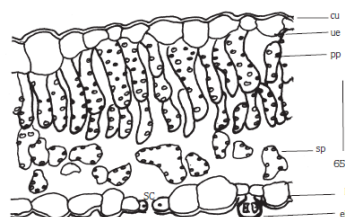
Slika 2.1.6. *Salvia sclarea* L. stablo (A, B i C)

Ozdemir i Senel (1999) su predstavili i šematski prikaz poprečnog preseka kroz list i stablo muskatne žalfije iz Turske (Slika 2.1.7. i Slika 2.1.8). Epidermis stabla je jednoslojan, sa ovalnim ćelijama i žlezdastim i nežlezdastim trihomima. Ispod epidermisa se nalazi kolenhim, izgrađen od 3-5 slojeva ćelija, koji je naročito nakupljen u uglovima stabla. Koru čini 5 slojeva parenhimskih ćelija, a iznad elemenata floema prostire se venac sklerenhimskih ćelija. Srž stabla je velika i čine je krupne parenhimske ćelije. Epidermis lica i naličja lista je jednoslojan, izgrađen od ćelija nepravilnog oblika, sa izraženom kutikulom i prisutnim nežlezdanim i žlezdanim trihomima. Palisad čine parenhimske ćelije, raspoređene u vidu u 2-3 sloja ka licu lista, ispod kojeg je sunderasti parenhim. Stome su dijacitne.



**Slika 2.1.7.** Poprečni presek stabljike *Salvia sclarea* L. (Ozdemir i Senel, 1999)

eh-mehanički trihom  
 e-jednoslojni epidermis  
 cl-kolenhim  
 p-parenhim  
 s-grupa sklereida  
 ph-floem  
 t-traheja  
 pr-srž



**Slika 2.1.8.** Poprečni presek lista *Salvia sclarea* L. (Ozdemir i Senel, 1999)

cu-kutikula  
 ue-epidermis lica  
 pp-palisadno tkivo  
 sp-sunderasti parenhim  
 le-epidermis naličja  
 gh-peltatni trihom  
 sc-stoma

## 2.2. *Salvia sclarea* L. U TRADICIONALNOJ MEDICINI

Lekovitost muskatne žalfije bila je poznata mnogim narodima od davnina. Smatra se da se najpre koristila u Nemačkoj kao dodatak zovi od kojih se spravljao infuz koji se zatim dodavao vinu i potom dobijalo takozvano Muskatel vino. Stari Jamajčani su smatrali da je *S. sclarea* izuzetna za lečenje ulceracija na koži i inflamacije oka. Takođe su dekokt od lista, kuvan u kokosovom ulju, smatrali delotvornim kod ujeda škorpije. Danas se koristi najčešće u suvom ili svežem obliku kao stomahik kod digestivnih tegoba zahvaljujući spazmolitičkom efektu i izrazito aromatičnim osobinama. Takođe, poznata je u tretmanu nekih bubrežnih bolesti, kao antiperspirant i antikataralno sredstvo. Seme (plod) ove žalfije sadrži značajnu količinu sluzi zbog kojih je našla svoju primenu u ublažavanju oftalmoloških tegoba zajedno sa sokom sveže biljke. Neki podaci upućuju da se ova sluz koristila i kod nekih tumora. Hladni ekstrakt muskatne žalfije može biti od pomoći u smirivanju inflamacije nakon vađenja trna ili sličnih stranih tela. Od listova se tradicionalno priprema mast koja se koristila za lečenje čireva i fleka na koži, a sprášeni ili zdrobljeni koren koristio se ušmrkavanjem za umirenje glavobolje. U Španiji se koristi kao deo polikomponentnih preparata u tretmanu ginekoloških poremećaja zbog ispoljavanja estrogenske aktivnosti, naročito za regulisanje premenstralnog sindroma u dismenoreji ili amenoreji (Dweck, 2000; Peana i Moretti, 2002). U Italiji se listovi i cvetovi u obliku infuza upotrebljavaju za pospešivanje diureze, kao emenagoga, hipoglikemijska i hemostatična sredstva. Takođe postoje podaci da se na ovom području koristi u obliku sredstva za ispiranje usne duplje u tretmanu gingivitisa, stomatitisa i afti, i kao dijaforetik (Leporatti i sar., 1985; Guarrera, 2005). U Sardiniji se dekokt muskatne žalfije davao rekonvalescentima kao tonično sredstvo i kod ublažavanja stresa, astenije, neurastenije i histerije. Za lečenje upale grla koristili su se listovi koji su potapani u vrelo maslinovo ulje kojim se potom natapala obloga koja se postavljala na vrat uz blago masiranje (Peano i Moretti, 2002). Na prostoru zemalja bivšeg Sovjetskog Saveza, infuz *S. sclarea* se još koristi i u terapiji akutnog reumatizma i poliartritisa (Lawrence, 1994). U Turskoj je poznata kao sastojak "čaja mošusne žalfije", dok se listovi i cvetovi upotrebljavaju kod digestivnih tegoba i kašlja (Karaman i Kocabas, 2001; Yalcin i sar., 2011). U Iranu nalazi primenu kod prehlada, bolnih menstruacija i dismenoreje (Bahmani i sar., 2015; Parsaei i sar., 2016). U Grčkoj se *S. sclarea*, "agiannitis", koristi kao diuretik, kod ublažavanja kašlja, prehlade, za lečenje rana i bolnog oka (Koutsaviti i sar., 2016). U Epirusu, delu Grčke, se tradicionalno koristila i za čišćenje krvi (Vokou i sar., 1993). U Urugvaju se



koristi kao hipotenziv, antidepresiv, sedativ i antiseptik (Dellavalle i sar., 2011). U Tadžikistanu se muskatna žalfija koristi kao narodni lek kod palpitacija, lošeg varenja i apetita, kod prehlada i bolova u grlu, kao diuretik i tonik. Infuz od nadzemnih delova se priprema kod groznice i problema u radu bubrega. Za eksternu primenu biljka se koristi kao emolijens. Plodovi muskatne žalfije se u ovim krajevima koriste u lečenju dizenterije i krvave stolice (Sharopov i sar., 2015). U Uzbekistanu i Kirgistanu se vršni delovi koriste kod groznice, čira na želucu, glavobolje, epilepsije, lošeg varenja i kao antispetično sredstvo. Takođe, muskatna žalfija u ovim krajevima nalazi primenu kod oboljenja bešike, poliartritisa, osteomijelitisa, artroze i trofičkog ulkusa. List se koristi kao spazmolitično i antiinflamatorno sredstvo, za spremanje dekokta za ispiranje kod infekcija ždrebla, periostitisa i tretman purulentnih rana i furunkula. Dekokt lista i cvetova se još koristi i kod tahikardije i astenije (Eisenman i sar., 2012).

*Salviae sclareae herba* se prema uputstvima *Hagerovog priručnika* (1994) *per os* koristi kod digestivnih i menstrualnih tegoba, opšteg stanja slabosti, katara, glavobolje, grčeva i bubrežnih tegoba, a topikalno kod upalnih rana. U obliku dekokta (50 g droge i 1 l vode) se priprema za lečenje gingivitisa i drugih upalnih procesa u usnoj duplji, i čišćenje rana, kuvanjem 1-2 minuta. U kombinaciji sa sirćetom i medom se preporučuje kod gnojnih infekcija noktiju. Za *per os* primenu koristi se 4-5 kašika droge koja se kuva sa 0,5 l vode nekoliko minuta. U Grčkoj se kao emenagog koristi kuvanjem u vinu. Kod kamena u bubregu preporučuju se sveži listovi (Hansel i sar., 1994).

Etarsko ulje ove biljne vrste, *Salviae sclareae aetheroelum*, nalazi značajno mesto u aromaterapiji. Najčešće se dobija hidroddestilacijom iz osušenih zeljastih nadzemnih delova u cvetu (*Salviae sclareae herba*) (Jančić i sar., 1995). Preko talamusa, ovo ulje smanjuje osećaj straha i deluje anksiolitički ublažavajući paranoju i deluziju. Takođe, može biti od velike pomoći kod problema depresije, konvulzija i nesаницe (Dweck, 2000; Imanshahidi i Hosseinzadeh, 2006). Etarsko ulje je zatim poznato i kao sredstvo sa izuzetnim antiinflamatornim, antiseptičnim, spazmolitičkim, adstringentnim, karminativnim i dezodorirajućim efektima. Zbog ovih karakteristika ulje nalazi primenu u kozmetici kao sredstvo za negu i održavanje lične higijene normalne, suve i zrele kože, i protiv celulita. Pomaže u kontroli proizvodnje sebuma, pa se koristi i za negu masne kože i kože sklone aknama (Ali i sar., 2015; Dweck, 2000). Za etarsko ulje se u literaturi navodi da reguliše menstrualni ciklus, olakšava napetost i grčeve u materici, i da ima afrodizijačka svojstva (Ali i sar., 2015). Zbog izrazite balzamaste arome etarsko ulje

muskatne žalfije se koristi u prehrambenoj industriji, proizvodnji parfema i za aromatizaciju duvana. Za ovakav istaknuti miris odgovoran je diterpen sklareol. Konverzijom sklareola u sklareolid dobija se odlična zamena za prirodni ambergris koji se široko koristi u parfemskoj industriji (Dweck, 2000).

### 2.3. POLIFENOLI

Fenoli su jedinjenja koja u svojoj osnovi imaju najmanje jedan aromatični prsten supstituisan sa najmanje jednom hidroksilnom grupom. Polifenoli su jedinjenja koja imaju više od jedne fenolne hidroksilne grupe vezane za jedan ili više benzenskih prstena (Vermerris i Nicholson, 2008). Oni su široko rasprostranjeni u biljnom svetu i predstavljaju najzastupljenije sekundarne metabolite sa preko 8000 fenolnih struktura, od jednostavnih molekula kao što su fenolne kiseline do visoko polimerizovanih jedinjenja kao što su tanini. Oni su sveprisutni u svim biljnim organima i zbog toga su sastavni deo ljudske ishrane (Dai i Mumper, 2010). Smatra se da je prosečni dnevni unos polifenola ishranom oko 1 g na dan (Scalbert i sar., 2002). Kao bitni sastojci biljnih namirnica voća, povrća, žitarica, i napitaka (čaj, kafa, vino, itd.), delimično su odgovorni za njihova ukupna organoleptička svojstva. Na primer, fenoli doprinose gorčini i oporosti voća i voćnih sokova zbog interakcije između fenola, uglavnom procijanidina, i glikoproteina iz pljuvačke. Takođe su odgovorni za boju biljnih tkiva i organa pa su tako antocijani, jedna od podgrupa flavonoida, odgovorni za crvenu, plavu ili ljubičastih boju. Biljni fenoli su uključeni u odbranu od ultraljubičastog zračenja ili napada raznih patogena i predatora (Dai i Mumper, 2010).

Fenoli u biljnom organizmu mogu nastati na dva načina. Najčešći put biosinteze odvija se preko šikimske kiseline (šikimski put) kada se od monosaharida formiraju aromatične aminokiseline (fenilalanin i tirozin), a zatim deaminacijom do cimetne kiseline i brojnih derivata (benzoeva kiselina, acetofenoni, lignani, lignin i kumarini). Drugi put biosinteze je acetogeninski-poliketidni put. On započinje acetatom do poli- $\beta$ -ketoestara (poliketida) čijom ciklizacijom nastaju policiklična jedinjenja kao što su hromoni, izokumarini, orcinoli, depsidi, depsidoni, ksantoni i hinoni. Veoma često fenoli imaju dualno biosintetsko poreklo što znači da nastaju kombinacijom šikimskog i acetanog puta (flavonoidi, stilbeni, pironi i ksantoni). Neki fenolni molekuli nastaju kombinacijom šikimskog i trećeg, mevalonskog, puta (furano- i piranokumarini) ili kombinacijom acetatnog i mevalonskog puta (kanabinoidi). Vrlo retko sva tri

puta biosinteze mogu biti uključena kao što je slučaj kod rotenoida (Bruneton, 1999). Podela biljnih fenola prema hemijskoj strukturi prikazana je u Tabeli 2.3.1. (Atkinson, 2018; Edwards, 2014; Giada, 2013; Kovačević, 2002; Vermerris i Nicholson, 2008).

Danas, polifenoli dobijaju na posebnom značaju zbog svojih mogućih uloga u prevenciji različitih degenerativnih bolesti kao što su kanceri, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti. Ova uloga se zasniva na brojnim eksperimentalnim studijama na životinjama kao i kliničkim i epidemiološkim. Stavovi o značajnim farmakološkim efektima polifenola su učvršćeni definisanjem mogućih mehanizama delovanja. Ovi mehanizmi mogu biti opšti ili specifični za određeno fenolno jedinjenje:

- ✓ Svi polifenoli su redukcionim agensima. Kao takvi, mogu uklanjati slobodne radikale, učestvovati u regeneraciji drugih antioksidanata, kao što je npr. vitamin E, i zaštititi ćelije od oksidativnog oštećenja. Njihove hemijske strukture utiču na njihov redoks potencijal. Naime, polifenoli sa dve vicinalne hidroksilne grupe na aromatičnom ostatku su potentniji čistači slobodnih radikala od polifenola sa jednom hidroksilnom grupom po aromatičnom ostatku. Međutim, jačina ovih razlika je znatno manja od razlike u apsorpciji u crevima, pa je stoga neophodno proceniti biološku raspoloživost različitih polifenola radi objašnjenja njihovih farmakoloških efekata (Scalbert i sar., 2002) (Slika 2.3.1).
- ✓ Neki polifenoli ispoljavaju i specifične efekte. Na primer izoflavoni, fitoestrogeni, su dokumentovano povezani sa smanjenjem rizika od hormon-zavisnih bolesti. Biološke aktivnosti fenolnih jedinjenja se često ispituju na kulturama ćelija ili izolovanim tkivima u formi u kojoj su prisutni u hrani i biljkama. Međutim, polifenoli se ekstenzivno metabolišu nakon *per os* primene, kako u "tkivu" tako i mikroflori kolona (Slika 2.3.1), pa je važno identifikovati takođe i metabolite polifenola i ispitati njihovu biološku aktivnost (Scalbert i sar., 2002).

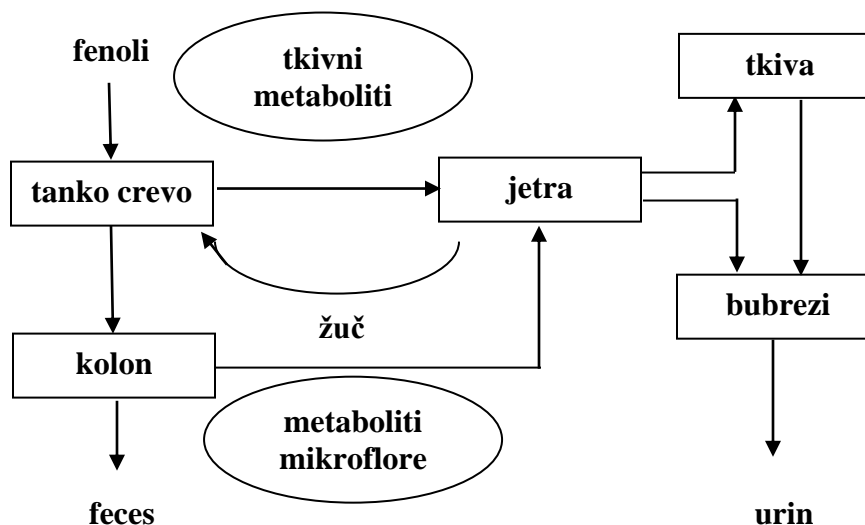


**Tabela 2.3.1.** Klase fenola zastupljene u biljnom svetu (Atkinson, 2018; Edwards, 2014; Giada, 2013; Kovačević, 2002; Vermerris i Nicholson, 2008)

STRUKTURA	KLASA	PRIMER
C <sub>6</sub>	prosti fenoli	katehol, floroglucinol, rezorcinol
C <sub>6</sub>	benzohinoni	hidrohinon
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	benzoeve kiseline	galna, siringinska, <i>p</i> -hidroksibenzoeva, vanilinska, protokatehinska kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acetofenoni	2-hidroksiacetofenon
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	fenilsirćetne kiseline	2-hidroksifenilsirćetna kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	hidroksicimetne kiseline	<i>p</i> -kumarinska, ferulinska, sinapinska, kafena, hlorogenska, ruzmarinska kiselina
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	kumarini, izokumarini	umbeliferon, eksuletin
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	fenilpropeni	eugenol, havikol, estragol
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	hromoni	kelin
C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	naftohinoni	juglon, plumbagin
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	ksantoni	gentizin
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	stilbeni	rezveratrol
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	antrahinoni	emodin, fiscion
<b>flavonoidi</b> C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	flavonoli	kvercetin, kempferol
	dihidroflavonoli	dihidrokvercetin, dihidrokempferol
	flavoni	apigenin, luteolin
	halkoni	izolikviricigenin, butein
	auroni	hispidol
	flavanoni	naringenin, eriodiktiol
	izoflavonoidi	daidzein, genistein, biokanin A
	antocijanidini	cijanidin, pelargonidin
	flavan-3-oli	katehin, afzelecin
	flavan-3,4-dioli	leukocijanidin, leukopelargonidin
<b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b> <b>dimeri ili oligomeri</b>	lignani i neolignani	podofilotoksin, pinorezinol
C <sub>18</sub>	betacijanini	betanidin, indikaksantin
C <sub>30</sub>	biflavonoidi	amentoflavon
<b>(C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)<sub>n</sub></b> <b>polimeri</b>	lignini	polimeri cimetil-, koniferil- i sinapilalkohola
<b>tanini</b> <b>oligomeri i polimeri</b>	kondenzovani (proantocijanidini)	procijanidin B-1, procijanidin B-2
	hidrolizirajući (galotanini, elagitanini)	pedunkulagin, eugenin
	mešoviti (katehinska jedinica)	akutisimin A

nastavak Tabele 2.3.1.

	vezana glikozidnom vezom za galotaninsku ili elagitaninsku jedinicu)	
<b>flobafeni polimeri</b>	>50 monomernih flavana	polimeri flavan-4-ola, najčešće apiferola i luteoferola



Slika 2.3.1. Put prolaska fenola i njihovi metaboliti kod čoveka (Scalbert i sar., 2002)

**Antioksidativna svojstva fenola** – Degenerativne bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti, karcinomi, osteoporozna i druge, u vezi su sa starenjem tako što se oksidativna oštećenja ćelijskih komponenti, molekula dezoksiribonukleinske kiseline (DNK), proteina i lipida akumuliraju sa godinama i doprinose degeneraciji somatskih ćelija i patogenezi bolesti. Antioksidansi mogu biti od pomoći direktnim delovanjem na reaktivne kiseonične vrste ili stimulacijom endogenih odbrambenih mehanizama. Fenolne grupe u polifenolima mogu prihvatiti elektron i formirati relativno stabilan fenoksil radikal, čime se zaustavljaju lančane reakcije oksidacije u ćeliji. Nakon *per os* unosa antioksidativnih jedinjenja povećava se i antioksidativni kapacitet plazme koji se može izmeriti *in vitro* metodama (ORAC (oxygen radical absorbance capacity) i FRAP (ferric reducing ability of plasma) ili hemiluminescijom. Povećanje antioksidativnog kapaciteta se objašnjava najpre prisustvom ovih jedinjenja i njihovih metabolita, ali i povećavanjem nivoa endogenih antioksidanasa ili uticajem na resorpciju prooksidativnih molekula, npr. gvožđa. U studiji na zdravim dobrovoljcima ispitivan je efekat katehina iz čaja (250 mg) na plazma koncentraciju lipida pri čemu je ustanovljeno da dolazi do signifikantnog sniženja fosfolipidnih peroksida. Slično, i nakon korišćenja soka crne ribizle i

jabuke nakon sedam dana u dozi od 1 l dnevno, došlo je do smanjenja plazma koncentracije malonil-dialdehida (MDA). Međutim, neke studije opovrgavaju stav o uticaju polifenola na smanjenje oksidacije lipida u plazmi. Naime, nakon osmonedeljne primene izoflavona u dozi od 55 mg nije primećen efekat na nivo i aktivnost F2-izoprostana, markera lipidne peroksidacije. Takođe, konzumacija 200 ml vina dnevno nakon deset dana nije dala značajne efekte na plazma koncentraciju MDA (Scalbert i sar., 2005).

**Uticaj polifenola na kardiovaskularni sistem (KVS)** – Dovoljan unos polifenolnih jedinjenja može značajno uticati na smanjenje morbiditeta i mortaliteta od kardio- i cerebrovaskularnih bolesti zbog antiinflamatornih i antiaterogenih svojstava kao što su antiagregacioni efekti, inhibicija peroksidacije DNK, zaštita LDL čestica (lipoproteina niske gustine) od oksidativnog oštećenja, poboljšanje funkcije HDL čestica (lipoproteina visoke gustine), i inhibicija ekspresije adhezionih endotelijalnih molekula. Pored ogromnog broja *in vitro* i studija na eksperimentalnim životinjama, blagotvorni efekti polifenola na kardiovaskularni sistem ispitani su u i nekoliko epidemioloških studija (Scalbert i sar., 2005). U meta-analizi 19 studija koje povezuju upotrebu vina sa koronarnim bolestima, zaključeno je da umerena konzumacija vina (300 ml) dnevno povezana sa nižim rizikom od infarkta miokarda koja se pripisuje polifenolima iz vina koji deluju antioksidantno, vazorelaksantno i antitrombocitno (de Gaetano i Rotondo, 2000). U Finskoj je u velikoj kohortnoj studiji pokazano da je redovan unos flavonoida u vezi sa smanjenim rizikom totalnog i koronarnog mortaliteta (Knekt i sar., 1996), što je potvrdila i studija Hertog i saradnika (1995). Unos katehina takođe je povezan sa smanjenim rizikom od koronarne smrti, ali ne i od moždanog udara (Arts i sar., 2001). U studiji Noad i saradnika (2016) zaključeno je da hrana bogata fenolima kao što je voće, povrće i crna čokolada, smanjuje nivo sistolnog krvnog pritiska i reguliše mikrocirkulaciju (Noad i sar., 2016). Značajno je spomenuti i to da su polifenolna jedinjenja u studijama pokazala i efekte na azot-monoksid, stimulišući njegovu endotelnu sekreciju, čime se objašnjava sniženje krvnog pritiska (Botden i sar., 2011). S druge strane, Woodward i Tunstall-Pedoe (1999) su studijom iz Škotske zaključili da nema značajne povezanosti polifenola sa kardiovaskularnom zaštitom, odnosno da konzumacija čaja, koji obiluje polifenolima, ne doprinosi značajno smanjenju rizika za KVS oboljenja (Woodward i Tunstall-Pedoe, 1999).

**Uticaj polifenola na maligna oboljenja** – U literaturi se mogu pronaći različiti mehanizmi antikancerogene aktivnosti polifenola. Neki od mehanizama su i ta da polifenolna

jedinjenja mogu delovati kao blokirajuća sredstva u fazi inicijacije. Ona utiču na metabolizam prokarcinogena modulirajući ekspresiju enzima citohroma P450 koji su uključeni u njihovu aktivaciju do kancerogena, a mogu i ubrzati njihovo izlučivanje povećavanjem ekspersije konjugujućih enzima II faze metabolizma (Scalbert i sar., 2005). Značajno je i što neki polifenoli sprečavaju stvaranje inicijalnih ćelija stimulisanjem reparacije DNK (Webster i sar., 1996). Ova jedinjenja mogu delovati kao supresivni agensi, i inhibirati formiranje i rast tumora (Agullo i sar., 1996). Takođe, inhibiraju onkogenu ekspresiju i aktivnost ornitin dekarboksilaze, ključnog enzima u sintezi poliamina koji utiču na proliferaciju ćelija (Gupta i sar., 1999; Lin i sar., 1997). Inhibicija ćelijske proliferacije može se postići i efektom na metabolizam arahidonske kiseline kada se redukuje aktivnost ciklooksigenaze-2 (Metz i sar., 2000). Polifenoli inhibiraju NF- $\kappa$ B (nuklearni faktora *kapaB*) aktivaciju, najverovatnije kroz aktiviranje redoks-senzitivnog signala ćelije (Scalbert i sar., 2005). Uz brojne *in vitro* studije na kancerskim linijama, i studija na animalnim modelima, sprovedena su i klinička i epidemiološka istraživanja. Intravenska primena kvercetina u dozi od 2000 mg/m<sup>2</sup> tokom tri nedelje je kod 51 pacijenta sa kancerom rezistentnim na terapiju smanjila značajno vrednosti nekih tumor markera (Ferry i sar., 1996). Jedna prospektivna studija je zaključila da polifenoli vina mogu zaštititi od štetnih efekata alkohola kod raka gornjih partija digestivnog trakta (Gronbaek i sar., 1998). Po rezultatima danske kohortne studije polifenoli vina smanjuju rizik od kancera pluća (Prescott i sar., 1999). Bosetti i saradnici (2000) su zaključili da prekomerna konzumacija vina, preko 3 čaše dnevno, čak povećava rizik od ezofagealnog kancera (Bosetti i sar., 2000). Unos flavonola je u više kohortnih studija bio značajno u vezi sa smanjenjem rizika od kancera pluća, prostate, želuca, rektuma i gornjih partija digestivnog sistema, iako je par studija opovrglo ove rezultate (Arts i Hollman, 2005; Scalbert i sar., 2005). Fitoestrogeni su se kroz nekoliko studija pokazali kao protektivna sredstva, naročito kod hormon-senzitivnih kancera, npr. izoflavoni soje (Messina i sar., 1994).

**Uticađ polifenola na *diabetes mellitus*** – Mnoge biljne vrste, bogate polifenolima, se tradicionalno koriste kao efikasni hipoglikemici. Na osnovu mnogih *in vitro*, eksperimenata na životinjskim modelima, i kliničkih studija biljni polifenoli mogu uticati na glikemiju kroz različite mehanizme, uključujući inhibiciju apsorpcije glukoze u crevima, ili njenog preuzimanja od strane perifernih tkiva, ili inhibicijom  $\alpha$ -amilaze, sukraze ili  $\alpha$ -glukozidaze u sluznici creva. Neka jedinjenja mogu da utiču i na smanjenje aktivnosti glukoznih transportera, npr. kvercetin, a neka da inhibiraju Na<sup>+</sup>-zavisno preuzimanje heksoza (kvercetin-3-*O*-glukozid, kafena i taninska

kiselina) (Scalbert i sar., 2005). Značajan mehanizam delovanja polifenolnih jedinjenja je i u tome što mogu da uspore glukoneogenezu, stimulišu oslobađanje insulina iz  $\beta$ -ostrvaca pankreasa i redukuju dislipidemiju i insulinsku rezistenciju. Od posebne važnosti je što polifenoli mogu da spreče glikozilaciju hemoglobina (HbA<sub>1c</sub>) i razvoj dugoročnih komplikacija dijabetesa kao što su kardiovaskularne bolesti, neuropatija, nefropatija i retinopatija (Bahadoran i sar., 2013; Scalbert i sar., 2005). Kliničke i epidemiološke studije vezane za uticaj ovih jedinjenja na regulisanje glikemije su nešto oskudnije, a neke čak i nisu pronašle značajnu vezu (Scalbert i sar., 2005). Uticaj polifenola na razvoj dijabetesa je dokazan, na primer, u epidemiološkoj studiji u kojoj je zaključeno da konzumiranje dekofeinizovane kafe, bogate hlorigenskom kiselinom, blagotvorno utiče na redukovanje postprandijalne glikemije, glikemije nakon gladovanja i intestinalne apsorpcije glukoze (Johnston i sar., 2003).

**Uticaj polifenola na neurodegenerativne bolesti** – U prevenciji neurodegenerativnih bolesti, u čijoj patogenezi leži oksidativni stres koji oštećuje moždano tkivo, značajnu ulogu mogu imati polifenoli. Primećeno je da su u nižim koncentracijama polifenoli protektivni, ali u višim mogu delovati pro-oksidativno i delovati neurotoksično (Scalbert i sar., 2005). U više eksperimentalnih studija na životinjama pokazani su efekti fenola na poboljšanje kognitivnih sposobnosti i neuronalne signalne transdukcije. Na primer, intravenska aplikacija epikatehina i katehina miševima poboljšala je oštećenja memorije indukovane cerebralnom ishemijom (Matsuoka i sar., 1995). Hronična administracija ferulinske kiseline miševima koji su intracerebralnom injekcijom dobijali *beta*-amiloid, koji je uključen u patogenezu Alchajmerove bolesti, značajno je smanjila štetne neurotoksične efekte (Yan i sar., 2001). *In vitro* studijama predloženi su neki od mehanizama delovanja kao npr. inhibicija NF- $\kappa$ B translokacije ili regeneracija protein kinaze C koji učestvuju u ćelijskoj proliferaciji i apoptozi (Levites i sar., 2002). U epidemiološkim, prospektivnim, studijama u Francuskoj, Danskoj, i Kanadi, je potvrđena veza između konzumacije vina i smanjenog rizika od demencije (Scalbert i sar., 2005). Takođe, u Francuskoj kohortnoj studiji je pokazana povezanost flavonola i flavona sa smanjenim rizikom od nastanka demencije (Commenges i sar., 2000).

### 2.3.1. Fenolne kiseline

Fenolne kiseline su organska jedinjenja sa najmanje jednom karboksilnom grupom i jednom fenolnom hidroksilnom grupom. U fitohemijskoj praksi se pod fenolnim kiselinama

podrazumevaju benzoeve i cimetine kiseline, međutim neki fitohemičari smatraju da su fenolne kiseline samo one koje imaju C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> jedinicu, a da cimetine kiseline pripadaju većoj grupi fenilpropanoida (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) (Bruneton, 1999).

**Fenolne kiseline C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>** – Ove kiseline su hidroksilovani derivati benzoeve kiseline. Mogu se naći u slobodnom stanju ili u obliku estara, depsida, glikozida i acetilovanih flavonoida. Najznačajniji predstavnik ove grupe jedinjenja je salicilna kiselina i njeni derivati. Galna kiselina i njen dimer su konstituenti hidrolizirajućih tanina. U biljkama se mogu naći i odgovarajući aldehidi kiselina kao npr. vanilin, anisaldehyd ili salicilaldehid (Bruneton, 1999; Kovačević, 2002).

**Fenolne kiseline C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>** – Ove fenolne kiseline su derivati cimetine kiseline. Najveći broj C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> kiselina je široko rasprostranjen u biljnom svetu kao npr. 4-kumarinska, kafena, ferulinska, i sinapinska kiselina. Veoma retko se nalaze u slobodnoj formi, a najčešće u esterifikovanom obliku kao estri alifatičnih alkohola (npr. mono- i dikafeoil tartarna, feruloiltartarna i kafeoiljabučna kiselina) i kao estri hina kiselina (npr. hlorogenska kiselina) i depsidi kiselina (ruzmarinska i litosperminska kiselina) (Bruneton, 1999).

Fenolne kiseline i njihovi glikozidi su lako rastvorni u rastvaračima polarne prirode i slabo alkalnim rastvorima. Derivati cimetine kiseline se lako izomerizuju u vodenoj sredini. Mnoge droge svoje farmakološko delovanje ispoljavaju upravo zahvaljujući fenolnim kiselinama. One mogu uticati na aktivnost nekih enzima kao na primer na lipidnu peroksidazu čijom inhibicijom ostvaruju efekat konzerviranja. Fenolne kiseline su odlična antiinflamatorna i antioksidantna sredstva. Najčešće se droge sa fenolnim kiselinama koriste kao hepatoprotektivna sredstva i kao holagozi i holeretici (Kovačević, 2002).

U biljnim vrstama roda žalfija veoma je zastupljena kafena kiselina i njeni derivati. Najznačajniji derivat kafene kiseline je ruzmarinska kiselina, a pored nje najčešće detektovane su i hlorogenska, ferulinska, litosperminska, junaneinska A-L i salvianolična kiselina A-K (Lu i Foo, 2002).

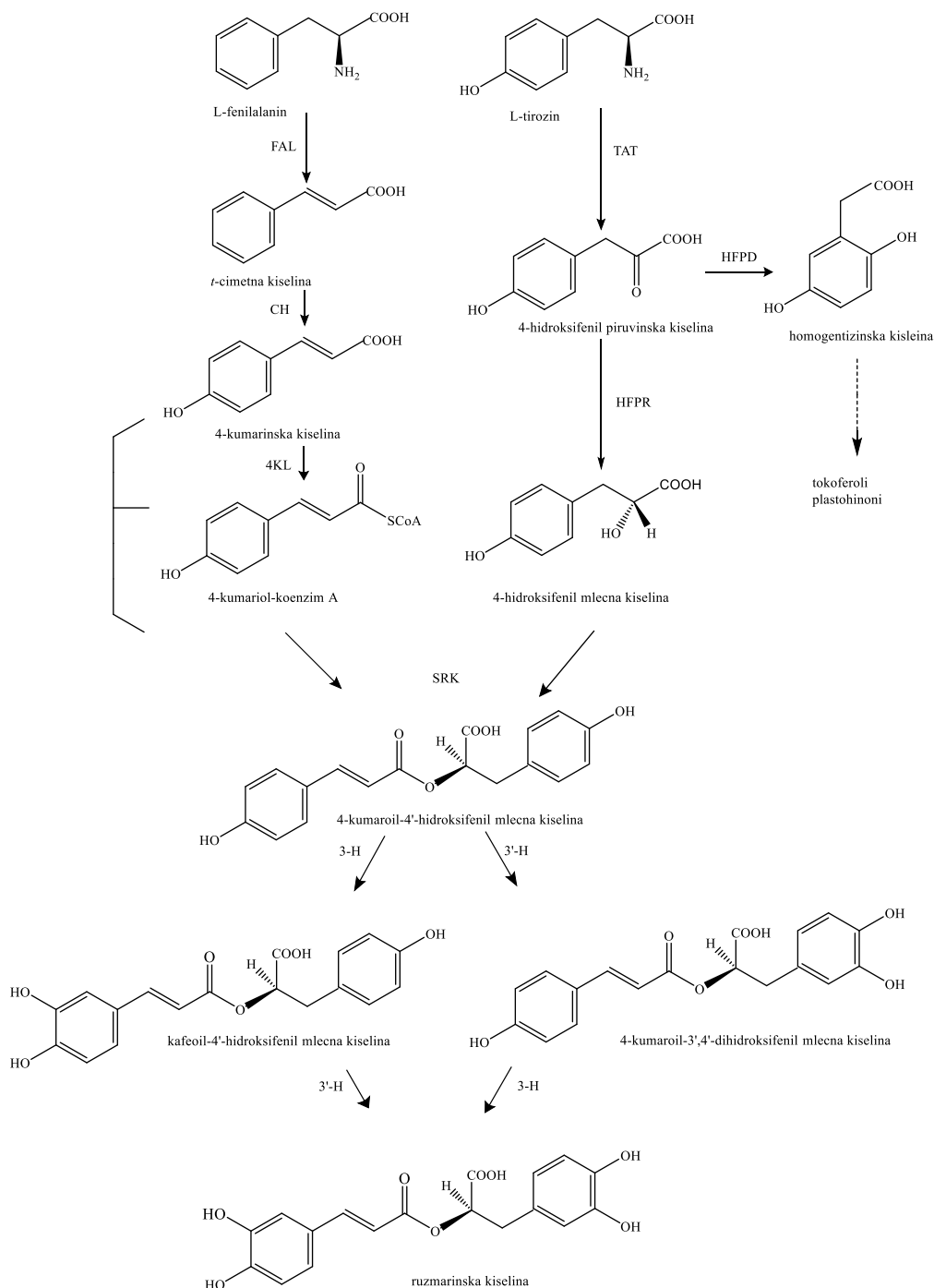
### **2.3.1.1. Ruzmarinska kiselina**

Ruzmarinska kiselina je najčešće zastupljena fenolna kiselina u vrstama *Salvia* roda. Ona je uglavnom rasprostranjena u vrstama familije Boraginaceae, i vrstama potfamilije Nepetoideae familije Lamiaceae. Pre nego što je njena struktura otkrivena, ruzmarinska kiselina je, kao i njoj

slična jedinjenja, bila poznata kao *Labiatergerbstoffe*, "tanin" koji je karakterističan za biljne vrste porodice Lamiaceae. Daljim istraživanjima je utvrđeno da ovo jedinjenje ne pripada ni jednoj grupi tanina, već da u njenoj osnovi leži kafena kiselina (Petersen i Simmonds, 2003). Nakon toga dva istraživača iz Italije, Scarpati i Oriente (1958), izoluju ružmarinsku kiselinu u čistom obliku, i nazivaju je po biljnoj vrsti odakle je izolovana, *Rosmarinus officinalis* L. (Scarpati i Oriente, 1958). Po hemijskoj strukturi ružmarinska kiselina zapravo predstavlja ester kafeine kiseline i 3,4-dihidroksi-fenilmlečne kiseline (Petersen, 2013). Praćenjem radioaktivnih aminokiselina u biljnim vstama roda *Mentha* L. u biogenetskim studijama dokazano je da su fenilalanin i tirozin ugrađeni u molekul ružmarinske kiseline (Ellis i Towers, 1970).

Biosinteza ružmarinske kiseline se odvija iz aminokiselinskih prekursora u prisustvu odgovarajućih enzima (Slika 2.3.2). Fenilalanin se pomoću enzima iz fenilpropanoidnog puta transformira u aktiviranu hidroksicimetnu kiselinu. Prvi korak predstavlja deaminaciju L-fenilalanina u *t*-cimetnu kiselinu pomoću fenilalanin amonijalaze (FAL). Nakon formiranja *t*-cimetne kiseline dolazi do reakcije hidroksilacije u položaju 4 do 4-kumarinske kiseline pod dejstvom enzima citohrom P450 monooksigenaze cinamat 4-hidroksilaze (CH). Generalno je prihvaćeno da se hidroksimetne kiseline dalje moraju aktivirati radi odvijanja narednih reakcija. Aktivacija se može odvijati na više načina, ali se najčešće odvija formiranjem koenzim A tioestra (4-kumaroil-koenzim A) pomoću hidroksicinamat koenzim A ligaze (4KL). Na ovom nivou susreću se produkti fenilalaninskog i tirozinskog puta biosinteze. Tirozin se najpre transaminacijom sa 2-oksoglutaratom prevodi u 4-hidroksifenil-piruvat i glutamat u prisustvu enzima piridoksal-fosfat zavisne transaminaze tirozin-amino-transferaze (TAT). Jedinjenje 4-hidroksifenil-piruvat, takođe, služi i kao prekursor za homogentizinsku kiselinu, a koja je prekursor za tokoferole i plastohinone. Dalje se 4-hidroksifenil-piruvat redukuje do odgovarajućeg 4-hidroksifenil-laktata preko hidroksifenil-piruvat reduktaze (HFPR). Nastali 4-hidroksifenil-laktat je R(+)-stereoizomer i to je jedini izomer koji može biti prihvaćen od enzima hidroksicinamoil-koenzim A:hidroksifenil-laktat hidroksicinamoil transferaze odnosno sintaze ružmarinske kiseline (SRK). Estarska veza između dva prekursora koja su dobijena različitim enzimskim reakcijama od tirozina i fenilalanina se formira između karboksilne grupe 4-kumarinske kiseline i alifatične hidroksilne grupe 4-hidroksifenil-laktata. Nastali ester 4-kumaroil-4'-hidroksifenil-laktat se zatim hidroksiliše u položajima 3 i 3' aromatičnog prstena

pomoću dve citohrom P450 monooksigenaze (3H i 3'H = hidroksicinamoil-hidroksifenil-laktat 3- 3'-hidroksilaze) kada se konačno formira ruzmarinska kiselina (Petersen i Simmonds, 2003).



**Slika 2.3.2. Biosinteza ruzmarinske kiseline**

FAL- fenilalanin amonijalaza; TAT - piridoksal-fosfat zavisne transaminaze tirozin-amino-transferaza; CH - cinamat 4-hidroksilaza; 4KL - hidroksicinamat koenzim A ligaza; HFPR – hidroksifenil-piruvat reduktaza; HFPD – hidroksifenil-piruvat dioksigenaza; SRK - sintaza ruzmarinske kiseline



Ruzmarinska kiselina se karakteriše brojnim farmakološkim efektima i to pre svega odličnim antioksidativnim, antibakterijskim, antivirusnim, antimutagenim, antiinflamatornim antitrombotičnim, antiagregacionim i renoprotektivnim. Antiinflamatorna aktivnost ruzmarinske kiseline se se zasniva na inhibiciji lipooksigenaze i ciklooksigenaze i uticaju na sistem komplementa (Lu i Foo, 2002; Petersen i Simmonds, 2003). Antioksidativni efekti se ogledaju u uklanjanju slobodnih radikala, redukciji metalnih jona i inhibiciji aktivnosti ksantin oksidaze (Tepe i sar., 2007). Posebno je od značaja što je toksičnost ruzmarinske kiseline niska jer  $LC_{50}$  vrednost određena na miševima iznosi 561 mg/kg nakon intravenske aplikacije. Iz organizma se vrlo brzo eliminiše sa poluvremenom eliminacije od 9 minuta (Petersen i Simmonds, 2003).

Ruzmarinska kiselina se pokazala i kao efikasno hepatoprotektivno sredstvo kod eksperimentalno-indukovane ekstrahepatične holestaze kod pacova. Ona je nakon *per os* primene ispoljila pozitivne terapijske efekte na histološku građu, biohemijske parametre, oksidativni stres, inflamaciju i fibrozu jetre, čineći je potencijalnim terapijskim agensom kod patoloških hepatičkih promena (Lin i sar., 2017). Na pacovima je dokazan i supresivni efekat ruzmarinske kiseline na izazvani mezangioproliferativni glomerulonefritis nakon oralne aplikacije gde je primećeno da ona utiče na povećanje aktivnosti superoksid dismutaze i na smanjenje fibrina, fibronektina i kolagena u glomerulima (Makino i sar., 2002). Od velikog je značaja da ovo jedinjenje ispoljava i hipotenzivni efekat. Nakon intravenske administracije ruzmarinske kiseline hipertenzivnim pacovima, došlo je do sniženja sistolnog krvnog pritiska mehanizmom inhibicije angiotenzin-konvertujućeg enzima (Ferreira i sar., 2018). Poznato je da ruzmarinska kiselina može uticati na anksioznost, depresiju i neurobihevioralne karakteristike. Ona je u brojnim neurološkim test-modelima na pacovima ili miševima nakon intraperitonealne aplikacije ispoljila anksiolitički, antidepresivni i antiepileptogeni efekat (Coelho i sar., 2015; Pereira i sar., 2005; Takeda i sar., 2002a; Takeda i sar., 2002b). Zajedno sa hipotenzivnim ruzmarinska kiselina ispoljava i kardioprotektivnu aktivnost. Nakon indukovano infarkta miokarda pacovima je intraperitonealno ubrizgavana ruzmarinska kiselina koja je uvećala srednji arterijski pritisak i brzinu srčanog rada, poboljšala ventrikularnu kontraktilnost, smanjila ventrikularni dijastolni pritisak, inhibirala elevaciju ST-segmenta i depresiju R-amplitude, i umanjila postinfarktne nekrozu i fibrozu (Toutouchi i sar., 2017). Primenjena topikalno, ona značajno ublažava inflamaciju kože pacova smanjujući proinflamatorne i oksidativne markere (Osakabe i sar., 2004b). Novije studije ukazuju na to da ruzmarinska kiselina može imati efekte u prevenciji i

tretiranju neuropatskog bola. Intraperitonealna primena ruzmarinske kiseline pacovima kojima je ugljentetrahloridom izazvana bol, smanjila je nivoe apoptopskih i proinflammatoryh faktora na osnovu čega je antinociceptivni efekat ispoljen (Rahbardar i sar., 2018). Kod miševa je uočena značajna imunomodulatorna odnosno antialergijska aktivnost ruzmarinske kiseline, nakon *per os* primene, kod modela indukovane respiratorne alergije. Tokom eksperimenta primećena je signifikantna redukcija broja leukocita/eozinofila, aktivnosti peroksidaze i interleukina (IL)-4 u bronhoalveolarnom lavažu (Costa i sar., 2012). Od značaja je i da ruzmarinska kiselina može da zaštiti pluća od oksidativnih i inflamatornih oštećenja pluća nakon izlaganja česticama izduvnih gasova. Nakon oralne aplikacije došlo je do redukcije ekspresije IL-1 $\beta$ , monocitnog hemoatraktantnog proteina-1, makrofagalnog inflamatornog proteina-1 $\alpha$ , keratinocitnog hemoatraktanta, iNOS mRNA i formacije nitrotirozina i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozina (Sanbongi i sar., 2003).

U kliničkom ispitivanju je pokazano da ruzmarinska kiselina može biti od pomoći u terapiji sezonskog alergijskog rinokonjuktivitisa. U poređenju sa placebo, ruzmarinska kiselina je kod pacijenata nakon 21 dana smanjila broj eozinofila i neutrofila u nazalnom fluidu. Ovaj efekat se najverovatnije postiže kombinacijom sledećih inhibicija inflamatornog odgovora i uklanjanja slobodnih radikala (Osakabe i sar., 2004a). Stansbury (2014) napominje da ruzmarinska kiselina može biti od značaja u terapiji astme i da se može kombinovati sa drugim lekovima u lečenju akutnog napada astme ili u hroničnim terapijama. Pored toga navodi da su značajne indikacije za primenu reaktivne bolesti disajnih puteva, alergijski rinitis, upala srednjeg uha, osetljivost na alergene. Preporuka za doziranje ruzmarinske kiseline, u kombinaciji ili samostalno, je 150 mg u formi kapsula, dva najviše do četiri, pet puta dnevno u toku četiri nedelje (Stansbury, 2014).

#### **2.3.1.2. Kafena kiselina**

Druga fenolna kiselina detektovana u ekstraktima muskatne žalfije je kafena kiselina (3,4-dihidroksicimetna kiselina). Njoj se pripisuju mnoga biološka dejstva od kojih su najznačajnija antioksidativna, antiinflamatorna, antikancerska i antimikrobna (Chao i sar., 2009; Gulcin, 2006; Rajendra-Prasad i sar., 2011; Stojković i sar., 2013; Wang i sar., 2009). Kafena kiselina je jedna od ključnih intermedijera u fenilpropainoidnom putu u biljkama koji započinje deaminacijom fenilalanina i nastankom cimetine kiseline. Dvostepenom hidrosilacijom cimetine

kiseline na položajima 3- i 4- benzenovog prstena, preko *p*-kumarinske, nastaje kafena kiselina. Enzimi koji su uključeni u biosintezu kafene kiseline su specifične citohrom P450 zavisne monooksigenaze cinamat 4-hidroksilaza i *p*-kumarat 3-hidroksilaza (Lin i Yan, 2012).

Vrlo je značajno da kafena kiselina ispoljava antidijabetički efekat suprimirajući progresiju dijabetesa tipa 2. Miševima je nakon *per os* aplikacije kafene kiseline znatno povećan nivo insulina, C-peptida i leptina, dok je nivo glukagona snižen. Smatra se da su mehanizmi ovog dejstva povezani sa njenim antioksidativnim efektom, poboljšanjem insulinske sekrecije i preuzimanja glukoze u adipocitima, i smanjenjem izlaska glukoze iz hepatocita (Jung i sar., 2006). Takođe, i nakon intravenske primene je kafena kiselina snizila nivo glukoze u krvi kod dijabetičnih pacova povećavajući preuzimanje glukoze u masnim ćelijama i potencirajući iskoristljivost glukoze (Hsu i sar., 2000). Kafena kiselina inhibira enzim 5-lipooksigenazu i time sprečava nastanak leukotrijena koji su uključeni u imunoregulaciju niza bolesti kao što je astma, razne alergijske reakcije i dr. Ujedno deluje i antiagregaciono kada je agregacija trombocita indukovana arahidonskom kiselinom (Koshihara i sar., 1984). Značajno je da kafena kiselina inhibira neuroinflamaciju indukovanu lipopolisaharidom, kada su se pored smanjenja proinflamatornih citokina ublažili poremećaji u ponašanju životinja, odnosno redukovalo vreme imobilizacije i pojačala lokomotorna aktivnost (Mallik i sar., 2016). Deshmukh i saradnici (2016) su utvrdili da kafena kiselina može biti značajna i u tretiranju Alchajmerove bolesti jer je kod streptozotocinom indukovane demencije pacova signifikantno došlo do poboljšanja poremećenih biohemijskih i bihejvioralnih parametara (Deshmukh i sar., 2016). Svoje neuroprotektivne efekte kafena kiselina je pokazala u studiji Akomolafe i saradnika (2017) i Anwar i saradnika (2012) kada je u *in vitro* uslovima došlo do smanjenja aktivnosti acetilholinesteraze kao i monoamin oksidaze, ekto-nukleozid trifosfat difosfohidrolaze i ekto-5'-nukleotidaze (Akomolafe i sar., 2017). Kao i ruzmarinska kiselina, kafena kiselina ispoljava antidepresivni efekat koji je dokazan u testovima "forsiranog plivanja" (*forced-swimming* test) kod miševa u kojem je značajno redukovana dužina perioda imobilizacije (Takeda i sar., 2002a). U studiji na miševima je dokazano da ova fenolna kiselina ispoljava antitumorske efekte odnosno da može, nakon topikalne aplikacije, smanjiti broj i progresiju indukovanih tumorskih formacija kože (Huang i sar., 1988). Antitumorski efekti kafene kiseline su prikazani i na modelu hepatocelularnog karcinoma na kulturi ćelijske linije HepG2 i *in vivo* na miševima nakon subkutane i oralne aplikacije (Chung i sar., 2004). U *in vitro* uslovima ona uspešno inhibira

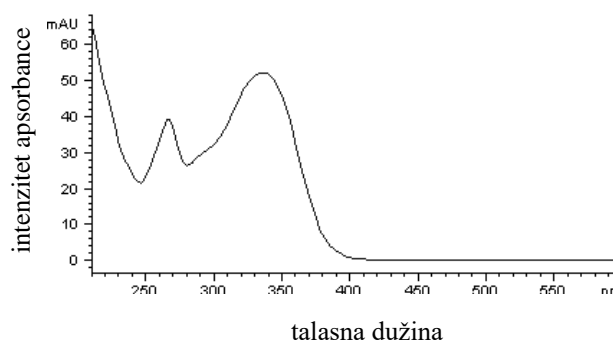
oksidativnu modifikaciju LDL čestica pa može stoga biti potencijalno antiaterosklerotsko sredstvo (Nardini i sar., 1995). Zbog toga što utiče na inhibiciju renin-angiotenzin-aldosteron sistema očekivano je da kafena kiselina može bit i efikasno antihipertenzivno sredstvo (Bhullar i sar., 2014).

### 2.3.2. Flavonoidi

Najveću grupu biljnih polifenola čine flavonoidi. U prirodi se nalaze u slobodnom obliku ili u formi heterozida. Kostanesku je 1895. godine izolovao osnovno jedinjenje i nazvao ga *flavon* (*flavus* – žut) te je po njemu i grupa sličnih jedinjenja dobila ime (Kovačević, 2002). Flavonoidi su široko rasprostranjeni u biljkama, sa preko 8000 identifikovanih predstavnika (Alzand i Mohamed, 2012). Lokalizovani su u ćelijskom soku, u vakuolama epidermalnih ćelija i ćelija mezofila. Oni su biljni pigmenti i odgovorni su za boju listova, plodova i cvetova. Žuti pigmenti potiču od halkona, aurona i nekih flavonola, dok su crvena, ljubičasta i plava boja poreklom od antocijana. Ova jedinjenja imaju karakterističan apsorpcioni spektar pa su vidljivi životinjama i onda kada ih ljudsko oko ne primećuje. Flavonoidi, stoga, imaju atraktantnu ulogu u odnosima sa drugima biljkama, insektima i drugim životinjama. Zbog svoje lokalizacije na površini organa flavonoidi štite od oksidanasa, mikroorganizama i ultraljubičastog zračenja (Alzand i Mohamed, 2012; Bruneton, 1999; Kovačević, 2002).

Biosinteza flavonoida u biljkama zasniva se na seriji enzimskih reakcija i polazi od tri aktivirana acetata (prsten A) i derivata cimetne kiseline (prsten B) kada se formira osnovni skelet, halkon, koji se sastoji iz C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> jedinice. Naknadno dolazi do ciklizacije piranovog prstena i formiranja flavanona, intermedijarnog naringenina, a zatim i do daljih transformacija do ostalih tipova flavonoidnih molekula. Podela flavonoida prikazana je u Tabeli 2.3.1. U prirodi se nalazi ogroman broj derivata osnovnih tipova flavonoida koji se međusobno razlikuju po broju, vrsti i položaju supstituenata. Modifikacija flavonoida najčešće podrazumeva hidroksilaciju, metoksilaciju i O- i C- glikozilaciju. Šećerni ostatak u flavonoidnim heterozidima može da se sastoji od jednog, dva ili više monosaharida koji su međusobno račvasto ili linearno povezani. Veza sa molekulom šećera se najčešće uspostavlja preko fenolnih grupa aglikona, i to tako da flavoni skoro uvek grade 7-O-, a flavonoli 3-O-heterozide. Flavoni, flavonoli i halkoni mogu da grade i C- heterozide koji su veoma stabilni (Alzand i Mohamed, 2012; Kovačević, 2002).

Flavonoidni aglikoni su liposolubilni i rastvaraju se u nepolarnim rastvaračima, dok su heterozidi rastvorni u polarnim rastvaračima, vodi i alkoholima i dr. Aglikoni i heterozidi imaju specifičan apsorpcioni spektar sa dva maksimuma. Od prstena A potiče traka apsorpcije na 240-280 nm, a od prstena B na 300-380 nm (primer Slika 2.3.3). Oni su retko vidljivi pri dnevnom osvetljenju, a pod ultraljubičastom svetlošću fluoreskuju (Kovačević, 2002).



**Slika 2.3.3.** Apсорpcioni spektar flavona apigenina

Flavonoidi ispoljavaju raznovrsne farmakološke aktivnosti. To su jedinjenja koja se karakterišu odličnim antioksidantnim efektima, ali u određenim situacijama mogu biti i prooksidansi (Alzand i Mohamed, 2012). Antioksidativna aktivnost flavonoida ogleda se u hvatanju slobodnih radikala koji nastaju u anoksiji ( $O_2^-$ ), inflamaciji ( $O_2^-$  i  $OH^\cdot$ ) ili lipidnoj autoksidaciji ( $ROO^\cdot$  i  $RO^\cdot$ ). Flavonoidi u *in vitro* uslovima su i inhibitori elastaze, hijaluronidaze, histidin dekarboksilaze, katehol-*O*-metiltransferaze, aldoza reduktaze, protein kinaze, 5-lipooksigenaze i dr. (Bruneton, 1999). Veliki broj ovih jedinjenja mogu imati i hormonsku aktivnost, naročito estrogenu. Najjaču estrogenu aktivnost ispoljavaju izoflavoni koji se iz tog razloga još zovu i fitoestrogeni. Flavonoidi značajno utiču na perifernu cirkulaciju i krvne sudove jer smanjuju njihovu permeabilnost i krtost, a pojačavaju elastičnost i tonus. Jedno od objašnjenja leži u tome da flavonoidi inhibiraju elastazu, hijaluronidazu i usporavaju razgradnju elastina. Zbog ovoga se flavonoidne droge ili izolovana flavonoidna jedinjenja često primenjuju kod koronarne i cerebralne insuficijencije. Flavonoidi mogu biti i odlična diuretska sredstva, kao i antiinflamatorna, hepatoprotektivna, spazmolitička, antiagregacijska, i dr. (Alzand i Mohamed, 2012; Kovačević, 2002).

Vrlo je široka distribucija flavonoida u *Salvia* vrstama. Prema istraživačima Lu i Foo (2002) najzastupljenije klase flavonoida su flavoni i flavonoli i njihovi heterozidi. Apigenin i

luteolin su primarni flavonoidi žalfija, a prisutni su i njihovi etri genkvanin, hrizoeriol, acacetin i diosmetin. Od ostalih flavonskih aglikona identifikovani su 6-hidroksilovani derivati apigenina i luteolina kao što su salvigenin, hispidulin, cirsimaritin, cirsiliol, skutelarin, i dr. (Lu i Foo, 2002). U dosadašnjim ispitivanjima hemijskog sastava različitih ekstrakata *S. sclarea* identifikovano je više jedinjenja koja pripadaju grupi flavonoida, fenolnih kiselina, terpena i fitosterola.

### 2.3.2.1. Luteolin

Luteolin je jedinjenje koje se karakteriše brojnim farmakološkim aktivnostima od kojih se pre svega ističe odlična antioksidativna i antiinflamatorna aktivnost (Funakoshi-Tago i sar., 2011; Kotanidou i sar., 2002; Seelinger i sar., 2008a). Uz to, u više studija je potvrđena i antialergijska aktivnost na miševima u kojima je luteolin smanjio simptome atopijskog dermatitisa, svrab i dinitrohlorbenzen-, histamin- i serotonin- indukovanu kutanu anafilaksu (Baolin i sar., 2005; Kawai i sar., 2007). Kao i kod većine flavonoida, i luteolin se u brojnim *in vitro* i *in vivo* testovima pokazao kao dobro antikancerogeno sredstvo. U *in vitro* testovima luteolin je citotoksično delovao na ćelijske linije humanog skvamoznog karcinoma pluća, karcinoma dojke, neuroblastoma, hepatokancera, karcinoma kolona, na andronezavisne humane kancerske ćelije prostate, i mišje i humane ćelije melanoma, dok je luteolin-7-*O*-glukozid delovao na ćelije adenokarcinoma kolona, гастриčne kancerske ćelije, karcinoma dojke i pluća (An i sar., 2008; Baskar i sar., 2011; Horvathova i sar., 2005; Seelinger i sar., 2008b). U *in vivo* studijama Manju i saradnika (2005, 2007) i Ashokkumara i Sudhandirana (2008) luteolin je kod pacova inhibirao indukovanu karcinogenezu kolona (dimetilhidrazinom i azoksimetanom, redom) koja je praćena smanjenjem lipidne peroksidacije, smanjenjem aktivnosti superoksid dismutaze i katalaze i povećanjem nivoa glutaciona. Wang i saradnici (2011) smatraju da zahvaljujući ovim antioksidativnim svojstvima i uticaju na enzimske sisteme luteolin deluje i nefroprotektivno kod dijabetičnih pacova. Uz to, luteolin može da vrši redukciju endotelijum zavisne relaksacije aortnih prstenova pacova koji su bili podvrgnuti visokim nivoim glukoze u krvi (Qian i sar., 2010). Vrlo je značajno da ovaj flavonoid, takođe kod dijabetičnih pacova, može delovati kardioprotektivno i smanjiti stepen oštećenja miokarda i aritmiju, i oslobađanje laktat dehidrogenaze nakon indukovanog infarkta (Sun i sar., 2012). U prilog ovoj aktivnosti značajno je istaći da luteolin deluje i vazorelaksantno na izazvane kontrakcije izolovane torakalne aorte pacova (Jiang i sar., 2004). Luteolin je u eksperimentalnoj studiji na miševima,

nakon oralne aplikacije, ispoljio preventivne efekte na gubitak koštane mase u postmenopauzalnoj osteoporozi redukujući diferencijaciju i funkciju osteoklasta (Kim i sar., 2011a). Luteolin je u studiji Liu i saradnika (2009) na miševima učestvovao u neurovaskularnoj zaštiti, modulaciji mikrovaskularne funkcije i poboljšanju holinergičkog sistema što se manifestovalo redukcijom indukovane amnezije i poboljšanjem pamćenja i spacijalnog učenja. Takođe su Patil i saradnici (2014) dokazali neuroprotektivne i nerotrofične efekte kod pacova štiteći dopaminergičke neurone i smanjujući mogućnost razvijanja parkinsonizma. Luteolin-7-O-glukozid je u *in vitro* i *in vivo* studijama uticao na smanjenje razvoja hepatotoksičnosti pacova izazvane ugljen-tetrahloridom. Heterozid se posebno isticao odličnom antioksidativnom aktivnošću i redukovanjem kiseoničnih vrsta i brojnih enzima (Qiusheng i sar., 2003).

### 2.3.2.2. Apigenin

Flavon apigenin se takođe karakteriše brojnim farmakološkim efektima koji su zajednički za većinu flavonoidnih jedinjenja, a to su pre svega antiinflamatorni, antioksidantni, antimikrobni, hemopreventivni i citotoksični efekti (Cushnie i Lamb, 2005; Lepley i sar., 1996; Madunić i sar., 2018; Singh i sar., 2004; Shukla i sar., 2006; Wang i sar., 2014). Antikancerski efekti apigenina ogledaju se u inhibiciji proliferacije, i apoptozi ćelija humanog hepatoma, karcinoma cerviksa, ovarijuma, dojke, prostate, pluća, pankreasa i ćelija akutne limoblastične leukemije (Chiang i sar., 2006; Fang i sar., 2007; Horinaka i sar., 2006; Liu i sar., 2005; Long i sar., 2008; Mak i sar., 2006; Ujiki i sar., 2006; Zheng i sar., 2005). Na studiji sa pacovima utvrđeno je da apigenin suprimira proces UVA/B indukovane karcinogeneze kože, karcinogeneze kolona nakon tretiranja azoksimetanom i hepatokarcinogeneze nakon davanja N-nitroso-dietilamina (Leonardi i sar., 2010; Singh i sar., 2004; Svobodova i sar., 2003). Takođe, apigenin ispoljava i antidepresivni efekat koji je potvrđen u eksperimentalnim studijama na miševima i pacovima. Nakon *per os* i intraperitonealne primene apigenin je redukovao vreme imobilizacije u forsiranom testu plivanja kod miševa i simptome indukovanog hroničnog stresa pacova smanjujući nivoe serumskog kortikosterona i regulišući nivoe serotonina i njegovih derivata (Li i sar., 2015; Nakazawa i sar., 2003; Yi i sar., 2008). Takođe, *in vitro* utiče i na inhibiciju GABA (*gama*-aminobuterna kiselina)-aktiviranog protoka hloridnih jona u dozno-zavisnom režimu (Avallone i sar., 2000). Od značaja je da apigenin može biti potencijalno efikasno vazorelaksantno sredstvo. U *in vitro* studiji na izolovanoj torakalnoj aorti pacova

apigenin je značajno redukovao kontrakcije glatke muskulature indukovane kalcijumom, kalijumom, fenilefrinom i norepinefrinom (Ko i sar., 1991; Zhang i sar., 2000). U istraživanju Panda i Kar (2007) zaključeno je da apigenin uspešno reguliše hiperglikemiju, disfunkciju štitaste žlezde i lipidnu peroksidaciju kod aloksan-indukovanog dijabetesa. Intradermalna aplikacija apigenin-7-*O*-glukozida značajno je smanjila dermatitis kod pacova koji je indukovao administracijom reaktivnih kiseoničnih vrsta. Fuchs i Milbradt (1993) su ovom studijom dokazali snažnu korelaciju antioksidativne i antiinflamatorne aktivnosti. Janssen i saradnici (1998) su ispitivali uticaj apigenina na hemostazu u *in vitro* i *in vivo* uslovima. U prvom delu njihovog ispitivanja na krvnoj plazmi i izolovanim trombocitima utvrđen je snažan efekat apigenina na sprečavanje agregacije trombocita. U drugom delu istraživanja sprovedena je klinička studija u kojoj su dobrovoljci dve nedelje koristili peršun kao izvor apigenina (84 mg/dnevno), međutim rezultati ukazuju da su efekti na hemostazu u ovom slučaju minorni zaključujući da su kardioprotektivni efekti flavonoida posledica nekih drugih načina delovanja (Jassen i sar., 1998).

### 2.3.2.3. Salvigenin

U odnosu na luteolin i apigenin, farmakološki efekti salvigenina su manje ispitivani. Sarvestani i saradnici (2018) su utvrdili da istovremena primena salvigenina (150  $\mu$ M) sa doksorubicinom indukuje apoptozu ćelija kancera kolona HT-2 i SW948 mitohondrijskim putem, promenom mitohondrijskog membranskog potencijala i smanjenjem produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS). Studija je pokazala da salvigenin u kombinaciji sa doksorubicinom, pored toga što povećava frekvenciju apoptoze, povećava i odnos Bax/Bcl-2, ekspresiju kaspaze-3 i PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*) cepanje. Od velikog je značaja da ovaj flavonoid indukuje apoptozu i pojačava efekat doksorubicina na ćelije kancera, jer na taj način može smanjiti dozu ovog leka i umanjiti njegove štetne efekte. Noori i saradnici (2013) su pokazali da salvigenin može imati i imunomodulatorna svojstva odnosno da doprinosi povećanju antitumorskog imuniteta na modelu raka dojke miševa. Uticaj na antitumorski imuni odgovor ispitan je kroz uticaj na proliferaciju splenocita miševa, pomeranje citokinskog profila i prisustva prirodnih CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fokp3<sup>+</sup>Treg ćelija. Rezultati su pokazali da je došlo do značajnog smanjenja nivoa IL-4 i povećanja interferon- $\gamma$  kod životinja tretiranih salvigeninom i značajnog smanjenja u nivou CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Fokp3<sup>+</sup>T regulatornih ćelija slezine (Noori i sar., 2013). Na humanim ćelijama neuroblastoma SH-SY5Y salvigenin, nakon tretiranja sa H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u koncentraciji



od 25  $\mu\text{M}$ , snižava apoptotičke faktore i povećava nivoe faktora autofagije. U ovom istraživanju zabeležena je značajno niža akumulacija ROS-a, kao i povećana produkcija glutaciona i smanjena aktivnost superoksid dizmutaze, nakon tretiranja ćelija sa  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rafatian i sar., 2012). Salvigenin se u studiji na pacovima pokazao i dobrim neuroprotektivnim sredstvom. U studiji Esfandabadi i Khodagholi (2013) pokazano je da salvigenin u dozi od 5 mg/kg tokom sedam dana smanjuje indukciju faktora apoptoze u hipokampusu i korteksu, za razliku od  $\beta$ -amiloida (10 ng/ $\mu\text{l}$ ) koji potencira apoptozu. Takođe, povećava aktivnost superoksid dizmutaze i katalaze u hipokampusu pacova, ali bez efekta na nivou korteksa. Agregati  $\beta$ -amiloida u mozgu predstavljaju osnov Alchajmerove bolesti pa salvigenin može imati vrlo značajno mesto u prevenciji ovog neurološkog oboljenja. Slične zaključke izveli su i Sanjarani i saradnici (2018) koji su pacovima aplikovali salvigenin *per os* u dozama 10 i 20 mg/kg, a koji su prethodno tretirani induktorom Alchajmerove bolesti, D-galaktozom, intraperitonealno 120 mg/kg. Rezultati su pokazali da svakodnevna primena različitih doza salvigenina tokom eksperimenta može usporiti nastanak Alchajmerove bolesti. Trajanje kašnjenja ulaska u mračnu komoru kod treniranih pacova u grupi tretiranoj salvigeninom, bilo je značajno više od kontrolne grupe. Brzina ekspresije mRNA faktora rasta BDNF (*brain-derived neurotrophic growth factor*) u grupama koje su primale salvigenin bila je veća od kontrolne grupe (Sanjarani i sar., 2018). Salvigenin je u dozama od 25, 50 i 100 mg/kg, intraperitonealno, kod pacova i miševa delovao antiinflamatorno i analgetično. U testu abdominalnih grčeva (*writhing test*) kod miševa salvigenin je delovao u dve doze, 50 i 100 mg/kg, pri čemu su grčevi smanjeni na 56,43% i 21,68%, redom. Kod testa sa vrelom pločom (*hot plate test*) analgetični efekti istih doza salvigenina su održavani 45 minuta, nakon čega je efekat slabio. Inflamacija šapica pacova izazvana karagenanom bila je značajno smanjena u odnosu na kontrolu kod maksimalne koncentracije salvigenina (Mansourabadi i sar., 2015).

### 2.3.3. Tanini

Tanini su u vodi rastvorna jedinjenja polifenolne strukture sa molekulskom masom od 300 do 3000. U ovu grupu spadaju i jedinjenja sa masom preko 20000 koja su zbog svoje polifenolne strukture svrstana u tanine ili "makromolekulska fenolna jedinjenja". Sa vodom formiraju koloidne rastvore, međutim stepen rastvorljivosti varira od stepena polimerizacije. Ova jedinjenja su izrazito opora, ali su netoksična. Sa teškim metalima, alkaloidima i proteinima

tanini formiraju teško rastvorne komplekse. Ovi polifenoli se u biljnom tkivu često protektivno sintetišu nakon infekcije mikroorganizmima, napada insekata ili herbivora. Tanini mogu biti i hemotaksonomski markeri, naročito kod skrivenosemenica (Bruneton, 1999; Furlan i sar., 2010; Kovačević, 2002; Khanbabaee i van Ree, 2001).

Postoje dve velike grupe tanina čija se podela zasniva na hemijskoj strukturi, a to su hidrolizirajući (estri šećera i fenolnih kiselina) i kondenzovani (kondenzovani flavanski molekuli) tanini (Tabela 2.3.1). Takođe postoje i mešoviti tanini, smeša ove dve grupe, i pseudotanini koji se produkuju od gradivnih jedinica tanina, ali sa manjom molekulskom masom. Hidrolizirajući tanini su poliestri galne kiseline ili njenih derivata i centralnog molekula glukoze i mogu se naći kao monomerni i oligomerni hidrolizirajući tanini (galotanini). U hidrolizirajuće tanine svrstavaju se i elagitanini kod kojih su najmanje dve galoil jedinice C-C povezane jedna sa drugom. Kondenzovani tanini su polimeri koji se formiraju kondenzovanjem nekoliko molekula flavan-3-ola (katehin, epikatehin) ili flavan-3,4-diola (leukoantocijanidini ili proantocijanidini) i javljaju se u formi oligomera ili polimera. Polimeri sa preko 50 jedinica flavana nazivaju se flobafeni. Tokom polimerizacije, delovanjem peroksidaze, oksiduju se *orto*-hidroksilne grupe do *orto*-hinona. Flobafeni su obojeni crveno, nerastvorni su u vodi i nemaju adstringente efekte koje imaju tanini (Khanbabaee i van Ree, 2001; Kovačević, 2002).

Efekte koje tanini ispoljavaju u vezi su sa osobinom kompleksiranja sa proteinima. Ovom reakcijom nastaju proteinski precipitati u površinskim slojevima kože i sluzokože čime se ostvaruje adstringentni efekat i povećava rezistencija na vodu, toplotu i abraziju. Hidrolizirajući tanini su reaktivniji u odnosu na kondenzovane. Hidrolizirajući tanini imaju posebno veliki afinitet prema proteinima koji sadrže prolin, a vezivanje nastaje uspostavljanjem vodoničnih veza čime se obrazuju reverzibilni kompleksi. Kondenzovani tanini u kiseloj sredini oksiduju do hinona koji sa nukleofilnim grupama proteina reaguju preko kovalentnih veza stvarajući ireverzibilne komplekse. Ovim mehanizmima tanini precipitiraju proteine na koži i sluzokoži, ali i digestivne enzime i proteine mikroorganizama čime se objašnjava i njihovo antiseptično dejstvo. Tanini se *per os* koriste kao antidijaroici kao i kod inflamatornih i infektivnih procesa organa gastrointestinalnog sistema. Zbog kompleksiranja sa alkaloidima i teškim metalima mogu se koristiti kao antidoti. Proantocijanidini jačaju tonus kapilara i krvnih sudova smanjujući njihovu permeabilnost i krtost, a procijanidinski dimeri iz cvetova gloga ispoljavaju pozitivni inotropni i vazodilatatorni efekat. Topikalna primena tanina i taninskih droga je od značaja kod

inflamacija, oštećenja i sitnih krvarenja na koži i sluzokoži. U eksperimentalnim studijama su dokazani još neki efekti tanina kao što su antioksidativni, hemostatički, diuretici, antiinflamatorni, antikancerogeni i efekti inhibicije angiotenzin konvertujućeg enzima, hijaluronidaze, protein kinaze C i sl. (Bruneton, 1999; Khanbabaee i van Ree, 2001; Kovačević, 2002; Scalbert, 1991; Zhao i sar., 2011).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su tanini u *Salvia* vrstama zastupljeni u obliku kondenzovanih tanina, od kojih je značajno prisustvo karakterističnog derivata katehina, salviatanina (Lu i Foo, 2002).

## 2.4. EKSTRAKTI

Ekstrakti su najznačajnija grupa biljnih preparata koji predstavljaju koncentrovane proizvode koji mogu biti tečne, polučvrste ili čvrste konzistencije, a dobijaju se iz biljnih ili animalnih droga. Pre procesa ekstrakcije droga mora biti pripremljena, a to podrazumeva usitnjavanje do konzistencije grubog praška, stabilizaciju odnosno inaktivaciju enzima, i obezmašćivanje. Koristeći različite selektivne rastvarače kao što su voda, alkoholi u različitim koncentracijama, propilenglikol, masna ulja i drugi, iz droge se ekstrahuju farmakološki aktivni sastojci zajedno sa određenom količinom balastnih materija (hlorofil, belančevine, masti, sluzi, smole i drugo). Odnos droga/rastvarač je specifičan i definisan je farmakopejama ili nekim drugim propisima. Kada droga nije oficinalna ili često korišćena, primenjuju se opšti odnosi koji su definisani u opisu tehnike ekstrakcije. Priprema ekstrakata se obavlja različitim ekstrakcionim tehnikama npr. maceracija, perkolacija, digestija, ekstrakcija superkričnim fluidima, ultrazvučna ekstrakcija i dr. čiji je postupak izvođenja može biti definisan farmakopejom (Jovanović, 2004; Kovačević, 2002; Savić, 2014).

Proces ekstrakcije predstavlja izdvajanje farmakološki aktivnih sastojaka iz biljnih ili životinjskih droga i odvajanje od neaktivnih odnosno inertnih komponenata uz pomoć rastvarača primenom odgovarajućih ekstrakcionih procedura. Svojstva i sadržaj lekovitih supstanci u drogi nisu samo genetski uslovljeni, već su podložni i uticaju okoline kao što su klimatski faktori, prihranjivanje, zemljište, način sakupljanja biljnog materijala i način sušenja. Značajan problem predstavlja kontaminacija biljnog materijala mikroorganizmima, kao i eventualno prisustvo pesticida (Jovanović, 2004; Sruthi i Indira, 2016). Izolovanje farmakološki aktivnih materija iz droga zavisi i od anatomske građe biljne vrste (Jovanović, 2004). Usitnjavnje droge obezbeđuje

povećanje specifične površine materijala, a time i mogućnost kontakta pojedinih čestica sa solvensom za ekstrakciju (Azwanida, 2015). Sa druge strane prevelika usitnjenost nije pogodna jer u postupcima gde je droga stacionarna, ekstrakcija biva otežana jer se zasićenija ekstrakciona tečnost teško probija kroz deblji sloj droge, naročito u prisustvu supstanci koje bubre. Takođe, u ovom slučaju je jako teško odvojiti ekstrakt od usitnjene droge, a jako usitnjena droga može adsorbovati već ekstrahovanu aktivnu supstancu (Jovanović, 2004). Prema Ph. Jug. IV (1984) droge se najčešće usitnjavaju do stepena usitnjenosti 0,75 (grub prašak – *pulvis grossus*). Pri kontaktu rastvarača za ekstrakciju sa usitnjenom drogom dolazi do ispiranja u oštećenim ćelijama biljke odnosno do rastvaranja njihovog sadržaja, dok u neoštećene ćelije solvens mora najpre da prođe. Osušena i smežurana ćelijska membrana se prvo bubrenjem dovodi do stanja koje omogućava prolaz rastvarača u unutrašnjost ćelija. Procesom bubrenja skeletna struktura postaje manje čvrsta, formiraju se intermicelarni prostori i solvens ulazi u ćeliju. Po ulasku u ćeliju dolazi do bubrenja protoplazme, sadržaj ćelija se rastvara i ukoliko se nalazi u rastvoru izlazi procesom difuzije kroz intercelularne prostore u okolnu tečnost do uspostavljanja ravnotežne koncentracije unutar i izvan ćelija (Jovanović, 2004).

Ekstrakti se pripremaju tako što se propisano usitnjeni biljni materijal, uglavnom osušeni, sa rastvaračem za ekstrakciju smeštaju u odgovarajući uređaj - ekstraktor. Sledeća faza podrazumeva nastanak tzv. međuproizvoda (*miscella*, eluat) koji se ostataka biljnog materijala odvaja. Ako se tokom ekstrakcije koriste tečni rastvarači, npr. etanol, voda, etanol-voda, nakon filtriranja dobija se tečni ekstrakt. Suvi ekstrakt se dobija ako se od faze *miscella* nastavi proces uparavanja u odgovarajućem vakuum uparivaču. Tokom uparavanja nastaje, najpre, polučvrsti ekstrakt od koga se daljim sušenjem dobija suvi ekstrakt (Savić, 2014).

**Tečni ekstrakti (*Extracta fluida*)** se najčešće izrađuju tako da se iz jednog dela droge dobija jedan deo ekstrakta (m/m ili v/m). Ovi ekstrakti se mogu standardizovati preko količine solvensa, farmakološki aktivnog jedinjenja ili ostatka nakon sušenja. Najčešće sredstvo za ekstrakciju je voda i razblaženi etanol, a načelno se izrađuju postupkom perkolacije. Pod tečnim ekstraktom se, takođe, može podrazumevati i rastvor suvog ekstrakta u odgovarajućem solvensu. Nakon rastvaranja, ove ekstrakte treba filtrirati jer često dolazi do pojave sedimentacije. Po potrebi tečni ekstrakti mogu da sadrže konzervanse kojima se prevenira razvoj mikroorganizama. Pakuju se u ambalažu koja se dobro zatvara i koja je obeležena nalepnicom sa naznačenim podacima o ekstraktu (naziv droge, solvens, odnos droga:solvens, vrednost parametara, vrsta i

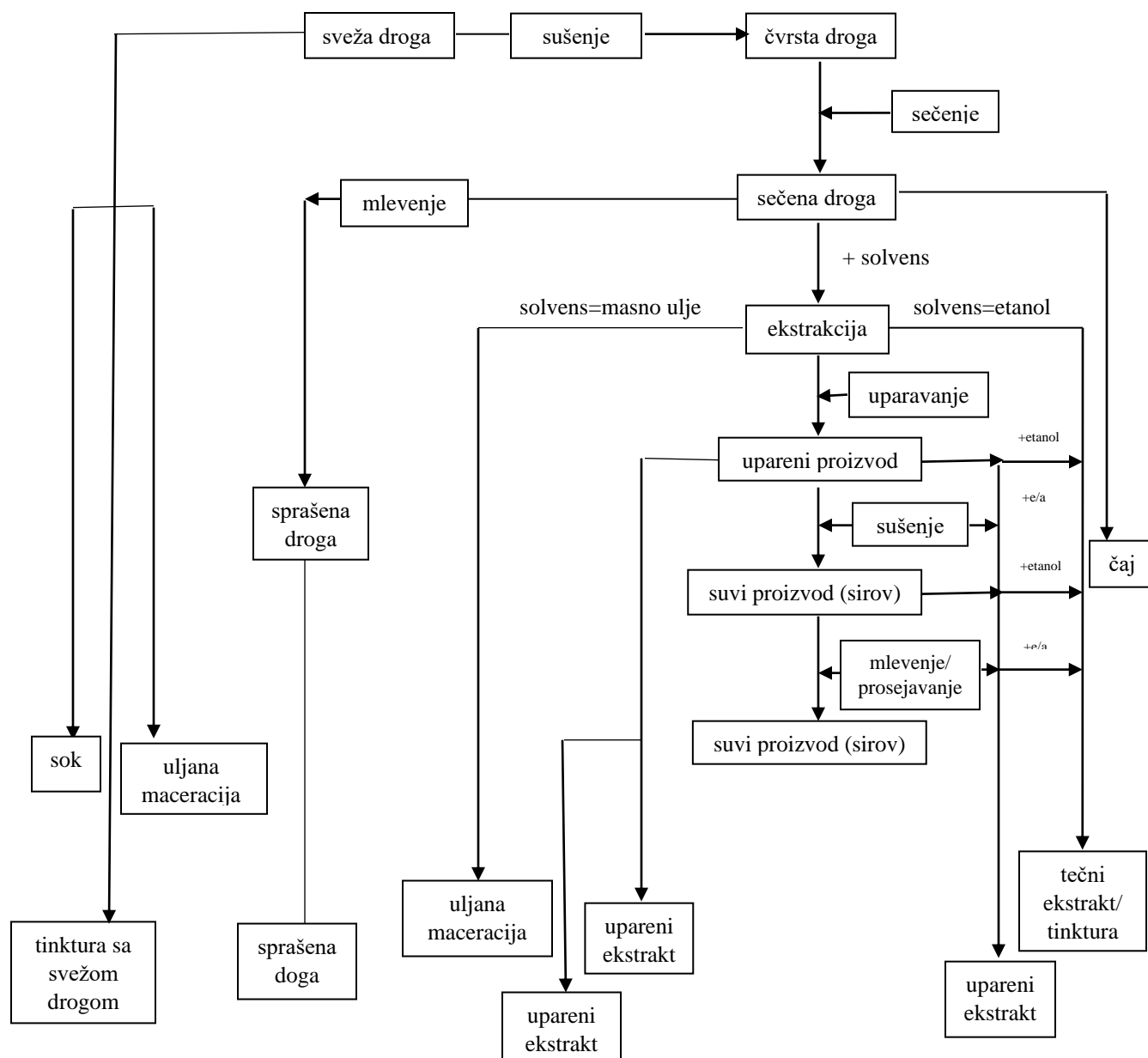
koncentracija konzervansa, datum proizvodnje i kontrole). Za tečne ekstrakte je uobičajeno da se određuju: organoleptičke osobine, zdravstvena ispravnost, realtivna gustina, sadržaj etanola, sadržaj metanola (<0,05% v/v), 2-propanola (<0,05% v/v), ostatak nakon sušenja i koncentracija definisanog aktivnog jedinjenja (Jovanović, 2004; Kovačević, 2002; Ph. Jug. V, 2000). Deveta evropska Farmakopeja (2017) za tečne ekstrakte propisuje ispitivanje relativne gustine, etanola, metanola (maksimum 0,05% v/v) i ostataka nakon sušenja, a ukoliko se ekstrakt izrađuje etanolom i prisustvo 2-propanola (maksimum 0,05% v/v) (Ph. Eur. 9,0, 2017).

**Polučvrsti ekstrakti (*Extracta spissa*)** se dobijaju delimičnim uparavanjem rastvarača koji se koristi kao ekstrakciono sredstvo. Na ovaj način nastaju polučvrsti, žitki ili pekmezasti ekstrakti. Evaporacija rastvarača se odvija najčešće u vakuum sušnicama na nižim temperaturama da bi se izbegla promena sastojaka ekstrakata. Ovakvi ekstrakti treba da daju minimum 70% ostatka posle sušenja. Oni takođe mogu da sadrže konzervanse. Pakuju se u odgovarajuću ambalažu i čuvaju se na tamnom i hladnom mestu. Obeležavaju se po propisima iz farmakopeje uz sve neophodne podatke. Parametri koji se prate za ispitivanje kvaliteta su organoleptičke karakteristike, ostatak nakon uparavanja i zdravstvena ispravnost (Jovanović, 2004; Kovačević, 2002). Prema zahtevima Ph. Eur. 9,0 (2017) za polučvrste ekstrakte je potrebno ispitati suvi ostatak i rezidue rastvarača (Ph. Eur. 9,0, 2017).

**Suvi, praškasti ekstrakti (*Extracta sicca*)** su čvrsti, praškasti proizvodi koji se dobijaju potpunim uparavanjem solvensa korišćenog za ekstrakciju. Ovi ekstrakti treba da sadrže minimum 95% suvog ostatka. Rastvarač se nakon ekstrakcije uparava pri sniženim pritiskom do suvog i suši u vakuumu uz silikagel, na temperaturi do 50°C. Koriste se pojedinačno ili u mešavinama uz dodatak materija koje poboljšavaju njihovu rastvorljivost (npr. instant čajevi). Pakuju se u dobro zatvorenu ambalažu, čuvaju se na tamnom mestu i propisno se obeležavaju. Kao parametri kvaliteta suvih ekstrakata određuju se ukupna količina ekstraktivnih materija, gubitak sušenjem, količina aktivnog sastojka, zdravstvena ispravnost i organoleptičke osobine (Jovanović, 2004; Kovačević, 2002). Suvi ili praškasti ekstrakti se najčešće koriste u proizvodnji fitopreparata, a njihova izrada obuhvata procedure prikazane na Slici 2.4.1. (Schulz i sar., 2004). Suvi ekstrakti se po Ph. Eur. 9,0 (2017) ispituju na ostatak nakon sušenja, prisustvo vode i rezidue rastvarača (Ph. Eur. 9,0, 2017).

Kvalitet ekstrakata je promenljiv zbog neujednačenog kvaliteta droge i rastvarača, pa se zato danas standardizacija ekstrakata vrši na osnovu količine farmakološki aktivnog jedinjenja

droge, "marker" materije, uvek prisutnog u drogi, a potom i u ekstraktu (Kovačević, 2002). Ph. Eur. 9,0 (2017) definiše standardizovane i kvantifikovane ekstrakte. Standardizovani ekstrakt podrazumeva ekstrakt koji je podešen na definisan sadržaj jednog ili više jedinjenja sa terapijskim efektom, a podešavanje se vrši pomoćnim indiferentnim materijama ili mešanjem istih ekstrakata različitog sadržaja aktivnog jedinjenja. Kvantifikovani ekstrakt je ekstrakt koji je podešen na sadržaj "marker" jednog ili više jedinjenja, pri čemu njihov sadržaj može da varira i kreće se u definisanom rasponu. Podešavanje se vrši mešanjem različitih serija istog ekstrakta (Ph. Eur. 9,0, 2007). Sadržaj aktivnih jedinjenja u biljnom materijalu i ekstraktima zavisi od mnogih faktora kao što su najpre genetski i klimatski faktori i kvalitet zemljišta. Varijacije su značajno manje kod kultivisanih biljaka u odnosu na divljerastuće (Schulz i sar., 2004). Određivanja aktivnih jedinjenja se vrše savremenim instrumentalnim tehnikama u odnosu na prirodu jedinjenja, a zatim se ekstrakt svodi na propisanu količinu dodavanjem indiferentnog praha, npr. skroba, laktoze, kvasca, ili istog ekstrakta koji sadrži veću količinu delotvornog sastojka (Kovačević, 2002).



**Slika 2.4.1.** Tehnički procesi u proizvodnji fitopreparata (Schulz i sar., 2004)

e/a – ekscipijens/adjuvans

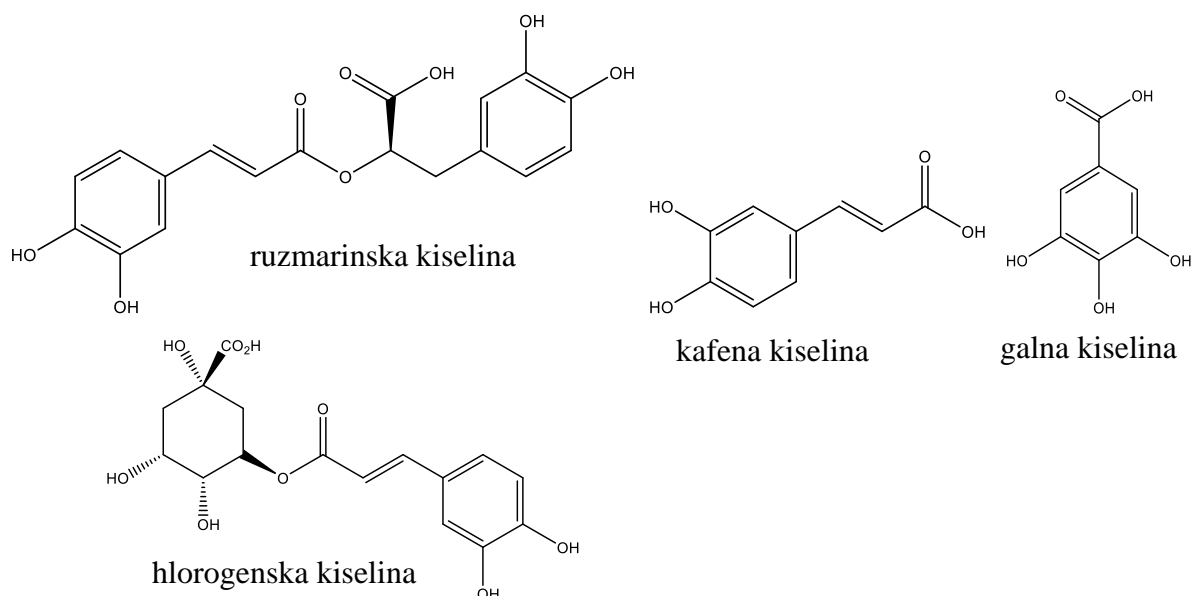
## 2.5. DOSADAŠNJA ISPITIVANJA HEMIJSKOG SASTAVA *Salvia sclarea* L.

### Fenolne kiseline

Dosadašnja istraživanja pokazuju da muskatna žalfija sadrži više vrsta fenolnih kiselina sa najčešće prisutnom ruzmarinskom i kafenom kiselinom (Slika 2.5.1). Kan i saradnici (2007) su odredili sadržaj fenolnih kiselina (ruzmarinske, kafene, galne i hlorogenske) iz različitih delova biljke sa područja Turske, pri čemu su utvrdili da stablo sadrži najveću količinu ruzmarinske (5,961 ng/g) i hlorogenske kiseline (252 ng/g), a list najveću količinu kafene i galne kiseline (444 i 8,686 ng/g, redom) (Kan i sar., 2007). U listu litvanske muskatne žalfije određeno je značajno više ruzmarinske kiseline, 41,10 mg/g (Bandoniene i sar., 2005). U metanolnom ekstraktu lista sa područja Mađarske ruzmarinska kiselina je bila zastupljena sa 3,90 mg u gramu ekstrakta, a kafena sa 0,08 mg/g (Janicsak i sar., 1999). U metanolnom ekstraktu nadzemnih delova turske muskatne žalfije sadržaj ruzmarinske kiseline iznosio je 56,30 mg/g, dok je u vodenom iznosio 37,70 mg/g (Ozturk i sar., 2011). Sharopov i saradnici (2018) su u metanolnom ekstraktu herbe i korena nemačke žalfije odredili sadržaj ruzmarinske, kafene i *p*-kumarinske kiseline. Ekstrakt herbe je sadržao najviše ruzmarinske (54,5%), potom *p*-kumarinske (9,4%), pa kafene kiseline (3,1%), dok je u ekstraktu korena bila zastupljenija kafena (8,8%), manje ruzmarinska (1,2%) i najmanje *p*-kumarinska kiselina (0,5%) (Sharopov i sar., 2018).

Istraživači Jasicka-Misiak i saradnici (2018) su u ekstraktima listova *S. sclarea* sa područja Ukrajine (standardni ukrajinski varijetet C785) i Poljske (varijetet Al-Todor) identifikovali čak 11 različitih fenolnih kiselina i to ruzmarinsku, kafenu, hlorogensku, ferulinsku, elagnu, *p*-kumarinsku, vanilinsku, siringinsku, 3-hidroksibenzoevu, 3,4-dihidroksibenzoevu (protokatehinsku), i *p*-hidroksibenzoevu kiselinu. Uz to, Zengin i saradnici (2018) daju i detaljnu HPLC analizu fenolnih kiselina u ekstraktima herbe *S. sclarea* sa područja Turske, tvrdeći da je ruzmarinska kiselina dominantna u sva tri ispitivana ekstrakta (etil-acetatni, metanolni i vodeni) sa opsegom koncentracija od 620±14 do 26610±408 µg/g. U svim ekstraktima zastupljene su bile i protokatehinska kiselina (od 12±0,4 do 130±0,6 µg/g), *p*-hidroksibenzoeva (od 50±0,6 do 254±12 µg/g), kafena (od 42±4 do 398±8 µg/g), siringinska (od 4±0,2 do 46±0,2 µg/g), *p*-kumarinska (od 14±0,06 do 56±2 µg/g), ferulinska (od 6±0,06 do 126±0,08 µg/g), benzoeva (od 48±0,6 do 102±0,6 µg/g), *o*-kumarinska (od 10±0,08 do 420±12 µg/g) i cimetna kiselina (od 14±1 do 94±4 µg/g), dok je hlorogenska bila prisutna u etil-acetatnom (42±0,2 µg/g) i metanolnom ekstraktu (108±2 µg/g) (Zengin i sar., 2018).





**Slika 2.5.1.** Strukturne formule pojedinih fenolnih kiselina prisutnih u ekstraktima *Salvia sclarea* L.

### Flavonoidi

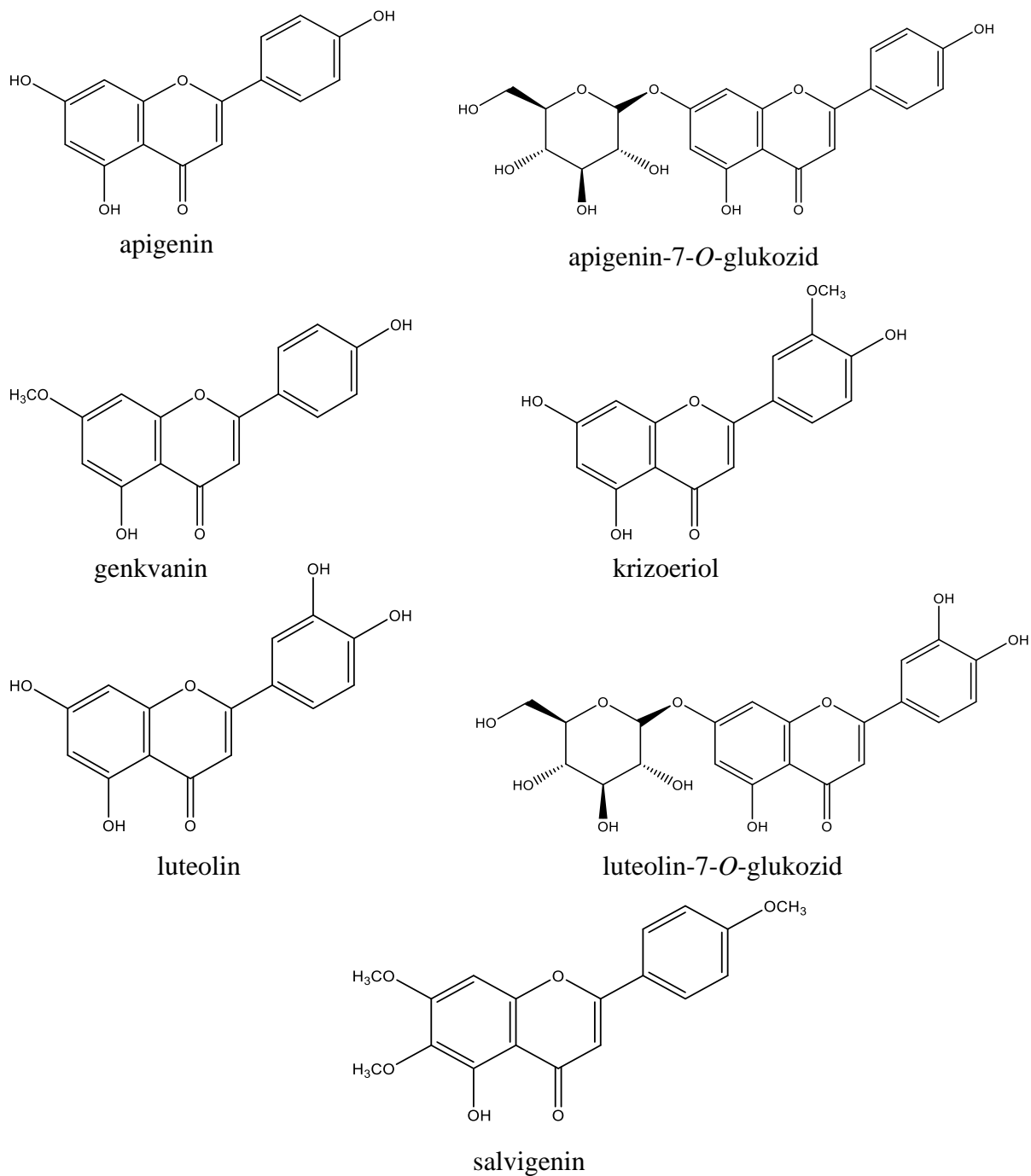
Podaci o sadržaju flavonoidnih jedinjenja su prilično limitirani u naučnoj i stručnoj literaturi. U dostupnim literaturnim podacima zabeleženo je prisustvo flavonoida, i to najčešće flavonske strukture (Adzet i sar., 1988; Lu i Foo, 2002; Ulubelen i sar., 1994) (Slika 2.5.2). Naime, Ulubelen i saradnici (1994) su u acetonskom ekstraktu herbe (Turska) identifikovali i izolovali apigenin, luteolin, 4'-metilapigenin, salvigenin, 6-hidroksiluteolin-6,7,3',4'-tetrametil etar i 6-hidroksi apigenin-7,4'-dimetil etar, postupkom tankoslojne hromatografije (TLC). U vodenometanolnom ekstraktu lista gajene žalfije (Španija) Adzet i saradnici (1988) su od flavona TLC i HPLC metodom takođe identifikovali apigenin i luteolin, kao i genkvanin, krizoeriol i salvigenin. Skorije istraživanje o flavonoidima u muskatnoj žalfiji autora Jasicka-Misiak i saradnika (2018) pokazuje da se u listu *S. sclarea* iz Ukrajine i Poljske mogu naći pored flavona (luteolina i krizina) i drugi flavonoidi: galangin, kempferol, miricetin i pinocembrin (Jasicka-Misiak i sar., 2018). Takođe, Zengin i saradnici (2018) daju detaljniji sastav metanolnog, etil-acetatnog i vodenog ekstrakata herbe biljnog materijala sa područja Turske. Rezultati ove studije pokazuju prisustvo apigenina u opsegu  $932,24 \pm 24$  –  $1744 \pm 48$   $\mu\text{g/g}$  i rutina u opsegu  $20 \pm 2$  –  $510 \pm 1,6$   $\mu\text{g/g}$  u sva tri ekstrakta, kao i luteolina u metanolnom i vodenom ( $1314 \pm 112$  i  $658 \pm 56$   $\mu\text{g/g}$ , redom), hesperidina u metanolnom ( $26 \pm 1,2$   $\mu\text{g/g}$ ), kvercetina u etil-

acetatnom i vodenom ( $60\pm 4$  i  $346\pm 14$   $\mu\text{g/g}$ , redom) i katehina u vodenom ekstraktu ( $892\pm 38$   $\mu\text{g/g}$ ) (Zengin i sar., 2018).

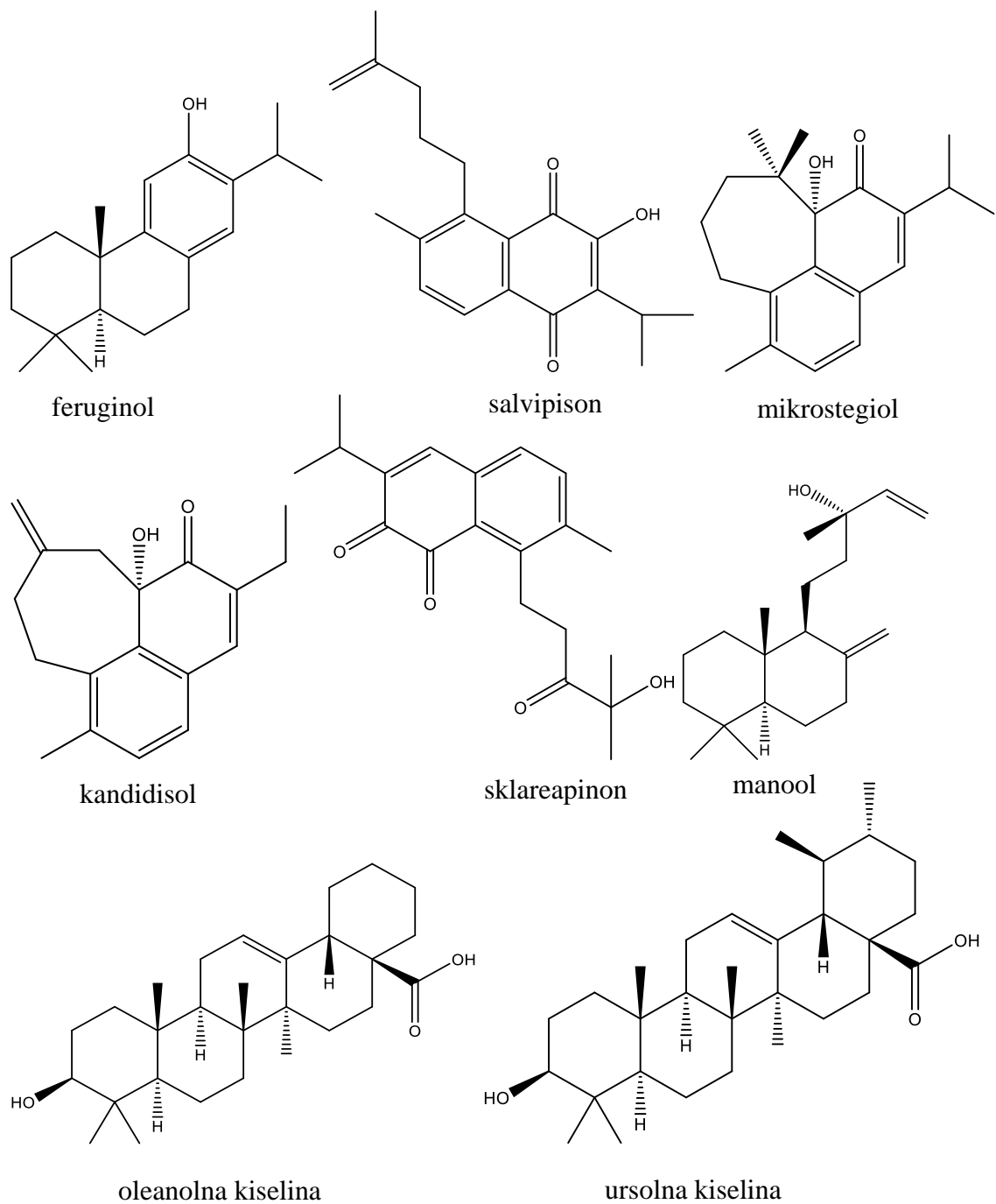
### Terpeni

Ulubelen i sar., (1994) su u acetonskom ekstraktu cele biljke identifikovali više diterpena: sklareol, manool, salvipison, feruginol, mikrosteგიol, kandidisiol, 7-oksorooleanon, 2,3-dehidrosalvipison i 7-oksoferuginol-18-al. Takođe, iz istog ekstrakta izolovano je i dva seskviterpena: kariofilen oksid i spatulenol, i triterpen  $\alpha$ -amirin (Ulubelen i sar., 1994). U acetonskom ekstraktu korena su identifikovana terpenska jedinjenja, i to: triterpeni- 3-okso-oleanolna kiselina i  $\alpha$ -amirin, i 12 diterpenoida: feruginol, salvipison, mikrosteგიol, kandidisiol, 2,3-dehidrosalvipison, etiopinon, 1-oksoetiopinon, salvinolon, kriptojaponol,  $\Delta^7$ -manool, sklareapinon i acetilsalvipison (Ulubelen i sar., 1997). U ekstraktu listova identifikovane su i oleanolna, ursolna i betulinska kiselina (0,095%, 0,091% i 0,03%, redom). Ekstrakcija ovih triterpenskih kiselina izvršena je smešom rastvarača tetrahidrofurana i etanola u odnosu 1:1 (v/v) (Razboršek i sar., 2008). U *in vitro* kultivisanom korenu muskatne žalfije takođe su izolovani diterpeni feruginol, salvipison, etiopinon i 1-oksoetiopinon, i triterpeni:  $2\alpha,3\alpha$ -dihidroksi-urs-12-en-28-oična kiselina,  $2\alpha,3\alpha,24$ -trihidroksi-urs-12-en-28-oična kiselina ursen tipa, oleanolna i ursolna kiselina (Kuzma i sar., 2006; Kuzma i sar., 2008; Rozalski i sar., 2006). U ekstraktima lista *S. sclarea* sa područja Ukrajine (standardni ukrajinski varijetet C785) i Poljske (varijetet Al-Todor) je identifikovan i seskviterpen - apscisinska kiselina (Jasicka-Misiak i sar., 2018).

Na Slici 2.5.3. predstavljene su strukturne formule nekih od identifikovanih terpena u ekstraktima muskatne žalfije.



**Slika 2.5.2.** Strukturne formule flavonoida najčešće prisutnih u ekstraktima *Salvia sclarea* L.



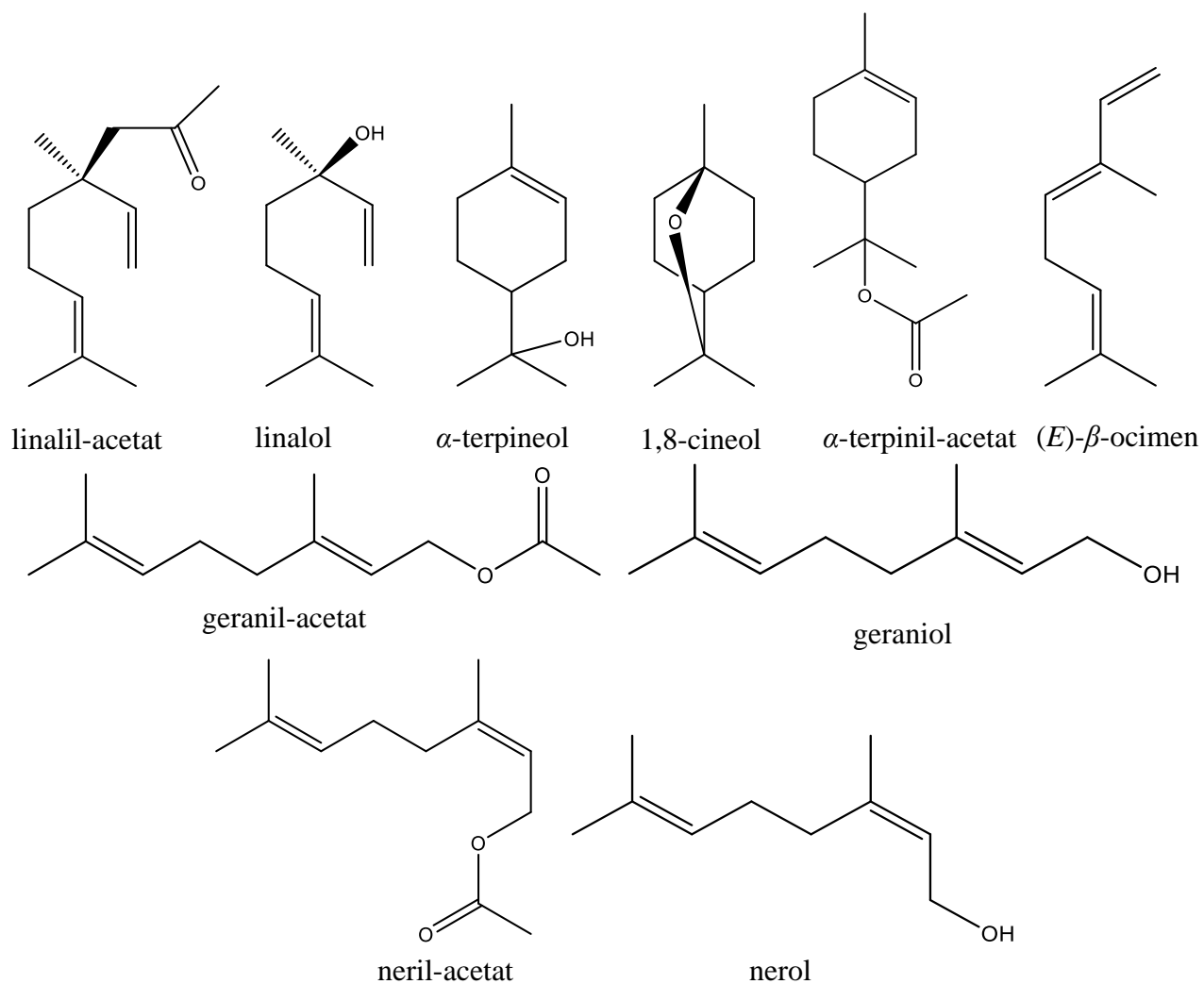
**Slika 2.5.3.** Strukturne formule pojedinih terpena prisutnih u ekstraktima *Salvia sclarea* L.

Etarsko ulje muskatne žalfije čine razna terpena jedinjenja iz grupe monoterpena, diterpena i seskvitpena.

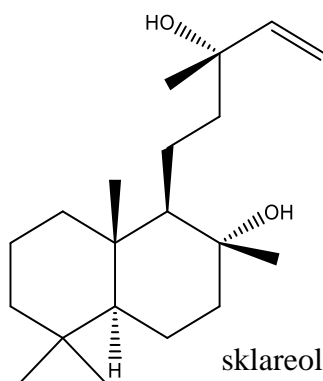
*Monoterpeni:* Monoterpeni su najzastupljeniji u gotovo svim analiziranim etarskim uljima *S. sclarea* i to pre svega linalol čija je zastupljenost od 2,60 do 62,51%, i linalil-acetat sa udelom od 1,00 do čak 73,57%. Od ostalih monoterpena u etarskom ulju najčešće su zastupljeni  $\alpha$ -terpineol (1,63-47,4%), 1,8-cineol (do 32,6%), geranil-acetat (0,36-5,80%), (*E*)- $\beta$ -ocimene (0,18-5,70%),  $\alpha$ -terpinil-acetat (do 22,1%), neril-acetat (do 2,76%), geraniol (do 7,70%), mircen (do 7,29%), nerol (do 2,5%),  $\alpha$ -pinen (do 6,5%),  $\beta$ -pinen (do 6,3%), kamfor (do 8,9%) limonen (do 1,55%), izoeugenil-acetat (do 2,28%) i ostali sa minimalnim prisustvom (Ayoub i sar., 2018; Cai i sar., 2006; Carrubba i sar., 2002; Dogan i sar., 2015; Dzumayev i sar., 1995; Džamić i sar., 2008; Farka i sar., 2005; Fraternali i sar., 2005; Gulen i sar., 2018; Hristova i sar., 2013; Hudaib i sar., 2001; Koutsaviti i sar., 2016; Kuzma i sar., 2009; Lattoo i sar., 2006; Lorenzo i sar., 2004; Nasermodeli i Rowshan, 2013; Ogutcu i sar., 2008; Paknejadi i sar., 2012; Peana i sar., 1999; Pešić i Banković, 2003; Pierozan i sar., 2009; Raafat i Habib, 2018; Rajabi i sar., 2014; Saharkhiz i sar., 2009; Schwiertz i sar., 2006; Sharopov i Setzer, 2012; Seol i sar., 2013; Torres i sar., 1997; Verma i sar., 2011; Verma, 2010; Yadav i sar., 2010) (Slika 2.5.4).

*Diterpeni:* Sklareol je diterpensko jedinjenje specifično za etarsko ulje *S. sclarea*, i može se naći čak i u količini do 41,80% (Carrubba i sar., 2002; Džamić i sar., 2008; Farka i sar., 2005; Fraternali i sar., 2005; Koutsaviti i sar., 2016; Kuzma i sar., 2009; Lorenzo i sar., 2004; Nasermodeli i Rowshan, 2013; Paknejadi i sar., 2012; Seol i sar., 2013; Verma i sar., 2011; Yadav i sar., 2010; Yuce i sar., 2014) (Slika 2.5.5). Sklareol je diterpenski alkohol labdanskog tipa. Biosinteza bicikličnih diterpena labdanskog tipa prolazi kroz stepenovanu jonizaciju i cikloizomerizaciju (*E,E,E*)-geranilgeranil-difosfata (GGPP). Kod skrivenosemenica, takva reakciona kaskada zahteva uzastopno aktivnost dve monofunkcionalne diterpenske sintaze (diTPSs). Klasa II diTPS katalizuje ciklizaciju GGPP molekula da bi se formirao biciklični difosfat, intermedijer, varijabilne stereochemije i hidroksilacije. Kasnije, diTPS klase I olakšavaju jonizaciju grupe difosfata i često dodatnu ciklizaciju i reorganizaciju reakcija. Kod skrivenosemenica i golosemenica, funkcionalna modifikacija labdana i labdanskih diterpenoida uključuju prvenstveno dodavanje hidroksilne grupe, koje može biti posredovano diTPSs sintazama ili kroz aktivnost zavisnog od citohrom P450 monooksigenaze (P450s) (Caniard i sar., 2012). Identifikovani su takođe i salviatrieni A i B, amfilektan/elizabetan tipa, koji su izolovani

iz etarskog ulja dobijenog n-heksanskom ekstrakcijom čašičnih listića cvetova (Laville i sar., 2012).

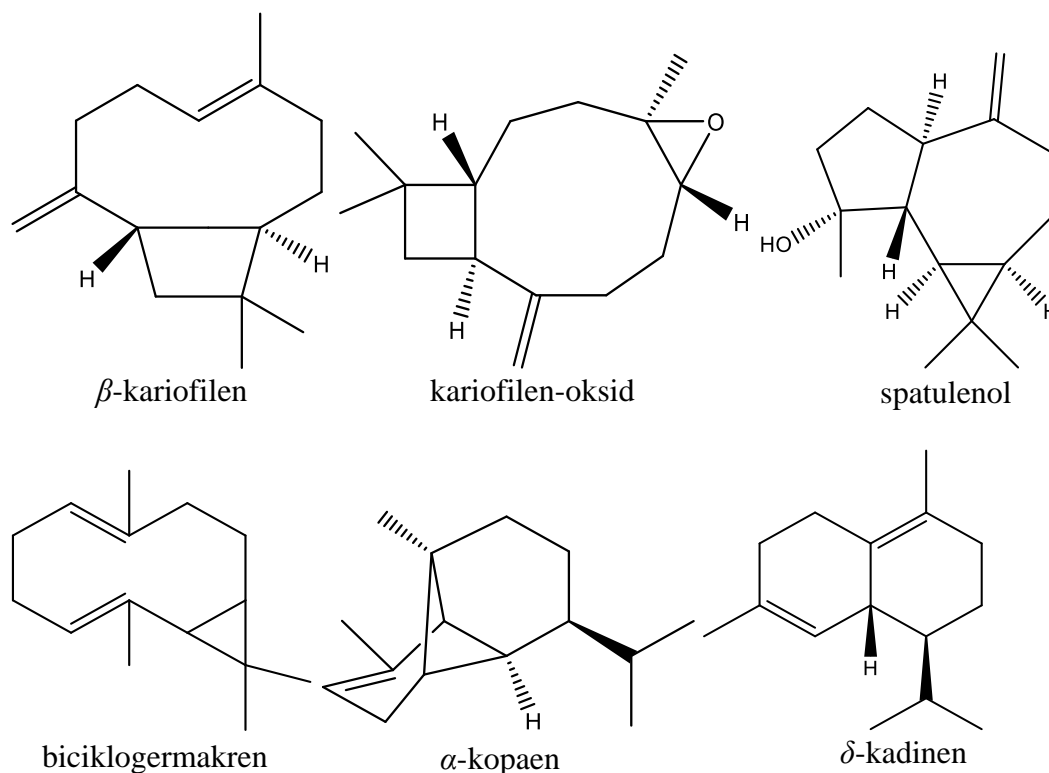


**Slika 2.5.4.** Strukturne formule najčešćih monoterpena u etarskom ulju *Salvia sclarea* L.



**Slika 2.5.5.** Strukturna formule diterpena skalreola u etarskom ulju *Salvia sclarea* L.

*Seskviterpeni*: Od seskviterpenskih jedinjenja dominantan je germakren D čija je zastupljenost 0,58-28,80%, a u etarskom ulju iz lista čak 67,72-68,85%. Od ostalih seskviterpena značajno je prisustvo  $\beta$ -kariofilena (1,00-16,24%), kariofilen-oksida (0,50-24,1%), spatulenola (0,18-11,4%), biciklogermakrena (0,27-12,50%),  $\alpha$ -kopaena (do 6%),  $\delta$ -kadinena (do 1,56%) i  $\gamma$ -murolena (3,32-31,30%), dok su u etarskom ulju iz lisne rozete izolovani i (*Z*)-lanceol (5,64%) i  $\beta$ -santalil-acetat (*Z*) (51,08%) (Ayoub i sar., 2018; Carrubba i sar., 2002; Džamić i sar., 2008; Farka i sar., 2005; Fraternali i sar., 2005; Gulen i sar., 2018; Hristova i sar., 2013; Hudaib i sar., 2001; Kuzma i sar., 2009; Lattoo i sar., 2006; Lorenzo i sar., 2004; Nasermodeli i Rowshan, 2013; Ogutcu i sar., 2008; Paknejadi i sar., 2012; Peana i sar., 1999; Pierozan i sar., 2009; Raafat i Habib, 2018; Rajabi i sar., 2014; Saharkhiz i sar., 2009; Schwiertz i sar., 2006; Sharopov i Setzer, 2012; Seol i sar., 2013; Torres i sar., 1997; Verma i sar., 2011; Yadav i sar 2010; Yuce i sar., 2014). Takođe identifikovani su i (*R*,5*E*)-2,12-epoksikariofil-5-en, (2*R*,5*E*)-kariofil-5-en-12-al, (2*S*,5*E*)-kariofil-5-en-12-al, izospatulenol, (1*R*,5*R*)-1,5-epoksisalvial-4(14)-en i salvial-4(14)-en-1-on (Maurer i Hauser, 1983) (Slika 2.5.6).



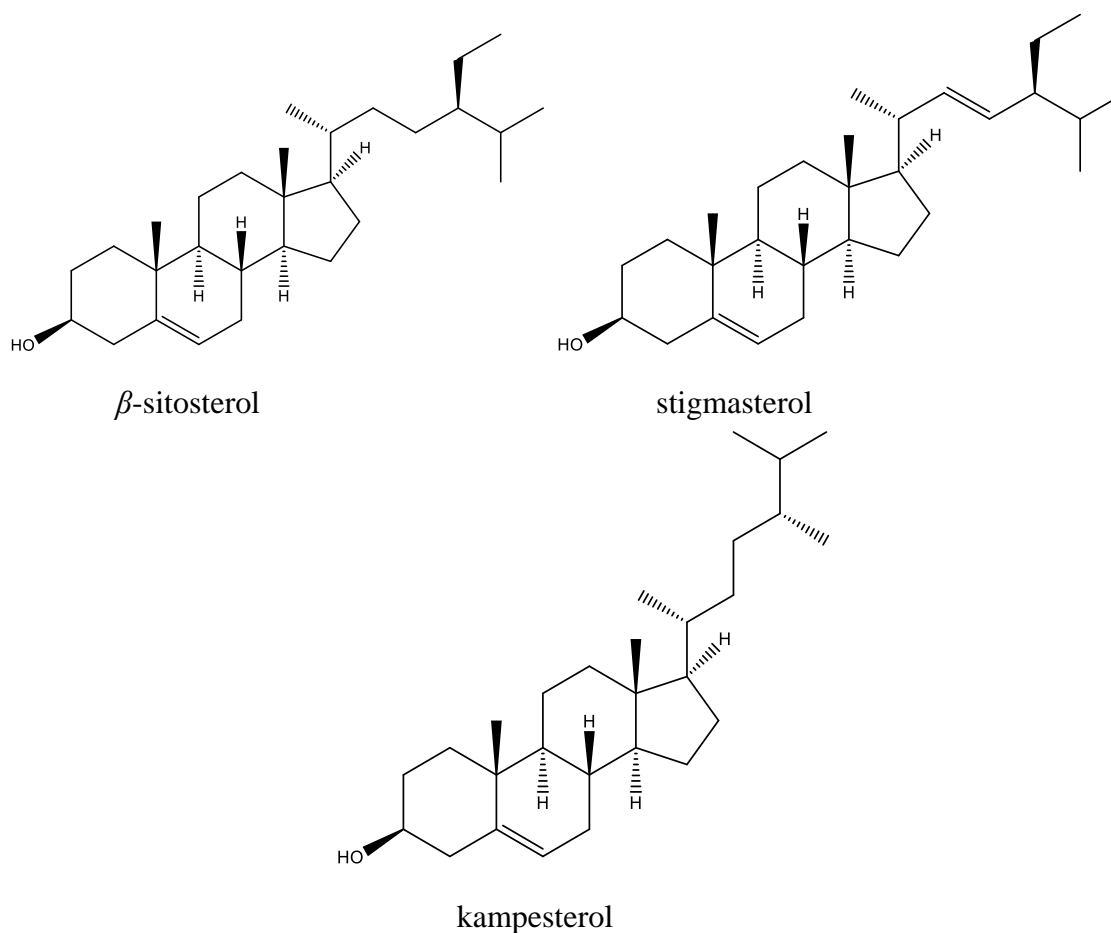
**Slika 2.5.6.** Strukturne formule nekih seskviterpena u etarskom ulju *Salvia sclarea* L.

U nekim etarskim uljima muskatne žalfije zabeleženo je prisustvo *trans*-anetola u količini do 40,08 mg/ml (Valgimiglib i sar., 2002), di-etil-*o*-ftalata (34,90%) (Cai i sar., 2006) i 1-metoksiheksan-3-tiola (van de Waal M i sar., 2002).

Da bi etarsko ulje muskatne žalfije (*Salviae sclareae aetheroleum*) bilo farmakopejskog kvaliteta sadržaj  $\alpha$ - i  $\beta$ -tujona treba da bude maksimum 0,2%, linalola 6,5-24%, linalil-acetata 56-78%,  $\alpha$ -terpineola maksimum 5%, germakrena D 1-12% i sklareola 0,4-2,6%, a temperatura čuvanja ne bi trebalo da prelazi 25C° (Ph. Eur. 9,0, 2017).

### Fitosteroli

Od fitosterola u acetonskim ekstraktima herbe i korena muskatne žalfije zabeleženo je prisustvo  $\beta$ -sitosterola, dok je u kultivisanom korenu identifikovan i stigmasterol i kampesterol (Ulubelen i sar., 1994; Ulubelen i sar., 1997; Kuzma i sar., 2006) (Slika 2.5.7).



Slika 2.5.7. Strukturne formule fitosterola identifikovanih u ekstraktima *Salvia sclarea* L.



### Sadržaj masnih kiselina

Kara i saradnici (2010) su analizirali sadržaj ukupnih lipida i masnih kiselina u različitim delovima muskatne žalfije sa područja Turske. Najviši nivo ukupnih lipida kvantifikovan je u plodićima, orašicama, (29,38%), što je i očekivano s obzirom na specifičan sastav ploda i semena koje je zbog ishrane klice uvek bogato masnim materijama, proteinima i ugljenim hidratima (Jančić, 2002). U ostalim biljnim delovima je sadržaj lipida značajno niži, npr. u listovima 9,42%, u cvetovima 7,04% i u celoj biljci 6,26%. U ovom biljnom materijalu identifikovane su 32 masne kiseline. Najzastupljenije masne kiseline bile su linolenska, oleinska i linolna kiselina u orašicama, (52,03%, 22,25%, i 15,83%, redom), palmitinska kiselina u listovima (16,06%) i stearinska kiselina u celoj biljci (9,07%) (Kara i sar., 2010). Orašice muskatne žalfije su stoga od velikog značaja sa nutritivnog aspekta i mogu zameniti trenutno mnogo korišćenije orašice španske žalfije ili čie, *Salvia hispanica* L. U orašicama muskatne žalfije je odnos masnih kiselina  $\omega 3:\omega 6$  nešto veći, i značajno je viši nivo oleinske kiseline. Sadržaj masnih kiselina u orašicama prikazan je u Tabeli 2.5.1. (Nativ i sar., 2006).

U orašicama turske muskatne žalfije najzastupljenija je bila linolenska kiselina (38,6%), a sledile su je oleinska (19,4%) i linolna kiselina (18,1%) (Azcan i sar., 2004). Preko 60% linolenske kiseline zabeleženo je u uzorcima orašica sa područja Francuske, kao i 14,6% linolne i 13,5% oleinske kiseline (Ferlay i sar., 1993). U istraživanju Živković i saradnika (2017) je u plodovima takođe dominantna bila  $\alpha$ -linolenska sa zastupljenošću od 54%. Ovi autori su utvrdili da orašice sadrže veliku količinu tokola od kojih je  $\gamma$ -tokoferol najprisutniji, kao i karotenoida sa luteinom kao dominantim. Taarit i sar., (2012) su ispitivali masno-kiselinski sastav listova muskatne žalfije sa tunižanskog područja i pratili njegovu promenu u odnosu na porast saliniteta zemljišta. Veliki nutritivni značaj listova muskatne žalfije ogleda se u prisustvu niskih koncentracija zasićenih masnih kiselina, i povoljnog niskog odnosa  $\omega 6:\omega 3$  masnih kiselina. Dominantne masne kiseline bile su  $\alpha$ -linolenska i palmitinska kiselina. Značajno je da je koncentracija od 25 mM NaCl smanjila udeo zasićenih masnih kiselina i povećala sadržaj mono- i poli- nezasićenih masnih kiselina u listu. Sa druge strane, porast na 50 mM i 75 mM NaCl je uzrokovao suprotne efekte koje se najverovatnije pripisuju inhibicijom enzimske aktivnosti desaturaza (Taarit i sar., 2012).

**Tabela 2.5.1.** Sadržaj masnih kiselina u plodovima *Salvia sclarea* L. (Nativ i sar., 2006)

MASNA KISELINA	OPSEG KONCENTRACIJA (%)
palmitinska kiselina	6,8-8,0
stearinska kiselina	1,9-2,6
oleinska kiselina	24,7-25,2
linolna kiselina	12,1-14,8
linolenska kiselina ( $\omega$ 3)	49,9-56,0
linolenska kiselina ( $\omega$ 6)	0-0,2
gadoleinska kiselina	0,6
behenska kiselina	0,1
lignocerinska kiselina	0,1
$\omega$ 6: $\omega$ 3 odnos = 3,95%	

### Sadržaj mineralnih materija

Mineralni sastav muskatne žalfije detaljno je analiziran u biljnom materijalu iz Mađarske. Szentmihalyi i saradnici (2009) su zabeležili značajno prisustvo kalijuma, kalcijuma i magnezijuma (Tabela 2.5.2). Autori posebno ističu visok sadržaj hroma u svim delovima biljke, cinka u braktejama, kao i litijuma u listovima i krunici sugerišući da ovaj mineral može doprineti efektima koje *S. sclarea* ispoljava na centralni nervni sistem. Sa toksikološkog aspekta, značajna je akumulacija olova (>2 mg/kg) u listovima, braktejama i čašici (Szentmihalyi i sar., 2009).

Mineralni profil orašica muskatne žalfije (Tabela 2.5.3) je veoma povoljan u smislu visokog sadržaja kalijuma (1290 mg/100 g), kalcijuma (928 mg/100 g), magnezijuma (360 mg/100 g), mangana (4,3 mg/100 g) i selena (60  $\mu$ g/100 g), čije su količine približne dnevnim preporučenim dozama (Nativ i sar., 2006).

**Tabela 2.5.2.** Mineralni sastav lista, brakteja, ploda, krunice i čašice (mg/kg) *Salvia sclarea* L. iz Mađarske (Szentmihalyi i sar., 2009)

MINERAL	LIST	BRAKTEJA	PLOD	KRUNICA	ČAŠICA
Al	174,2±5,6	236,1±2,2	9,4±0,21	104,3±1 6	345,5±4,8
B	17,23±1,13	44,01±0,89	17,11±1,02	24,02±0,0	36±0,0
Ca	11925±125	29165±69	48574±248	6628±164	19169±87
Cr	0,31±0,11	0,51±0,05	0,10±0,01	0,13±0,02	0,19±0,01
Cu	7,1±0,5	8,8±0,2	15,2±0,9	12,6±1,0	9,3±0,6
Fe	289,3±23	413,9±31,1	43,5±2,4	175,6±9,5	486,6±15,1
K	14758±125	29268±96	10014±85	26058±147	13237±113
Li	9,91±1,02	1,06±0,02	3,91±0,21	11,05±0,96	4,24±0,11
Mg	2021±16	4126±54	3110±97	2623±114	3704±99
Mn	14,2±0,56	40, 9±1,41	30,4±1,36	20,1±2,11	32,7±0,98
Mo	0,42±0,01	2,53±0,14	0,73±0,08	0,78±0,03	0,51±0,04
Na	390,2±2,8	340,3±6,8	62,6±1,9	71,3±4,7	390,9±6,4
Ni	1,30±0,05	0,69±0,03	0,29±0,04	3,11±0,021	2,06±0,07
P	2624±114	3611±96	6206±75	3101±165	2309±54
Pb	1,91±0,13	3,44±0,31	0,15±0,01	0,21±0,02	4,06±0,02
V	0,60±0,02	2,61±0,09	0,14±0,01	0,28±0,01	0,65±0,04
Zn	19,2±1,0	121,5±1,6	40,6±2,7	24,9±1,4	20,4±0,9

### Sadržaj aminokiselina

Sadržaj aminokiselina je detaljno istražen u plodovima muskatne žalfije. Orašice su odličan nutritivni izvor esencijalnih amino kiselina koje zadovoljavaju čak 50-160% od USRDA (preporučene dnevne doze u Sjedinjenim Američkim Državama). Dominantne esencijalne aminokiseline su treonin, izoleucin, leucin, lizin, fenilalanin i arginin, a prisutne su i histidin, valin i metionin (Nativ i sar., 2006).

U orašicama *S. sclarea* je otkriveno i prisustvo lektina, dimernog glikoproteina, koji se sastoji iz sedamnaest aminokiselina. Dominantna aminokiselina je glicin, a u značajnom procentu su prisutni serin, treonin i asparaginska kiselina (Medeiros i sar., 2000; Piller i sar., 1986).

**Tabela 2.5.3.** Mineralni profil (mg/100 g) plodova *Salvia sclarea* L. (Nativ i sar., 2006)

MINERAL	KONCENTRACIJA	MINERAL	KONCENTRACIJA
Al	2,2	Mg	360 (400)
Ag	<0,05	Mn	4,3 (4)
B	1,4	Mo	0,06
Ba	2,3	Ni	<0,05
Be	<0,01	Na	17,3
Ca	928 (1000)	P	682
Cd	<0,01	Pb	<0,05
Co	<0,05	S	261
Cr	0,03	Se	0,06 (0,06)
Cu	1,9 (2)	Sr	2,2
Fe	8,4	Ti	<0,03
Hg	0,07	V	<0,03
K	1290 (2500)	Zn	5,6
Li	<0,09	* u ( ) su date dnevne preporučene doze u mg prema USRDA	

USRDA - preporučene dnevne doze u Sjedinjenim Američkim Državama

## 2.6. ANTIOKSIDANTI

Primena sintetskih antioksidanata, kao što su npr. butilhidroksitoluen (BHT) i butilhidroksianizol (BHA), doprinosi održavanju kvaliteta prehrambenih i kozmetičkih proizvoda, međutim sigurnost i bezbednost njihove upotrebe je danas vrlo diskutabilna (Brewer, 2011). Zbog brojnih prednosti koje pružaju kada se koriste kao prirodni antioksidanti u odnosu na sintetske, biljke i biljni proizvodi proteklih godina često nalaze svoje mesto u industriji (Kostić i sar., 2015). Aromatično bilje i začini se tradicionalno definišu kao deo biljke koji se koristi u ishrani zbog svojih aromatičnih karakteristika, bez ili sa niskom hranljivom vrednošću. S druge strane, u današnje vreme aromatične biljne vrste i začini se definišu i kao izvori različitih fitojedinjenja, od kojih mnoga ispoljavaju moćnu antioksidativnu aktivnost i stoga mogu imati važnu ulogu u antioksidantnoj odbrani i redoks signalizaciji (Paur i sar., 2011).

Postoji više različitih reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) koji imaju odvojene i značajne uloge u normalnoj fiziologiji i neophodni su za različite biohemijske procese. Sa druge strane, različite ROS su takođe uključene i u etiologiju bolesti kao što su kanceri, ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti, infekcije, hronična inflamatorna oboljenja, dijabetes i autoimune

bolesti. Različiti endogeni antioksidanti koje proizvodi organizam (npr. glutation, tioredoksini, različiti antioksidativni enzimi) imaju specifične hemijske i fiziološke karakteristike koje obezbeđuju da svi delovi ćelija, organa ili tkiva budu zaštićeni od oksidativnog oštećenja. Prirodni antioksidanti se u ishrani takođe nalaze u različitim oblicima, pri čemu su polifenoli i karotenoidi najveća grupa tih molekula. Ova jedinjenja imaju različite funkcije, a biljke ih proizvode kako bi zaštitile svoje ćelije od oksidativnog oštećenja kiseoničnih radikala i ekscitovanih molekula (Paur i sar., 2011). Oksidacija polifenola, polifenoloksidazom, dovodi do nastajanja polimera koji štiti biljno tkivo, kao i do nastajanja lignina (Milić i sar., 2000).

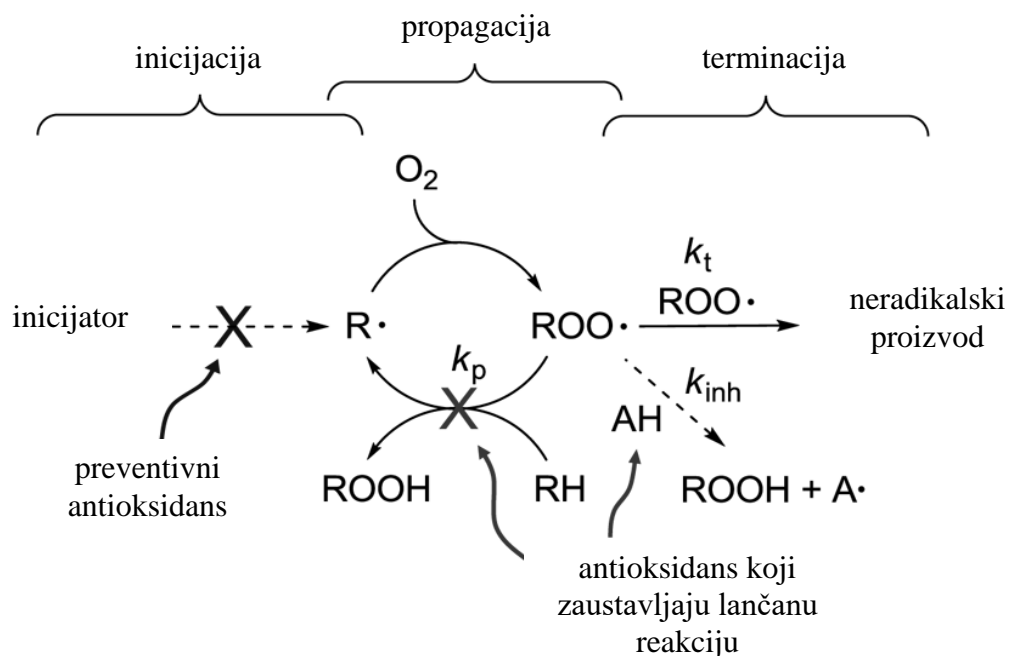
Slobodni radikali se karakterišu prisustvom nesparenog elektrona u spoljašnjoj orbiti zbog čega su vrlo reaktivni (npr. superoksid  $OO\cdot$  i hidroksi radikal  $HO\cdot$ ). Takođe, na organizam deluje i klasa neradikalnih jedinjenja, npr. vodonik-peroksid ( $H_2O_2$ ) ili peroksininitrit-jon ( $ONOO\cdot$ ), koji svoje efekte ispoljavaju na sličan način kao slobodni radikali, iako nemaju nesparene elektrone (Tabela 2.6.1) (Đukić i sar., 2008). Proizvodnja slobodnih radikala može biti posledica endogenih ili egzogenih stimulusa, uključujući ultraljubičasto (UV) zračenje, izlaganje toksinima iz okoline, hemoterapiju ili prekomernu fizičku aktivnost. Međutim, proizvodnja ROS se odvija i u različitim delovima ćelije iz enzima poput nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, dualne oksidaze (DUOX), ksantin oksidaze, azot-oksida (NO) sintaze (NOS), kao i tokom transporta elektrona u mitohondrijama tokom proizvodnje energije. Pri nekontrolisanoj produkciji ROS molekula nastupa oksidativni stres kada dolazi do oksidacije proteina, enzima DNK što vodi razvoju hroničnih degenerativnih bolesti (Paur i sar., 2011).

Reakcija peroksidacije koja je praćena dekompozicijom ili polimerizacijom nezasićenih masnih kiselina odvija se odvajanjem vodonika sa aktivirane metilenske grupe, susedne nezasićenoj vezi. Tada se formira radikal sa kiseonikom u triplet stanju i stvara lipidni peroksi ( $ROO\cdot$ ) radikal. Supresione efekte na lipidnu peroksidaciju pokazuju vitamin E, C i B, kao i  $\beta$ -karoten, kao i endogeni molekuli mokraćna kiselina i bilirubin (Milić i sar., 2000).

**Tabela 2.6.1.** Reaktivne kiseonične vrste: kiseonični radikali i neradikalaske kiseonične vrste  
(Cohen i Nyska, 2002)

Naziv	Simbol
Kiseonični radikali	
Kiseonik (bi-radikal)	$O_2^{\cdot\cdot}$
Superokid-anjon	$O_2^{\cdot-}$
Hidroksil	$OH^{\cdot}$
Peroksil	$ROO^{\cdot}$
Alkoksil	$RO^{\cdot}$
Azot-oksidi	$NO^{\cdot}$
Neradikalaske kiseonične vrste	
Vodonik-peroksid	$H_2O_2$
Organski peroksidi	$ROOH$
Hipohlorna kiselina	$HOCl$
Ozon	$O_3$
Aldehidi	$HCOR$
Singletni kiseonik	$^1O_2$
Peroksi-nitrit	$ONOOH$

Antioksidantna jedinjenja su sposobna da usporavaju ili odlažu proces oksidacije čak i kada se koriste u malim koncentracijama (<1%, obično 1-1000 mg/l). Reakcija oksidacije počinje inicijalnim radikalom ( $R^{\cdot}$ ), koji vezuje kiseonik i formira peroksi radikal ( $ROO^{\cdot}$ ) (Slika 2.6.1) koji je sposoban da napada nove molekule formirajući opet nove slobodne radikale. Ovakve reakcije se ciklično ponavljaju sve dok se radikali slučajno ne sretnu i ne formiraju "neradikalaske" proizvode. Antioksidantna sredstva koja sprečavaju stvaranje inicijalnog radikala su preventivni antioksidansi (npr. enzim katalaza, helatori metalnih jona). Pored njih postoje antioksidansi (AH) koji zaustavljaju ili usporavaju lančane reakcije koje podrazumevaju doniranje vodonika i neutralisanje  $ROO^{\cdot}$  radikala stvarajući  $ROOH$  molekul (npr. fenolna jedinjenja). Takođe, postoje i indirektni antioksidansi koji su zapravo molekuli koja povećavaju aktivnost ili ekspresiju enzima koji su zaduženi za ovakvu aktivnost u živim sistemima (Amorati i sar., 2013).



**Slika 2.6.1.** Primer mehanizma oksidacije (formiranje peroksil radikala) i antioksidativne zaštite (Amorati i sar., 2013).

U poslednje vreme razne studije upućuju na to da je unos jednog antioksidanta, kao što je npr. visoka doza vitamina C, vitamina E ili  $\beta$ -karotena, bez velikog značaja. Alternativna i potencijalno efikasnija borba protiv ROS molekula bila bi, zapravo, kombinacija različitih antioksidativnih jedinjenja. Dijetetski antioksidansi mogu biti veoma korisni jer mogu zaštititi organizam od prekomernog oksidativnog stresa i smanjiti rizik od hroničnih oboljenja, bez ugrožavanja normalnih funkcija kiseoničnih vrsta (Blomhoff, 2005). Iako se zaštitni efekti prvenstveno pripisuju poznatim antioksidantima poput vitamina C, vitamina E ili  $\beta$ -karotena, biljni fenoli takođe mogu igrati značajnu ulogu u zaštiti od slobodnih kiseoničnih vrsta. Polifenoli pokazuju širok spektar bioloških efekata koji najčešće uključuju antibakterijske, antivirusne, antiinflamatorne, antialergijske, hepatoprotektivne, antitrombotične, antikancerogene i vazodilatatorne aktivnosti, a mnoge od ovih bioloških funkcija su pripisane eradikaciji slobodnih radikala (Soobrattee i sar., 2005). Hranom se mogu uneti dovoljne količine  $\beta$ -karotena, likopena, luteina, zeaksantina, flavonoida, fenolnih kiselina, proantocijanidina, stilbena, kumarina i drugih fitojedinjenja koji su sposobni da doniraju vodonik sa svojih

hidroksilnih grupa, stabilišu nesparene elektrone i heliranju jone metala (Blokhina i sar., 2003; Carlsen i sar., 2010).

U studiji Carlsen i saradnika (2010) ispitivan je sadržaj ukupnih antioksidativnih jedinjenja u hrani i jasno je zaključeno da je hrana biljnog porekla odličan, odnosno, najbogatiji izvor antioksidanasa, u poređenju sa životinjskim i mešovitim prehrambenim proizvodima. Autori posebno naglašavaju da se začini, lekovito bilje i biljni preparati odlikuju visokim antioksidativnim sposobnostima. Iako imaju relativno mali udeo u hrani, oni snažno doprinose antioksidativnom delovanju, a posebno u kulturama gde se redovno koriste. Rezultati istraživanja pokazuju da karanfilić ima najviši potencijal, a slede ga nana, piment, cimet, origano, timijan, žalfija, ruzmarin, šafran i estragon, svi u osušenom obliku (Carlsen i sar., 2010).

Paur i saradnici (2011) napominju da nije svaki izvor antioksidanasa u isto i vreme dobar bioaktivni izvor, ili da su svi antioksidanti koji su u njemu bioaktivni. Biološka raspoloživost se u velikoj meri razlikuje od jednog do drugog jedinjenja tako da najsnažnija antioksidativna hrana nije nužno ona koja vodi do najvećih koncentracija aktivnih metabolita u ciljnim tkivima. Antioksidanti uključuju hemijski različita jedinjenja kod kojih postoje razlike u apsorpciji, metabolizmu, transportu i izlučivanju i preuzimanju od strane ćelija (Paur i sar., 2011).

Biljne vrste familije Lamiaceae su značajni izvori polifenola i prirodnih antioksidanata, posebno vrste roda *Salvia* (Tepe i sar., 2006). Ove vrste se karakterišu prisustvom brojnih polifenola od kojih su najčešće prisutne ruzmarinska, kafena, karnozolna i salvianolična kiselina, luteolin, apigenin, salvigenin, karnozol, rozmanol, epirozmanol, rozmadial i metil-karnozat (Lu i Foo, 2002; Tepe i sar., 2006). Mnoge *in vitro* studije ukazuju na odlična antioksidativna svojstva ekstrakata i etarskih ulja biljnih vrsta roda *Salvia* koja su veoma često u snažnoj korelaciji sa sadržajem aktivnih sekundarnih metabolita (Alimpić, 2016).

## 2.7. MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi pripadaju velikoj i vrlo heterogenoj grupi organizama u koju se ubrajaju bakterije, virusi, mikroalge, mikrogljive i protozoe. Sve pripadnike mikroorganizama karakteriše više zajedničkih osobina, a to su najpre male dimenzije, a potom i velika brzina razmnožavanja i visoka sposobnost metaboličke adaptacije. Najbrojnija grupa mikroorganizama jesu bakterije koje su kosmopoliti i nastanjuju zemljište, vazduh, vodu, ali i sredine koje nisu povoljne za život drugih vrsta živih organizama (Mihajilov-Krstev, 2009). Na organizam čoveka mikroorganizmi



ispoljavaju pozitivne efekte koristeći produkte nekih metaboličkih procesa, čisteći organizam od "nus" produkata, sintetišući neke vitamine i aminokiseline, obezbeđujući nespecifičnu rezistenciju i štiteći organizam od drugih vrsta patogena. Uprkos tome, danas oni predstavljaju jedan od najvećih medicinskih problema jer je veliki broj njih štetan po čoveka i izaziva ozbiljne infektivne procese (Karakašević, 1977). U patogene mikroorganizme se ubrajaju patogeni paraziti i patogeni saprofiti. Prva grupa za svoju ishranu koristi metabolite domaćina ili žive ćelije dok druga grupa živi u okolnoj sredini domaćina i u njega dospevaju nekim pasivnim putem, preko rana, kontaminacijom vode ili hrane i sl. (Mihajilov-Krstev, 2009).

Bakterije predstavljaju prokariotske organizme vrlo jednostavne građe. Najveći broj bakterija nalazi se u crevnoj flori, kao i na koži čoveka. Velika većina u telu je bezopasna, međutim mnoge su i toksične i mogu biti izazivači različitih infekcija (Huttenhower i sar., 2012). Toksičnost ovih mikroorganizama zasniva se na sintezi toksina koji se mogu lučiti u spoljašnju sredinu (egzotoksini) ili su deo bakterijskog ćelijskog zida (endotoksini). Egzotoksini se sintetišu kod živih i fiziološki normalnih patogenih bakterija. Po prirodi su proteini koji se denaturišu povišenom temperaturom, UV zračenjem, jakim kiselinama ili bazama, solima teških metala ili enzimima pa su stoga inaktivni kad se unose *per os*. Izuzetak čini botulin koga sintetiše bakterija *Clostridium botulinum*. Za egzotoksine je karakteristična veoma dobra antigenost koja se zadržava i nakon njihove dezintegracije, što je posebno od značaja za veštačku imunizaciju protiv nekih bolesti (npr. tetanus i difterija). S druge strane endotoksini su sastavni delovi ćelija i oni se iz bakterije oslobađaju tek nakon lize ćelije. Za razliku od egzotoksina, endotoksini nisu osetljivi na faktore denaturacije, manje su toksičnosti i slabije antigenosti. Endotoksini salmonela, šigela, ešerihija i ostalih Gram-negativnih bakterija izazivaju tipične znake trovanja kao što su prolivi, povraćanja, povišena temperatura ali i kongestija, hiperglikemija, edemi, krvarenje u crevima i trbušnim organima (Karakašević, 1977; Mihajilov-Krstev, 2009).

Kvasci, jednoćelijske gljive, predstavljaju eukariotske organizme koji na svojoj površini poseduju ćelijski zid od glukana, hitina, manoproteina i proteina ćelijskog zida. Oni su saprofitni mikroorganizmi i mnogi od njih vode parazitski način života. Takođe, kvasci su i fakultativni anaerobi jer opstaju i u aerobnoj i u anaerobnoj sredini. Vrlo su rasprostranjeni u vazduhu, vodi, zemljištu, u plodovima voća i povrća itd. (Carlile i sar., 2001).

### 2.7.1. Gram-pozitivne bakterije

#### *Staphylococcus aureus*

Stafilokoke su medicinski veoma značajne bakterije. Posebno su značajne *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* i *S. saprophyticus*. One su loptastog oblika, a raspoređuju se u vidu grozdova. Većina stafilokoka nema kapsulu, nepokretne su, ne obrazuju endospore i fakultativni su anaerobi. Gram-pozitivne su, međutim patogeni sojevi mogu biti i Gram-varijabilni (Mihajilov-Krstev, 2009; Taylor i Unakal, 2017). Vrlo je značajno da su stafilokoke veoma otporne bakterije koje mogu izdržati temperature od 60°C sat vremena, a neke čak i 80°C. Takođe, rezistentne su i prema sušenju, i prema visokim koncentracijama šećera i natrijum-hlorida. Veoma su rasprostranjene pa se mogu naći u vodi, vazduhu, prašini, na namirnicama i raznim predmetima. Neke od njih se nalaze na koži ili u nosnoj šupljini zdravih ljudi kao deo normalne flore (Mihajilov-Krstev, 2009).

Patogene stafilokoke su piogeni mikroorganizmi koji sintetišu razne enzime i toksine, i mogu izazvati infekciju svih tkiva i organa, a najčešće kožne infekcije, rinitis, laringitis, pneumoniju, ali i osteomijelitis, artritis, pleuritis, meningitis, endokarditis, gastroenteritis, flebitis, mastitis i stafilokoknu sepsu. Stafilocokni enterotoksini mogu biti i uzročnici alimentarnih infekcija. Infekcije se prenose direktnim ili indirektnim kontaktom, najčešće vazdušnim putem preko nazalnog i nazofaringealnog sekreta, gnoja ili drugih lučevina. Stafilocokni enterotoksini se prenose putem namirnica sa visokim sadržajem natrijum-hlorida i šećera. Ovi mikroorganizmi su dugo i jako bili osetljivi na peniciline, međutim razvitkom rezistencije njihova je efikasnost značajno smanjena. Stoga se danas koriste noviji polusintetski derivati penicilina, eritromicin, kanamicin (Foster, 1996; Karakašević, 1977; Taylor i Unakal, 2017).

*S. aureus* ili zlatni stafilocok je dobila ime po zeleno-žutim kolonijama. Veoma je patogena bakterija i čest je izazivač mnogih infekcija. Ona je fakultativno anaerobna bakterija koja u svom zidu sadrži dosta mureina koji je vezan sa tejhajnom kiselinom i polisaharida, a u ćelijskoj membrani lipotejhajnu kiselinu. Ove supstance aktiviraju sistem komplemenata i makrofage. Sposobna je da sintetiše koagulazu i katalazu, a od toksina produkuje protein A, faktor nagomilavanja, fibronektin-vezujući protein,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - i  $\delta$ - toksine, superantigeni egzotoksin, enterotoksine A-E, H, G i I. Vrlo su otporne na toplotu, opstaju čak pola sata na temperaturi od 100°C (Mihajilov-Krstev, 2009). Zlatni stafilocok naseljava kožu i sluzokožu,

naročito kod hospitalizovanih pacijenata. Infekcije koje izaziva mogu biti invazivne i intoksikacijske, ali mogu biti kombinovane. Procenjuje se da je oko polovina svih odraslih osoba kolonizovano, i da su oko 15% populacije perzistentni nosioci ove bakterije. Za terapiju je važno da se koriste antibiotici koji su otporni na  $\beta$ -laktamazu. Zbog masovne upotrebe antibiotika javio se veliki broj rezistentnih sojeva, a najpoznatiji je MRSA (meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*). MRSA infekcije se karakterišu značajnim morbiditetom i mortalitetom u opštoj populaciji, a naročito su zastupljene u bolničkim uslovima. U terapiji ovih infekcija se stoga koriste svega par antibiotika sa glikopetidnom strukturom npr. vankomicin (Boucher i Corey, 2008; Foster, 1996; Taylor i Unakal, 2017).

### *Enterococcus faecalis*

Enterokoke su Gram-pozitivne anaerobne koke koje mogu preživeti teške uslove u prirodi. Mogu se naći u tlu, vodi i biljkama. Neki sojevi se koriste u proizvodnji hrane, dok su drugi uzrok ozbiljnih infekcija kod ljudi i životinja (npr. kolonizacija gastrointestinalnog i genitalnog trakta ljudi). Enterokoke mogu rasti u temperaturnom opsegu od 10 do 42°C i u sredinama sa širokim pH vrednostima. Neki od predstavnika ovog roda su pokretni. Iako postoji preko 15 vrsta roda *Enterococcus*, 80-90% kliničkih izolata jeste *E. faecalis*. Ove bakterije obično formiraju kratke lance ili su raspoređeni u parovima. Međutim, pod određenim uslovima rasta, one se izdužuju i postaju kokobacili (Mihajilov-Krstev, 2009). Kod bakterije *E. faecalis* tri glavne komponente čine ćelijski zid: peptidoglikan, tejhojna kiselina i polisaharid. *E. faecalis* je generalno nekapsulirana, međutim izolati poseduju kapsularni polisaharid (de la Maza i sar., 2004). Ova bakterija takođe ima sposobnost da formira površinske pile koji mogu dovesti do formiranja biofilma. Sojevi koji uzrokuju endokarditis sadrže velike količine ovih pila koje omogućuju vezivanje za površinu srčanog tkiva (Nallapareddy i sar., 2006).

*E. faecalis* je čest uzrok nozokomijalnih infekcija. Ove infekcije mogu biti lokalne ili sistemske i zahvataju najčešće urinarni trakt, ali se javljaju i abdominalne infekcije, infekcije rana, bakteremija i endokarditis. *E. faecalis* je sposobna da preživi razne faktore životne sredine kao što su ekstremne temperature i može sticati otpornost na višestruke antibiotike. Zbog toga je ova bakterija veliki zdravstveni problem danas (Murray, 1998). Najčešći način na koji *E. faecalis* uzrokuje infekcije u bolnicama je prenos bakterije između pacijenata ili preko ruku zdravstvenih radnika. Ova bakterija uglavnom izaziva infekcije urinarnog trakta u obliku cistitisa, prostatitisa i

epididimitisa. Ona može izazvati i nozokomijalnu bakteremiju čiji je izvor urinarni trakt, a koji se javlja od inficiranog intravenoznog katetera. Endokarditis je najozbiljnija enterokokna infekcija, kod koje je međutim u mnogim slučajevima lečenje antibioticima bez uspeha i u tom slučaju je neophodna hirurška intervencija. Retki oblici infekcije su meningitis, osteomijelitis, septični artritis i vrlo retko pneumonija. Zbog multirezistentnosti enterokoka na mnoge antibiotike, lečenje ovih infekcija je teško (Gilmore, 2002).

Bakterije roda *Enterococcus* su rezistentne ili smanjeno osetljive prema mnogim antimikrobnim lekovima uključujući i one koje deluju na zidove bakterijske ćelije: aminoglikozidi, penicilin, ampicilin, cefalosporini, i vankomicin, a *E. faecalis* je takođe otporan i na teikoplanin. Enterokokni izolati sa smanjenom osetljivošću na vankomicin su poznati pod nazivom "enterokoke otporne na vankomicin (vancomycin-resistant strains)" ili "VRE" i mogu se kategorizovati kao vanA, vanB i vanC. VanA i vanB predstavljaju najveću pretnju, jer su oni najodrživiji i geni otpornosti se prenose na plazmid. Sojevi enterokoka koji su osetljivi na vankomicin su ređi i manje česti od sojeva rezistentni na vankomicin (Kristich i sar., 2014; Murray, 1998; Paulsen i sar., 2003).

### ***Streptococcus pneumoniae***

Streptokoke su generalno vrlo heterogena grupa bakterija. Loptastog su oblika (koke) i raspoređuju se u vidu dužih ili kraćih lanaca. Ove bakterije nisu pokretne i pripadaju fakultativno anaerobnim mikroorganizmima. U svom ćelijskom zidu streptokoke sadrže C-supstancu koja je po hemijskoj strukturi polimer ugljenih hidrata i čija se građa razlikuje kod različitih vrsta streptokoka. Gnojne infekcije izazivaju piogene streptokoke, a javljaju se i oralne streptokoke kao i enterokoke (Mihajilov-Krstev, 2009).

*Streptococcus pneumoniae* (pneumokok) je aerobna ili fakultativno anaerobna, okruglasta bakterija koja raspoređena u parove obrazuje formu kapljice ili plamena sveće. Za virulentnost su zaduženi proteini pneumokoka kao i kapsula, izgrađena od polisaharida, koja se javlja oko parova koka, a koja se gubi gajenjem na hranljivim podlogama. Ova kapsularna supstanca nije toksična, ali prodire u tkivo pri čemu neutrališe antitela koja se stvaraju protiv pneumokoka. Pili omogućavaju prijanjanje mikroorganizma na ćelijske površine i stoga igraju ulogu u infekciji domaćina. Pneumokoke nastanjuju gornje disajne puteve gde predstavljaju deo bakterijske flore, međutim kod oslabljenog imenskog sistema ili usled drugih infekcija one se umnožavaju, šire i

izazivaju infekciju. Najčešće infekcije pneumokokama su pneumonija, sinuzitis, otitis, meningitis, artritis, peritonitis, perikarditis, endokarditis, bakteremija itd. Smatra se da je najveći broj pneumonija na svetskom nivou uzrokovan upravo pneumokokom. Veliki broj sojeva pneumokoka je posato rezistentan na penicilin G, pa se terapija sprovodi vankomicinom, cefalosporinima novije generacije, makrolidima, fluorohinolonima. Inače su ove bakterije u spoljašnjoj sredini prilično osetljive jer ih uništava temperatura od 50°C, fenol, teški metali, kalijum-permanganat, deterdženti, sapuni i razna dezinfekciona sredstva, dok zaklonjeni od sunčevog svetla i u sasušenom sputumu mogu opstati i više meseci. Izvor zaraze je kliconoša sa nazofaringealnim sekretom i sputumom, pa se uzročnik najčešće prenosi kapljično, preko vazduha ili predmetima opšte upotrebe (Dion i Ashurst, 2018; Mihajilov-Krstev, 2009).

### ***Streptococcus pyogenes***

Piogeni streptokok ( $\beta$ -hemolitički streptokok grupe A) je loptasta ili ovalna, nepokretna, bez flagela (na površini se mogu uočiti vrlo kratke fimbrije) i fakultativno anaerobna bakterija. Odgovorna je za 90% svih streptokoknih infekcija. Na njenu patogenost utiču enzimi i toksične supstance koje stvara:

- pirogeni toksini A, B i C koji snažno aktiviraju imunski sistem oslobađanjem proinflamatornih medijatora pa dovode do osipa kod šarlaha ili septičnog šoka;
- streptolizini O i S koji su vrlo toksični, uništavaju ćelijsku membranu, i za dan ili dva nakon infekcije izazivaju degeneraciju napadnutog organa;
- eritrogeni toksin koji je uzročnik šarlaha ili skarlatine koji se sintetiše u nazofaringealnom tkivu odakle prelazi u krvotok i disitribuiše se po organizmu, deluje na vaskularni endotel i na ćelije jetre i bubrega.

Od enzima *S. pyogenes* produkuje streptokinazu koja razlaže fibrin, dezoksiribonukleazu koja razara molekule DNK i hijaluronidazu koja razlaže hijaluronsku kiselinu (Mihajilov-Krstev, 2009).

Prema faktorima spoljašnje sredine je slabo otporna, međutim u sasušenom stanju može dugo ostati virulentna (na temperaturama od preko 45°C ne može opstati). Na njenoj površini nalazi se kapsula koja sadrži kapsularnu supstancu koja sadrži hijaluronsku kiselinu. U zidu ove bakterije nalaze se specifični antigeni M, T i R. Faktor virulencije je antigen M koji stimuliše proces fagocitoze i produkciju M-antitela. Ispod ćelijskog zida nalazi se C-supstanca, potom

mukopeptidni sloj i citoplazmatska membrana. U samoj ćeliji nalazi se i nukleoproteini poznati kao P-supstanca.

*S. pyogenes* izaziva oboljenja koje se zovu streptokokoze. Ova oboljenja se mogu podeliti u tri grupe:

- erizipel, celulitis, impetigo, infekcije paranazalnih sinusa, angine, meningitis, sepsa – oboljenja sa invazivnim učinkom streptokoka usled prodora i širenja u organizam;
- šarlah, septički šok – oboljenja sa intoksikacijskim učinkom;
- reumatska groznica i akutni glomerulonefritis – oboljenja sa autoimunim učinkom.

Streptokokne ili serilne sekvele, su zapravo postsreptokokna oboljenja (streptokoke grupe A) koja se mogu razviti nedeljama, mesecima ili čak godinama posle infekcije piogenog streptokoka usled autoimunog procesa. Reumatska groznica se može manifestovati karditisom, artritisom, kožnim promenama ili horeom (neurološka manifestacija). Antitela koja se tokom infekcije stvore mogu se vezati za neke ćelije organizma (endokard) ili se kompleksi antigen-antitela mogu taložiti npr. u glomerulima ili zglobovima izazivajući oštećenje (Cunningham, 2016; Mihajilov-Krstev, 2009).

Izvor zaraze piogenim streptokokom su osobe koje ove bakterije nose na sluzokoži nosa ili ždrela. Prenose se direktnim kontaktom, vazduhom ili kapljičnim putem, ili indirektnim putem preko odeće, posteljine, pribora, igraćaka. Antibiotička terapija se zasniva na upotrebi penicilina i bacitracina, a kod pacijenata sa penicilinskom alergijom koriste se antibiotici iz grupe makrolida (Mihajilov-Krstev, 2009).

### ***Bacillus cereus***

Bakterije roda *Bacillus* su uglavnom saprofiti, štapićastog oblika sa zaobljenim krajevima. Većina bakterija iz ovog roda su pokretne i mogu se naći kao pojedinačne, u parovima ili u vidu lanaca. Za njih je karakteristično da obrazuju endospore koje su termorezistentne. Bakterije roda *Bacillus* su aerobi ili fakultativni anaerobi (FDA, 2012).

*Bacillus cereus* je velika bakterija koja proizvodi spore vrlo otporne na visoku temperaturu, sušenje, zamrzavanje ili zračenje. Upravo zbog ovoga, i otpornosti prema

pasterizaciji i *gama* zračenju, *B. cereus* predstavlja ozbiljan problem u prehrambenoj industriji. Bakterija je pokretna i aerob je ili fakultativni anaerob (FDA, 2012; Bottone, 2010).

Izvori ove bakterije su slatka i morska voda, mesta raspadanja organskih materija, kao i intestinalni sistem nekih beskičmenjaka. Od značaja za patogenost ove bakterije su egzoenzimi i toksini hemolizini, fosfolipaze i proteaze (Bottone, 2010). Alimentarne toksikoinfekcije ovom bakterijom se mogu javiti u dva oblika. Jedan oblik se manifestuje vodenastim stolicama praćene bolovima i grčevima. Ovi simptomi nastaju 6-15 sati nakon konzumiranja kontaminiranih namirnica (meso, mleko, riba, povrće), a traju do 24 časa. Drugi oblik toksikoinfekcije se karakteriše povraćanjem koje uzgred može biti praćeno grčevima i dijarejom. Simptomi se javljaju 0,5-6 časova nakon uzimanja kontaminirane hrane (FDA, 2012).

Imunokompromitovani pacijenti su podložniji bakterijemiji, endokarditisu, meningitisu, pneumoniji i endoftalmitisu, a može biti povezan i sa periodontalnim bolestima i drugim ozbiljnijim infekcijama (Hoffmaster, 2006; Wijnands, 2006).

Za lečenje ovih infekcija je bitno znati da penicilini i cefalosporini nemaju značaja usled rezistencije nastale usled sinteze  $\beta$ -laktamaze. Stoga se efikasnim smatraju eritromicin, klindamicin, hloramfenikol, vankomicin, ciprofloksacin, tetraciklini i aminoglikozidi (Bottone, 2010).

### ***Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* je fakultativno anaerobna bakterija štapićastog oblika sa pokretnim flagelama. Izuzetno je termostabilna bakterija pa može da preživi i temperature ispod 1°C na kojoj je čak sposobna i da se razmnožava. Široko je rasprostranjena u vlažnoj sredini, u zemljištu, ili na mestu raspadanja vegetacije. Čelije *L. monocytogenes* mogu da formiraju biofilm, što im omogućava da se kao zajednica priključe na čvrste površine gde proliferišu i postaju izuzetno teški za uklanjanje (Lorber, 1997; Harvey i sar., 2007).

Infekcije koje nastaju usled delovanja *L. monocytogenes*, listerioze, mogu biti vrlo ozbiljne, čak se mogu završiti i letalnim ishodom. Ove infekcije se mogu klasifikovati u dve forme. Prva forma predstavlja neinvazivni oblik gastrointestinalne infekcije koja se javlja kod zdravih ljudi sa dobrim imunskim odgovorom. Tada se javlja febrilni gastroenteritis sa kratkim vremenom inkubacije i trajanjem simptoma od par sati do 2,3 dana. Simptomi mogu biti mučnina, gađenje, povraćanje, dijareja, bolovi u mišićima, groznica. Kod nekih osoba se ovi

simptomi čak i ne razvijaju. Drugi oblik infekcije je ozbiljniji, invazivniji i može dovesti do meningitisa ili sepse. Inkubacija je u ovom slučaju duža, od tri dana do tri meseca. Posebno su ugrožene imunokompromitovane i starije osobe, kao i trudnice. Kod trudnica se javljaju simptomi koji liče na grip, međutim infekcija se može završiti i prekidom trudnoće. Jedna trećina potvrđenih slučajeva infekcije ovom bakterijom, prenešene sa majke na dete, završilo se na ovaj način. S druge strane, živorođena deca mogu oboleti od meningitisa odnosno upale moždanih ovojnica (FDA, 2012; Rouquette i Berche, 2006).

Veliki broj namirnica može biti izvor zaraze bakterijom *L. monocytogenes*: sveže i čokoladno mleko, sirevi, sirovo povrće, živina, meso, kobasice, riba, sladoled itd. Posebno je važno naglasiti da bakterija raste na niskim temperaturama pa predstavlja ozbiljan problem u prehrambenoj industriji (FDA, 2012).

Listerioze se leče *beta*-laktamskim antibioticima pre svega ampicilinom. Kod težih oblika listerioze kao što su bakterijemija, endokarditis ili meningitis, ampicilin se kombinuje sa gentamicinom. Kod pacijenata intolerantni na peniciline tretman se sprovodi trimetoprim-sulfametoksazolom. Cefalosporini, eritromicin, hinoloni i tetraciklini se ne preporučuju u lečenju listerioza jer je njihova efikasnost minimalna. Kod nekih pacijenata koji su lečeni cefalosporinima i vankomicinom je čak dolazilo i do razvijanja listerioznog meningitisa (Lorber, 1997).

### **2.7.2. Gram-negativne bakterije**

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* je štapićasta, aerobna, asporogena, oportunistička, široko rasprostranjena bakterija (namirnice, voda, zemljište, biljke, životinje, ljudi, bolnice, kanalizacija) sa unipolarnom pokretljivošću. Ova bakterija je sposobna da sintetiše i sekretuje endotoksine, egzotoksine, enzime i druga biološka aktivna jedinjenja koja su odgovorna za njenu toksičnost. Flagela koju poseduje je veoma važna u ranim fazama infekcije, jer se njom pripaja i napada tkiva domaćina. Podjednako su značajne i pile koje doprinose adheriranju za mukozne površine i epitelne ćelije. Kod imunokompromitovanih pacijenata može izazvati meningitis, pneumoniju, dermatitis, kao i infekcije urinarnog i gastrointestinalnog sistema i rana (Brooks i sar., 2007; Lederberg, 2000; Mihajilov-Krstev, 2009; van Delden, 2004). *P. aeruginosa* je vodeći Gram-negativni oportunistički patogen u većini medicinskih centara, sa 40-60% smrtnosti.



Takođe, komplikuje tok cistične fibroze i skoro uvek je navedena kao jedna od vodećih tri Gram-negativna patogena (Fick, 1993).

Značajno je to da *P. aeruginosa* ima prirodnu rezistentnost na penicilin i *beta*-laktamske antibiotike zbog specifičnosti građe ćelijskog zida i prisustva pumpe koja izbacuje molekul antibiotika iz bakterijske ćelije. S druge strane, *P. aeruginosa* prilično brzo razvija rezistenciju na antibiotike, pa se danas najčešće koristi kombinovana agresivna terapija aminoglikozidima i antipseudomonalnog 13-laktama ili hinolonima (Mihajilov-Krstev, 2009).

### ***Proteus mirabilis***

*Proteus mirabilis* je Gram-negativna, fakultativno anaerobna bakterija koja se karakteriše pokretljivošću pomoću flagela i sposobnošću samoizolacije i lučenja polisaharida kada je u kontaktu sa čvrstim površinama. Ove osobine joj omogućavaju vezivanje i laku pokretljivost duž površina (npr. medicinske opreme). Značajno je da kolonizaciji doprinosi i sposobnost formiranja biofilмова zbog koje se *P. mirabilis* suprotstavlja i stvara rezistenciju ka odbrani domaćina i ka određenim antibioticima. *P. mirabilis* se prvenstveno nalazi u zemljištu i vodi. Iako je deo normalne crevne flore (zajedno sa *Klebsiella* vrstama i *E. coli*), poznato je da izaziva ozbiljne infekcije kod ljudi. Iako nije uobičajeni uzrok nozokomijalnih infekcija, pokazalo se da vrste roda *Proteus* izazivaju infekciju sa kolonizovane kože i usne sluzokože pacijenata ili osoblja koje rade u bolnicama. Najčešća manifestacija proteusnih infekcija su infekcije urinarnog sistema koje se najčešće javljaju kod žena i osoba između 20 i 50 godina. Faktori koji mogu povećati rizik od *P. mirabilis* infekcija su i duže trajanje kateterizacije, nepravilno čišćenje ili nega katetera, neka primarna bolest i nedostupnost sistemskih antibiotika (Foris i Snowden, 2017).

Ulazak *P. mirabilis* u tkivo domaćina zavisi od aktivnosti njegovih fimbrija koje sadrže određena jedinjenja i polisaharide koji omogućavaju vezivanje za određene lokacije u organizmu domaćina (npr. endotel urinarnog trakta) ili druge nežive površine (npr. medicinski uređaji). Vrste roda *Proteus* takođe proizvode ureazu, za koju se pokazalo da je povezan sa povećanim rizikom od pijelonefritisa i infekcija gornjih partija urinarnog sistema. One hidrolizuju ureu u amonijak, čime alkaliziraju urin stvarajući okruženje u kojem može preživeti. Kao i druge Gram-negativne bakterije, vrste roda *Proteus* oslobađaju endotoksin (deo Gram-negativnog bakterijskog ćelijskog zida) koje mogu napasti krvotok čime pokreću dodatni inflamatorni

odgovor domaćina koji može na kraju rezultirati sistemskim inflamatornom odgovorom, sa visokom incidencijom smrtnosti (Foris i Snowden, 2017).

Lečenje nekomplikovane infekcije urinarnog trakta uključuje trimetoprim/sulfametoksazol kombinaciju ili fluorohinolone (npr. ciprofloksacin). Alternativa ovom tretmanu, kod pijelonefritisa, je jednokratna doza ceftriaksona ili gentamicina iza kojih slede cefalosporini ili prethodno spomenuta terapija. Ako pacijent ima ozbiljnije stanje ili je hospitalizovan, terapiju čini neki od antibiotika putem intravenozne primene: ceftriakson, gentamicin, fluorohinoloni, gentamicin i ampicilin, ili aztreonam, nakon čega se prelazi na oralnu terapiju. *Proteus* infekcije se mogu izbeći uz pravilno sprovođenje higijene i sanitarnih mera, kao što je adekvatna sterilizacija medicinske opreme i površina (Foris i Snowden, 2017).

### ***Salmonella enteritidis***

Mnogobrojni članovi roda *Salmonella* jesu patogeni za čoveka i zbog oboljenja koja izazivaju nazivaju se tifus-paratifus-enteritis grupa. *S. enteritidis* je štapićasta, fakultativno anaerobna bakterija koja je lako pokretna zbog prisutnih flagela. Osetljive su na 56°C nakon 20 do 30 minuta, ali i na hlor, Na-dezoksiholat i jedinjenja selen. *S. enteritidis* produkuje endotoksin, a oboljenja koja izaziva zovu se salmoneloze (Mihajilov-Krstev, 2009). Izazivač je alimentarnih toksikoinfekcija koje su praćene akutnim gastroenteritisom, a najčešće se prenose preko jaja koja mogu biti kontaminirana na svojoj površini, penetracijom patogena u unutrašnjost jajeta ili infekcijom reproduktivnih organa kokoške (Gantois i sar., 2009). U ovom slučaju od antibiotske terapije se preporučuju  $\beta$ -laktamidi i fluorohinoloni. Kod izazvanih salmoneloza koriste se i ampicilin, trimetoprim-sulfaometoksazol ili cefalosporini novije generacije, pri čemu takođe postoji opasnost od razvijanja rezistentnosti (Mihajilov-Krstev, 2009).

### ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* je kratka, pokretna, štapićasta aerobna i fakultativno anaerobna bakterija. Veoma je otporna, pa mesecima može opstati na raznim predmetima, vodi i zemlji. Sposobna je da preživi na temperaturama ispod 0°C, dok je temperatura od 60°C ubija nakon 15 - 20 minuta (Mihajilov-Krstev, 2009). Takođe, osetljiva je i na delovanje hlora i hlornih jedinjenja. *E. coli* se normalno nalazi u kolonu i deo je normalne crevne flore čoveka gde sintetiše vitamin B12 i antibiotike (kolicin), učestvuje u transformaciji šećera i proteina i

prevenira kolonizaciju patogenih mikroorganizama (Hudault i sar., 2001; Mihajilov-Krstev, 2009). S druge strane, glavni je uzročnik enteritisa, urinarnih infekcija, kao i septikemije, meningitisa ili pneumonije. Izvor zaraze je izmet i mokraća obolelih osoba ili životinje, a najčešće se prenosi prljavim rukama, raznim predmetima kao i vazduhom. Toksičnost *E. coli* pripisuje se endotoksinu, enterotoksinu i hemolizinima. Sve inflamacije uzrokovane *E. coli* najčešće se tretiraju sulfonamidima, ampicilinom, cefalosporinima i tetraciklinima (Mihajilov-Krstev, 2009).

Intestinalne infekcije ešerihijom se mogu javiti na više načina i u više formi. Enterotoksigena *E. coli* izaziva putničku dijareju koja se prenosi preko kontaminirane vode i hrane ili direktno sa obolelom osobom dok se kolonizacija mukoze creva vrši pomoću enterotoksina ST- i LT-toksina. Enteropatogena *E. coli* najčešće izaziva dijareju u pedijatrijskoj populaciji kada bebe mogu biti inficirane u toku porođaja ili čak i *in utero*. Enterohemoragična *E. coli* izaziva hemoragični kolitis koji podrazumeva pojavu krvavih stolica produkujući egzotoksin – verotoksin (Mihajilov-Krstev, 2009). Posebno je opasan soj 0157:H7 jer se hemoragična dijareja može nastaviti na hemolitički-uremički sindrom koji se manifestuje hemolitičkom anemijom, trombocitopenijom i akutnom bubrežnom insuficijencijom (Wasey i Salen, 2018). Za hronične oblike dijareje koje mogu potrajati više od 14 dana zaslužna se enteroagregativna *E. coli* koja proizvodi toksin koji je sličan ST-toksinu, i hemolizin. Enteroinvazivna *E. coli* produkuje sindrom koji je sličan dizenteriji koji se češće javlja kod dece na putovanju, a praćen je povišenom temperaturom i krvavim stolicama (Mihajilov-Krstev, 2009).

Urinarne infekcije su najčešće ekstraintestinalne infekcije bakterijom *E. coli*. Vrlo su česte, posebno kod žena, u formi cistitisa ili pijelonefritisa (Johnson, 1991). Uropatogeni sojevi koji poseduju P-fimbrije su odgovorni za cistitis, dok su sojevi sa P-pilima izazivači pijelonefritisa. *E. coli* može biti uzročnik i neonatalnog meningitisa, a može i da se u slučajevima nefunkcionisanja odbrambenog mehanizma čoveka raširi putem krvi i izazove sepsu, što je češća pojava u pedijatrijskoj populaciji kada nedostaju IgM antitela. Kod pacijenata sa hroničnim bolestima ili koji su na dugoj terapiji citostaticima, kortikosteroidima ili antibioticima *E. coli* može izazvati sepsu, endotoksični šok ili pneumoniju (Mihajilov-Krstev, 2009).

### ***Enterobacter aerogenes***

*Enterobacter aerogenes* je štapičasta fakultativno anaerobna, pokretna i inkapsulisana bakterija. Pokretljivost ove bakterije potiče od prisutnih flagela koje okružuju površinu ćelije (Gayet i sar., 2003). Enterobakterije se nalaze u zemlji, vodi, mlečnim proizvodima, i u intestinalnom traktu životinja, ali i ljudi (Ronald i Bartha, 1998).

Infekcije koje se pripisuju ovoj bakteriji obično su respiratorne, gastrointestinalne i urinarne, posebno cistitis, međutim mogu se razviti i infekcije rana, opekotina, krvotoka i centralnog nervnog sistema, artritis, osteomijelitis, endokarditis, endooftalmitis (Brooks i sar., 2007; Mihajilov-Krstev, 2009). Deca, stariji i oni koji su u terminalnoj fazi drugih bolesti ili su imunosuprimirani su osetljivi za razvoj ovakvih infekcija. One često nastaju kod hospitalizovanih pacijenata, stoga *E. aerogenes* pripada grupi nozokomijalnih i oportunističkih bakterija (Janda i Abbott, 2006).

Lečenje infekcija izazvanih *E. aerogenes* je prilično teško zbog multirezistentne prirode bakterije. Sojevi roda *Enterobacter* su otporni na peniciline i druge cefalosporine zbog proizvodnje *beta*-laktamaze sa cefolosporinaznom aktivnošću. Pored toga, mnogi su otporni na tetracikline, hloramfenikol, streptomycin, fluorohinolone kao i na druge aminoglikozide (Greenwood i sar., 2002). *E. aerogenes* je sposobna da razvije rezistenciju i zbog mutacije gena koji kodiraju porine (proteinske kanale) i membranske efluks pumpe koje ispumpavaju molekule antibiotika pre nego što mogu da oštete ćeliju bakterije. Novi lekovi u borbi protiv ove bakterije su fokusirani na derivate alkoksihinolina odnosno 4-alkoksi supstituisana jedinjenja hinolina. Pokazalo se da jedan od ovih lekova, označen kao "jedinjenje 905", indukuje inhibiciju pumpe hloramfenikola, omogućavajući hloramfenikolu ulazak u bakterijsku membranu, povećavajući njegovu koncentraciju u ćeliji. Neki klinički sojevi su povećali osetljivost na norflokacin i tetraciklin "jedinjenjem 905" omogućavajući antibioticima da dostignu efektivne koncentracije unutar bakterijske ćelije (Chevalier i sar., 2004).

### ***Klebsiella pneumoniae***

Ova bakterija predstavlja štapičast, nepokretan i fakultativno anaeroban mikroorganizam. Bakterija izolovana iz humanog uzorka je kokobacilarnog oblika i dosta je otporna prema raznim spoljašnjim faktorima. Temperatura od 56°C je može uništiti, ali je sa druge strane otporna

prema isušivanju. Rezervoar *K. pneumoniae* je čovek, zemlja ili voda, a prenosi se uglavnom posredstvom vazduha (Mihajilov-Krstev, 2009).

Bakterija *K. pneumoniae* sadrži debelu polisaharidnu kapsulu koja okružuje ćeliju i koja je štiti od fagocitoze (Merino i sar., 1992). Ona proizvodi slab lipopolisaharid kao i jednu nekrotoksičnu supstancu. Poznata je po tome što je izazivač inflamacija respiratornog i urinarnog trakta koje su mnogo zastupljenije kod imunokompromitovanih i hospitalizovanih pacijenata. Kod dece ova bakterija izaziva enteritis i enterokolitis. Od antibiotske terapije koriste se streptomycin, kanamicin, gentamicin, hloramfenikol, cefalotin i polimiksini, klinafloksacin, karbapenemi, hinoloni, iako postoji opasnost od brze pojave rezistencije (Ashurst i Dawson, 2018; Brisse i sar., 1999; Mihajilov-Krstev, 2009).

### 2.7.3. Jednoćelijske gljive – kvasci

Kvasci su jednoćelijski eukariotski organizmi koji pripadaju grupi fakultativnih anaeroba. Široko su rasprostranjeni u prirodi, a najčešće se sreću u vazduhu, zemljištu, vodi, voću, povrću itd. Njihov ćelijski zid je prevashodno izgrađen od hitina i glukana. Kao rezervne materije mogu skladištiti lipide u formi uljanih kapi, glikogen, trehalozu, manitol i arabitol (Carlie i sar., 2001).

#### *Candida albicans*

Rod *Candida* je veoma heterogen rod i obuhvata veliki broj vrsta. Vrsta *Candida albicans* je patogena za čoveka i toplokrvne životinje i izaziva tzv. kandidijaze. Iako je patogena, zajedno sa ostalim vrstama ovog roda čini normalnu floru na koži, ustima, vagini i crevima. Kandidijaze nastaju kada se antibioticima uništava bakterijska flora. Najčešće se razvijaju oralna i vaginalna, a neretko i sistemska kandidijaza. Oralna manifestacija ove bolesti karakteriše se pojavom beličastih mrlja na mukozi usne duplje, jezika ili gingive koje se kasnije mogu pretvoriti u ulcerozne promene. Vaginalna forma kandidijaze javlja se kao svrab, nelagoda, pečenje i bol vaginalne vulve sa belim sekretom. Sistemska kandidijaza se javlja kod imunokompromitovanih osoba i može da zahvati gastrointestinalni trakt, pluća, slezinu i jetru (Martins i sar., 2014; Mihajilov-Krstev, 2009).

Terapija kandidijaza se zasniva na upotrebi fungistatika ili fungicida koji se mogu primenjivati lokalno ili sistemski. Sistemske kandidijaze se najčešće leče amfotericinom B ili flukonazolom. Oralne manifestacije kandidijaze tretiraju se najčešće nistatinom, klotrimazolom,

flukonazolom ili itrakonizolom, dok se za kožne najčešće koristi klotrimazol, mikonazol i nistatin. Za genitalnu kandidijazu se topikalno propisuju klotrimazol, mikonazol, butokonazol, tiokonazol, nistatin ili borna kiselina (Pappas i sar., 2004).

## 2.8. INFLAMACIJA

Zapaljenje ili inflamacija je deo nespecifičnog imunskog odgovora koja predstavlja lokalizovanu zaštitnu reakciju na bilo koju vrstu štetnih stimulusa. Najvažniji znaci inflamacije (povišenje lokalne temperature, bol, crvenilo, otok i gubitak funkcije) mogu se objasniti povećanim protokom krvi, povećanim ćelijskim metabolizmom, vazodilatacijom, oslobađanjem medijatora, ekstravazacijom tečnosti i ćelijskim influksom. U većini slučajeva, upalna reakcija je kratkotrajna i rezultira željenom zaštitnom reakcijom. Međutim, u nekim slučajevima, prekomerna ili dugotrajna inflamacija može dovesti do velikog oštećenja tkiva, disfunkcije organa i smrtnosti (Ferrero-Miliani i sar., 2007; Granger i Senchenkova, 2010).

Proces zapaljenja se manifestuje usko povezanim promenama u vidu vaskularnih, celularnih, metaboličkih i biohemijskih promena. Vaskularne promene su najizrazitije na nivou mikrocirkulacije. Najpre se javlja kratkotrajna vazokonstrikcija arteriola i arterijskog dela kapilara dejstvom simpatikusa, a zatim dolazi do vazodilatacije i nagomilavanja krvi, ubrzanja cirkulacije, povećanja pritiska, smanjenja vensko-arterijalne razlike u parcijalnim pritiscima kiseonika, usled dejstva samog izazivača inflamacije kao i dejstvom medijatora inflamacije, produkata metabolizma, porasta koncentracija vodonikovih jona, poremećene koncentracija jona  $K^+$  i  $Ca^{2+}$ . Nakon arterijske nastaje i venska hiperemija usled širenja venskih delova kapilara, venula i sitnih vena, nakon čega dolazi do lokalne acidoze, oslobađanja medijatora i edema. Inflamirana tkiva dobijaju manje kiseonika zbog smanjene cirkulacije krvi kada nastupa prestaza, a zatim i stadijum staze. U toku inflamacije značajno se povećava i permeabilnost zidova krvnih sudova kada dolazi do izlaska vode, tkivnih proteina i ćelijskih elemenata u okolno tkivo. Efekti ovih odgovora su da povećaju isporuku inflamatornih ćelija do oštećenog tkiva, razrede štetne agense u pogođenom području, izoluju područje od zdravog tkiva i sistemske cirkulacije, i pomognu fazi regeneracije procesa (Granger i Senchenkova, 2010; Radić, 2012).

Celularne promene koje se javljaju tokom inflamacije vezane su za položaj leukocita u krvnim sudovima (marginacija) i njihovu aktivnost. Zbog povećane permeabilnosti krvnih sudova i izlaska tečnosti iz mikrocirkulacije, ćelije krvi ostaju u krvnim sudovima kada se

povećava viskoznost krvi. Leukociti se tada raspoređuju periferno, uz endotel krvnog suda (marginacija). Leukociti adheriraju na endotel u inflamiranom području nakon čega sledi njihov prelazak u perivaskularni prostor (migracija). Privučenim raznim hemijskim i tenzioaktivnim signalima leukociti puštaju svoje pseudopode, prolaze između endotelnih ćelija i napuštaju krvni sud. Usmereno kretanje leukocita ka inflamiranom tkivu naziva se hemotaksa. Supstance sa pozitivnom hemotaktičnom aktivnošću privlače leukocite, a to su C3a i C5a komponente komplementa, piogene bakterije, adenilna kiselina, ribonukleinska kiselina, produkti autolize i interleukini. Kod akutnog zapaljenja se proces migracije odvija sa polimorfonuklearima (pre svega neutrofilima) i manje i kasnije sa mononuklearima (monociti i limfociti) koji dominiraju i u hroničnom zapaljenju. Polimorfonukleari vrše fagocitozu mikroorganizama ili ćelijskog debrisa, a ukoliko je čestica inertna ona ostaje u leukocitu kada nakon njegove smrti makrofagi preuzimaju fagocitozu. Neutrofili, s druge strane, aktiviraju i luče brojne citokine, stvaraju azot-monoksid, reaktivne kiseonične vrste i egzocitiraju mikrobicidne faktore (katepsin G, lizozim i dr.) (Radić, 2012; Ryan i Majno, 1977).

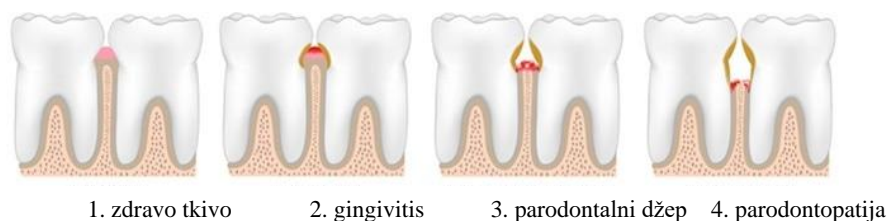
U inflamiranom području poremećen je i metabolizam ugljenih hidrata, masti i proteina, gasova i mineralnih supstanci, a dolazi i do poremećaja u vrednostima pH sredine i osmotskog pritiska. U toku inflamacije pojačana je razgradanja glikogena kada se povećava nivo glukoze i fosfornih estara, i nagomilava mlečna i pirogroždana kiselina što pogoduje nastanku lokalne acidoze. Katabolizam masti je izuzetno izražen, ali ne do krajnjih proizvoda već do nivoa *beta*-oksidacije masnih kiselina, kada dolazi do nakupljanja ketonskih tela i takođe razvoja acidoze. Razgradanja proteina pod dejstvom proteolitičkih enzima teče do nivoa albumoza, peptona, polipeptida i aminokiselina. Iz proteinskih kompleksa tkiva i oslobođenih nukleinskih kiselina, DNK i RNK, nastaju nukleotidi koji utiču na krvne sudove, fagocitozu i stvaranje vezivnog tkiva (Radić, 2012).

Prema toku, zapaljenja se mogu klasifikovati u akutna, subakutna i hronična. Akutno zapaljenje nastaje naglo, i karakteriše se intenzivnim tokom, kratkom dužinom trajanja sa izraženim vaskularnim i eksudativnim promenama i pojačanom migracijom leukocita. Hronično zapaljenje nastaje postepeno, i karakteriše se promenama slabijeg intenziteta, dužim tokom i dominacijom proliferativnih procesa. Infiltracija urođenih ćelija imunskog sistema, posebno neutrofila i makrofaga, karakteriše akutno, dok infiltracija T limfocita i plazma ćelija

karakteristike hronično zapaljenje. Subakutno zapaljenje je na granici akutnog i hroničnog zapaljenskog procesa (Ferrero-Miliani i sar., 2007; Radić, 2012).

### 2.8.1. Parodontopatija

Parodontalna oboljenja su raznovrsna stanja kod kojih inflamatorni proces rezultira uništavanjem gingive (gingivitis) i destrukcijom potporne strukture zuba (parodontopatija). Gingivitis predstavlja zapaljenje mekog tkiva koje okružuje zub, kao direktan imunski odgovor na mikrobijalni plak. Parodontopatija se nastavlja na netretirani gingivitis i ogleda se inflamacijom i razaranjem potporne strukture zuba koja uključuje destrukciju parodontalnog ligamenta, alveolarne kosti i mekog tkiva (Slika 2.8.1). Parodontopatija rezultuje formiranjem parodontalnog džepa, recesijom gingive i ukoliko se ne tretira gubitkom zuba. Jedna je od najčešćih bolesti usne duplje i glavni je uzrok gubitka zuba kod odraslih, a u poslednje vreme se povezuje sa važnim sistemskim bolestima, kao što su kardiovaskularne ili komplikacije u trudnoći (Guthmiller i Novak, 2002; Kinane, 2001; Saini i sar., 2009).



**Slika 2.8.1.** Faze parodontalnih bolesti (<https://www.news-medical.net/health/Management-of-Periodontitis.aspx#>)

Etiologija parodontalnih bolesti se najpre zasniva na prisustvu bakterijskog plaka, mikrobioloških produkata, i imunskom odgovoru domaćina. Prema novijim studijama u progresiji parodontalnih bolesti važnu ulogu imaju i faktori životne sredine kao i bihevioralni i genetski faktori. Primećena je direktna veza između parodontopatije i prevalencije pušenja, a prevalenca i težina parodontopatije je značajno veća kod pacijenata sa dijabetesom tipa I i tipa II. Retke posete stomatologu, prethodna istorija parodontalnih bolesti, krvarenje na zubima i osteoporoza predstavljaju takođe faktore rizika. Iako više različitih faktora leži u patogenezi, najveći broj ovih oboljenja se smatra infektivnim bolestima. Bakterije su primarni uzročnici parodontopatije, ali nedavni dokazi takođe upućuju i na gljive i herpes viruse kao patogene (Guthmiller i Novak, 2002). Više od 500 bakterijskih vrsta se mogu naći u usnoj duplji



kolonizovane na različitim lokacijama i površinama gde formiraju biofilmove. Bakterijski biofilmovi, plakovi, se nalaze pričvršćeni na površini zuba i predstavljaju komplekse koje se sastoje od velikog broja različitih vrsta bakterija (O'Toole i sar., 2000). U razvoju parodontopatije najčešće su od značaja subgingivalne bakterijske vrste rodova, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium*, *Actinobacillus*, *Eikenella* i *Treponema* (Guthmiller i Novak, 2002). Endotoksin, po sastavu lipopolisaharid (LPS), je deo spoljašnje membrane i gradivni je element većine Gram-negativnih parodontopatogenih bakterija koji se odlikuje visokim imunoaktivnim potencijalom (Perunović, 2015).

Značajan broj studija pokazao je da je upotreba biljaka potencijalni i novi trend u prevenciji i tretmanu parodontalnih bolesti sa manje štetnih efekata na ljudski organizam. Neki lekovi za tretman oralnih inflamacija mogu da promene mikrobiom usne duplje i uzrokuju promenu boje zuba (Feres i sar., 2015; Palombo, 2011; Sweetman, 2007). Pored toga, mogu izazvati gastrointestinalne poremećaje koji su obično praćeni dijarejom, mučninom i povraćanjem, ili ređe da uzrokuju fototoksičnost i akumulaciju u kostima i zubima (Sweetman, 2007). Prema tome, potraga za prirodnim proizvodima ili fitojedinjenjima sve više raste sa izgledima da postanu prihvatljive alternative ili komplementarna sredstva kod oralnih inflamacija (Palombo, 2011). Bioaktivna jedinjenja iz biljaka, kao što su fenolne kiseline, flavonoidi, tanini, terpenoidi, alkaloidi itd., su se pokazala korisnim u parodontopatiji zbog svojih snažnih antimikrobnih i antiinflamatornih aktivnosti (Kumar i sar., 2009). Biljne vrste roda *Salvia*, posebno *S. officinalis*, dobro su poznati efektivni agensi čije aktivne komponente mogu smanjiti zapaljenje gingive, inhibirati rast plaka i povoljno uticati na profilaksu karijesa (Ehrnhofer-Ressler i sar., 2013; Willershausen i sar., 1991).

### **Inflamatorni i imunski putevi u patogenezi parodontopatije**

Patogeneza parodontopatije posredovana je inflamatornim odgovorom na prisustvo bakterija u dentalnom biofilmu. Prisustvo ovih mikroorganizama kod osoba bez dokazane progresije bolesti ukazuje na to da je bolest efekat imunskog odgovora i procesa inflamacije, a ne samo prisustvo bakterija. Regulacija imunološko-inflamatornih mehanizama određuje osetljivost pacijenta i može biti modifikovana faktorima okoline (Cekici i sar., 2014).

Inicijalna, početna, inflamacija parodontalnih tkiva se smatra fiziološkim mehanizmom odbrane od mikroorganizama. Klinički nalazi bolesti u ovoj fazi uključuju formiranje supragingivalnih i subgingivalnih plakova, koji su obično praćeni formiranjem kalkulusa i zapaljenjem gingive. Ako se plakovi uklone, inflamacija se povlači sa povratkom tkiva u homeostazu. Međutim, proces postaje patološki ukoliko lezije perzistiraju (Cekici i sar., 2014). Faze gingivitisa i parodontopatije bile bi početna (inicijalna), rana, zrela i odmakla (Page, 1976). Odmakla lezija se naziva i destruktivna faza, jer predstavlja prelaz od gingivitisa do parodontopatije. Ono što dovodi do zapaljenja i imunskih odgovora u osnovi parodontopatije jeste da se imunološki događaji preklapaju u različitim fazama bolesti. Mehanizmi uključeni u zapaljenje, rešavanje i lečenje obuhvataju sve komponente imunskog sistema koji kooperiraju kako bi zaštitili parodoncijum (Cekici i sar., 2014).

Početna lezija je odgovor leukocita i endotelnih ćelija bakterijskom biofilmu. U ovoj fazi, nema znakova kliničkog zapaljenja, ali se promene u tkivima mogu histološki uočiti. Metabolički proizvodi bakterija aktiviraju epitelne ćelije da proizvode citokine i stimulišu neurone na proizvodnju neuropeptida što uzrokuje vazodilataciju lokalnih krvnih sudova. Neutrofili napuštaju krvni sud i migriraju prema mestu upale kao odgovor na hemokine. Sledi rana faza, sa povećanim brojem neutrofila u vezivnom tkivu i pojavom makrofaga, limfocita, plazma ćelija i mastocita, sa aktiviranim proteinima komplementa. Protok gingivalne tečnosti je uvećan, dok epitelijum proliferiše sa histološki uočljivim promenama. Vidljivi su i klinički znaci zapaljenja gingive, kao što je krvarenje. Sledeća faza je zrela lezija koja se može smatrati periodom tranzicije od urođenog do stečenog imunskog odgovora. Dominantni su makrofagi, plazma ćelije i T i B limfociti, sa IgG1 i IgG3 subklasama B limfocita. Protok krvi je oštećen, a kolagenolitička aktivnost je povećana. Postoji i povećana proizvodnja kolagena fibroblastima. Klinički, ova faza predstavlja umereni do teški gingivitis sa gingivalnim krvarenjem i promenama boja i konture. Završna faza je prelaz na parodontopatiju - odmakla lezija. Nepovratni gubici vezivanja i gubitak kostiju su vidljivi i histološki i klinički. Inflamatorna lezija se proteže dublje, utičući na alveolarnu kost (Cekici i sar., 2014; Fiorellini i sar., 2006).

Mehanizmi odbrane domaćina uključuju urođeni imunski sistem i stećeni, odnosno adaptivni imunski sistem. Urođeni imunski sistem podrazumeva ćelije nehematopoetskog porekla, naročito epitelne ćelije, mijeloidne ćelije hematopoetskog porekla (fagociti) i urođenu humoralnu odbranu, sistem komplemenata. Kod urođenog imunskog odgovora na parodontalne

patogene, javljaju se i neuropeptidi tj. peptidni neurotransmiteri u inicijalnom odgovoru, koji deluju lokalno preko receptora na neuronima ili imunskim ćelijama. Takođe, u ovom inicijalnom odgovoru, u toku akutne inflamacije, dolazi i do produkcije odgovarajućih citokina i hemokina. Ako se infekcija produžava nastaje hronična lezija koja vodi ka ranoj leziji u kojoj su još uvek prisutni elementi urođenog imuniteta, ali se aktivira i adaptivni imunski odgovor. Fagociti, kao što su makrofagi i neutrofil, na svojoj površini poseduju receptore koji vrše prepoznavanje i vezivanje bakterija ili stranih molekula (npr. LPS), nakon čega se proizvode hemokini koje privlače nove fagocite. Sistem komplemenata takođe generiše biološki aktivne proteine koje privlače monocite, limfocite i neutrofile, a može i direktno uništiti bakterijsku ćeliju. Histaminom indukovana vazodilatacija, nastala posredstvom mast ćelija, povećava protok krvi i regrutaciju fagocita (Cekici i sar., 2014).

Citokini i hemokini predstavljaju "poruke" koje se razmenjuju između ćelija. Citokini su niskomolekularni proteini koji su prisutni u inicijaciji, ali i kasnijim fazama inflamacije gde regulišu amplitudu i dužinu trajanja odgovora. Hemokini su hemostatski citokini koji imaju važnu ulogu u migraciji fagocitnih ćelija do mesta infekcije. Citokine proizvode razne ćelije npr. epitelne ćelije, fibroblasti, fagociti (neutrofil i makrofagi) u akutnim i ranim hroničnim fazama inflamacije, i imunske ćelije (limfociti) u zreloj i odmakloj fazi. Sekretija proinflamatornih citokina genetski je regulisana i zavisna od aktivacije transkripcije nuklearnog faktora *kappaB* (Cekici i sar., 2014; Hanada i Yoshimura, 2002). U citokine spadaju grupe hemokina, interleukina, limfokina, tumorskih faktora rasta i interferona (Hegazi i Abdel-Rahman, 2015). Nakon prepoznavanja i prezentacije mikroba odgovarajućim ćelijama, citokini urođenog odgovora, uključujući faktor tumorske nekroze *alfa* (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i interleukin-6 (IL-6), su prvi koji se pojavljuju u patogenezi parodontopatije (Cekici i sar., 2014). Parodontopatija predstavlja rezervoar proinflamatornih citokina i prostaglandina, čiji su povišeni nivoi zabeleženi kako lokalno u gingivalnoj tečnosti, tako i sistemski u cirkulaciji (Perunović, 2015). IL-1 $\beta$  i IL-6 su urođeni citokini i povezani su sa zapaljenskom ćelijskom migracijom i osteoklastogenezom (Cekici i sar., 2014). IL-1 $\beta$  ispoljava izraženu proinflamatornu aktivnost. Kao odgovor na stimulus sintetišu ga makrofagi, fibroblasti, keratinociti, endotelne ćelije, T i B limfociti. IL-6 je citokin proinflamatornog karaktera kojeg sintetišu makrofagi, monociti, T ćelije, fibroblasti, hepatociti, endotelne i neuronske ćelije (Perunović, 2015). Sa druge strane TNF- $\alpha$  je citokin koji ima mnoštvo funkcija, od ćelijske migracije do destrukcije

tkiva. TNF- $\alpha$  utiče na migraciju ćelija indukujući ushodnu regulaciju molekula za adheziju neutrofila na zid krvnog suda dovodeći do ekstrasvazacije. Takođe, stimuliše proizvodnju hemokina uključenih u migraciju ćelija do inficiranih i inflamiranih tkiva, i reguliše proizvodnju IL-1 $\beta$  i IL-6. TNF- $\alpha$  korelira sa destrukcijom ekstracelularnog matriksa i resorpcijom kosti putem aktivnosti koje promovišu sekreciju matriks metaloproteinaze i RANKL-a (receptorski aktivator za nuklearni faktor  $\kappa$ B ligand). U toku periodontitisa inflamirana tkiva sintetišu i značajne količine prostaglandina, naročito prostaglandina E2 (PGE2). PGE2 je snažan stimulator resorpcije alveolarne kosti. Izlučuje se stimulacijom bakterijskim LPS-om iz makrofaga, međutim i ćelije periodontalnog ligamenta mogu da ga proizvode, čak i bez stimulisanja. Ova sekrecija se povećava preko IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  i paratiroidnog hormona. Interferon-*gama* je citokin adaptivnog imunskog odgovora čija je uloga da promoviše vezivanje antigena za antigenprezentujuće ćelije i ima važnu ulogu u sazrevanju B ćelija. U parodontalnim lezijama interferon-*gama* može biti prisutan u visokim koncentracijama, naročito kod progresivnih formi parodontopatije (Cekici i sar., 2014; Honda i sar., 2006; Perunović, 2015).

Stečena imunost se zasniva na složenim interakcijama između antigen prezentujućih ćelija i T i B limfocita. Postoji jaka korelacija između ćelijski-posredovanog (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> ćelijski odgovor) i humoralnog odgovora (stvaranje antitela) i prisustva parodontopatije i stepena njegove progresije. Formiranje antitela je specifično za specifične parodontopatogene mikroorganizme (Guthmiller i Novak, 2002).

### **Destrukcija koštanog tkiva i ekstracelularnog matriksa**

Poremećaj ravnoteže između osteoblasta i osteoklasta kao rezultat aktivnosti bakterijskih produkata i proinflamatornih citokina predstavljaju glavnu osnovu gubitka kosti izazvanog zapaljenjem. Kompleksni inflamacijski signali i citokini regulišu osteoklastogenezu kao glavnog patološkog procesa koji nastaje napredovanjem inflamacije, preko RANKL-a, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  i PGE2 (Cekici i sar., 2014). Osteoklastogeneza zapravo predstavlja zaštitini mehanizam kojim se sprečava ulazak mikroorganizama u kost, međutim na kraju dovodi do rasklaćivanja i gubitka zuba (Perunović, 2015).

Postoje značajni dokazi koji ukazuju da kolagenaze, zajedno sa ostalim matriks metaloproteinazama, igraju važnu ulogu u destrukciji parodontalnog tkiva. Aktivacija matriks metaloproteinaza uključuje tkivne i plazma proteinaze kao i bakterijske proteinaze, zajedno sa

oksidativnim stresom. Ovi enzimi se sintetišu u gingivalnim epitelnim ćelijama, fibroblastima, endotelijalnim ćelijama, monocitima/makrofagima i plazma ćelijama. Transkripcija gena matriks metaloproteinaze je na najnižem nivou u zdravom parodontalnom tkivu, međutim kod parodontopatije, sekreciju specifičnih matriks metaloproteinaza stimulišu i regulišu razni citokini. Glavni stimulatorni citokini su TNF- $\alpha$ , IL-1 i IL-6. Takođe je poznato da se aktivirane metaloproteinaze mogu aktivirati drugim metaloproteinazama međusobno kaskadnom aktivacijom (Cekici i sar., 2014).

## 2.9. GASTROINTESTINALNI SISTEM

Gastrointestinalni ili digestivni sistem čini digestivna cev i žlezde čiji se sekreti izlivaju u nju. Digestivnu cev čine usna duplja, ždrelo, jednjak, želudac, tanko i debelo crevo, a žlezde koje se izlivaju u digestivni tubus su pljuvačne žlezde, jetra i pankreas. Iako svaki deo digestivne cevi ima specifičnu građu, uočavaju se i neke zajedničke karakteristike: serozni, mišićni, podsluzokožni i sluzokožni omotač. Osnovne funkcije gastrointestinalnog sistema su unos, razgradnja i apsorpcija hranljivih materija i eliminacija krajnjih produkata varenja hrane (Ranković i Veličković, 2013).

Najčešći poremećaji gastrointestinalnog sistema su funkcionalni gastrointestinalni poremećaji (FGIP) koji uključuju niz morfoloških i fizioloških poremećaja koji se karakterišu poremećenom pokretljivošću creva, visceralnom hipersenzitivnošću, promenom funkcije sluznice, imunskog sistema, izmenjenom mikrobiotom i procesima nervnog sistema (Drossman, 2016). Ovi poremećaji se karakterišu prisustvom simptoma hroničnog tipa, a po definiciji pacijenti sa FGIP nemaju organske, sistemske ili metaboličke abnormalnosti koje bi dale objašnjenje za njih. Izraz "funkcionalni" se uglavnom odnosi na poremećaje u neuromuskularnoj funkciji zahvaćenog dela gastrointestinalnog trakta koja indukuje nelagodnost. Smatra se da FGIP nastaju dejstvom kombinovanih predisponirajućih genetskih faktora i uslova spoljašnje sredine kao što je ishrana, akutni gastroenteritis i dr. Na osetljivost i disfunkciju creva mogu uticati i psihosocijalni faktori uzrokovani stresom ili psihijatrijskim poremećajima (Drossman, 2006; Mapel, 2013).

Poremećaji motiliteta creva mogu se manifestovati pojavom dijareje, spazma, opstipacije ili sindroma iritabilnih creva. Akutna dijareja može biti vrlo ozbiljna kod dece dovodeći do značajnog morbiditeta i mortaliteta, čak i u razvijenim zemljama. Ona najčešće nastupa kao

posledica infekcije u digestivnom traktu. Uzročnik ovih toksikoza mogu biti različite bakterije, virusi ili paraziti koje se prenose se prenose kontaminiranom hranom, vodom ili sa kontaktom sa zaraženom osobom kao posledica sprovođenja loše higijene (SZO, 2017).

Upotreba lekovitih biljnih vrsta i njihovih proizvoda je veoma rasprostranjena u oblasti gastrointestinalnih oboljenja. Najčešće indikacije biljnih droga i preparata obuhvataju dispepsiju, konstipaciju, gastro-ezofagealni refluks, sindrom iritibalnih creva, ezofagitis, gastritis i hronične gastrointestinalne infekcije (disbioze), a mogu biti od pomoći i kod alergija, netolerancije, peptičkog ulkusa, inflamatornih bolesti npr. ulceroznog kolitisa i Kronove bolesti, divertikulitisa, anoreksije. Aromatične droge (npr. iz porodice Lamiaceae i Apiaceae) se koriste kao odlična spazmolitična i karminativna sredstva pa nalaze primenu kod kolika, flatulencije, sindroma iritibalnog kolona, kongestivne dispepsije, usporenog varenja i hroničnih inflamacija i infekcija (Bone i Mills, 2013).

### **2.9.1. Glatki mišići gastrointestinalnog sistema**

Pokretanje u digestivnom sistemu omogućena je kontrakcijom glatkih mišićnih slojeva koje čine spoljašnji mišićni sloj, a to su unutrašnji cirkularni i spoljašnji longitudinalni između kojih se nalazi mijenterički Auerbahov nervni plexus. Vlakna ovih slojeva su međusobno povezana tako da se akcioni potencijal prenosi sa jednog na drugi sloj mišića creva (Branković, 2016).

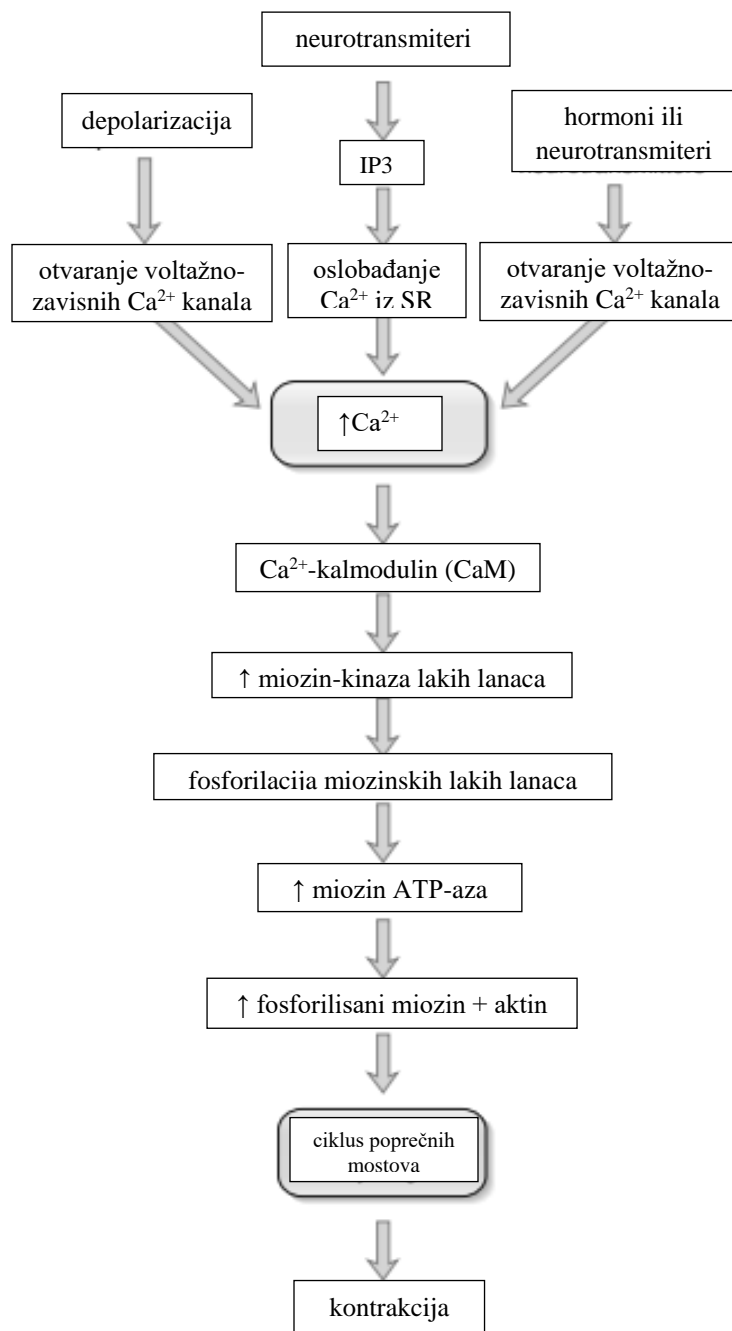
Glatki mišići digestivnog sistema mogu imati dva oblika električne aktivnosti: spontanu električnu aktivnost – spori talasi i šiljke. Spori talasi su ritmičke promene membranskog potencijala i njihova pojava povećava aktivnost natrijumskih kanala. Ovi talasi ne predstavljaju akcione potencijale i uglavnom ne izazivaju kontrakciju mišića, ali mogu izazvati šiljate potencijale koji dovode do kontrakcije. Šiljati potencijali predstavljaju akcione potencijale muskulature digestivnog trakta. Akcioni potencijal glatkih mišića nastaje ulaskom jona kalcijuma i natrijuma kroz spore kalcijumsko – natrijumske kanale. Intersticijske Kavalove ćelije, koje su lokalizovane između longitudinalnog i cirkularnog sloja glatkih mišića, stvaraju osnovni električni ritam, koji se poroznim vezama prenosi na mišićni sloj zida digestivnog sistema. Neki glatki mišići u gastrointestinalnom sistemu se mogu tonički kontrahovati u trajanju od par minuta do par sati. Iako mehanizam toničkih kontrakcija nije u potpunosti jasan, smatra se

da ih izaziva ponavljanje šiljatih potencijala, ali i neki hormoni, odnosno kontinuirani ulazak kalcijumovih jona u glatka mišićna vlakna (Branković, 2016).

Kontrakcija glatkih mišića se odvija interakcijom aktinskih i miozinskih niti, koji čine glatki mišić, u prisustvu dovoljne količine jona  $\text{Ca}^{2+}$  (Slika 2.9.1). Slobodni kalcijum se vezuje za kalcijum vezujući protein – kalmodulin koji aktivira kinazu kratkog lanca miozina da bi započeo ciklus poprečnih mostova. Tada dolazi do klizanja aktinskih filamenata između miozinskih zbog čega se mišić skraćuje odnosno kontrahuje. Ovaj ciklus poprečnih mostova se nastavlja sve dok je prisutna dovoljna količina kalcijumskih jona. Miozinski poprečni mostovi sadrže četiri laka lanca. Da bi započeo uporedni hod poprečnih mostova glatkih mišića potrebno je da se laki miozinski lanci fosforilišu miozin kinazom koju aktivira kalmodulin. Tokom trajanja akcionog potencijala kalcijum iz ekstracelularne tečnosti ulazi u sarkoplazmu. Kada se koncentracija  $\text{Ca}^{2+}$  u sarkoplazmi poveća dolazi do vezivanja kalcijuma za kalmodulin koji se tada aktivira. Kalmodulin, dalje, aktivira miozin kinazu koja fosforiliše laki lanac miozina i započinje ciklus poprečnih mostova. Laki lanci se mogu defosforilisati miozin-fosfatazom kada dolazi do usporavanja ili zaustavljanja ciklusa poprečnih mostova (Radenković, 2016).

Kalcijum, neophodan za odvijanje procesa glatkomišićne kontrakcije, može imati različito poreklo. U sarkoplazmu stiže iz vanćelijskog prostora ili iz intraćelijskih depoa. Kalcijum iz vanćelijskog prostora je neophodan za dugotrajne tj. toničke kontrakcije kada jon ulazi kroz voltažne kalcijumske kanale, receptorske (ligand zavisne), metaboličke i kalcijumske kanale koji se aktiviraju istezanjem (Radenković, 2016). Glavni put ulaska  $\text{Ca}^{2+}$  iz ekstraćelijskog prostora je kroz voltažne kalcijumske kanale. Najznačniji tip kanala u glatkim mišićima digestivnog sistema je L-tip  $\text{Ca}^{2+}$  kanala koji pored ulaska kalcijuma u ćeliju omogućava i aktivaciju  $\text{Ca}^{2+}$ -zavisnog- $\text{K}^{+}$  kanala (Farrugia, 1999). Kalcijum iz intraćelijskih depoa, sarkoplazmatskog retikuluma, dovoljan je samo za kratkotrajnu kontrakciju. Iz ovog depoa se jon kalcijuma oslobađa pod uticajem drugih glasnika: inozitol trifosfata (IP3) i diacilglicerola (DAG). Vezivanje raznih liganada za receptore npr. vazopresina, angiotenzina II, noradrenalina, prostaglandina F2alfa, tromboksana A2 i drugih dovodi do aktivacije fosfolipaze C koja se fosfatidilinozitol 1,4-difosfat deli na IP3 i DAG. Nastali IP3 izaziva otvaranje kalcijumskih kanala na sarkoplazmatskom retikulumu i difiziju jona kalcijuma u sarkoplazmu (Radenković, 2016).

Relaksacija glatkog mišića nastaje kada se kalcijum vrati u svoje depoe ili se izbaci iz ćelije, pri čemu se smanjuje njegova koncentracija u sarkoplazmi. Kalcijumska pumpa ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza) vraća kalcijum u depo, a iz ćelije ga izbacuje  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  pumpa. Ove pumpe aktiviraju odgovarajući sekundarni glasnici (ciklični adenzin monofosfat cAMP i ciklični guanozin monofosfat cGMP). Takođe, relaksaciju glatkih mišića mogu izazvati i faktori koji blokiraju kalcijumske kanale i sprečavaju njegov ulazak u ćeliju (Radenković, 2016).



**Slika 2.9.1.** Redosled molekularnih događaja u kontrakciji glatkih mišića (Costanzo, 2010)

IP3 – inozitol trifosfat; SR – sarkoplazmatski retikulum; CaM – kalmodulin; ATP – adenzin trifosfat;



### 2.9.2. Kontrola funkcije gastrointestinalnog sistema

Regulacija funkcije gastrointestinalnog sistema (motorne i sekretorne) je kompleksna i bazira se na brojnim nervnim, parakrinim i hormonskim mehanizmima. Nervna regulacija gastrointestinalnog sistema se sastoji iz spoljašnje i unutrašnje inervacije. Spoljašnju inervaciju vrše neuroni koji inervišu ovaj sistem, a čija se tela nalaze izvan njega i deo su autonomnog nervnog sistema. Sistem unutrašnje inervacije se naziva i enterički nervni sistem i predstavljen je neuronima koji se nalaze u sastavu gastrointestinalnog sistema - submukozni (Majsnerov) i mijenterički (Auerbahov) pleksus (Branković, 2016). Endokrina (hormonska) kontrola gastrointestinalnog sistema se zasniva na delovanju gastrointestinalnih hormona koji se sekretuju iz endokrinih ćelija i krvotokom dolaze do ciljnih ćelija sa odgovarajućim receptorima. Najznačajniji gastrointestinalni peptidni hormoni su: gastrin, holecistokinin, sekretin, grelin, motilin, gastrični inhibitorni peptid i glukagonu sličan peptid 1 (Track, 1980). Parakrinu kontrolu gastrointestinalnog sistema omogućavaju endokrine ćelije digestivnog trakta koje svoje sekrete ne izlučuju u lumen creva nego u međućelijsku tečnost preko koje utiču na susedne ćelije. Najznačajniji parakrini medijatori su histamin, serotonin i somatostatin (Branković, 2016).

Parasimpatička vlakna inervišu digestivni sistem preko *nervus vagus* i sakralnog nervnog pleksusa. Iz moždanog stabla i sakralnog dela kičmene moždine polaze preganglijska nervna vlakna koja se završavaju na ganglijama u zidu organa. Postganglijska vlakna na svojim završecima oslobađaju acetilholin. Postganglijski neuroni pripadaju enteričkom nervnom sistemu. Preganglijska vlakna simpatičkog nervnog sistema polaze iz kičmene moždine i završavaju se na simpatičkim prevertebralnim i paravertebralnim ganglijama. Postganglijska vlakna inervišu glatku muskulaturu digestivnog trakta. Simpatička nervna vlakna se mogu završiti u enteričkom nervnom sistemu. Na postganglijskim simpatičkim nervnim završecima oslobađa se noradrenalin. Noradrenalin pomoću adrenergičkih receptora smanjuje motilitet digestivnog trakta, a povećava tonus sfinktera. Uz eferentna vlakna postoje i aferentna simpatička vlakna preko kojih se prenose informacije do nervnog sistema i stvara osećaj mučnine i bola (Branković, 2016).

Enterički nervni sistem počinje od ezofagusa, a završava se u debelom crevu. Enterički nervni sistem kod ljudi sadrži 200–600 miliona neurona, raspoređenih u više hiljada malih ganglija, od kojih se velika većina nalazi u dva pleksusa, mijenteričkom i submukoznom. Mijenterički pleksus formira kontinuiranu mrežu koja se proteže od gornjeg jednjaka do

unutrašnjeg analnog sfinktera. Submukozne ganglije i vezni snopovi vlakana formiraju pleksuse u tankom i debelom crevu, ali ne i u želucu i jednjaku. Veze između enteričkog nervnog sistema i centralnog nervnog sistema nose vagusni i karlični (sakralni) nervi i simpatički putevi (Furness i sar., 2014). Osnovna funkcija mijenteričkog pleksusa je kontrola motorike, a submukoznog da reguliše sekreciju žlezda i protok krvi u digestivnom sistemu. Mijenterički pleksus inerviše uzdužne i kružne glatke mišiće, a submukozni pleksus inerviše žlezdani epitel, crevne endokrine ćelije i krvne sudove u submukozi i na taj način se kontroliše intestinalna sekrecija, apsorpcija i kontraktilnost submukoznih mišića. Enterički nervni sistem može da funkcioniše samostalno, ali je pod uticajem vegetativnog nervnog sistema. Neuron enteričkog nervnog sistema stvaraju brojne neurotransmitere: noradrenalin, acetilholin, azot-monoksid, dopamin, adenzin-trifosfat, serotonin, holecistokinin, supstatin P, somatostatin, i dr. Osnovni neurotransmiter u digestivnom sistemu je acetilholin. Acetilholin stimulise motoriku i sekreciju u digestivnom sistemu. Inhibicijski neurotransmiteri su azot-monoksid i adenzin-trifosfat. Enterički nervni sistem je povezan sa centralnim nervnim sistemom pomoću simpatičkih i parasimpatičkih nerava što se naziva crevno-moždana osovina. Senzitivna nervna vlakna koja inervišu digestivni sistem prenose informacije do enteričkog nervnog sistema kao i do prevertebralnih ganglija simpatičkog nervnog sistema, kičmene moždine i moždanog stabla (Branković, 2016).

### **Acetilholin**

Acetilholin se sintetiše u holinergičkim vlaknima, u završnom delu aksona, iz acetil koenzima A i holina, nakon čega se deponuje u vezikule. Sintezu ovog neurotransmitera omogućava enzim holinacetil transferaza. Nakon oslobađanja acetilholina iz vezikula dolazi do njegovog vezivanja za postsinaptičke holinergičke receptore, i njegove razgradnje u sinaptičkoj pukotini pomoću holinesteraze do holina i acetatnog jona. Nastali holin se transportuje nazad do nervnih završetaka gde se ponovo može iskoristiti za sintezu acetilholina (Nešić, 2016; Purves i sar., 2001).

Postoje dve kategorije holinergičkih receptora: nikotinski i muskarinski holinergički receptori. Nikotinski holinergički receptori su pentameri i tipični predstavnici jonskih kanala koji se otvaraju ligandom (receptroski ili ligand-zavisni kanali). Postoje tri tipa nikotinskih receptora i to mišićni, ganglijski i tip receptora koji se nalazi u centralnom nervnom sistemu (CNS). Muskarinski receptori pripadaju grupi receptora koji se vezuju za G-proteine. Postoji pet tipova

muskarinskih receptora ( $M_1$ - $M_5$ ). Receptori  $M_1$  ili nervni su lokalizovani u CNS, u perifernim neuronima, i u parijetalnim ćelijama želuca.  $M_2$  receptor je srčani i nalazi se u srcu i na presinaptičkim završecima centralnih i perifernih neurona.  $M_3$  receptori su vezani za stimulaciju sekrecije egzokrinih žlezdi i kontrakciju visceralnih i vaskularnih glatkih mišića. Za tipove receptora  $M_4$  i  $M_5$  se zna da im je najvažnija lokalizacija CNS, ali bez potpunog objašnjenja i opisa (Rang i sar., 2005).

### Noradrenalin

Noradrenalin (norepinefrin), iz grupe kateholamina, se sintetise u aksoplazmi i deponuje u vezikule. Sinteza noradrenalina započinje od tirozina, preko L-DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) i dopamina. Po izlučivanju vezuje se za adrenergičke receptore u tkivima, a iz sinaptičke pukotine se odstranjuje na više načina i to reapsorpcijom u nervne završetke aktivnim transportom, difuzijom u okolnu telesnu tečnost i enzimskom razgradnjom monoaminooksidazom i/ili katehol-*O*-metil transferazom (Nešić, 2016; Paravati i Warrington, 2018).

Za adrenergičke receptore se vezuju adrenalin i/ili noradrenalin. Oni su smešteni u efektornim organima simpatičkog nervnog sistema. Postoje dve klase adrenergičkih receptora: *alfa* ( $\alpha$ ) i *beta* ( $\beta$ ) receptori. Ove klase receptora nisu homogene i mogu se podeliti na 9 podtipova:  $\alpha_1$  ( $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ ,  $\alpha_{1d}$ ) i  $\alpha_2$  ( $\alpha_{2a}$ ,  $\alpha_{2b}$ ,  $\alpha_{2c}$ ), i  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ , i  $\beta_3$  receptori (Day i sar., 1997). *Alfa* receptori imaju veći afinitet prema noradrenalinu nego prema adrenalinu. S druge strane  $\beta_1$  i  $\beta_3$  receptori imaju podjednak afinitet prema noradrenalinu i adrenalinu, dok  $\beta_2$  pokazuju veći afinitet ka adrenalinu. Vezivanjem noradrenalina za  $\alpha_1$  receptor aktivira se G protein koji stimuliše konverziju fosfatidilinozitol bifosfata u IP3 i DAG. IP3 stimuliše oslobađanje  $Ca^{2+}$  jona iz depoa i uslovljava odgovor ćelije. Vezivanje noradrenalina za  $\alpha_2$  receptor aktivira se inhibitorni G protein (G1) koji smanjuje aktivnost adenilne ciklaze i dovodi do smanjenja cAMP. Smanjenje cAMP menja funkcionalno stanje ćelije. Vezivanjem noradrenalina i adrenalina za  $\beta$  receptor aktivira se stimulatívni G protein (Gs) koji dovodi do rasta aktivnosti adenilne ciklaze i porasta nivoa cAMP (Nešić, 2016).

## 2.10. RESPIRATORNI SISTEM

Osnovna uloga respiratornog sistema je dopremanje kiseonika tkivima i odstranjivanje ugljen-dioksida iz tkiva. Vazduh koji uđe u pluća preraspoređuje se u disajnim putevima i alveolama. Vazdušni prostor pluća se može podeliti na dve zone: provodnu i respiracionu. Respiraciona zona je mesto gde se odvija razmena gasova i nju čine respiracione bronhiole, alveolarni sakulusi i alveole. U provodnoj zoni se ne vrši razmena vazduha i nju čine nosna duplja, grkljan, ždrelo, traheja, bronhije i bronhiole. Traheja je disajni put prve generacije. Ova zona ima funkciju kondicioniranja vazduha odnosno zagrevanja, vlaženja i čišćenja vazduha pomoću treplji i mukusa (Kovačević, 2016).

Bolesti disajnih organa spadaju među najčešće akutne i hronične bolesti širom sveta. One se javljaju u svim društvima, bez obzira na nivo njihovog razvoja i česte su među svim starosnim grupama. Ukupna incidenca respiratornih oboljenja povećana je poslednjih decenija usled naglog povećanja faktora rizika kao što su: porast broja stanovnika i urbanizacija (češći bliski kontakti i razvijanje respiratornih infekcija), ekonomski rast i industrijalizacija što povećava nivo zagađenja atmosferskog vazduha, pogoršanje socioekonomske situacije u mnogim zemljama uz istovremeno smanjenje finansiranja zdravstvenih usluga, visok nivo zagađenja vazduha u zatvorenom, povećanje prevalencije konzumiranja duvana, epidemija HIV (human immunodeficiency virus) infekcija sa pratećim respiratornim manifestacijama (SZO, 2008).

Infekcije gornjih partija respiratornog trakta obuhvataju običnu prehladu, laringitis, faringitis/tonzilitis, akutni rinitis, akutni rinosinuzitis i akutni *otitis media*. Infekcije donjih puteva respiratornih trakta uključuju akutni traheitis, bronhitis, bronhiolitis i pneumoniju (Centre for Clinical Practice at NICE (UK), 2008). Akutne respiratorne infekcije su veoma česte naročito u pedijatrijskog populaciji. Tuberkuloza, astma, hronična opstruktivna plućna bolest (HOPB) i rak pluća su vodeći uzroci respiratornog morbiditeta i mortaliteta kod odraslih (SZO, 2008). Prateći simptom mnogih poremaćaja respiratornog trakta je bronhokonstrikcija ili brohospazam koji predstavlja abnormalnu kontrakciju glatke muskulature disajnih puteva za koju se pretpostavlja da je posledica unutrašnje abnormalnosti u miocitima disajnih puteva. Kao važan patogeni proces je i disfunkcija nervnog sistema sa viškom holinergičke i/ili tahikininske aktivnosti (Cosio i sar., 2012).

Biljni preparati vrlo često nalaze primenu u tretmanu ili kotretmanu mnogih respiratornih oboljenja, a najšće kod inflamacija gornjih respiratornih organa: prehlade, rinitisa, sunizitisa,

otitisa, bronhitisa, traheitisa, alergijskog rinitisa, a mogu biti od pomoći i kod hroničnog bronhitisa i traheitisa, astme i hronične opstruktivne bolesti pluća (Bone i Mills, 2013). Mnoge studije su pokazale da ekstrakti i etarska ulja biljnih vrsta porodice Lamiaceae ispoljavaju inhibitorne efekte na izolovanoj traheji eksperimentalnih životinja, a dobro je poznato da se ove aromatične droge i tradicionalno široko koriste kod respiratornih smetnji ovog tipa npr. bosiljak, timijan (Blažeković i sar., 2006; Janbaz i sar., 2014).

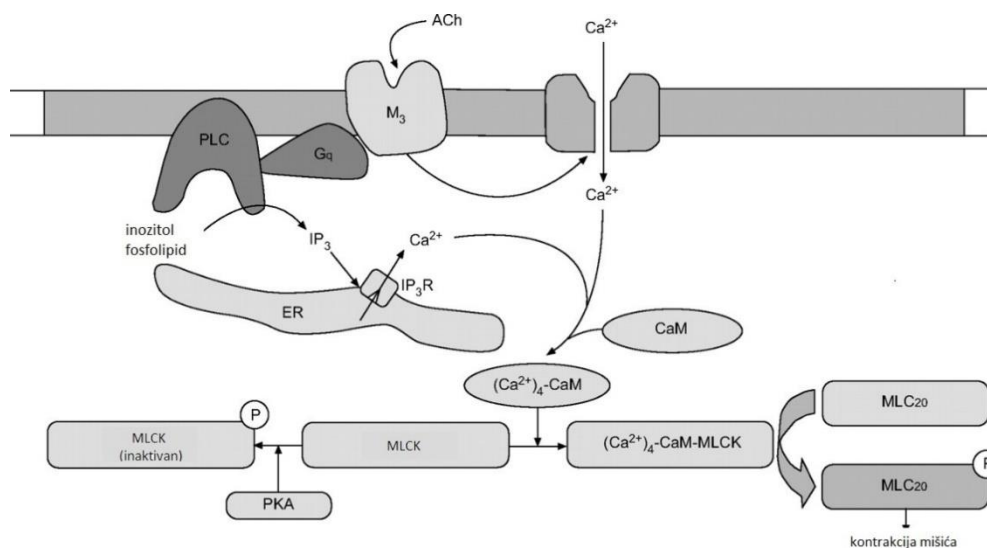
### 2.10.1. Glatki mišići traheje

Traheja ili dušnik je organ cevastog oblika koji pripada organima donjih disajnih puteva. Traheja se nastavlja na prstenastu hrskavicu grkljana, a završava se račvom kojom se deli na levi i desni primarni bronh (Bogdanović, 2003). Zid dušnika grade tri sloja: spoljni, srednji i unutrašnji. Spoljni sloj čini vezivno tkivo, srednji sloj je izgrađen od elastičnih vlakana, hrskavičavih prstenova i glatkih mišićnih vlakana, a unutrašnji sloj predstavlja respiratornu sluzokožu (Stefanović i sar., 2008).

U opnastom delu zida dušnika nalazi se mišićni sloj. Njega grade glatka mišićna vlakna grupisana uzdužno i poprečno. Svojom kontrakcijom ovi mišići regulišu širinu lumena, a time i količinu vazduha koja ulazi ili izlazi iz pluća. Funkciju muskulature respiratornog sistema regulišu autonomni nervni sistem. *N. vagus* parasimpatičkim granama inerviše dušnik, dok simpatička inervacija potiče iz donjeg i gornjeg grudnog ganglion. Razdraženjem simpatikusa i aktivacijom  $\beta_2$  receptora dolazi do opuštanja glatke muskulature u zidu dušnika i proširenja dušnika – bronhodilatacija, ali i do smanjenog lučenja žlezdi. Stimulacijom parasimpatikusa acetilholinom dolazi do povećanja tonusa glatkih mišića i sužavanja dušnika – bronhokonstrikcija – kao i do pojačanog lučenja njegovih žlezdi (Stefanović i sar., 2008).

Bronhijalni spazam, bronhokonstrikcija, se inicira povećanom produkcijom sluzi usled iritacije i alergijske reakcije, inflamacije vazdušnih puteva, udisanja dima ili hladnog vazduha, virusnih infekcija, toplotskih i osmotskih promena izazivajući širok spektar ćelijskih, vaskularnih i neuroloških događaja. Ona nastaje aktivacijom parasimpatičkog nervnog sistema kada postganglijska vlakna otpuštaju acetilholin pored glatkog mišićnog sloja organa disajnog puta. Čelije glatkih mišića na membranama imaju muskarinske receptore tipa  $M_3$  čijom aktivacijom se aktivira intracelularni G protein koji potom aktivira enzim fosforilazu C, a proces se završava povećanjem intracelularnog  $Ca^{2+}$  i kontrakcijom. Mehanizam kontrakcije glatke muskulature

disajnih puteva predstavljen je na Slici 2.10.1. Kontrakcijom glatke muskulature smanjuje se dijametar disajnih organa i povećava se njihov otpor. Bronhospazam je čest kod pacijenata sa respiratornim problemima, kao što su astma, hronični bronhitis, hronična opstruktivna bolest pluća i cistična fibroza (Bacsi i sar., 2016).



**Slika 2.10.1.** Kontrakcija glatkih mišića disajnih puteva (Giembycz i Newton, 2006)

Kontraktorni agonisti, kao što je acetilholin (ACh), vezuju se za G-proteinske (G<sub>q</sub>) spojene muskarinske M<sub>3</sub> receptore na plazmatskoj membrani, što rezultira aktivacijom fosfolipaze C (PLC) i naknadnom proizvodnjom inozitol trisfosfata (IP<sub>3</sub>) kao produkt hidrolize inozitol fosfolipida. IP<sub>3</sub> se veže za ligandno-regulisane IP<sub>3</sub> receptore (IP<sub>3</sub>R) na endoplazmatskom retikulumu (ER) da bi oslobodio Ca<sup>2+</sup> u citoplazmu. Pored toga, mnogi agonisti mogu takođe stimulisati, direktno ili indirektno, ulazak Ca<sup>2+</sup> iz spoljašnje ćelije preko dejstva Ca<sup>2+</sup> kanala u plazma membrani. Porast intracelularnog Ca<sup>2+</sup> uzrokuje da se Ca<sup>2+</sup> veže za kalmodulin (CaM; a kasnije i za kinazu lakog lanca miozina (MLCK)) sa formiranjem katalitički aktivnog (Ca<sup>2+</sup>)<sub>4</sub>-CaM-MLCK kompleksa, koji zatim fosforilira (P) serin 19 od 20-kDa regulatorni laki lanac miozina (MLC<sub>20</sub>) za povezivanje aktina i miozina i kontrakciju glatkih mišića. PKA: protein kinaza A. (Giembycz i Newton, 2006)

## 2.11. DOSADAŠNJA ISPITIVANJA FARMAKOLOŠKIH AKTIVNOSTI *Salvia sclarea* L.

### Antioksidativna aktivnost

Biljne vrste roda *Salvia* L. su važni izvori prirodnih antioksidanasa. Njihov značaj se, stoga, ogleda u primeni u prehrambenoj industriji, ali i potencijalnoj primeni u proizvodima za zaštitu zdravlja i prevenciju nekih bolesti (Baricevic i Bartol, 2000). U dosadašnjim studijama, ekstrakti i etarska ulja *S. sclarea* sa različitih područja su ispoljila odlične antioksidativne aktivnosti koje su procenjivane različitim *in vitro* metodama. U najvećem broju istraživanja ispitivana je aktivnost hvatanja slobodnih radikala različitim testovima koji uključuju upotrebu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala. Od ostalih metoda za ispitivanje antioksidativnih

efekata korišćeni su:  $\beta$ -karoten/linolna kiselina metod, ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)) metod, FRAP (ferric reducing antioxidant power) metod, test  $Fe^{2+}$ -indukovane lipoperoksidacije, fosfomolibdenski metod, tiocijanatni metod, test sposobnosti heliranja jona gvožđa, test bleomicin-Fe-indukovane lipoperoksidacije, test inhibicije lipoperoksidacije merenjem nivoa malonil-dialdehida, i test hvatanja superoksid anjona i vodonik-peroksida (Bandoniene i sar., 2002; Bozan i sar., 2002; Couladis i sar., 2003; Derakhshani i sar., 2012; Gulcin i sar., 2004; Jasicka-Misiak i sar., 2018; Kaur i sar., 2015; Loizzo i sar., 2014; Miliauskas i sar., 2004; Orhan i sar., 2007; Ogutcu i sar., 2008; Yuce i sar., 2014; Taarit i sar., 2012; Tepe i sar., 2006; Tulukcu i sar., 2009; Yalcin i sar., 2011). Ekstrakti su pokazali inhibirajući efekat na aktivnost ksantin oksidaze, ali i efekte potenciranja efekata antioksidativnih enzima superoksid dizmutaze, askorbat peroksidaze, katalaze i glutation reduktaze (Kaur i sar., 2015; Orhan i sar., 2007). Od značaja je da ekstrakti *S. sclarea* imaju protektivni efekat na dezoksiribonukleinsku kiselinu od oštećenja indukovano hidroksil radikalima (Kaur i sar., 2015).

### Antimikrobna aktivnost

#### Antifungalna aktivnost

Ekstrakti i etarsko ulje muskatne žalfije sa različitih područja ispoljavaju odlične antifungalne efekte. U Tabeli 2.11.1. je prikazan literaturni pregled antifungalnih efekata ekstrakata i etarskih ulja.

**Tabela 2.11.1.** Prikaz antifungalnih efekata ekstrakata i etarskih ulja biljne vrste *Salvia sclarea* L.

ISPITIVANI EKSTRAKT/ETARSKO ULJE	POREKLO BILJNOG MATERIJALA	GLJIVA	AUTORI
petroletarski ekstrakt cvasti	Kina	<i>Erysiphe graminis</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Scerotinia sclerotiorum</i>	Miao-feng i sar., (2003), (2005)
kiseli i puferski ekstrakt ploda	Urugvaj	<i>Alternaria</i> spp.	Dellavalle i sar., (2011)
hlороformski i acetonski ekstrakt herbe	Turska	<i>Aspergillus candidus</i> (hlороformski ekstrakt) <i>Byssochlamys fulva</i>	Gulcin i sar., (2004)
vodeni, etanolni i heksanski ekstrakt lista	Turska	<i>Epicoccum nigrum</i> , <i>Colletotrichum coccodes</i>	Yuce i sar., (2014)
etrasko ulje herbe	Turska	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Verticillium dahliae</i>	Yilar i Bayan (2017)
komercijalno etarsko ulje	Amerika	<i>Fusarium oxysporum</i> ,	Zabka i sar., (2009)

nastavak Tabele 2.11.1.

		<i>Fusarium verticillioides,</i> <i>Penicillium expansum,</i> <i>Penicillium brevicompactum,</i> <i>Aspergillus flavus,</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	
komercijalno etarsko ulje (para)	Amerika	<i>Chaetomium globosum,</i> <i>Penicillium chrysogenum,</i> <i>Cladosporium cladosporioides,</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Puškarova i sar., (2017)
komercijalno etarsko ulje	Italija	<i>Aspergillus niger,</i> <i>Aspergillus terreus,</i> <i>Penicillium chrysogenum,</i> <i>Penicillium pinophilum,</i> <i>Trichoderma viride</i>	Angelini i sar., (2006)
etarsko ulje herbe	Italija	<i>Fusarium oxysporum,</i> <i>Botrytis cinerea,</i> <i>Rhizoctonia solani,</i> <i>Alternaria solani</i>	Fraternale i sar., (2005)
etarsko ulje herbe	Italija	<i>Candida albicans</i>	Peana i sar., (1999)
komercijalno etarsko ulje	Bugarska	<i>Candida albicans,</i> <i>Candida tropicalis,</i> <i>Candida krusei, Candida glabrata, Candida parapsilosis</i>	Hristova i sar., (2013)
komercijalno etarsko ulje	Srbija	<i>Alternaria alternate,</i> <i>Aspergillus niger,</i> <i>Aspergillus terreus,</i> <i>Aspergillus flavus,</i> <i>Aspergillus ochraceus,</i> <i>Aspergillus versicolor,</i> <i>Candida albicans,</i> <i>Aureobasidium pullulans,</i> <i>Cladosporium cladosporioides,</i> <i>Cladosporium fulvum,</i> <i>Fusarium tricinctum,</i> <i>Fusarium sporotrichioides, Mucor mucedo, Penicillium funiculosum, Penicillium ochrochloron, Phomopsis helianthi, Phoma macdonaldii, Trichoderma viride, Trichophyton menthagrophytes</i>	Džamić i sar., (2008)
etarsko ulje herbe	Poljska	<i>Candida albicans</i>	Kuzma i sar., (2009)
komercijalno etarsko ulje	Kina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lv i sar., (2011)
komercijalno etarsko ulje	Nemačka	<i>Candida albicans,</i> <i>Candida glabrata</i>	Schwartz i sar., (2006)



Iako su većina ispitivanih ekstrakata i etarskih ulja muskatne žalfije ispoljili antifungalne efekte, postoje i izuzeci kada su ovi efekti izostali. Vodeni ekstrakt ploda, za razliku od kiselog i puferskog, nije imalo efekte na *Alternaria* spp. (Dellavalle i sar., 2011). Dihlormetanska frakcija acetonskog ekstrakta korena gajene i transformisane muskatne žalfije (dobijen infekcijom sterilnih izdanaka bakterijom *Agrobacterium rhizogenes*) su ispoljile slab antikandidijalni efekat (*Candida albicans*) (Kuzma i sar., 2007). Metanolni ekstrakti, pripremljeni od biljnog materijala iz Turske, takođe nisu bili efikasni u suzbijanju rasta *C. albicans* kao i *Saccharomyces cerevisiae* (Tulukcu i sar., 2009). Hloroformski i acetonski ekstrakt herbe (Turska) nisu ispoljili efekte na *Penicillium frequentans* i *Fusarium equiseti* (Gulcin i sar., 2004). Etarsko ulje herbe žalfije sa područja Turske nije ispoljilo antifungalnu aktivnost protiv ispitivanih sojeva gljiva: *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichophyton*, *Monilia*, *Microsporum*, *Mortieraula*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* i *Rhizopus* (Ogutcu i sar., 2008). Etarsko ulje herbe iz Australije nije bilo aktivno prema kandidi (*Candida albicans*) (Hammer i sar., 1999). Na gljive roda *Canidida* (*C. fammata* i *C. albicans*) nije delovalo ni komercijalno etarsko ulje musaktne žalfije iz Italije (Ebani i sar., 2018).

### **Antibakterijska aktivnost**

Ekstrakti i etarsko ulje muskatne žalfije ispoljavaju inhibitorne efekte na rast i razvoj mnogih bakterijskih sojeva, čiji je pregled prikazan u Tabeli 2.11.2.

**Tabela 2.11.2.** Prikaz antibakterijskih efekata ekstrakata i etarskih ulja biljne vrste *Salvia sclarea* L.

ISPITIVANI EKSTRAKT/ETARSKO ULJE	POREKLO BILJNOG MATERIJALA	BAKTERIJA	AUTORI
dihlormetanska frakcija acetonskog ekstrakta korena	Poljska: • transformisani koren dobijen infekcijom sterilnih izdanaka bakterijom <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , soja LBA 9402, kao nosilac pRi 1855 plazmida • gajena	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Kuzma i sar., (2007)
ekstrakt	Slovačka	meticilin-rezistentnih sojeva <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Chovanova i sar., (2013)
metanolni ekstrakti herbe	Turska	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> ,	Tulukcu i sar., (2009)

nastavak Tabele 2.11.2.

		<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	
hlороformski i acetonski ekstrakt herbe	Turska	<i>Bacillus brevis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Gulcin i sar., (2004)
metanolni i etanolni ekstrakt herbe	Iran	tetraciklin-rezistentni soj <i>Brucella melitensis</i>	Motamedi i sar., (2010)
etarsko ulje herbe	Iran	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Paknejadi i sar., (2012)
komercijalno etarsko ulje	Francuska	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	Cui i sar., (2015)
etarsko ulje	Srbija	<i>Listeria monocytogenes</i>	Tomičić i sar., (2018)
komercijalno etarsko ulje	Italija	<i>Escherichia coli</i>	Ebani i sar., (2018)
etarsko ulje herbe	Belgija	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>	Mith i sar., (2014)
komercijalno etarsko ulje	Brazil	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Pierozan i sar., (2009)
komercijalno etarsko ulje	Kina	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Lv i sar., (2011)
etarsko ulje herbe	Poljska <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> gajena	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Kuzma i sar., (2009)
etarsko ulje herbe	Italija	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i>	Peana i sar., (1999)
komercijalno etarsko ulje	Nemačka	<i>Atopodium vaginae</i> , <i>Bacteriodes vulgatus</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Streptococcus agalacticae</i>	Schwartz i sar., (2006)

Antibakterijske efekte, međutim, nisu ispoljili neki ekstrakti i etarska ulja *S. sclarea*. Dihlormetanski ekstrakti korena gajene (Poljska) i transformisane muskatne žalfije nisu bili aktivni prema *E. coli* i *P. aeruginosa* (Kuzma i sar., 2007). Ovi istraživači potvrđuju da ni etarsko ulje iste muskatne žalfije ne pokazuje efekte na *P. aeruginosa*, ali i na *E. faecalis* (Kuzma i sar., 2009). Na *S. aureus* nisu delovali vodeni i metanolni ekstrakti herbe grčke muskatne žalfije (Stagos i sar., 2012). Metanolni ekstrakti herbe, takođe sa područja Turske, nisu bili aktivni prema *Yersinia enterocolitica* i *Morganella morganii* (Tulukcu i sar., 2009). Gulcin i saradnici (2004) su pokazali da dihlormetanski i acetonski ekstrakti herbe nemaju efekte prema *L. monocytogenes* i *E. coli*. Etarsko ulje herbe sa područja Turske nije imalo antibakterijskih efekata na bakterije iz rodova: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholdria*, *Clavibacter*, *Cedecea*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Xanthomonas* i *Yersinia* (Ogutcu i sar., 2008). Na vrste roda *Enterococcus* nije delovalo ni komercijalno ulje sa područja Italije (Ebani i sar., 2018). Australijska muskatna žalfija se takođe karakteriše etarskim uljim sa slabijom antibakterijskom aktivnošću prema sledećim ispitivanim bakterijama: *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas sobria*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* i *S. aureus* (Hammer i sar., 2009). Bez efekta na *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *L. monocytogenes* i *S. aureus* bilo je i etarsko ulje iz Španije (Rota i sar., 2004). *E. coli*, *S. typhimurium* i *Pseudomonas fluorescens* nisu bile osetljive na etarsko ulje herbe iz Belgije (Mith i sar., 2014). Etarsko ulje herbe iranske muskatne žalfije nije pokazalo efekte na *Streptococcus mutans* (Paknejadi i sar., 2012). Na vaginalne izolate *Lactobacillus acidophilus* i *Lactobacillus casei* komercijalno etarsko ulje muskatne žalfije iz Nemačke nije ispoljilo efekte (Schwiertz i sar., 2006). Na bakteriju *E. coli* etarsko ulje kineske muskatne žalfije nije delovalo inhibitorno (Lv i sar., 2011), kao ni američke žalfije koje je bilo inaktivno i prema *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecalis*, *S. typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, *Pseudomonas fragi*, *Arthrobacter protophormiae* (Puškarova i sar., 2017).

### ***Antivirusna aktivnost***

Ekstrakti muskatne žalfije mogu efikasno delovati na smanjenje virusne aktivnosti. Potvrđeno je da dihlormetanski ekstrakt listova *S. sclarea* izrazito snižava aktivnost virusa

influence, sa  $EC_{50}$  vrednošću ( $EC_{50}$  = efektivna koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti virusa) od 0,06 mg/ml, dok metanolni ekstrakt značajno inhibira replikaciju *Herpes simplex* (HSV) virusa HSV-1 i HSV-2 sa  $EC_{50}$  vrednostima od 0,12 i 0,5 mg/ml, redom (Ogutcu i sar., 2008).

### **Antiprotozoalna aktivnost**

Metanolni, heksanski, hloroformski i vodeni ekstrakti herbe muskatne žalfije sa područja Turske su ispoljili inhibitorne efekte na rast i razvoj parazitskih protozoa *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania donovani* i *Plasmodium falciparum*. Ovi mikrobi su odgovorni za tropske bolesti tripanozomijazu, leišmanijazu i malariju koje su najčešće zastupljene u nerazvijenim zemljama Afrike. Najaktivniju antiprotozoalnu aktivnost ispoljio je heksanski ekstrakt jer je najjače redukovao rast tri protozoe *T. brucei rhodesiense*, *T. cruzi* i *L. donovani* sa  $IC_{50}$  vrednostima ( $IC_{50}$  = inhibitorna koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% aktivnosti protozoa) 2,40, 18,17 i 5,25  $\mu\text{g/ml}$ , redom. Najefikasniji u pogledu inhibicije uzročnika malarije, *P. falciparum*, bio je hloroformski ekstrakt čija je  $IC_{50}$  iznosila 2,54  $\mu\text{g/ml}$ . Vodeni i metanolni ekstrakti, pripremljeni polarnim rastvaračima, su s druge strane bili aktivni ali u značajno manjoj meri (Kirmizibekmez i sar., 2011).

### **Larvicidna aktivnost**

Etanolni ekstrakt nadzemnih delova muskatne žalfije iz Turske ispoljio je odličan larvicidni efekat prema larvama komarca *Culex pipiens* L. u laboratorijskim uslovima. Rastvori ekstrakta su ubačeni u komore u koje su kasnije smeštene i larve komarca. Nakon 24h primećeno je da ekstrakt žalfije u maksimalnoj koncentracijod 200 ppm izaziva letalni efekat kod 90% izloženih larvi (Cetin i sar., 2006). Odličnu larvicidnu aktivnost ispoljilo je i etarsko ulje žalfije, koje je značajno inhibiralo rast i razvoj larvi insekta *Spodoptera littoralis* (vrsta moljca) 24h nakon aplikovanja. Ulje je toksično delovalo na larve moljca prilikom obe vrste aplikovanja, topikalnom metodom i metodom fumigacije sa  $LD_{50}$  vrednostima ( $LD_{50}$  = srednja letalna doza) od 11,9  $\text{ml/m}^3$  i 0,046  $\mu\text{l}$  po larvi, redom (Pavela, 2005).

### Repelentna aktivnost

Repelentna aktivnost ekstrakata nadzemnih delova *S. sclarea* iz Irana je ispitana na modelu domaće muve *Musca domestica* L. Istraživanje je obuhvatilo petroletarski, vodeni, hlороformski, benzenski i acetonski ekstrakt u dve koncentracije (1 g/10 ml i 0,5 g/10 ml). Ekstrakti su nanošeni na parče poliesterske tkanine na Petrijevoj šolji koja je sadržala i kockice šećera radi atrakcije insekata, a koja je unošena u komoru sa odraslim jedinkama muva. Primećeno je da svi ekstrakti, u većoj ili manjoj meri u obe koncentracije, odvrćaju i odbijaju domaće muve, pa stoga mogu biti potencijalna repelentna sredstva. Jaćina repelentnih efekata opadala je sledećim redom: petroletarski>benzenski>vodeni>acetonski>hlороformski ekstrakt (Fakoorziba i sar., 2014).

Na modelu ovog insekta ispitana je repelentna aktivnost i etarskog ulja *S. sclarea*. Etarsko ulje dobijeno od biljnog materijala sa područja Amerike se pokazalo kao potencijalno efikasno repelentno sredstvo u dva test sistema, topikalnom i fumigantnom. Nakon 24h delovanja rastvora ulja, preraćunate LD<sub>50</sub> vrednosti su iznosile 29 µg po insektu i 75,6 µg/cm<sup>3</sup>, redom (Pavela, 2008).

Kayedi i saradnici (2014) su ispitivali repelentni efekat etarskih ulja *Salvia sclarea*, *Satureja khuzestanica*, *Lavandula officinalis* i *Myrtus communis* protiv ženskih jedinki komarca *Anopheles stephensi*. U ispitivanju je učestvovalo četiri dobrovoljaca kojima su aplikovana ulja (u koncentracijama 10%, 20% i 40%), kao i pozitivna (N, N-dietil-3-metil benzamid) i negativna kontrola (etanol ili bez ikakvog tretmana) na rukama, na području podlaktice. Cela podlaktica je bila izložena komarcima u kavezima u trajanju od 45 sekundi nakon čega su posmatrani eventualni ujedi inskata. Procedura izlaganja je ponavljana još tri puta. Nakon prve serije, procedura je ponavljana još četiri puta, svaki put sa novim jedinkama komaraca. Autori su utvrdili da je postojala znaćajna razlika u broju ugriza između negativnih kontrola i primenjenih prirodnih repelenata i pozitivne kontrole. Etarsko ulje muskatne žalfije je sa najmanjom koncentracijom ispoljilo repelentnu aktivnost, a maksimalni efekti su uočeni sa koncentracijom od 40% (Kayedi i sar., 2014).

Repelentni efekti etarskog ulja francuske žalfije ispitani su na tri vrste komaraca *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* i *Culex quinquefasciatus* na dobrovoljcima, sa ciljem da se oceni njegovo vreme zaštite i repelentno delovanje. Dvadesetoprocentni rastvor ulja aplikovan je na kožu podlaktice dobrovoljaca koji su tokom 8 sati na svakih 30 minuta ubacivali ruku u

komoru sa komarcima. Vreme koje je proteklo od aplikacije repelenta do prva dva uazstopna uboda okarakterisano je kao protektivno vreme, koje je za etarsko ulje žalfije iznosilo 120, 300 i 480 minuta za *Aedes*, *Anopheles* i *Culex*, redom. Procenat repelencije je iznosio 45,9%, 19%, i 100%, istim redom (Amer i sar., 2006).

### **Citotoksična i antiproliferativna aktivnost**

Citotoksična aktivnost etarskog ulja *in vivo* i *in vitro* gajene muskatne žalfije određena je na ćelijskoj liniji HL-60, koja predstavlja humane leukemijske polimijelocitne ćelije, i na NALM-6 limfoblastnim ćelijama MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) testom. *S. sclarea* je gajena u laboratorijskim uslovima na odgovarajućim hranljivim podlogama. *In vivo* žalfija gajena je iz semena, a *in vitro* iz izdanka. Oba etarska ulja su ispoljila sličnu citotoksičnu aktivnost prema HL-60 ćelijama sa IC<sub>50</sub> vrednostima od 6,5 µg/ml za *in vivo* i 6,4 µg/ml za *in vitro* gajenu žalfiju. Citotoksična aktivnost prema NALM-6 ćelijama je izraženija kod *in vitro* (IC<sub>50</sub>=8,1 µg/ml) u odnosu na *in vivo* (IC<sub>50</sub>=20,1 µg/ml) žalfiju, što autori ovog istraživanja pripisuju većem sadržaju germakrena-D u *in vitro* etarskom ulju (Kuzma i sar., 2009). Na iste ćelijske linije praćeni su citotoksični efekti dihlormetanske frakcije acetonskog ekstrakta korena transformisane i gajene muskatne žalfije. Kod obe ćelijske linije značajno efikasniji je bio ekstrakt transformisanog korena (NALM-6: IC<sub>50</sub>=2,1 µg/ml vs 37,7 µg/ml i HL-60: IC<sub>50</sub>=2,6 µg/ml vs 45,8 µg/ml). Hemijskom karakterizacijom diterpena utvrđeno je da u ovom ekstraktu ima značajno više etiopinona, kao i salvipisona i feruginola u odnosu na ekstrakt korena gajene muskatne žalfije (Rozalski i sar., 2006). Citotoksične efekte ispoljili su i metanolni ekstrakti herbe i korena žalfije iz Nemačke na HeLa ćelije (ćelije humanog karcinoma cerviksa), MCF-7 (ćelije humanog adenokarcinoma dojke), CCRF-CEM (humane ćelije T limfoblastne leukemije) i CEM/ADR5000 (ćelije adriamicin-rezistentne leukemije). Sharopov i sar., (2018) navode da citotoksična aktivnost ovih ekstrakata potiče od *orto*-dihidroksilnih grupa na fenolnim molekulima, naročito ruzmarinske kiseline.

Metanolni ekstrakt herbe *S. sclarea* iz Irana je ispoljio značajne antiproliferativne efekte na ispitivanim tumorskim ćelijskim linijama. Ekstrakt je svoje efekte ispoljio na devet ćelijskih linija, sa sledećim IC<sub>50</sub> vrednostima: COR-L23 – velike ćelije humanog karcinoma pluća (61,2 µg/ml), Caco-2 – ćelije humanog adenokarcinoma kolona (101,8 µg/ml), A375 – ćelije malignog melanoma (107,4 µg/ml), C32 – ćelije amelanocitnog melanoma (51,5 µg/ml), A549 – ćelije

humanog karcinoma pluća (67,1 µg/ml), ACHN – ćelije humanog renalnog adenokarcinoma (54,8 µg/ml); Huh-7D12 – ćelije humanog hepatocelularnog karcinoma (129,3 µg/ml); MCF-7 - ćelije adenokarcinoma dojke (47,1 µg/ml), LNCaP - ćelije karcinoma prostate (74,8 µg/ml). Na proliferaciju ćelija humanih fibroblasta kože (142BR) ekstrakt nije imao značajnog uticaja (Loizzo i sar., 2014).

Fiore i saradnici (2006) su pratili antiproliferativne efekte metanolnog ekstrakta korena gajene *S. sclarea* (Italija). Najjača inhibicija proliferacije zabeležena je kod ćelijske linije CIR (limfoblastne B-ćelije) sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 147,6 µg/ml. Ekstrakt je nešto slabije delovao na linije WiDr – ćelije kolorektalnog adenokarcinoma (194,4 µg/ml), HT-29 – ćelije kolorektalnog adenokarcinoma (196,1 µg/ml), HEC-1A – ćelije endometrijalnog adenokarcinoma (215,4 µg/ml), JEG-3 – ćelije horiokarcinoma (234,8 µg/ml), MDA Pca2b – ćelije adenokarcinoma prostate (294,4 µg/ml), T98G – ćelije glioblastoma multiforme (369,1 µg/ml), i DBTRG-05MG – ćelije glioblastoma (402,8 µg/ml). Ekstrakt je, međutim, bio inaktivan prema ćelijskoj liniji glioblastoma, astrocitoma, U-87MG (Fiore i sar., 2006).

Kirmizibekmez i saradnici (2011) su tokom studije o antiprotozalnoj aktivnosti ekstrakata herbe žalfije, poreklom iz Turske, ispitali i eventualnu toksičnost (citotoksičnost) na L6 ćelijskoj liniji pacovskih skeletnih mioblasta. Heksanski ekstrakt se pokazao potencijalno toksičnim po zdrave ćelije sa IC<sub>50</sub> vrednošću od 18,3 µg/ml. Hloroformski i metanolni ekstrakti su bili manje aktivni ka ovoj ćelijskoj liniji sa IC<sub>50</sub> od 83,9 i 87,6 µg/ml, redom, dok se vodeni pokazao kao najbezbedniji sa inhibitornom koncentracijom od preko 90 µg/ml (Kirmizibekmez i sar., 2011).

### **Antiholinesterazna aktivnost**

Mnogi biljni ekstrakti i etarska ulja utiču na inhibiciju acetilholinesteraze, ključnog enzima u razgradnji acetilholina, i predstavljaju potencijalnu strategiju za lečenje neuroloških poremećaja kao što su Alchajmerova bolest, senilna demencija, ataksija i mijastenija gravis (Mukherjee i sar., 2007; Orhan i sar., 2006). Antiholinesterazna aktivnost ekstrakata ispitana je u *in vitro* uslovima, a podrazumevala je ispitivanje sposobnosti ekstrakata da inhibiraju aktivnost acetilholinesteraze i butirilholinesteraze. Orhan i saradnici (2007) su zaključili da hloroformski ekstrakt herbe musaktne žalfije, sakupljane u Turskoj, u koncentraciji od 1 mg/ml inhibira aktivnost acetilholinesteraze za 55,3%, dok su metanolni, etil-acetatni i petroletarski ekstrakt bili

manje efektivni (25,3%, 33,5% i 25,8%, redom). S druge strane, aktivnost ovih ekstrakata u istoj koncentraciji na inhibiciju butirilholinesteraze je značajno veća tako da je za petroletarski ekstrakt iznosila 52,6%, za hloroformski 59,9%, za etil-acetatni 75,7% i za metanolni 15,1%. Na osnovu ovih rezultata primetno je da se nepolarni ekstrakti karakterišu istaknutijom antiholinesteraznom aktivnošću, odnosno da su nepolarna jedinjenja muskatne žalfije odgovorna za ove efekte (Orhan i sar., 2007). Aktivnost acetilholinesteraze i butirilholinesteraze praćena je i kod ekstrakata muskatne žalfije iz Turske. Zengin i saradnici (2018) su takođe utvrdili da je najbolje efekte ispoljio etil-acetatni ekstrakt sa aktivnim koncentracijama od  $1,87 \pm 0,09$  mg galantamin ekvivalenta (GALAE)/g za acetilholinesterazu i  $1,68 \pm 0,08$  mg GALAE/g za butirilholinesterazu, a najslabiji vodeni čije su aktivne koncentracije bile  $1,15 \pm 0,11$  i  $0$  mg GALAE/g, redom (Zengin i sar., 2018).

Etarska ulja *S. sclarea* takođe imaju sposobnost da redukuju aktivnost acetilholinesteraze i butirilholinesteraze, sa visokom aktivnošću čak i do 99% (Gulen i sar., 2018). Antiholinesterazni efekti su praćeni kod etarskog ulja muskatne žalfije (1 mg/ml), sa područja Turske, koja je gajena uz pomoć organskog ili hemijskog đubriva. Zanimljivo je da etarsko ulje gajene žalfije sa organskim đubrivom nije ispoljilo nikakve efekte prema acetilholinesterazi (0%), ali da je bilo izuzetno aktivno u inhibiciji butirilholinesteraze (76%). S druge strane etarsko ulje gajene žalfije sa hemijskim đubrivom je bilo efikasno, mada umereno, prema acetilholinesterazi (11,6%) i nešto snažnije ka butirilholinesterazi (45,1%) (Orhan i sar., 2008). Ayoub i saradnici (2018) su pokazali da sa istom koncentracijom etarskog ulja žalfije, sa područja Grčke, od 1 mg/ml inhibicija iznosi  $11,23 \pm 0,003\%$ .

### **Efekti na aglutinaciju eritrocita**

Plodovi muskatne žalfije sadrže lektin koji može imati funkciju hemaglutinina (Bird i Wingham, 1974; Medeiros i sar., 2000; Piller i sar., 1986). Lektini su proteini, makromolekuli, koji se specifično vezuju za ugljene hidrate i vrše prepoznavanje na ćelijskom i molekularnom nivou odnosno igraju brojne uloge u biološkim fenomenima prepoznavanja ćelija, proteina, i ugljenih hidrata (Rutishauser i Sachs, 1975). Mogu se naći u brojnim namirnicama, npr. u zrnavlju, krompiru i mahunarkama. U balansiranoj ishrani, ukoliko se hrana adekvatno priprema, oni nisu štetni (Gundry i Epstein, 2016). Za lektine je poznato da su antinutrijenti i da mogu proizvesti neke neželjene reakcije kao što su gastrointestinalne smetnje, alergije ili malnutricija



(Cordain i sar., 2007; Gundry, 2016). Ovi proteinski molekuli su slični antitelima i imaju sposobnost aglutinacije crvenih krvnih zrnaca, pa mogu biti od koristi za analizu krvnih grupa (Sharon i Lis, 1972; Sharon i Lis, 2004). Bird i Wingham (1974) su prvi otkrili prisustvo lektina u orašicama muskatne žalfije definišući ga kao Tn-specifični aglutinin. Nakon toga su Piller i saradnici (1986) determinisali njegov sastav i utvrdili da je po tipu N-acetilgalaktozamin (GalNAc)-vezujući aglutinin, koji se vezuje za Tn eritrocite, i u većim koncentracijama za Cad eritrocite. Eritrociti A, B i 0 krvne grupe nisu bili aglutinirani ovim lektinom, čak i nakon dodavanja papaina i sijalidaze. Od značaja je da lektin muskatne žalfije detektuje i vezuje se za Tn antigene ne samo eritrocita, već potencijalno i granulocita, trombocita, B i T limfocita, i nekih kancerskih ćelija (Berger, 1999; Piller i sar., 1986; Piller i sar., 1990).

### **Antiinflamatorna i antinociceptivna aktivnost**

Aktivnost etarskog ulja *S. sclarea* na smanjenje akutne inflamacije indukovane karagenanom i histaminom ispitana je na modelu pacova, a anti-nociceptivna na modelu miša. Nakon subkutane injekcije u dozi od 250 mg/kg ulje je pokazalo značajan antiinflamatorni efekat i umereno analgetičko dejstvo. Antiinflamatorna aktivnost etarskog ulja je bila izraženija kod edema izazvanog karagenanom, sa efektom ekvivalentnim dozi indometacina od 5 mg/kg. U studiji je pored etarskog ulja praćen i pojedinačan efekat jedinjenja koja su sastojci ulja (metil-havikol, linalol,  $\alpha$ -terpineol i linalil-acetat). Rezultati pokazuju da ova jedinjenja pojedinačno proizvode slabije antiinflamatorne efekte u odnosu na etarsko ulje, ukazujući na to da je dejstvo ulja određeno sinergističkim delovanjem ovih sastojaka. Umerena periferna analgezija koja nastaje nakon aplikovanja etarskog ulja *S. sclarea* se uglavnom pripisuje njegovim alkoholnim komponentama (Moretti i sar., 1997). Antiinflamatorna aktivnost etarskog ulja ispitana je u sličnoj studiji istraživača Peana i Satta (1993). Etarsko ulje je pokazalo efekte suprimiranja inflamacije šape pacova, indukovane karagenanom, u dozi od 350 mg/kg, subkutano. Periferni analgetički efekat etarskog ulja *S. sclarea* ispitan je subkutanom aplikacijom na miševima u dozi od 350 mg/kg, nakon intraperitonealne administracije mravlje kiseline. U oba test-sistema ulje je imalo signifikantne efekte u odnosu na kontrolu sa maksimalnim antiinflamatornim efektom nakon 3h (Peano i Satta, 1993).

U *in vitro* uslovima praćeni su antiinflamatorni efekti ekstrakata *S. sclarea* putem inhibicije enzima 5-lipooksigenaze. Utvrđeno je da metanolni ekstrakt herbe signifikantno vrši

inhibiciju aktivnosti ovog enzima sa  $IC_{50}$  vrednošću od 1,87 mg/ml, dok su kod drugih *Salvia* vrsta ove vrednosti iznosile do 8,24 mg/ml (Sharopov i sar., 2018).

### **Efekti na centralni nervni sistem**

Među etarskim uljima sa anksiolitičkim efektom poput ulja lavande, ruže, narandže, limuna, sandalovine, rimske kamilice i geranijuma, značajno mesto zauzima i etarsko ulje muskatne žalfije (Dobetsberger i Buchbauer, 2011; Setzer, 2009). Studije na miševima tretiranim etarskim uljem pokazuju opravdanost tradicionalne upotrebe *S. sclarea* kod poremećaja CNS kao što su paroksizmalna stanja, epilepsija, nesvestica, astenija, stres, neurastenija i histerija. Etarsko ulje je ispoljilo dozno zavistan sedativni efekat kod miševa nakon administracije ulja u dozama od 50 – 400 mg/kg kada je došlo do promena u ponašanju životinje, smanjenja spontane motorne aktivnosti, i potenciranja narkotičkih efekata heksobarbitala, hloral-hidrata i etanola. Etarsko ulje žalfije je, takođe, ispoljilo i antikonvulzivno dejstvo protiv epileptičkih napada izazvanih električnim šokovima, ali ne i kod konvulzija izazvanih pentametilentetrazolom ili strihninom, ali je s druge strane, delovalo protektivno od letalnih doza ovih konvulzivnih supstanci. Na motornu aktivnost koja je stimulirana amfetaminom ili kofeinom (CNS stimulansi) nije bilo efekata. Ponovljene niske doze ulja (50 – 100 mg/kg) dovele su do letalnog ishoda usled hipotermičkog efekta i poremećaja disanja ukazujući da etarsko ulje ima opšti nespecifičan inhibitorni efekat na CNS koja se ogleda antikonvulzivnim efektom, uticajem na motornu aktivnost i potenciranjem narkotičkog efekta lekova. Ovo etarsko ulje, čak i samostalno primenjeno, ispoljava narkotički efekat u dozi koja je blizu toksične ( $LD_{50} = 520$  mg/kg za miševe i 740 mg/kg za pacove). Treba naglasiti da ekstrakte *S. sclarea* treba koristiti orezno, posebno kada je cilj dejstva CNS (Peano i Moretti, 2002; Peano i Satta, 1992).

Cinar i saradnici (2011) su ispitivali stepen vezivanja metanolnog ekstrakta listova *S. sclarea* (Turska) za  $\mu$  opiodne peptidne receptore u *in vitro* uslovima. U studiji je utvrđeno da ovaj ekstrakt, odnosno jedinjenja iz ekstrakta, imaju izražen afinitet vezivanja za ove receptore time što izmeštaju radioobeleženi diprenorfin iz veze sa receptorom. U maksimalnoj koncentraciji ekstrakta od 0,11 mg/ml stepen vezivanja iznosio je 60,2% u izolovanim moždanim membranama pacova i 68,2% u transformisanoj ćelijskoj kulturi ovarijuma kineskog hrčka koje eksprimiraju humani  $\mu$  opiodni receptor (Cinar i sar., 2011). S druge strane, ispitan je i mehanizam delovanja jedinjenja korena muskatne žalfije na centralni nervni sistem (CNS) *in*

*in vitro* na modelu procene afiniteta vezivanja za serotoninergičke (5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2A</sub> i 5HT<sub>2C</sub>), noradrenergičke ( $\alpha_1$  i  $\alpha_2$ ) i dopaminergičke (D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>) receptore. Afinitet vezivanja za ove receptore ispitan je sa metanolnim ekstraktom korena na izolovanim delovima mozga (*cortex* i *corpus striatum*) Wistar pacova. Maksimalna koncentracija ekstrakta od 125  $\mu\text{g/ml}$  je pokazala visok stepen vezivanja za 5HT<sub>2A</sub> receptore (88,39%) i umeren za D<sub>2</sub> receptore (46,76%). Ekstrakt nije ispoljio efekte na 5HT<sub>1A</sub>, 5HT<sub>2C</sub>, D<sub>1</sub> i noradrenergičke receptore (Federica i sar., 2006).

Efekat na CNS ispitan je i u studiji Grossa i saradnika (2013) koji su pratili uticaj hronične upotrebe masnog ulja *S. sclarea* na bihevioralne i biohemijske parametre kod miševa. Miševi Sabra linije su uzgajani koristeći selektivni pristup uzgoja koji se zasniva na bihevioralnoj paradigmi dominantne i pokorne veze, koja se, inače, koristi za ispitivanje antidepresivnih lekova i lekova za stabilizaciju raspoloženja. Životinje su hronično hranjene uljem *S. sclarea* ili uljem suncokreta koje je služilo kao negativna kontrola (160 ml/kg hrane). Efekti dugotrajne upotrebe ulja muskatne žalfije su praćeni kod grupe miševa starosti 4 nedelje sve do 16 nedelje, i kod grupe miševa čije su majke hranjene od začeca pa sve do navršene 16 nedelje života, pri čemu se svaka od njih sastojala od dominantnih i pokornih miševa. Dominantne životinje, čije su skotne majke dobijale hranu obogaćeno uljem žalfije, pokazale su značajno smanjenje dominantnog i anksioznog ponašanja, u poređenju sa životinjama tretiranim suncokretovim uljem. Slična tendencija uočena je i kod životinja sa pokornim ponašanjem tretirane uljem *S. sclarea* kod koje je primećeno i značajno smanjenje nivoa kortikosterona za razliku od ostalih grupa. Ovi nalazi potvrđuju hipotezu o ulja *S. sclarea* poseduje anksiolitička svojstva (Gross i sar., 2013).

U istraživanju Seol i saradnika (2010) etarsko ulje *S. sclarea* je ispoljilo značajan antidepresivni efekat kod pacova, u testu forsiranog plivanja, u odnosu na kontrolu i etarsko ulje kamilice, lavande i ruzmarina. Etarsko ulje je pacovima aplikovano intraperitonealno u rastvoru sa bademovim uljem, u dozi od 0,1 ml/100 g 60 minuta pre izvođenja testa, kao i putem inhalacije (20 ml vruće vode i 1 ml ulja) 60, 120, 240 i 360 minuta pre testa. Vreme imobilnosti je u odnosu na fluoksetin i kontrolu bilo signifikantno kraće (10,20s vs 19,29 i 50,91s;  $p < 0,001$ ), a u odnosu na imipramin slično (10,20s vs 12,78s). Istraživanjem mehanizma antidepresivne aktivnosti etarskog ulja uočeno je da ono najverovatnije nastupa nakon interakcije sa

dopaminergičkim receptorima, jer je aktivnost blokirana supstancom SCH-23390 i haloperidolom (antagonisti D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> i D<sub>4</sub> receptora) (Seol i sar., 2010).

### **Efekti na kardiovaskularni sistem (KVS)**

Efekti etarskog ulja *S. sclarea* na KVS ispitani su na modelu indukovanog stresa hroničnom imobilizacijom koji je izazvao endotelnu disfunkciju pacova. Pacovima su intraperitonealno aplikovani bademovo ulje, rastvori etarskog ulja (5%, 10% i 20%; 0,1 ml/100 g) ili nifedipin (10 mg/kg). Nakon aplikovanja sledio je stres imobilizacije 2h dnevno, 14 dana. Pacovima su praćeni sistolni krvni pritisak, srćana frekvencija, serumske koncentracije kortikosteroida (biomarker hroničnog stresa) i malonil-dialdehid (biomarker oksidativnog stresa), produkcija azot-monoksida i nivoi eNOS (NO-sintaza, biomarker endotelne disfunkcije). Endotelna disfunkcija praćena je merenjem efekta etarskog ulja na kontrakciju torakalne aorte pacova *in vitro*. Sistolni krvni pritisak pacova je znaćajno redukovan sa sve tri koncentracije etarskog ulja (5%-132,02 mmHg, 10%-127,97 mmHg, 20%-127,09 mmHg) u odnosu na kontrolu, 152,82 mmHg, dok je srćana frekvencija smanjena sa maksimalnom koncentracijom od 20% (404,54 otkucaja/min vs 450,85 otkucaja/min). Serumska koncentracija kortikosteroida i nivoi malonil-dialdehida su u odnosu na kontrolu znaćajno bili sniženi tretmanom 10% i 20% uljem (10%-32,27 ng/ml i 20%-24,83 ng/ml vs 72,82 ng/ml; 10%-73,89 nM/ml i 20%-78,00 nM/ml vs 105,27 nM/ml). Maksimalna koncentracija rastvora etarskog ulja povećala je produkciju NO (47,88 vs 25,76 µM) i ekspresiju eNOS u odnosu na kontrolu. Aortni prstenovi pacova su relaksirani maksimalnom koncentracijom etarskog ulja (Yang i sar., 2014).

### **Antidijabetski efekat**

U studiji istraživaća Raafat i Habi (2018) ispitano je delovanje etarskog ulja muskatne žalfije iz Libana, i to sa dva lokaliteta Bejrut i Tanajel. Istraživanje je sprovedeno na aloksan-indukovanim dijabetičnim miševima kojima su etarska ulja, rastvorena u dimetil-sulfoksidu, aplikovana *per os* u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg. Glikemija je kod akutnog dijabetskog efekta praćena odmah po aplikaciji ulja i nakon 0,5, 2 i 6 sati. Kod subhroničnog efekta ulja su aplikovana svakog drugog dana, a parametri su praćeni 1., 3., 5. i 8. dana nakon primenjenih doza. U poređenju sa negativnom kontrolom, vehikulumom, oba testirana etarska ulja pokazuju statistički znaćajno sniženje nivoa glukoze u krvi. Ulje sa lokaliteta Bejrut je redukovalo

glikemiju za 42,3%, 44,7% i 51,7% nakon 6h, sa primenjenim dozama od 50, 100 i 200 mg/kg, redom. Ulje sa lokaliteta Tanajel bilo nešto niže efikasnosti sa redukcijom od 31%, 40,5% i 42% nakon 6h sa istim dozama, redom. U subhroničnom testu, osmog dana je nivo glukoze u krvi kod prvog ulja snižen još više, i to za 44,1%, 50,2% i 52% za primenjene tri doze, dok je kod drugog iznosio 40,6%, 42,1% i 44%, redom. Autori studije zaključuju da su za ovakve efekte odgovorni linalol i linalil-acetat čiji su efekti takođe bili ispitani istim testom (Raafat i Habi, 2018).

U *in vitro* studiji Zengin i saradnika (2018) pokazan je umereni inhibitorni efekat ekstrakata herbe *S. sclarea* sa područja Turske na aktivnost  $\alpha$ -amilaze, ali i jak na aktivnost  $\alpha$ -glukozidaze. Aktivne koncentracije etil-acetatnog, metanolnog i vodenog ekstrakta koje su inhibirale  $\alpha$ -amilazu kretale su se od 0,19-1,17 mmol akarboza ekvivalenta (ACAE)/g, a opseg koncentracija koje su inhibirale  $\alpha$ -glukozidazu bio je 9,11-18,24 mmol ACAE/g. Vodeni ekstrakt je bio najefikasniji u redukciji enzima  $\alpha$ -glukozidaze dok je u isto vreme bio najmanje aktivan u inhibiciji  $\alpha$ -amilaze (Zengin i sar., 2018).

### **Ostale farmakološke aktivnosti**

Etarsko ulje *S. sclarea* aplikovano intraperitonealno pacovima pojačava stvaranje žuči u jetri, odnosno ispoljava holeretičke efekte. Maksimalni volumen sekretovane žuči zabeležen je nakon 3 sata od aplikovanja (Peano i Moretti, 2002). Lis-Balchin i Hart (1997) su ispitivali efekte etarskog ulja na kontraktilnost skeletne i glatke muskulature *in vitro*. Ovi istraživači su utvrdili da primena ulja izaziva bifazične efekte, povećanje i smanjenje kontraktilnosti električnom strujom stimuliranih skeletnih mišićnih vlakana dijafragme pacova, dok je kod glatkih mišića ileuma zamorca delovalo spazmogeno, a potom spazmolitično nakon stimulacije električnom strujom (Lis-Balchin i sar., 1997). Značajno je da etarsko ulje nema genotoksične efekte koji su ispitani na humanim embrionalnim ćelijama pluća, HEL 12469, odnosno da ulje ne izaziva značajno oštećenje DNK *in vitro* nakon 24h u Komet testu u alkalnim uslovima (Puškarova i sar., 2017). Ceschel i saradnici (1998) su ispitivali permeabilnost etarskog ulja kroz izolovanu bukalnu sluzokožu svinje, *in vitro*. Etarsko ulje je inkorporirano u tri formulacije: mikroemulziju, hidrogel, i mikroemulziju/hidrogel. Utvrđeno je da je mikroemulzija/hidrogel omogućila najefikasnije difundovanje jedinjenja iz etarskog ulja kroz bukalnu sluzokožu, pri čemu su terpeni okarakterisani sa najvećim efektom permeabilnosti (Ceschel i sar., 1998). Vodeni ekstrakt herbe žalfije sa područja Turske delovalo je inhibitorno na aktivnost tirozinaze,

enzima uključenog u melagenezu, čija je unhibicija značajna u tretmanu hiperpigmentacija kože. Ovaj ekstrakt obiluje katehinom, za razliku od etil-acetatnog i metanolnog ekstrakta koji nisu ispoljili ovaj efekat, pa se smatra da ova aktivnost vodenog ekstrakta potiče najvećim delom od katehina (Zengin i sar., 2018).

### **2.11.1. Klinička efikasnost biljne vrste *Salvia sclarea* L.**

#### **Efekti na ublažavanje simptoma dismenoreje**

U randomiziranoj, placebo kontrolisanoj studiji sprovedenoj na 67 studentkinja u Koreji, praćeni su efekti aromaterapije na ublažavanje menstrualnih grčeva. Ispitanice su bile podeljene u tri grupe, tako da je prva grupa bila eksperimentalna (n=25), druga placebo (n=20), a treća kontrolna (n=22). Prva grupa je bila podvrgnuta tretmanu aromaterapije koju je podrazumevala masažu abdomena rastvorom etarskog ulja *S. sclarea*, *Lavandula officinalis* i *Rosa centifolia* u odnosu 2:1:1 u bademovom ulju. Placebo grupi je aplikovano samo bademovo ulje, na isti način i pod istim uslovima kao i kod eksperimentalne grupe, dok je kontrolna grupa bila bez ikakvog tretmana. Rastvor etarskih ulja je nanošen na predeo abdomena, masažom u trajanju od 15 minuta tokom nedelju dana, tako da je poslednji dan tretmana bio prvi dan menstrualnog ciklusa. Nivoi menstrualnih grčeva su procenjivani korišćenjem vizuelne analogne skale, a težina dismenoreje je merena višedimenzionalnim sistemom bodovanja. Na osnovu izjašnjavanja ispitanica iz sve tri grupe i višestrukom regresionom analizom, došlo se do zaključka da je u eksperimentalnoj grupi došlo da značajnog ublažavanja simptoma dismenoreje, pre svega bola, u obe vremenske tačke nakon eksperimenta (prvi i drugi dan menstrualnog ciklusa). Ova klinička studija dokazuje da je aromaterapija i topikalno nanošenje kombinacije etarskih ulja muskatne žalfije, lavande i ruže efikasna u smanjenju težine menstrualnih tegoba, te se ona može preporučiti kao deo nege i tretmana za žene koje doživljavaju simptome dismenoreje (Han i sar., 2006).

#### **Efekti na ublažavanje bola i smanjenje anksioznosti kod porodilja**

Klinička randomizirana studija, sprovedena u Italiji u trajanju od osam meseci na 513 trudnica, ispitala je efekte aromaterapije na smanjenje straha i anksioznosti, kao i na ublažavanje bolova i pojačanje porođajnih kontrakcija. Kriterijumi koje su trudnice u studiji ispunjavale jesu da su u 36 nedelji trudnoće (ili više) i da nose jedan plod cefalične prezentacije.

Trudnice su nasumično bile podeljene u dve grupe tako da je 251 trudnica bila u eksperimentalnoj grupi, a 262 u kontrolnoj. Ispitanice iz eksperimentalne grupe su birale jednu vrstu etarskog ulja koja bi bilo aplikovanou obliku rastvora u bademovom ulju (*S. sclarea* – muskatna žalfija, *Chamaemelum nobile* – rimska kamilica, *Boswellia carteri* – tamjan, *Lavandula angustifolia* – lavanda ili *Citrus reticulata* – mandarina). Načini primene su uključivali masaže, akupresurne tačke, kupke za stopala, porođajne bazene, obloge i komprese. Žene su same procenjivale stepen porođajnih bolova pre primene i 30 minuta nakon primene aromaterapije korišćenjem Lickert skale. Za etarsko ulje *S. sclarea* opredelilo se 28 trudnica (11%). Primena aromaterapije je značajno redukovala osećaj bola kod prvorođkinja u odnosu na kontrolnu grupu, dok je ona bila beznačajna kod žena koje su već rađale. Međutim, ne treba zanemariti činjenicu da se ipak bol i anksioznost tokom napredovanja porođaja pojačavala. Zaključak je da ovi rezultati nisu dovoljno uverljivi i da postoji sumnja da je u pitanju slučajnost, tako da studija ostavlja prostor za neka dalja ispitivanja i potencijalnu primenu aromaterapije u svrhu ublažavanja bola i smanjenja bola i anksioznosti kod trudnica i porodilja (Burns i sar., 2007).

### **Efekti na ublažavanje bola i smanjenje anksioznosti tokom menstrualnog ciklusa**

Aromaterapija i abdominalna masaža etarskim uljima može redukovati bol i anksioznost kod žena tokom menstrualnog ciklusa. Duplo slepa, placebo kontrolisana, klinička studija je ispitivala značaj aromaterapije tokom menstrualnog ciklusa kod 63 žena, medicinskih sestara, koje su svoje iskustvo bola ocenilo preko 5, na skali od 0-10. Ispitanice su bile podeljene u tri grupe, tako da je jedna bila eksperimentalna, druga placebo, a treća je bila bez tretmana. Etarsko ulje muskatne žalfije primenjivano je desetominutnom abdominalnom masažom, dva puta dnevno, prvog i drugog dana ciklusa, u kombinaciji sa etarskim uljima *Rosa centifolia*, *Rosa damascena*, *Pelargonium graveolens* i *Zingiber officinale* u odnosu 1:0,5:0,1:1:1, koja su rastvorena (3%) u masnim uljima badema, jojobe i noćurka (8:1:1). Placebo grupa je aplikovala samo bademovo ulje. Pre i nakon 24h od poslednjeg tretmana pacijentkinje su klasifikovale bol i stepen anksioznosti odgovarajućom vizuelnom, analognom skalom. Rezultati studije, nakon multiple regresione analize pokazuju da aromaterapija statistički značajno ublažavaju osećaj bola i stepen anksioznosti, u odnosu na placebo grupu i grupu bez tretmana (Kim i sar., 2011b).

### **Efekti na krvni pritisak kod pacijentkinja sa urinarnom inkontinencijom**

Seol i saradnici (2013) su sprovedi kliničku, randomiziranu, duplo-slepu studiju koju su činile 34 pacijentkinje iz Koreje sa urinarnom inkontinencijom. Pacijentkinje su bile podeljene u eksperimentalne i kontrolne grupe (dve grupe su podvrgnute efektima etarskog ulja muskatne žalfije ili lavande, a jedna kontrolna, bademovim uljem). Ulja su rastvorena u bademovom ulju (5%) i kao takva aplikovana 60 minuta pacijentkinjama putem inhalacije, i to tokom urodinamičkog pregleda. U studiji su procenjivani sledeći parametri: krvni pritisak, puls, stopa respiracije i nivo salivarnog kortizola. Kod grupe koja je tretirana etarskim uljem muskatne žalfije primećeno je značajno sniženje sistolnog krvnog pritiska za 4,7% u odnosu na kontrolu, međutim zabeležen je porast dijastolnog za 5,1%. Srčani puls je smanjen za 5% u odnosu na kontrolu, ali bez statističke značajnosti. Primena ulja muskatne žalfije dovela je do statistički značajnog smanjenja respiratorne stope za 5,5% u odnosu na kontrolu. Koncentracija salivarnog kortizola se smanjila kod ove grupe pacijentkinja za 0,9, međutim bez statističke značajnosti u odnosu na kontrolu. Zaključak studije je inhalacija 5% etarskog ulja *S. sclarea* efikasno može ublažiti stres koji se javlja kod pacijentkinja sa urinarnom inkontinencijom i da može indukovati osećaj relaksacije tokom urodinamičkog pregleda (Seol i sar., 2013).

### **Efekti na promene nivoa 5-hidroksitriptamina i kortizola kod žena u menopauzi**

U ovoj pilot studiji Lee i saradnika (2014) su učestvovala 22 žene pedesetih godina koje su u periodu menopauze. Ispitanice su na osnovu odgovarajućih skala podeljene u dve grupe, normalna i grupa žena sklone razvoju depresije. Nakon inhalacije etarskog ulja *S. sclarea* primećeno je značajno smanjenje nivoa kortizola i povećanje nivoa 5-hidroksitriptamina (5-HT) kod obe grupe ispitanica. Nivoi 5-HT su bili u značajnijoj meri povećani kod žena iz normalne grupe (484% vs 341%), a nivo kortizola kod žena koje su sklone depresiji (31% vs 16%). zaključuju da inhalacija etarskim ulje muskatne žalfije može značajno doprineti sprečavanju nastanku depresije kod žena nakon reproduktivnog perioda (Lee i sar., 2014).

### **Efekti na psihofiziološko stanje kod starijih ispitanika**

Studija je obuhvatala dvadeset ispitanika starosti 55-80 godina koji su bili podvrgnuti isparenjima etarskog ulja (0,1 mg/m<sup>3</sup>) i kojima je puštana relaskirajuća muzika u trajanju od 20 minuta. Kontrolnu grupu je činio isti broj ispitanika koji su samo slušali relaks-muziku. Efekti na



kardiovaskularni sistem procenjeni su merenjem broja otkucaja srca i krvnog pritiska, dok su efekti na nervni sistem praćeni merenjem mentalnog kapaciteta, mentalne brzine, i parametara WAM testa (osećaj blagostanja, aktivnost, raspoloženje). Zaključak studije je da etarsko ulje muskatne žalfije blago smanjuje nivo sistolnog i dijastolnog krvnog pritiska i broj otkucaja srca (sa  $124,75 \pm 3,93/78,35 \pm 2,11$  mmHg na  $118,25 \pm 3,68/76,50 \pm 1,76$  mmHg;  $77 \pm 2,49$  na  $73,95 \pm 1,94$  otkucaja u minutu). Takođe, deluje blago stimulatивно na mentalni kapacitet, ali bez značajnih efekta na mentalnu brzinu i psihofiziološke parametre (WAM) u odnosu na kontrolnu grupu (Koval i sar., 2015).

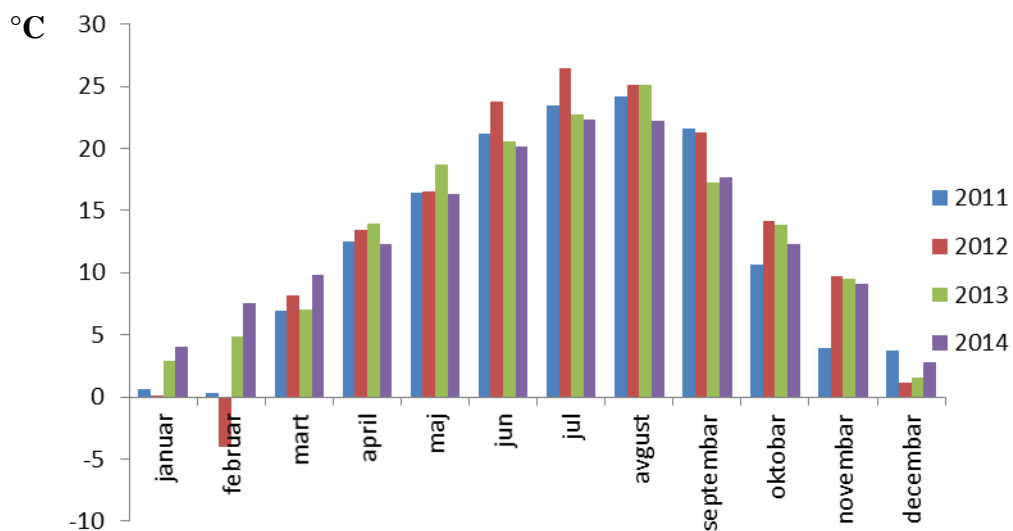
### **Efekti na psihofiziološko stanje tokom fizičke aktivnosti**

U ovoj studiji je učestvovalo dvadeset žena starosti 20-50 godina koje su bile fizički aktivne 90 minuta vežbajući istočne plesove tokom čega su bile podvrgnute isparenjima etarskog ulja *S. sclarea* u različitim koncentracijama od 0,5, 1 i 2 mg/m<sup>3</sup>. Kontrolnu grupu su činile žene koje su samo bile fizički aktivne. Uticaj etarskog ulja na kardiovaskularni sistem procenjen je merenjem broja otkucaja srca i krvnog pritiska, a uticaj na nervni sistem ocenjivan je merenjem parametara WAM testa (osećaj blagostanja, aktivnost, raspoloženje). Rezultati studije pokazuju da etarsko ulje *S. sclarea*, u koncentracijama od 1 i 2 mg/m<sup>3</sup>, nakon fizičke aktivnosti ispoljava hipotenzivne i tahikardijalne efekte. Fizička aktivnost je kod obe grupe ispitanica značajno popravila psihofiziološko stanje, mereći WAM parametre. Naročito je primećeno da podvragavanje isparenjima etarskog ulja muskatne žalfije u koncentracijama 1 i 2 mg/m<sup>3</sup> ono dodatno raste (Bekmambetov i sar., 2015).

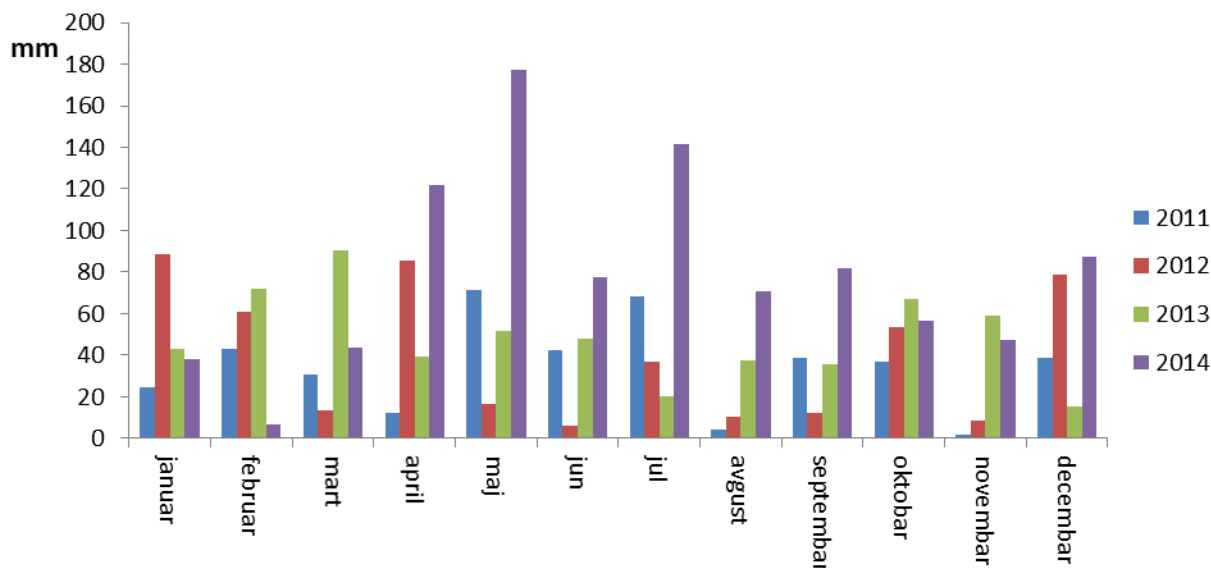
### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. BILJNI MATERIJAL I KARAKTERISTIKE STANIŠTA

Nadzemni delovi, stabljika sa listovima i cvetovima (*herba*), biljne vrste *Salvia sclarea* L., sakupljani su u Malči, u okolini Niša (GPS koordinate: 43°33'05.27" N, 22°03'06.26" E; na oko 334 m nadmorske visine), jula 2011, 2012, 2013 i 2014. godine u punoj fazi cvetanja. Na pomenutom lokalitetu vrsta nastanjuje suva, travnata i u izvesnoj meri ruderalna staništa u neposrednoj blizini naselja. Prema zvaničnim podacima Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije u 2011. godini srednja godišnja temperatura je iznosila 12,2°C, u 2012. godini 13°C, u 2013. godini 13,2°C i u 2014. godini 13°C. Godišnja količina padavina u 2011. godini je bila 411,9 mm, u 2012. godini 617,5 mm, u 2013. godini 581,5 mm i u 2014. godini 950,2 mm (RHMZ, 2011; RHMZ, 2012; RHMZ, 2013; RHMZ, 2014). Srednje prosečne mesečne temperature vazduha i mesečne količine padavina tokom svih meseci u 2011, 2012, 2013. i 2014. godini prikazani su na Slikama 3.1.1. i 3.1.2.



**Slika 3.1.1.** Srednje prosečne mesečne temperature vazduha u periodu od 2011. do 2014. godine na teritoriji Niša



**Slika 3.1.2.** Prosečne mesečne količine padavina u periodu od 2011. do 2014. godine na teritoriji Niša

Biljni materijal je identifikovao prof. dr Bojan Zlatković, sa Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Nišu, dok je herbarski primerak deponovan u Herbarijumu Instituta za botaniku i Botaničke bašte "Jevremovac" Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu (BEOU), pod kolektorskim brojem 17077.

Materijal (*herba*) je sušen na tamnom, hladnom i dobro provetrenom mestu, a zatim je čuvan u papirnim kesama do analiza. Osušeni biljni materijal je samleven na mehaničkom mlinu do stepena usitnjenosti grubog praška (0,75) i u takvom obliku korišćen za pripremu ekstrakata.

### 3.2. MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (*Salviae sclareae herba*)

Morfo-anatomske karaktersitike biljne droge *Salviae sclareae herba* proučavane su u Laboratoriji za sistematiku i ekologiju biljaka, Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Nišu.

Za detaljnu morfološku analizu delova droge (list, stablo i cvet) i posmatranje površinskih struktura korišćen je stereomikroskop Leica MZ16A sa Leica DFC320 digitalnom kamerom (Leica Microsystem©, Wetzlar, Germany).

Anatomske karakteristike pojedinačnih organa koji čine drogu praćene su na trajnim histološkim preparatima, sa akcentom na analizu karakteristika indumentuma biljke. Analizirani su poprečni preseći lista i stabla koji su sečeni ručno, kao i delovi cveta (krunica i brakteja) koji su posmatrani *in toto*. Preparati su obezbojeni hloralhidratom i fiksirani rastvorom želatina, a zatim posmatrani i slikani digitalnom kamerom Leica DFC290, na svetlosnom mikroskopu Leica DM 1000 (Leica Microsystem©, Wetzlar, Germany).

### 3.3. IZRADA EKSTRAKATA

U toku rada analizirano je četrdeset različitih ekstrakata *Salviae sclareae herba*, po deset iz svake od četiri godine sakupljanja biljnog materijala. Kao rastvarači korišćeni su etanol i metanol različitih koncentracija uz tri ekstrakcione tehnike. Postupkom jednostruke maceracije, po propisu četvrte jugoslovenske farmakopeje (Ph. Jug. IV), izrađeni su ekstrakti sa koncentrovanim (96% v/v) etanolom, apsolutnim metanolom i 80% metanolom (v/v). Metodom ultrazvučne ekstrakcije napravljeno je pet ekstrakta i to koncentrovanim (96% v/v), 80% (v/v) i 60% (v/v) etanolom, i apsolutnim i 80% (v/v) metanolom. Dva ekstrakta su dobijena postupkom ekstrakcije, digestije, koja je izvedena na povišenoj temperaturi pomoću 80% (v/v) i 60% (v/v) etanola.

Jednostruka maceracija predstavlja jednostepenu ekstrakciju propisano usitnjene droge sa propisanim rastvaračem na sobnoj temperaturi. Usitnjena droga ekstrahovana je rastvaračem u odnosu 1:10, u erlenmajeru sa šlifovanim zatvaračem. Proces ekstrakcije je trajao pet dana uz mućkanje dva puta dnevno, a nakon toga je filtriranjem i presovanjem odvojem macerat od ostatka droge (Ph. Jug. IV). Dobijeni macerat je po propisu stajao još dva dana na hladnom mestu, nakon čega je uz pomoć rotacionog vakum uparivača (Kika-Werke) potpuno uklonjen rastvarač. Suvi ekstrakti su čuvani zatvorenim staklenim bočicama u frižideru na 4°C do analize.

Metoda ultrazvučne ekstrakcije podrazumevala je ekstrakciju droge rastvaračem u odnosu 1:10, u ultrazvučnom kupatilu u trajanju od 20 minuta. Nakon toga izvršena je filtracija kroz filter-papir, a dobijeni filtrat, odnosno tečni ekstrakt je uparavan do suva u rotacionom vakuum uparivaču (Kika-Werke). Ekstrakti su čuvani u dobro zatvorenim staklenim bočicama na temperaturi do 4°C do analize.

Metodom digestije je usitnjeni biljni materijal ekstrahovan rastvaračem tri sata u vodenom kupatilu na temperaturi od 40°C u odnosu 1:10. Dobijeni tečni ekstrakt je uz pomoć rotacionog vakum uparivača (Kika-Werke) potpuno uparen, a suvi ekstrakt je čuvan u zatvorenoj staklenoj bočiciu frižideru na 4°C do analize.

U daljem tekstu ekstrakti će biti označeni na sledeći način, uz dodatu godinu kada je biljni materijal, od kog je ekstrakt spravljen, sakupljan:

- EM - ekstrakcija maceracijom i koncentrovanim etanolom
- MM - ekstrakcija maceracijom i apsolutnim metanolom
- M80 - ekstrakcija maceracijom i 80% (v/v) metanolom
- EU - ekstrakcija ultrazvučnom metodom i koncentrovanim etanolom
- E80U - ekstrakcija ultrazvučnom metodom i 80% (v/v) etanolom
- E60U - ekstrakcija ultrazvučnom metodom i 60% (v/v) etanolom
- MU - ekstrakcija ultrazvučnom metodom i apsolutnim etanolom
- M80U - ekstrakcija ultrazvučnom metodom i 80% (v/v) etanolom
- E80T - ekstrakcija digestijom i 80% (v/v) etanolom
- E60T - ekstrakcija digestijom i 60% (v/v) etanolom

### **3.4. HEMIJSKA KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.**

#### **3.4.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola**

Sadržaj ukupnih fenola određen je kolorimetrijskom metodom po Hagermanu sa saradnicima (2000). Metoda podrazumeva upotrebu komercijalno dostupnog Folin-Ciocalteu reagensa, koji je neposredno pred analizu razblažen istom zapreminom destilovane vode. Razblaženim uzorcima ekstrakata u epruveti (0,02 ml) dodato je 0,48 ml destilovane vode, 0,25 ml Folin-Ciocalteu reagensa i 1,25 ml 20% rastvora  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ . Sadržaj epruvete je dobro promešan, a onda ostavljen da stoji 40 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je merena apsorbanca na UV-Vis spektrofotometru (Evolution 60 Thermo scientific) na 725 nm, uz slepu probu koja je umesto rastvora razblaženog ekstrakta sadržala destilovanu vodu. Rezultati su izraženi kao miligram katehinskih ekvivalenata po gramu ekstrakta (mg CE/g) i milligram ekvivalenata galne kiseline po gramu ekstrakta (mg GAE/g). Pre analize ekstrakata konstruisana je kalibraciona kriva korišćenjem različitih razblaženja rastvora katehina i galne kiseline kojima

je, takođe, po istoj proceduri, dodavana destilovana voda, Folin-Ciocalteu reagens i 20% rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10\text{H}_2\text{O}$ . Apsorbanca ovakvih rastvora, nakon 40 minuta, merene su na 725 nm, a kriva je konstruisana iz odnosa koncentracije rastvora katehina i galne kiseline i dobijenih vrednosti ekstincija (Hagerman i sar., 2000). Sve analize su izvedene u tri ponavljanja.

### 3.4.2. Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Ukupni tanini su u ekstraktima određivani na sličan način uz upotrebu Folin-Ciocalteu rastvora. Epruveti koja je sadržala 1 ml destilovane vode i 1 ml razblaženog uzorka dodato je 100 mg polivinilpolipirrolidona (PVPP) čija je uloga vezivanje tanina iz ekstrakta. Nakon toga je sadržaj u epruveti dobro promućkan i ostavljen 15 minuta na 4°C da se ohladi. Smeša je potom centrifugirana 10 minuta na 3000 obrtaja/min, a za dalju analizu korišćeni su supernatanti koji su sadržali sva fenolna jedinjenja izuzev tanina jer su se oni prethodno vezali za PVPP. Na ovaj način su iz supernatanta, prethodno opisanom metodom (3.4.1.), određeni ne-taninski polifenoli. Sadržaji tanina u ekstraktima određeni su iz razlike sadržaja ukupnih i ne-taninskih polifenola (Hagerman i sar., 2000). Sve analize su izvedene u tri ponavljanja.

### 3.4.3. Određivanje sadržaja ukupnih flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima određivan je kolorimetrijskom  $\text{AlCl}_3$  metodom (Formagio i sar., 2014; Nkengla, 2014). Ekstrakti su najpre razblaženi do koncentracije od 5 mg/ml, a zatim je po 0,5 ml dobijenog rastvora pomešano sa 1,5 ml koncentrovanog etanola, 0,1 ml 10% rastvora  $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 ml 1M rastvora Na-acetata i 2,8 ml vode. Nakon 30 minuta rastvori su prenešeni u mikrotitarske ploče (200  $\mu\text{l}$ ) čije su apsorbance merene na ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland) na 405 nm. Slepu probu je činila smeša bez rastvora  $\text{AlCl}_3$  koji je zamenjen ekvivalentnom količinom vode. Rezultati su izraženi kao mikrogrami luteolin-ekvivalenata po miligramu ekstrakta ( $\mu\text{g LE/mg}$ ), uz kalibracionu krivu. Kalibraciona kriva je konstruisana iz odnosa odgovarajućih apsorbanci i koncentracija rastvora luteolina. Najpre je pripremljen rastvor luteolina u 50% (v/v) etanolu u koncentraciji od 1 mg/ml koji je zatim razblažen do 250, 200, 100, 50, 25, 12,5 i 6,25  $\mu\text{g/ml}$ . Od svakog razblaženja je uzeto po 0,5 ml, a zatim dodato 1,5 ml koncentrovanog etanola, 0,1 ml 10% rastvora  $\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 ml 1M rastvora Na-acetata i 2,8

ml vode. Takođe su posle 30 minuta merene apsorbance rastvora standarda na ELISA čitaču na 405 nm, a zatim je konstruisana kalibraciona kriva koja je korišćena za preračunavanje ukupnih flavonoida (Formagio i sar., 2014; Nkengla, 2014). Analize su izvedene u tri ponavljanja.

#### 3.4.4. Određivanje sadržaja ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline

Sadržaj ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline (UDHK) određivan je prema proskripciji iz devete Evropske farmakopeje (Ph. Eur. 9,0, 2017) koja je opisana u monografiji droge *Rosmarini folium*. Najpre je 0,2 g suvog ekstrakta pomešano sa 80 ml 50% alkohola, a zatim je smesa zagrevana na vodenom kupatilu u erlenmajeru sa brušenim čepom i povratnim kondenzatorom u trajanju od 30 minuta. Nakon hlađenja dobijeni tečni alkoholni ekstrakt je odvojen od ostataka droge filtriranjem. Filtrat je sakupljen i razblažen do 100 ml 50% alkoholom. Jedan mililitar ovog rastvora je pomešan sa 2 ml 0,5M hlorovodonične kiseline i 2 ml rastvora koji je prethodno pripremljen rastvaranjem 10 g NaNO<sub>2</sub> i 10 g Na-molibdata u 100 ml vode, a zatim i dodato 2 ml razblaženog rastvora NaOH (8,5 g/100 ml). Tako pripremljen rastvor razblažen je do 10 ml destilovanom vodom pri čemu je dobijen finalni rastvor. Rastvor za poređenje je pripremljen razblaživanjem 1 ml tečnog alkoholnog ekstrakta do 10 ml destilovanom vodom. Finalnom rastvoru merena je apsorbanca na 505 nm na UV-Vis spektrofotometru (Evolution 60 Thermo scientific). Sadržaj ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline, izražen u procentima ruzmarinske kiseline, izračunat je korišćenjem formule:

$$(A \times 2,5)/m$$

pri čemu je A - apsorbanca finalnog rastvora na 505 nm, a m - masa supstance izražena u gramima (Ph. Eur. 9,0, 2017). Sve analize su izvedene u triplikatu.

#### 3.4.5. Određivanje hemijskog sastava HPLC analizom

HPLC analiza je izvedena prema postupku opisanom prema Kostić i saradnici (2015) uz određene modifikacije. Kvantifikacija i identifikacija jedinjenja izvedena je na Agilent 1200 HPLC sistemu (Agilent Technologies, Palo Alto, CA., SAD) sa "diode array" detektorom (DAD). Korišćena je analitička kolona Purospher Star RP-18e (150 × 4,6 mm) sa veličinom čestica od 5 µm, proizvođača Merck, Darmstadt, Nemačka. Ekstrakti su najpre rastvoreni u HPLC-metanolu (i u dejonizovnoj vodi za ekstrakt E80U 2011 koji je korišćen za detaljniju

analizu farmakološke aktivnosti) do koncentracije od 10 mg/ml, a potom su filtrirani kroz mikrofiltre veličine 0,45 µm. Rastvoreni ekstrakti su injektovani u zapremini od 10 µl dok je protok u koloni iznosio 0,7 ml/min. Mobilnu fazu je činila smeša 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 održavana je na 30°C. Jedinjenja su identifikovana i kvantifikovana na osnovu UV-Vis odgovora signala u poređenju sa standardima. Količina identifikovanih jedinjenja izražene su u µg u mg ekstrakta. Sve analize su izvedene u tri uzastopna ponavljanja.

### 3.5. ODREĐIVANJE ANTIOKSIDATIVNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

#### 3.5.1. Određivanje antioksidativne aktivnosti u DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sistemu

Određivanje antioksidativnog efekta ekstrakata u DPPH sistemu, odnosno njihove sposobnosti da neutrališu i “hvataju” slobodne radikale, vršena je prema metodi opisana od strane Kostić i saradnika (2015). Ovo ispitivanje se zasniva na redukciji DPPH· radikala u DPPH-H, pri čemu se prati promena boje iz ljubičaste u žutu. Rastuće koncentracije rastvorenih ekstrakata, zapremine 40 µl, dodate su udubljenjima 96-mikrotitarske ploče koja su prethodno sadržala po 120 µl metanola. Svakom udubljenju na ploči je zatim dodato i po 40 µl metanolnog rastvora DPPH (0,2 mg/ml). Sadržaj mikrotitarskih ploča je kratko promešan na šejkeru, a potom su ploče ostavljene na tamnom mestu 30 minuta. Apsorbance dobijenih mešavina u udubljenjima ploča merene su ELISA čitačem (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finland) na 550 nm. Procenat inhibicije stvaranja slobodnih radikala računat je pomoću formule:

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

U jednačini  $A_K$  predstavlja apsorbancu kontrolnog reagensa (rastvarač + rastvor DPPH),  $A_A$  apsorbancu rastvora koji sadrži analizirani ekstrakt, a  $A_S$  apsorbancu slepe probe odnosno čistog rastvarača. Na osnovu dobijenih procenata inhibicije i koncentracije ekstrakata konstruisane su prave pomoću kojih su definisane  $IC_{50}$  vrednosti (koncentracija uzorka koja neutrališe 50% slobodnih radikala). Kao standard za poređenje antioksidativne aktivnosti



ekstrakata korišćena su standardna jedinjenja sa visokom i potvrđenom antioksidativnom aktivnošću: ružmarinska i askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol, butilhidroksitoluol (BHT) i butilhidroksianizol (BHA). Sve analize su izvedene u triplikatu.

### 3.5.2. Određivanje antioksidativne aktivnosti u $\beta$ -karoten/linolna kiselina sistemu

Sposobnost ekstrakta da inhibiše proces lipidne peroksidacije ispitivan je po metodi Kostić i saradnika (2015). Ova metoda prati nivo uticaja ekstrakta u zaštiti molekula linolne kiseline od lipidne peroksidacije, pri čemu se smanjuje "trošenje"  $\beta$ -karotena koji bi u odsustvu ekstrakta imao ulogu antioksidansa. Sve to za posledicu ima zadržavanje žute boje sistema koja potiče od  $\beta$ -karotena. Rastvor  $\beta$ -karotena pripremljen je rastvaranjem 2 mg  $\beta$ -karotena u 10 ml hloroforma. Dva mililitra ovog rastvora prenešeno je u balon i uparavano na vakuum uparivaču na 40°C, zajedno sa dodatom linolnom kiselinom (50  $\mu$ l) i emulgatorom Tween 20 (360 mg). Nakon totalne evaporacije hloroforma, u balon je dodato 100 ml oksigenisane destilovane vode uz jače mešanje čime je formirana emulzija. Kao slepa proba korišćena je emulzija u odsustvu  $\beta$ -karotena. Ova vodena emulzija je pipetirana u količini od 200  $\mu$ l u svako udubljenje 96-mikrotitarske ploče koje su sadržale po 25  $\mu$ l rastućih razblaženja ispitivanih uzoraka. Ploče su zatim inkubirane 120 minuta na 55°C. Apsorbance dobijenih mešavina u udubljenjima ploča merene su ELISA čitačem (Multiskan Ascent No354, Thermo LabSystems, Finland) na 450 nm pre inkubiranja ( $A_0$ ) i nakon 120 minuta ( $A_{120}$ ). Sadržaj mikrotitarskih ploča je dobro promešan na šejkeru pre merenja apsorbancija. Procenat inhibicije računat je prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{120}/A_0) \times 100\%$$

Konstruisane su prave koje prikazuju zavisnost koncentracije ekstrakata i procenata inhibicije, a zatim su pomoću dobijenih jednačina prave rezultati izraženi kao  $IC_{50}$ . Kao standard za poređenje antioksidativne aktivnosti ekstrakata korišćena su standardna jedinjenja sa visokom i potvrđenom antioksidativnom aktivnošću: ružmarinska i askorbinska kiselina,  $\alpha$ -tokoferol, butil hidroksitoluol (BHT) i butil hidroksianizol (BHA). Sve analize su izvedene u triplikatu.

### 3.6. ODREĐIVANJE ANTIMIKROBNE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

#### 3.6.1. Mikrobiološki sojevi

Za ispitivanje *in vitro* antimikrobne aktivnosti ekstrakta biljne vrste *S. sclarea* korišćeni su tipski laboratorijski sojevi bakterija i gljiva proizvedeni od strane American Type Culture Collection (ATCC). Predstavnici Gram (+) bakterija bili su: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus faecalis* ATCC 9433, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6301, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Bacillus cereus* ATCC 11778 i *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Od Gram (-) bakterija korišćene su: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Proteus mirabilis* ATCC 12453, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048 i *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Za procenu antifungalne aktivnosti korišćena je *Candida albicans* ATCC 24433.

#### 3.6.2. Mikrodiluciona metoda

Antibakterijska i antifungalna aktivnost ekstrakata određivana je mikrodilucionom metodom prema proskripcijama CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) (2005). Od prekonocnih kultura ispitivanih sojeva mikroorganizama koji su uzgajani na hranljivom i saburo-dekstroznom agaru, napravljena je suspenzija u sterilnom fiziološkom rastvoru turbiditeta 0.5 McFarlanda koja sadrži  $1,5 \times 10^8$  CFU (colony forming units)/ml za bakterije i  $1,5 \times 10^7$  CFU/ml za kvasce. Nakon toga pripremljene su odgovarajuće podloge za bakterije – Mueller-Hinton bujon (MHB) i za kvasac – saburo-dekstrozni bujon (SDB). Sterilisane tečne podloge su razlivene u sterilne epruvete u količini od 10 ml, a zatim inokulisane sa po 133  $\mu$ l suspenzije mikroorganizama, da bi se dobio konačan broj od  $2 \times 10^6$  CFU/ml. U svako udubljenje mikrotitarske ploče sa 96 mesta, pipetirano je po 100  $\mu$ l inokulisane podloge i napravljena serija duplih razblaženja ekstrakata (u 10% vodenom rastvoru dimetilsulfoksida (DMSO)), u rasponu od 0,1–100 mg/ml, tako da je ukupna zapremina u svakom udubljenju iznosila 100  $\mu$ l, a gustina suspenzije  $2 \times 10^6$  CFU/ml za bakterije i  $2 \times 10^5$  CFU/ml za kvasac. Mikrotitarske ploče su inkubirane 24h na 37C° za bakterije, tj. 48h na 25C° za gljive (CLSI, 2005). Postupak je izveden u triplikatu.

Hloramfenikol, streptomycin i nistatin korišćeni su kao pozitivne kontrole, u opsegu koncentracija od 0,008 do 16 µg/ml. Negativnu kontrolu činile su dve kontrole rasta – jedna je sadržala inokulisanu MHB ili SDB podlogu, a druga inokulisanu hranljivu podlogu sa serijom dvostrukih razblaženja rastvarača u opsegu od 0,004 do 15 µl/ml. Najniža koncentracija gde nije bilo vidljivog rasta mikroorganizama definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Mikrobiološki rast detektovan je dodavanjem po 20 µl 0,5% vodenog rastvora 2,3,5-trifenil tetrazolijum hlorida (TTC) u svako udubljenje. Uloga TTC je bojenje živih, poraslih kolonija u crveno (Sartoratto i sar., 2004). Da bi se odredila minimalna baktericidna koncentracija (MBC) sadržaj iz svih udubljenja, u kojima nije došlo do razvijanja crvene boje, je prenešen na Petrijeve ploče sa Mueller-Hinton agarom, koje su zatim inkubirane 24h na 37°C za bakterije, odnosno sa saburo-dekstroznim agarom inkubirane 48h na 25°C za gljive. Nakon perioda inkubiranja brojane su porasle kolonije mikroorganizama i određena MBC, koja se definiše kao najniža koncentracija ekstrakata pri kojoj je ubijeno 99,9% inokulisanih mikroorganizama (CLSI, 2005).

### **3.7. ISPITIVANJE ANTIINFLAMATORNOG EFEKTA ETANOLNOG EKSTRAKTA *Salvia sclarea* L. U LIPOPOLISAHARIDOM IZAZVANOJ PARODONTOPATIJI PACOVA**

#### **3.7.1. Eksperimentalni dizajn sa životinjama**

U ovoj studiji ispitivan je antiinflamatorni efekat ekstrakta E80U iz 2011. godine. Za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti *in vivo* korišćeni su pacovi Wistar soja, dobijeni iz vivarijuma Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Svi eksperimentalni postupci su odobreni od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu (broj 01-9002-03) i u skladu su sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU i Dobrom Naučnom Praksom. Trideset muških Wistar pacova uzrasta od deset nedelja i telesne težine 247,5±54,16 g su pre eksperimenta čuvani u žičanim kavezima, u sobi sa kontrolisanim uslovima temperature (21-23°C) i vlažnošću vazduha (65-70%) sa 12-časovnim dnevnim režimom. Životinje su hranjene mlevenim granulama, i imale su slobodan pristup vodi tokom eksperimenta. Pacovi su anestetizirani 10% rastvorom ketamin-hidrohlorida (2 ml/kg) intraperitonealno. Lipopolisaharid (LPS) bakterije *Escherchia coli* (055:B5) razblažen u sterilnom fiziološkom rastvoru, korišćen je za indukciju

eksperimentalne parodontopatije. Jedan mikrolitar (1  $\mu$ l) LPS rastvora (10  $\mu$ g/ $\mu$ l) je lagano dva puta tokom eksperimenta (deset dana), ubrizgavan u interdentalnu papilu između prvog i drugog desnog maksilarnog molara (Dumitrescu i sar., 2004) korišćenjem Hamiltonovog mikrošprica. Pacovi su nasumično podeljeni u pet eksperimentalnih grupa sa šest životinja u svakoj:

- grupa I - pacovima je ubrizgan fiziološki rastvor i tretirani su vehikulumom (destilovanom vodom),
- grupa II - pacovima je ubrizgan fiziološki rastvor i tretirani su ekstraktom,
- grupa III - pacovima je ubrizgan LPS rastvor i tretirani destilovanom vodom,
- grupa IV - pacovima je ubrizgan LPS rastvor i tretirani su ekstraktom,
- grupa V - pacovima je ubrizgan LPS rastvor i tretirani su ekstraktom tri dana pre injektovanja LPS rastvora kao i tokom perioda ispitivanja.

Pacovi iz grupe I i II su dobili istu zapreminu (1  $\mu$ l) sterilnog fiziološkog rastvora na istom mestu maksile pacova. Životinje iz grupe II, III, IV i V su dobijale ekstrakt muskatne žalfije rastvoren u vodi, dva puta dnevno *per os*, odnosno oralnom gavažom, u pojedinačnoj dozi od 200 mg/kg telesne težine. Administracija rastvorenih ekstrakata ili vehikuluma započeta je istog dana kada je injektovan LPS rastvor, osim u grupi V koja je tretirana ekstraktom preventivno, tri dana pre LPS injekcije. Posle deset dana, pacovi su lišeni života velikom dozom anestetika ketamin-hidroklorida, a zatim su maksile izolovane i podeljene na dva dela. Meko tkivo oko molara pacova je pažljivo odvojeno i dalje pripremano za biohemijske analize. Iz svake grupe izabrani su primerci molara sa okolnim gingivalnim tkivom koji su podvrgnuti standardnim histološkim procedurama.

### 3.7.2. Histopatološka analiza

Patohistološka analiza je sprovedena na Katedri za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Materijal, molari sa okolnim tkivom gingive, ispran je u fiziološkom rastvoru i fiksiran u 10% rastvoru formaldehida 7 dana. Nakon toga materijal je podvrgnut procesu demineralizacije zbog prisustva koštanih elemenata, 15 dana u 18% rastvoru dinatrijum-etilendiamintetraacetata ( $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ ). Po završetku dekalcinacije, materijal je sečen na tanke delove u mezijalno-distalnom smeru i tretiran klasičnim histološkim procedurama do parafinskih kalupa. Debljina finalnih histoloških preparata je bila 4  $\mu$ m, a podvrgnuti su

hematoksilin-eozin (HE) bojenju.

### **3.7.3. Merenje faktora inflamacije (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , i IL-6) u gingivalnom tkivu pacova**

Nivoi faktora inflamacije, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , i IL-6 određeni su u supernatantima 5%-homogenata pripremljenih od svežeg tkiva gingive sa dejonizovanom vodom. Merenje nivoa citokina vršeno je pomoću ELISA kita, specifičnih za pacovski biološki materijal, u skladu sa uputstvima proizvođača (Invitrogen Life Technologies, SAD). Ukratko, po 50  $\mu$ l uzorka je prenešeno u odgovarajuća udubljenja, bunarčiće, mikrotitratrske ploče, a potom je dodato 50  $\mu$ l rastvora pufera, i 50  $\mu$ l pufera za inkubaciju za IL-6 test. Posle inkubacije i ispiranja bunarčića dodato je 100  $\mu$ l odgovarajućeg biotin konjugata, a zatim su mikrotitratrske ploče ostavljene na ponovnu inkubaciju. Nakon ispiranja, u bunarčiće je dodato 100  $\mu$ l streptavidin - *horseradish peroxidase* (HRP) rastvora. Sadržaj mikrotitratrskih ploča je inkubiran i ispran, a zatim je pipetirano 100  $\mu$ l stabilizovanog hromogena posle kog je usledilo finalno dodavanje 100  $\mu$ l stop rastvora. Apsorbanca svakog bunarčića je očitana na 450 nm na ELISA čitaču (Multiskan Ascent No354, Thermo Labsystems, Finska). Vrednosti koncentracija uzoraka računata su iz standardne krive, a rezultat je prema uputstvu i dvaput umnožen. Rezultati su prikazani kao pg citokina u mg svežeg tkiva gingive.

### **3.8. ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA**

Spazmolitička aktivnost ekstrakata muskatne žalfije (2011: E80U, E60U, E80T, E60T, E, EU, M, MU, M80 i M80U) na izolovanom ileumu pacova ispitivana je praćenjem uticaja na spontane i indukovane kontrakcije kalijum-hloridom (KCl) i acetilholinom. Ekstrakti EU 2011, E80U 2011, E80U 2012, E80U 2013 i E80U 2014 su dodatno ispitani i na barijum hloridom- (BaCl<sub>2</sub>), kalcijum hloridom- (CaCl<sub>2</sub>) i histaminom- indukovane kontrakcije, kao i u uslovima primene blokatora azot-oksida sinteze, N $\omega$ -nitro-L-arginin metil estra (L-NAME). Ekstrakt EU 2011 je odabran zbog specifičnosti hemijskog sastava, dok je ekstrakt pripremljen 80% etanolom ultrazvučnom tehnikom (koji je ispitan na antiinflamatornu aktivnost) praćen kroz četiri godine sakupljanja biljnog materijala (E80U 2011-2014). Efekti na spontane, KCl- i acetilholin-

indukovane kontrakcije praćeni su i kod najzastupljenijeg jedinjenja u ekstraktima, ruzmarinske kiseline. Svi eksperimenti su izvedeni u šest ponavljanja.

Ekstrakti su aplikovani u obliku 10% vodenog rastvora, dok je ruzmarinska kiselina za analizu rastvarana u 10% DMSO-u (DMSO:voda=10:100).

### **3.8.1. Eksperimentalne životinje**

Eksperimentalne procedure izvedene su u skladu sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama, uz odobrenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (rešenje broj 323-07-00073/2017-05/04).

Za definisanje spazmolitićke aktivnosti korišćeni su albino laboratorijski pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne težine 200-250 g i starosti 10-12 nedelja, uzgajani u vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Nedelju dana pre eksperimenta životinje su odvojene i ćuvane u žićanim kavezima od nerđajućeg ćelika u standarnim laboratorijskim uslovima sa temperaturom prostorije koja se održava u granicama od 20-24°C, sa 12-ćasovnim dnevним režimom. Životinje su u svakom trenutku imale pristup hrani i vodi, pri ćemu im se 24 ćasa pre eksperimenta ukidala hrana.

### **3.8.2. Izolovanje i postavljanje ileuma pacova**

Na početku eskperimenta pacov je smeštan u zatvorenu komoru i izlagan isparenjima etra. Nakon anesteziranja otvaran je grudni koš i presećana aorta, a zatim su izolovani delovi ileuma odvojene od mezenterijuma. Ovako pripremljen segmenti ileuma postavljeni su u kupatilo koje je saćdržalo 20 ml fiziološkog rastvora za izolovano crevo (Tirodov rastvor) na 37C° uz konstantno uvođenje smeše kiseonika i ugljen-dioksida (95% i 5%). Tirodov rastvor se saćstojao iz sledećih komponenti: NaCl (150 mM), KCl (2,7 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), NaHCO<sub>3</sub> (12 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,8 mM) i glukoza (5,5 mM). Pola sata pre početka eksperimenta ileum je stabilizovan u kupatilu (Miladinović i sar., 2018). Promene u kontraktilnosti tankog creva registrovane su pomoću transdjusera (Transducer-TSZ-04-E, Experimetria doo, Budimpešta, Maćarska), a dobijeni podaci analizirani uz pomoć softvera SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System.

### 3.8.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata na spontane kontrakcije ileuma pacova

Prvu eksperimentalnu seriju činila je analiza efekata ekstrakata *S. sclarea* na spontane kontrakcije izolovanog ileuma. Rastvori ekstrakata su dodavani u kumulativnim dozama (0,005, 0,015, 0,05, 0,15, 0,5 i 1,5 mg/ml) pri čemu je iz krive očitavan dozno-zavisani odgovor. Ekstrakti su dodavani nakon perioda adaptacije. Rezultati su izračunavani kao razlika između površina krive pre i nakon dodavanja uzoraka. Za svaku koncentraciju ekstrakta spazmolitički efekat je izražavan u procentima u odnosu na početnu spontanu aktivnost izolovanog creva bez prisustva ispitivanog ekstrakta (Miladinović i sar., 2018).

Kao pozitivna kontrola je korišćen opijumski alkaloid sa spazmolitičkim delovanjem, papaverin, u koncentracijama 0,01-3 µg/ml.

### 3.8.4. Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova

Kontrakcije ileuma su indukovane dodavanjem rastvora KCl (80 mM) nakon perioda adaptacije. Nastale toničke kontrakcije ileuma izazvane KCl inhibisane su kumulativnim dodavanjem rastvora ekstrakata u koncentracijama od 0,005 do 1,5 mg/ml u intervalima od 15 minuta. Spazmolitički efekat ekstrakata je izračunavan na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta KCl (Miladinović i sar., 2018).

Verapamil, antagonist kalcijumskih kanala, korišćen je kao pozitivna kontrola (0,015-1,5 µg/ml).

### 3.8.5. Ispitivanje uticaja ekstrakata na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova

U ovoj seriji eksperimenata su kontrakcije ileuma stimulisane kumulativnim dodavanjem rastućih koncentracija acetilholina (5, 15, 50, 150, 500 i 1500 nM), nakon perioda adaptiranja. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva koncentracijski-zavisnih kontrakcija. Preparati ileuma su potom ispirani Tirodovim rastvorom do ponovnog uspostavljanja stabilnih spontanih kontrakcija. Posle toga u vodeno kupatilo je dodavan ispitivani rastvor ekstrakta koncentracije 0,5 mg/ml, a nakon 5 minuta je ponavljana serija sa istim koncentracijama acetilholina i formirana je nova kriva kontraktilnog efekta acetilholina.

Preparati ileuma su ponovo ispirani Tirodovim rastvorom do uspostavljanja spontanijh kontrakcija. Postupak je ponovljen sa uzorkom istog ekstrakta koncentracije 1,5 mg/ml. Spazmolitički efekat ekstrakata je predstavljen kroz seriju kriva kojima je prikazan kontraktilni efekat acetilholina (%) u prisustvu ispitivanih ekstrakata i upoređen je sa efektom samog acetilholina, odnosno u odsustvu ekstrakta (Miladinović i sar., 2018).

Atropin (140 nM), neselektivni blokator muskarinskih receptora, korišćen je kao pozitivna kontrola.

### **3.8.6. Ispitivanje uticaja ekstrakata na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova**

Pre indukovanja kontrakcija preparata ileuma uspostavljen je period adaptacije od 30 minuta. Za indukciju kontrakcija ileuma dodavane su rastuće koncentracije rastvora histamina (1, 3, 10, 30, 100 i 300 nM) u vodeno kupatilo. Zavisnost dobijenih kontrakcija (%) u odnosu na koncentracije rastvora histamina predstavljena je kontrolnom krivom. Nakon toga preparati ileuma su ispirani Tirodovim rastvorom do ponovnog uspostavljanja spontanijh kontrakcija. U vodeno kupatilo je potom dodavan ispitivani rastvor ekstrakta (1,5 mg/ml) i nakon 5 minuta je ponovljena serija sa istim koncentracijama rastvora histamina (1–300 nM). Radi procene spazmolitičkog efekta ekstrakta konstruisane su krive kontraktilnog efekta histamina (%) u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 1,5 mg/ml i u njegovom odsustvu (Bigović i sar., 2010).

### **3.8.7. Ispitivanje uticaja ekstrakata na barijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova**

Za indukciju kontrakcija preparata ileuma dodavane su rastuće koncentracije rastvora BaCl<sub>2</sub> (3, 9, 30, 90, 300 i 900 µM) u vodeno kupatilo po periodu adaptacije. Na osnovu dobijenih kontrakcija u odnosu na koncentracije rastvora BaCl<sub>2</sub> konstruisana je kontrolna kriva. Preparati ileuma su nakon toga ispirani Tirodovim rastvorom do ponovnog uspostavljanja stabilnijh spontanijh kontrakcija. U vodeno kupatilo je dodavan ispitivani rastvor ekstrakta u koncentraciji od 0,5 mg/ml i nakon 5 minuta je ponovljena serija sa istim koncentracijama rastvora BaCl<sub>2</sub>. Preparat ileuma je ponovo ispiran, ostavljan do uspostavljanja spontanijh kontrakcija pa je postupak ponovljen sa koncentracijom ekstrakta od 1,5 mg/ml. Konstruisane su krive



kontraktilnog efekta  $\text{BaCl}_2$  u prisustvu ekstrakta u koncentraciji od 0,5 mg/ml i od 1,5 mg/ml. Spazmolitički efekat ispitivanih uzoraka je predstavljen kroz seriju kriva kojima je prikazan kontraktilni efekat  $\text{BaCl}_2$  (%) koji je postignut u prisustvu i odsustvu ispitivanih ekstrakata (Branković i sar., 2011).

### **3.8.8. Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalcijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma pacova**

Za ovaj eksperiment je period adaptacije preparata ileuma postignut u rastvoru bez jona kalcijuma. Nakon uspostavljanja stabilnih spontanijih kontrakcija, dodavane su rastuće koncentracije rastvora  $\text{CaCl}_2$  (0,01, 0,03, 0,1, 0,3, 1 i 3 mM) u vodeno kupatilo i beležene rastuće kontrakcije. Na osnovu dobijenih rezultata konstruisana je kontrolna kriva koncentracijskizavisnih kontrakcija. Preparat ileuma je zatim ispiran do ponovnog uspostavljanja stabilnih spontanijih kontrakcija. Nakon toga u vodeno kupatilo je dodat rastvor ekstrakta koncentracije 0,5 mg/ml, i posle pet minuta iste rastuće koncentracije  $\text{CaCl}_2$ . Postupak je ponovljen i sa rastvorom ekstrakta koncentracije 1,5 mg/ml. Formirane su krive kontraktilnog efekta  $\text{CaCl}_2$  u prisustvu ispitivanog ekstrakta u koncentraciji od 0,5 mg/ml i od 1,5 mg/ml. Kao standard korišćen je verapamil koji je aplikovan u dozama od 0,015-1,5  $\mu\text{g/ml}$ . Spazmolitički efekti ispitivanih ekstrakata su prikazani kroz seriju kriva kojima je prikazan kontraktilni efekat  $\text{CaCl}_2$  (%) koji je postignut u prisustvu ispitivanih uzoraka i upoređen je sa efektima kontrolne serije u kojoj je delovao samo  $\text{CaCl}_2$  odnosno u odsustvu ekstrakta (Miladinović i sar., 2018).

### **3.8.9. Ispitivanje uticaja ekstrakata na kontrakcije ileuma pacova indukovane blokatorom azot-oksida sinteze (L-NAME)**

Za ispitivanje uticaja ekstrakata na kontrakcije ileuma pacova indukovane sa L-NAME korišćena je metoda Sedighi i saradnika (2014) sa modifikacijama. Preparat izolovanog ileuma je postavljen u vodeno kupatilo i ostavljen dok se ne razvije stabilna spontana kontraktilnost. U prvoj seriji eksperimenta su rastvori ekstrakata dodavani u kumulativnim dozama od 0,005 do 1,5 mg/ml. U drugoj seriji eksperimenta je, nakon perioda adaptacije, u vodeno kupatilo dodat rastvor L-NAME koncentracije 100  $\mu\text{M}$  i ispitivani rastvori ekstrakata kumulativno, u istim rastućim koncentracijama (0,005-1,5 mg/ml). Efekat uzoraka je izračunavan na osnovu razlika

površina ispod krive i bazalne linije kao procenat inhibicije efekta L-NAME (Sedighi i sar., 2014).

### **3.9. ODREĐIVANJE SPAZMOLITIČKE AKTIVNOSTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA IZOLOVANOJ TRAHEJI PACOVA**

Spazmolitička aktivnost ekstrakata na izolovanoj traheji pacova ispitivana je na indukovanim kontrakcijama pomoću kalijum-hlorida i karbahaola. Ispitivani su ekstrakti iz 2011: E80U, E60U, E80T, E60T, E, EU, M, MU, M80 i M80U. Ekstrakt pripremljen 80% etanolom ultrazvučnom tehnikom (koji je ispitan na antiinflamatornu aktivnost) praćen je kroz četiri godine sakupljanja biljnog materijala (E80U 2011-2014). Svi eksperimenti su rađeni u šest ponavljanja.

#### **3.9.1. Eksperimentalne životinje**

Eksperimentalne procedure izvedene su u skladu sa Evropskom Direktivom 2010/63/EU za eksperimente na životinjama, uz odobrenje Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine (rešenje broj 323-07-00073/2017-05/04). Za definisanje spazmolitičke aktivnosti na traheji korišćeni su albino laboratorijski pacovi Wistar soja, muškog pola, telesne težine 200-250 g i starosti 10-12 nedelja, uzgajani u vivarijumu Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu. Nedelju dana pre eksperimenta životinje su odvojene i čuvane u žičanim kavezima od nerđajućeg čelika u standardnim laboratorijskim uslovima sa temperaturom prostorije koja se održava u granicama od 20-24°C, sa 12-časovnim dnevnim režimom. Životinje su u svakom trenutku imale pristup hrani i vodi, pri čemu im se dvadesetčetiri časa pre eksperimenta ukidala hrana.

#### **3.9.2. Izolovanje i postavljanje traheje pacova**

Na početku eskperimenta pacov je smeštan u zatvorenu komoru i izložen isparenjima etra. Nakon anesteziranja otvaran je grudni koš i presećana je aorta, a potom je izolovana traheja. Traheji je odvajan ostatak vezivnog tkiva nakon čega je isecana na segmente. Segment traheje činila su tri do četiri hrskavičava prstena. Ovako pripremljeni segmenti traheje su postavljeni u kupatila za izolovane organe, zapremine 20 ml, koja su sadržala Krebsov rastvor, koji je

konstantno zagrevan na 37°C i aerisan karbogenom (95% O<sub>2</sub> i 5% CO<sub>2</sub>). Krebsov rastvor je sadržao: NaCl (137 mM), KCl (2,81 mM), CaCl<sub>2</sub> (1,8 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,1 mM), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,417 mM), NaHCO<sub>3</sub> (11,9 mM) i glukoza (11,10 mM) (Patel i sar., 2013). Izolovane traheje su stabilizovane 60 minuta pre eksperimenta. Promene u kontraktilnosti traheja registrovane su pomoću transdjusera (Transducer-TSZ-04-E, Experimetria doo, Budimpešta, Mađarska), a dobijeni podaci analizirani uz pomoć softvera SPEL Advanced ISOSYS Data Acquisition System.

### **3.9.3. Ispitivanje uticaja ekstrakata na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova**

Preparat izolovane traheje je postavljen u vodeno kupatilo i ostavljen 60 minuta do postizanja stabilnih spontanih kontrakcija. Karbahol je dodat u koncentraciji od 1 µM nakon čega su nastupile toničke kontrakcije. Rastvori rastućih koncentracija ekstrakata (0,005-1,5 mg/ml) su kumulativno dodavani u kupatilo. Spazmolitički efekat uzorka je izražen preko razlike u površini ispod krive i bazalne linije i predstavljen kao procenat inhibicije efekta karbahola. Atropin, blokator muskarinskih receptora, je korišćen kao pozitivna kontrola (0,41-100 µg/ml) (Patel i sar., 2013).

### **3.9.4. Ispitivanje uticaja ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije traheje pacova**

U vodeno kupatilo postavljen je preparat izolovane traheje koji je ostavljen sat vremena radi uspostavljanja stabilne kontraktilnosti. Kontrakcije traheje postignute su dodatkom rastvora KCl (80 mM). Nakon ustaljenja kontrakcija dodavan je ekstrakt u rastućim kumulativnim koncentracijama u rasponu od 0,005 do 1,5 mg/ml. Spazmolitički efekat ekstrakta je izražen na osnovu razlika površina ispod krive i bazalne linije u vidu procenta inhibicije efekta KCl. Verapamil, antagonist kalcijumskih kanala, je korišćen kao pozitivna kontrola (0,41-100 µg/ml) (Patel i sar., 2013).

### 3.10. STATISTIČKA ANALIZA

Rezultati su statistički obrađeni u statističkom paketu SPSS (verzija 20.0 SPSS, Inc., Chicago, IL). Kontinualne varijable su prikazane u vidu aritmetičke sredine i standardne devijacije (osim rezultata prinosa ekstrakcije i antimikrobne aktivnosti). Normalnost raspodele kontinualnih varijabli utvrđena je Shapiro-Wilk testom. Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka poređene su vrednosti varijabli između dve grupe, a za poređenje varijabli između više grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse ANOVA. Kod ANOVA analize obavljena je i odgovarajuća *post hoc* analiza (Duncan test) kojom je utvrđeno između kojih parova uzoraka su razlike statistički značajne. U korelacionoj analizi korišćen je Pirsonov koeficijent linearne korelacije. Smernice za veličinu korelacije su bile: 0,9-1,0 veoma snažna; 0,5-0,9 snažna; 0,3-0,5 umerena i do 0,3 slaba (Cohen, 1992). Nivoi značajnosti od  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$  su smatrani statistički značajnim.

## 4. REZULTATI

### 4.1. MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (*Salviae sclareae herba*)

#### 4.1.1. Morfološke karakteristike droge

Nakon postupka primarne prerade i sušenja biljnog materijala, u sastavu usitnjene biljne droge *Salviae sclareae herba*, konstatovano je prisustvo delova listova, brakteja, cvetova (krunica i čašica), delova stabla i osovine cvasti, kao i manja količina zrelih plodova – orašica. Čašica se vrlo lako odvaja nakon sušenja od krunice, pa se u biljnom materijalu uglavnom sreću odvojeno. Posmatranjem usitnjenog materijala na stereomikroskopu detaljnije su uočavane površinske strukture delova droge. Kao što je i u opisu biljne vrste istaknuto, nadzemni delovi *S. sclarea* su gusto obrasli trihomima. Naime, na svim posmatranim osušenim delovima droge uočavaju se žlezdani i nežlezdani trihomi, međutim njihova distribucija po biljnim organima nije jednaka, od brakteje koja je gotovo gola do stabla i listova koji su gusto obrasli trihomima.

Na Slici 4.1.1. su prikazani osušeni i usitnjeni nadzemni delovi droge *Salviae sclareae herba*, koja je korišćena za izradu ekstrakata, hemijsku karakterizaciju i ispitivanje farmakološke aktivnosti. Takođe, prikazani su i delovi droge posmatrani stereo mikroskopom: brakteja, cvet (čašica i krunica) i osovina cvasti, delovi lista, stabla i plod (Slike 4.1.2-4.1.6).

#### *Brakteja*

Osušena brakteja je fragilne strukture, blede-ružičaste boje, srcolikog izgleda sa zašiljenim vrhom, celog oboda (Slika 4.1.2. B, C, D). Po svojoj površini je gotovo gola sa znatno manjim prisustvom trihoma u odnosu na ostale delove droge. Stereomikroskopijom se mogu uočiti nežlezdani i loptasti peltatni trihomi žuto-narandžaste boje, dok se kapitatni teže uočavaju.

#### *Čašica i krunica*

Dvounsata čašica je zeleno-sive boje sa istaknutim rebrima i zupcima. Po površini su uočljivi oštri mehanički i žlezdani, peltatni i kapitatni trihomi. Krunica je kolabirana sa zadržanom formom i strukturom sveže dvounsate krunice, blede roze boje i sa dugim prašnicima. Po površini krunice se stereomikroskopijom uočavaju brojni mehanički i peltatni trihomi sa žuto-narandžastim sadržajem, dok se kapitatni teže uočavaju (Slika 4.1.2. A, E-I).



**Slika 4.1.1.** Elementi droge *Salviae sclareae herba*: usitnjeni nadzemni delovi (A); i 1. čašica; 2. fragment lista; 3. segment stabljike; 4. krunica; 5. orašica; 6. brakteja (B)

### *List*

Osušeni list je zeleno-sive boje, na naličju svetliji u odnosu na lice, plitko nazubljen po obodu (Slika 4.1.3). Obe strane lista su gusto obrasle dugačkim, višecelijskim mehaničkim dlakama koje se prepliću i daju listu sivkastu notu. Nervatura je gusto-mrežasta, istaknutija na naličju. Na licu osušenog lista nervi imaju izgled plitkih useka, dok su na naličju jako ispupčeni pa se između nerava formiraju "nabori". Na obe površine lista, a naročito na naličju, vidljive su brojne loptaste peltatne žlezde sa žuto-narandžastim sadržajem, kao i kapitatni sa prozirnim sadržajem, i jako dugi, često kolabirani, mehanički trihomi.

### *Stablo i osovina cvasti*

Osovina cvasti i stablo su na preseku četvorougao, zeleno-sive boje, veoma gusto obrasli trihomima. Na njima su prisutni dugi i kratki mehanički trihomi. Za razliku od drugih

delova droge, na stablu i osovini cvasti su veoma zastupljene i jako uočljive dugačke kapitatne dlake sa prozirnim sadržajem, kao i ređe peltatne dlake (Slika 4.1.4. i Slika 4.1.5).

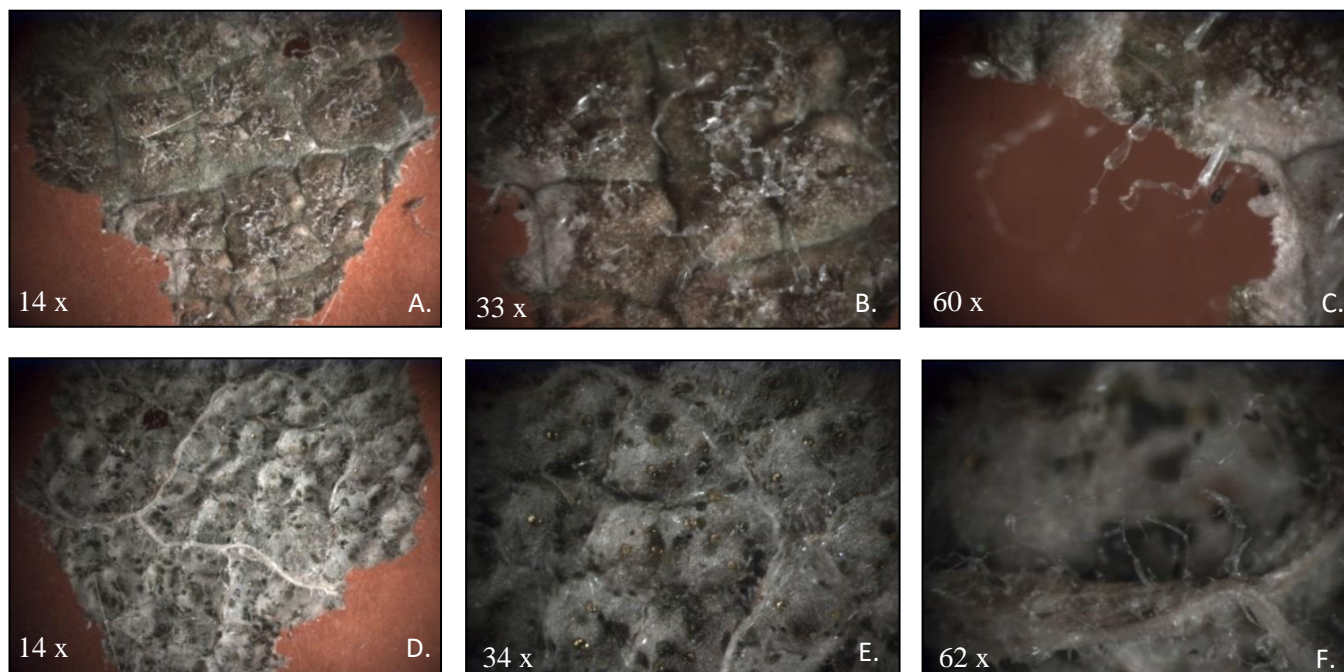
### Plod

Iako je biljni materijal sakupljan u periodu punog cvetanja, u posmatranom uzorku droge u manjem procentu su prisutne orašice, što ukazuje da su neke jedinke iz sakupljenog biljnog materijala već formirale plodove. Orašice su sitne, loptaste, braon boje, sjajne i gole. Po površini plodova se uočava karakteristična ornamentika u vidu mrežastih nabora (Slika 4.1.6).

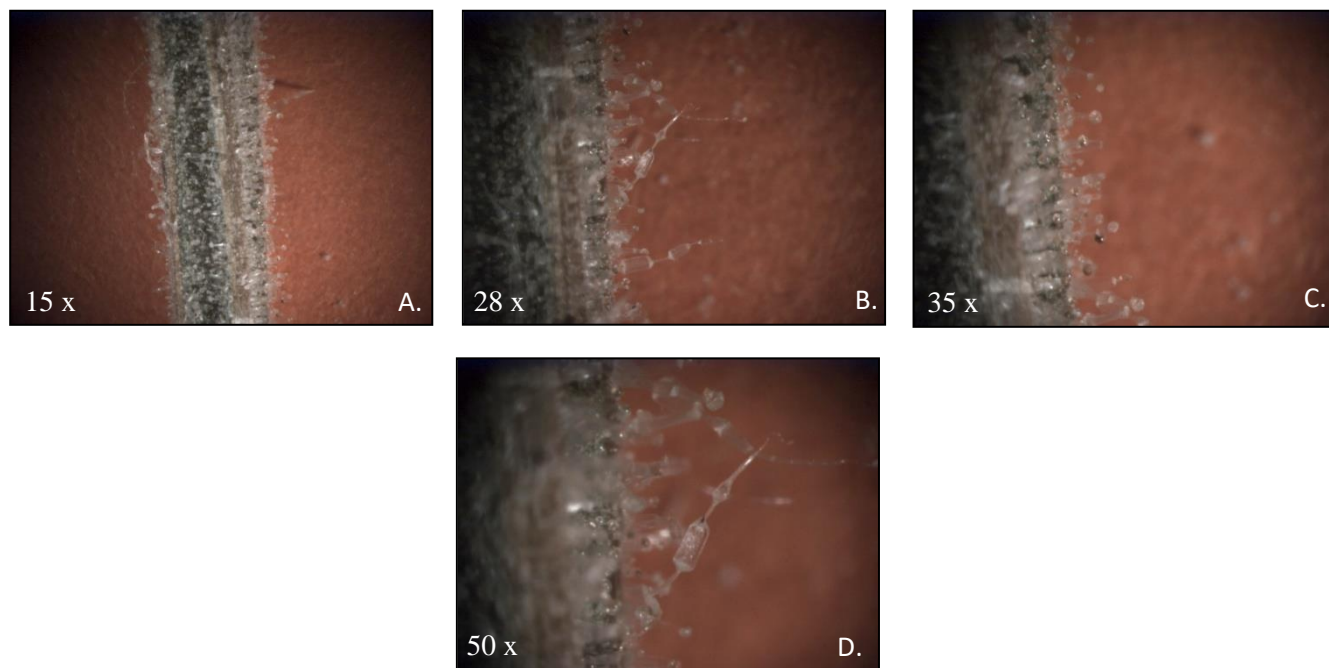


**Slika 4.1.2.** Delovi cveta i brakteja biljne vrste *Salvia sclarea* L. iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala (A – cvet; B, C, D – brakteja; E, F, G – čašica; H, I – krunica; J – deo čašice i krunice)



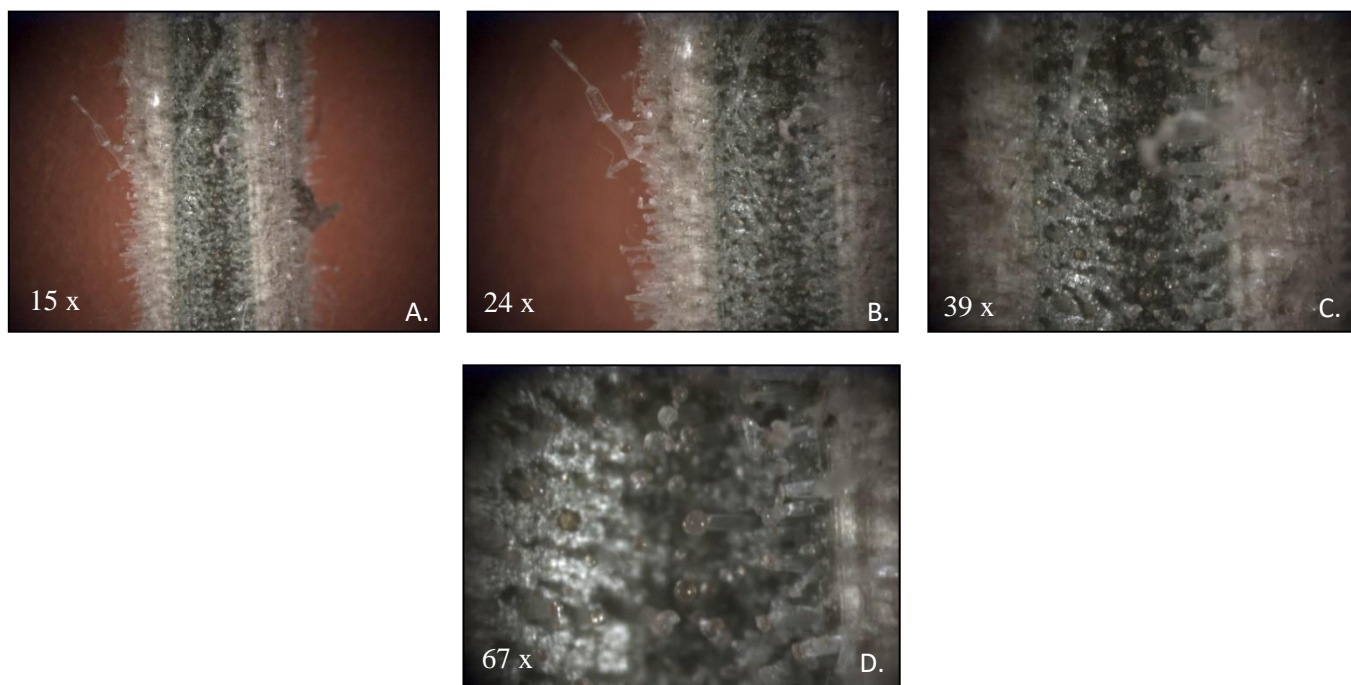


**Slika 4.1.3.** Fragmenti lista biljne vrste *Salvia sclarea* L. iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala (A, B, C – lice lista; D, E, F – naličje lista)

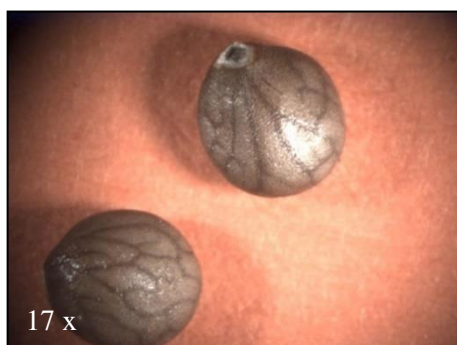


**Slika 4.1.4.** Osovina cvasti biljne vrste *Salvia sclarea* L. iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala (A, B, C, D)





**Slika 4.1.5.** Stablo biljne vrste *Salvia sclarea* L. iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala (A, B, C, D)



**Slika 4.1.6.** Orašica biljne vrste *Salvia sclarea* L. iz osušenog i usitnjenog biljnog materijala

#### 4.1.2. Anatomske karakteristike droge - analiza indumentuma

Kao i kod ostalih predstavnika familije Lamiaceae, indumentum nadzemnih organa *S. sclarea* se sastoji od žlezdanih i nežlezdanih trihoma distribuisanih po površini svih delova biljke. Svetlosnom mikroskopijom i analizom mikrografija trajnih preparata utvrđeno je prisustvo nežlezdanih, mehaničkih, trihoma koji su nerazgranati i uniserijadni sa jednom ili više ćelija, kao i žlezdanih, diferenciranih na peltatne i kapitatne u kojima je smešteno etarsko ulje.

### *Brakteja*

Najmanja distribucija svih vrsta trihoma zabeležena je na površini brakteja (Slika 4.1.7.). Nežlezdani, mehanički, trihomi su na braktejama naročito zastupljeni po nervima i obodu (Slika 4.1.7. A, B, D-H). Po nervima se uočavaju kratki jedno- do tro- ćelijski trihomi sa zašiljenom terminalnom ćelijom (Slika 4.1.7. H), dok se na obodu brakteja primećuju i duži, sa preko pet ćelija (Slika 4.1.7. D, E, F). Kod pojedinih trihoma je uočeno i prisustvo irazito izdužene zašiljene terminalne ćelije (Slika 4.1.7. D). Na površini brakteje registrovano je prisustvo i višećelijskih, mehanički trihoma sa višećelijskom osnovom (Slika 4.1.7. G).

Peltatni žlezdasti trihomi zastupljeni su po površini brakteje. Karakterišu se tamnim sadržajem i loptastim izgledom koju čini multicelularna glavica sa kutinizovanim zidom i bazalnom ćelijom usađenom u epidermis (Slika 4.1.7. I i J). Drugi tip sekretornih žlezdi jesu kapitatni žlezdasti trihomi koji se karakterišu prisustvom jednoćelijske glavice (kapituluma) i jednoćelijske drške (Slika 4.1.7. A, B).

### *Čašica i krunica*

Prisustvo trihoma na površini cveta, čašice i krunice, je znatno veće u odnosu na brakteje (Slika 4.1.8. i 4.1.9). Nežlezdani trihomi su kratki i čine ih do četiri ćelije, sa terminalnom zašiljenom ćelijom (Slika 4.1.8. E-G i Slika 4.1.9. B). Peltatni trihomi su raspoređeni po čitavoj površini cvetnih delova i njihovo prisustvo je upadljivo veće u poređenju sa braktejom (Slika 4.1.8. A-C, H i Slika 4.1.9. D, E, F). Po površini i nervima čašice veoma su česti i kapitatni, kraći trihomi, često sa spljoštenijom i naboranom unicelularnom glavicom, mada se mogu uočiti i pojedinačni trihomi sa dužom drškom (Slika 4.1.8. A-D i Slika 4.1.9. A, C). Na trajnim preparatima krunice primećena su i polenova zrna (Slika 4.1.9. H).

### *Lista*

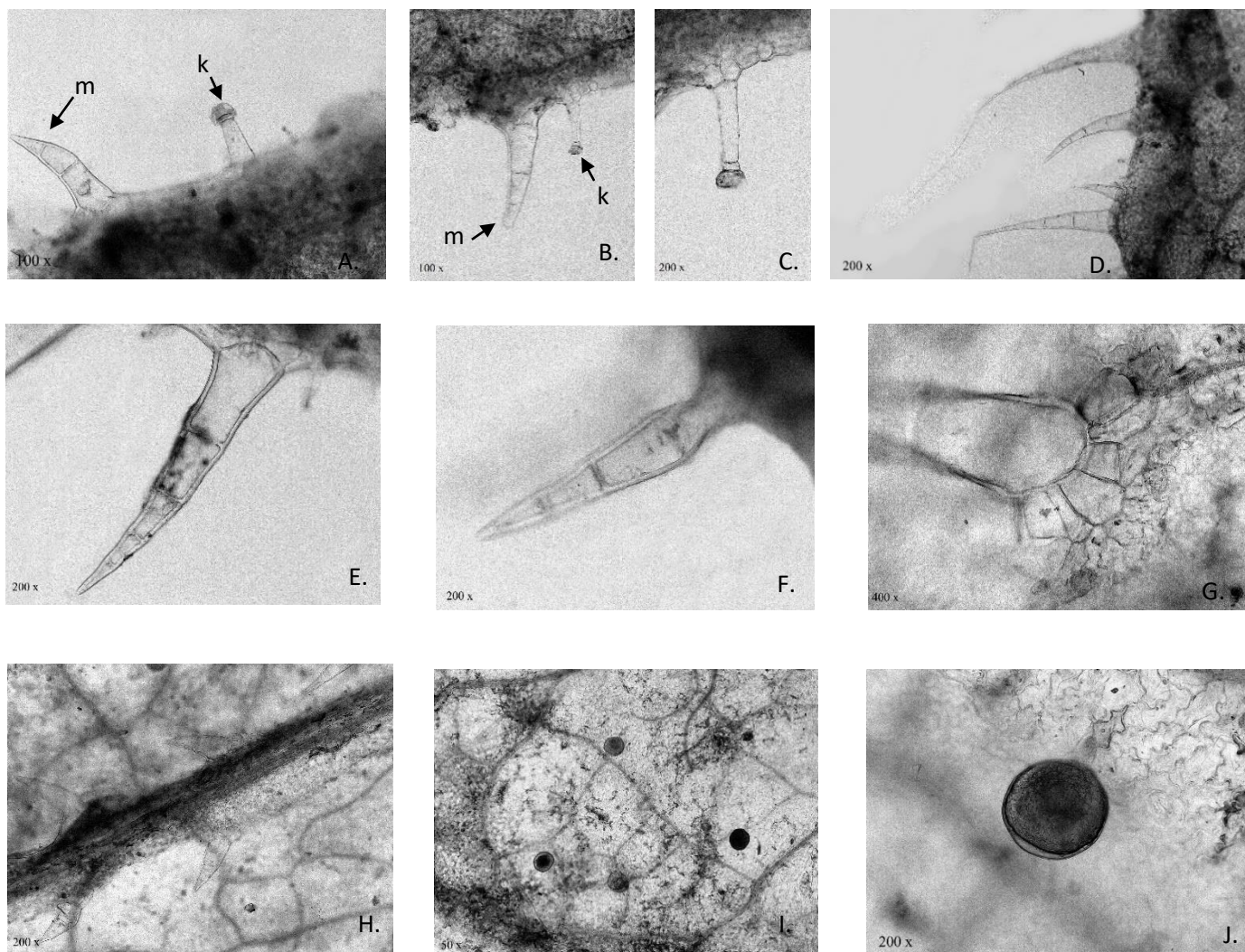
Površina lista obiluje kapitatnim trihomima, dok su peltatni i nežlezdani manje zastupljeni (Slika 4.1.10.). Na preparatima su uočene dve vrste kapitatnih trihoma. Jedan tip žlezdanih kapitatnih trihoma karakteriše se jako kratkom unicelularnom drškom i većom jednoćelijskom glavicom (Slika 4.1.10. G-K), a drugi izduženom unicelularnom drškom i malom jednoćelijskom glavicom, često spljoštenom (Slika 4.1.10. H, I, M). Peltatni trihomi nisu primećeni u značajnom broju (Slika 4.1.10. L). Iz grupe mehaničkih, na površini lista sreću se

višećelijski trihomi, od kojih su pojedini upadljivo kolabirani do višestruko savijeni, sa zašiljenom terminalnom ćelijom (Slika 4.1.10. A-D, G), kao i jednoćelijski klinasti trihomi (Slika 4.1.10. E, F, H, I).

### *Stablo*

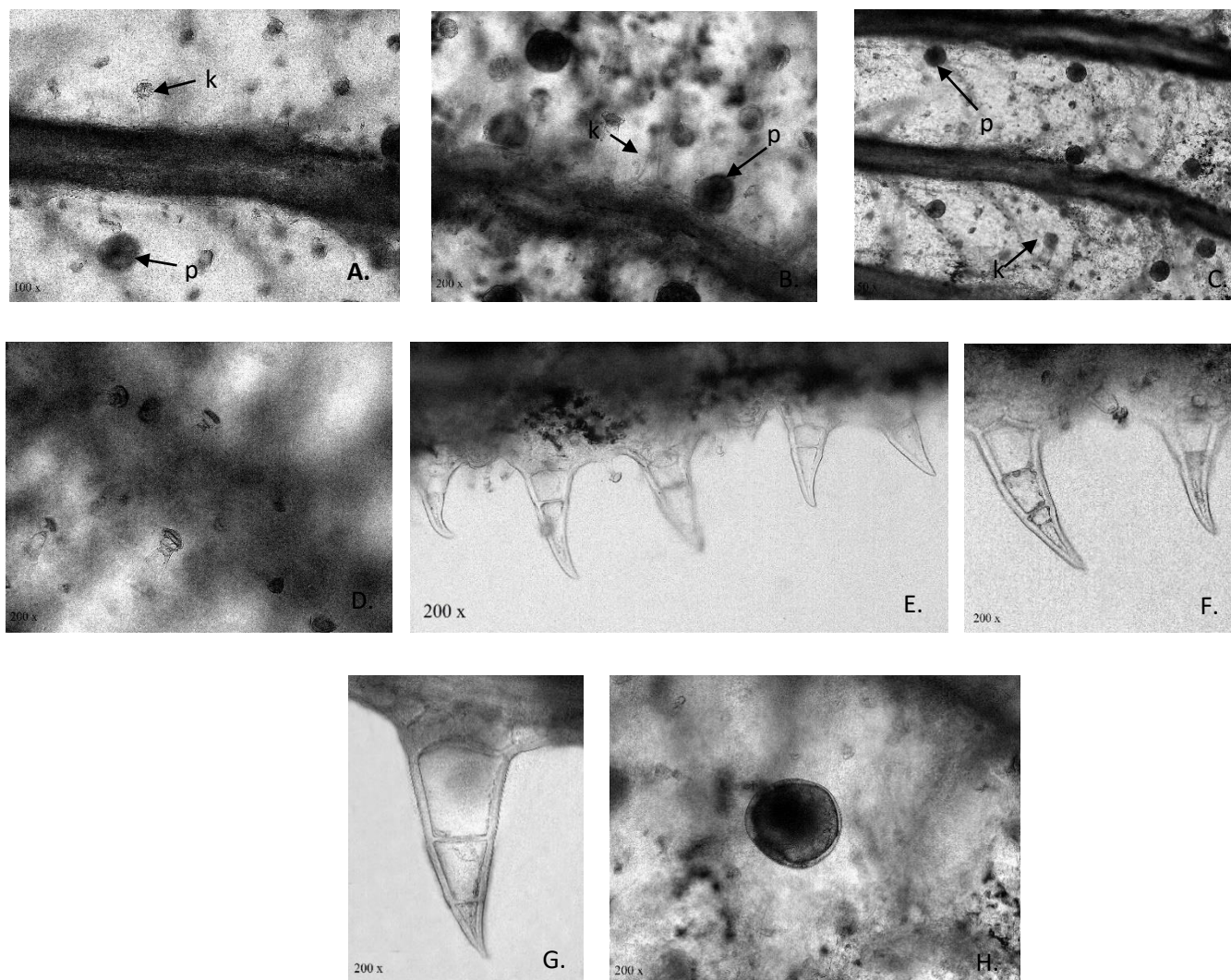
Na epidermisu poprečnog preseka stabla (Slika 4.1.11), izgrađenom u vidu kontinuiranog sloja ovalnih ćelija, takođe se uočavaju trihomi. Indumentum stabla čine u najvećem procentu žlezdani kapitatni trihomi, a zatim i nešto manje zastupljeni peltatni i nežlezdani, mehanički – višećelijski i klinasti trihomi. Kapitatni trihomi se i kod stabla javljaju u dve forme, sa kratkom unicelularnom drškom i većom jednoćelijskom glavicom (Slika 4.1.11. K) i, dominantnije, sa dužom unicelularnom drškom i manjom jednoćelijskom glavicom (Slika 4.1.11. A-E). Na epidermisu stabla primećeni su i peltatni trihomi, čija je pojava znatno ređa od kapitatnih (Slika 4.1.11. J). Mehanički trihomi su dugački, višećelijski, često kolabirani i relativno retki (Slika 4.1.11. F, G), dok su klinasti, jednoćelijski, zastupljeniji (Slika 4.1.11. C, H, I).

U Tabeli 4.1.1. predstavljeni su tipovi, podtipovi kao i distribucija trihoma na ispitivanim nadzemnim organima muskatne žalfije.

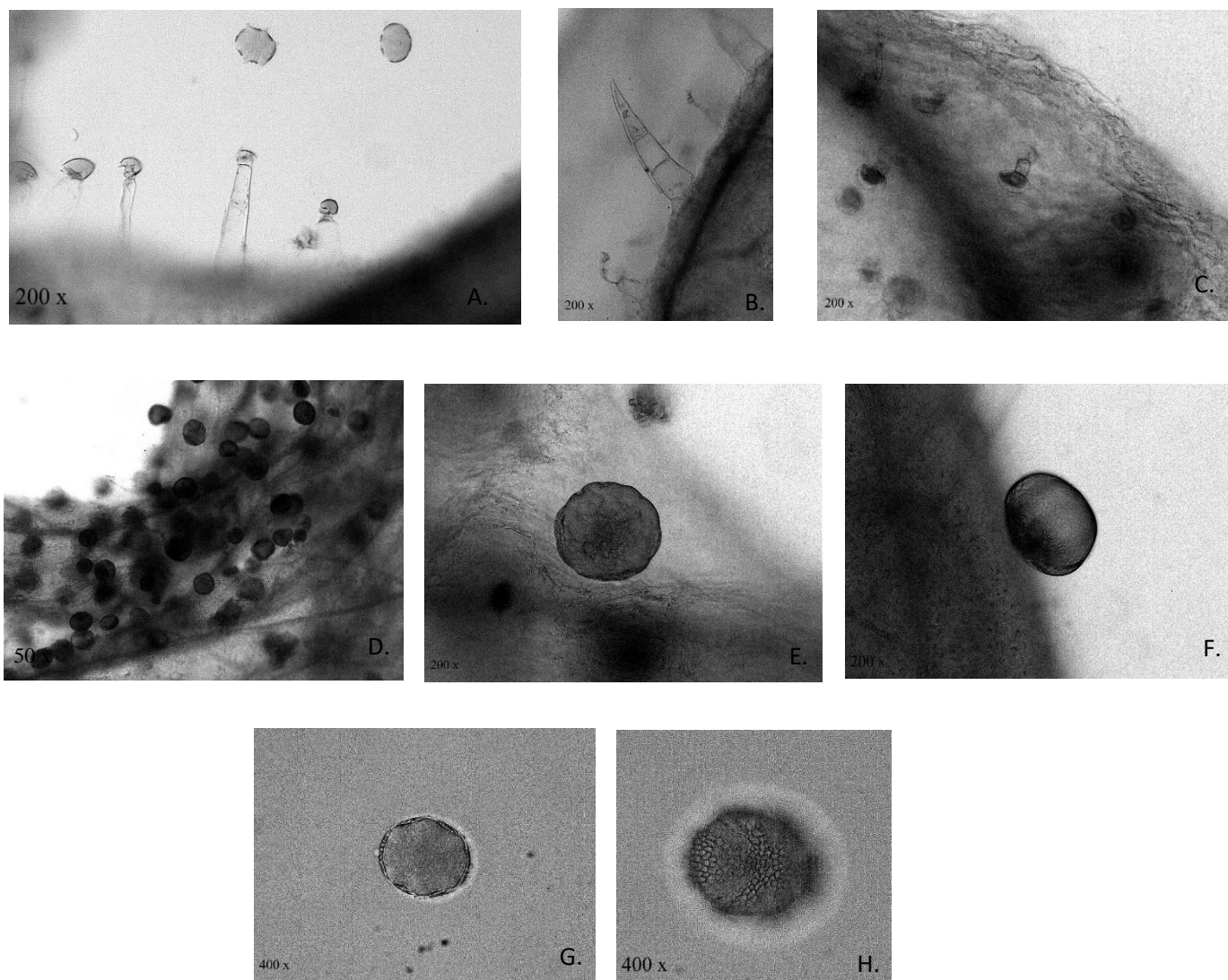


**Slika 4.1.7.** Trihomi na površini brakteje biljne vrste *Salvia sclarea* L. (A, B (100X) – mehanički (m) i kapitatni (k), C (200X) – kapitatni, D, E, F (200X) – mehanički, G (400X) – mehanički sa višćelijskom bazom, H (200X) – mehanički raspoređeni na nervu, I (50X) – peltatni i J (200X) – peltatni)



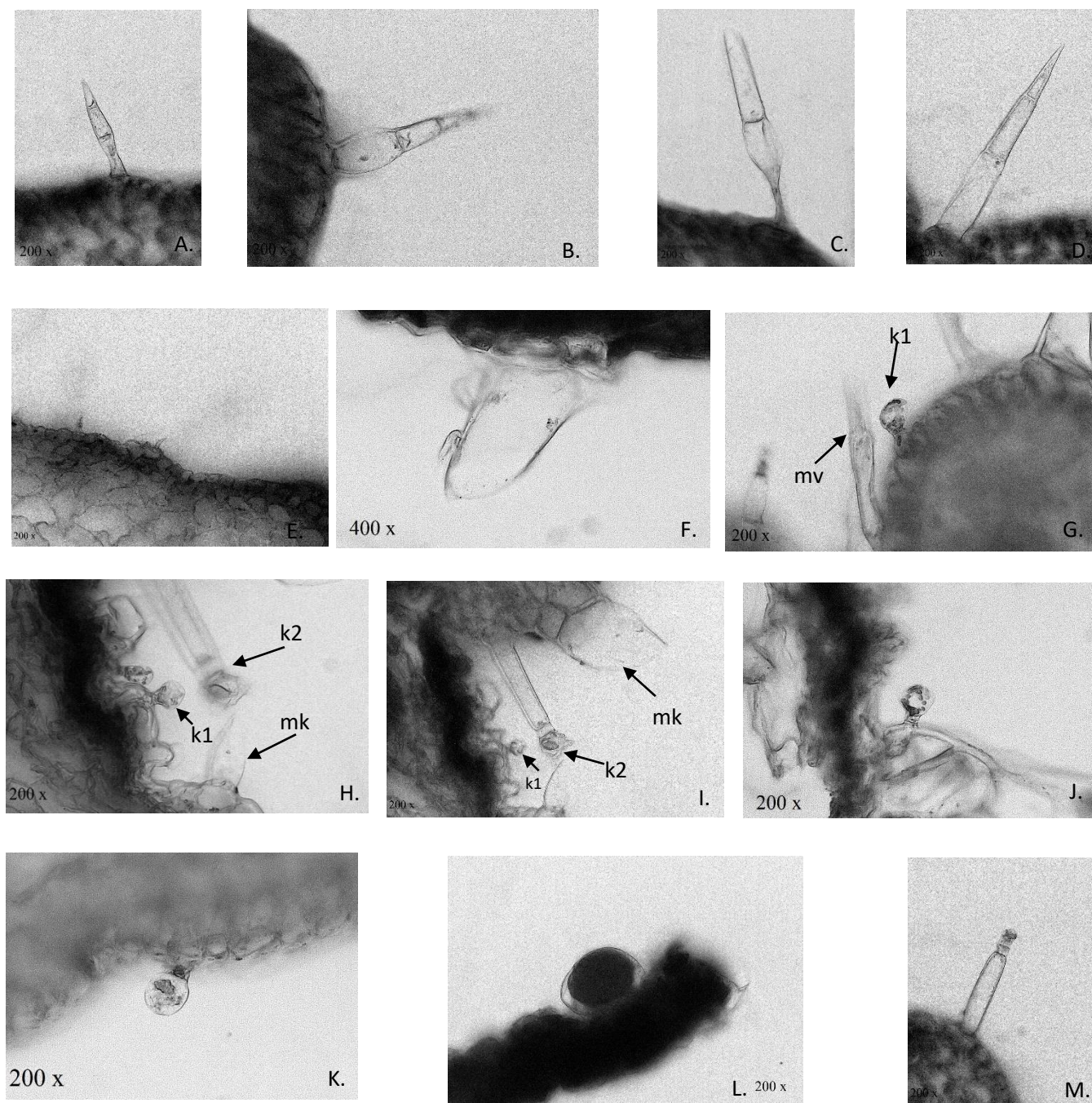


**Slika 4.1.8.** Trihomi na površini čašice biljne vrste *Salvia sclarea* L. (A (100X), B (200X), C (50X) – peltatni (p) i kapitatni oko nerava (k), D (200X) – kapitatni, E, F, G (200X) – mehanički, H (200X) – peltatni)



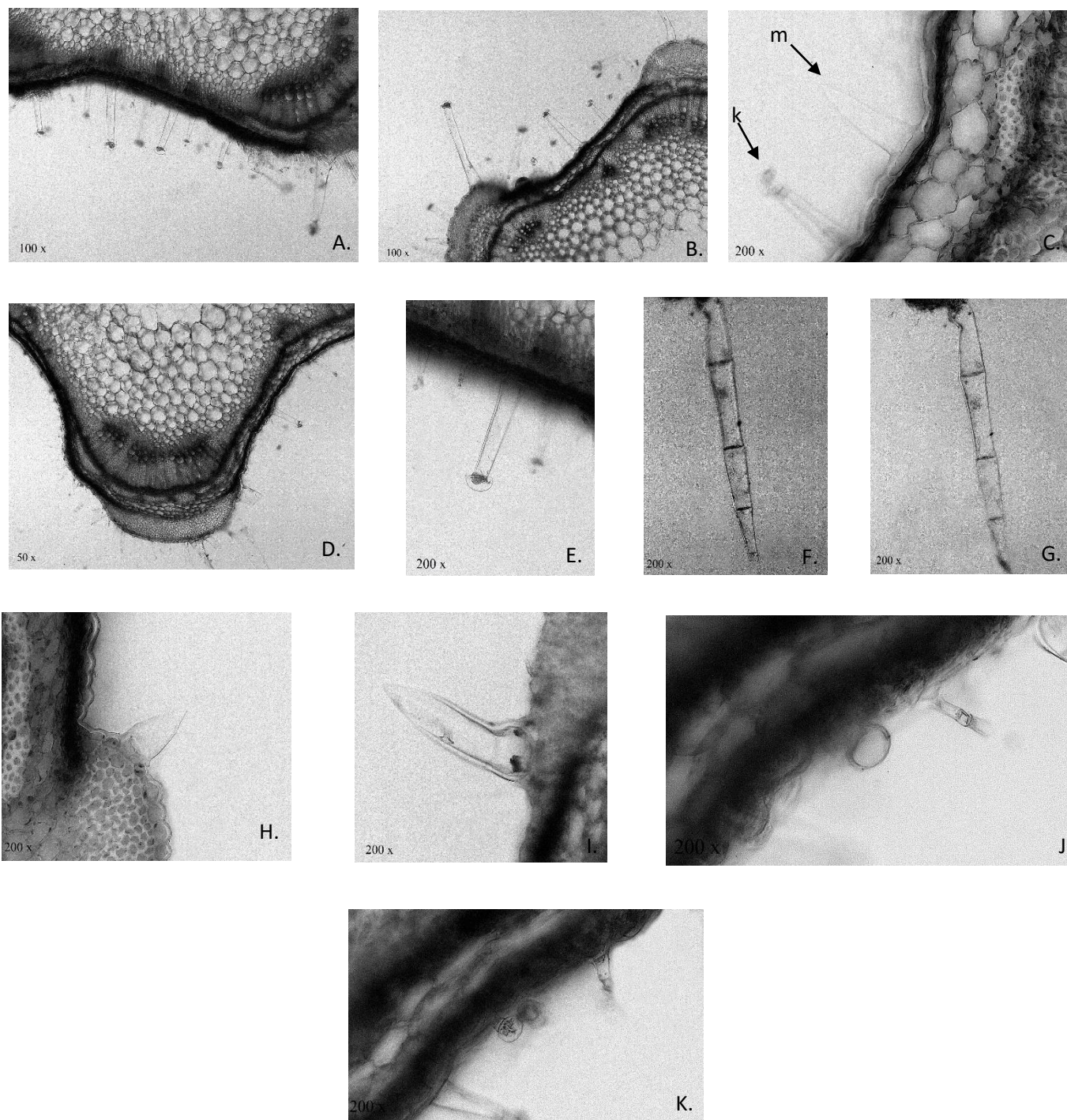
**Slika 4.1.9.** Trihomi na površini krunice biljne vrste *Salvia sclarea* L. (A (200X) – kapitatni, B (200X) mehanički, C (200X) – kapitatni, D (50X) – peltatni, E, F (200X)) i G, H (400X) – polenovo zrno





**Slika 4.1.10.** Trihomi na površini lista biljne vrste *Salvia sclarea* L. (A, B, C, D (200X) – mehanički višecelijski, E (200X), F (400X) – mehanički klinasti, G (200X) – mehanički višecelijski (mv) i kapitatni sa kratkom drškom i većom glavicom (k1), H, I (200X) – mehanički klinasti (mk), kapitatni sa kratkom drškom i većom glavicom (k1) i kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom (k2), J, K (200X) – kapitatni sa kratkom drškom i većom glavicom, L (200X) – peltatni, M (200X) – kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom)





**Slika 4.1.11.** Trihomi na površini stabla biljne vrste *Salvia sclarea* L. (A, B (100X) – kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom, C (200X) - kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom (k) i mehanički klinasti (m), D (50X), E (200X) - kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom, F, G (200X) – mehanički višecelijski, H, I (200X) – mehanički klinasti, J (200X) – peltatni, K (200X) – kapitatni sa kratkom drškom i većom glavicom)



**Tabela 4.1.1.** Tipovi, podtipovi i distribucija trihoma na nadzemnim organima *Salvia sclarea* L.

TIP	PODTIP	DISTRIBUCIJA
NEŽLEZDANI	klinasti – jednoćelijski	brakteja, čašica, list, stablo
	višećelijski	brakteja, čašica, krunica, list, stablo, osovina cvasti
	višećelijski sa izrazito izduženom, zašiljenom terminalnom ćelijom	brakteja
ŽLEZDANI	kapitatni sa dugom drškom	brakteja, čašica, krunica
	kapitatni sa kratkom drškom	brakteja, čašica, krunica
	kapitatni sa dugom drškom i manjom glavicom	list, stablo, osovina svasti
	kapitatni sa kratkom drškom i većom glavicom	list, stablo
	peltatni	brakteje, čašica, krunica, list, stablo, osovina cvasti

#### 4.2. PRINOSI EKSTRAKCIJE

Prinosi ekstrakcije biljnog materijala iz svih godina sakupljanja, izraženi u procentima (%), su prikazani u Tabeli 4.2.1. U svim godinama sakupljanja biljnog materijala najmanji prinosi su postignuti ekstrakcijom koncentrovanim etanolom, dok su najveći prinosi zabeleženi kod ekstrakata pripremljeni 60% etanolom. Kod etanolnih ekstrakata najmanji prinosi su postignuti ekstrakcijom koncentrovanim etanolom, dok su povećanjem polarnosti etanolnih rastvora, dodatkom vode, prinosi značajno rasli. Kod etanolno-vodenih rastvarača su i ultrazvučna i metoda digestije dale visoke i slične prinose, pri čemu je 60% etanol bio nešto efikasniji u odnosu na 80%. Najveći prinos je zabeležen kod ekstrakta E60U iz 2014. godine, pripremljen 60% etanolom ultrazvučnom metodom (23,67%), a najmanji kod ekstrakta EU iz iste godine (4,53%) dobijen istom metodom koncentrovanim etanolom. Kada su u pitanju metanolni ekstrakti, ekstrakcija apsolutnim metanolom je u odnosu na 80% metanol bila manje efikasna, što je takođe u skladu sa nižom polarnošću rastvarača. Kod ovih ekstrakata se metoda maceracije uglavnom pokazala boljom u odnosu na ultrazvučnu tehniku. Apsolutni metanol je u odnosu na koncentrovani etanol izolovao veću količinu ekstraktibilnih materija. Sa druge strane, porast prinosa dodavanjem vode je značajno više rastao kod etanolnih u odnosu na metanolne ekstrakte.

**Tabela 4.2.1.** Prinosi ekstrakcije (%) osušenih nadzemnih delova *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	%			
<b>E80U</b>	15,31	10,30	11,85	15,20
<b>E60U</b>	20,81	16,85	21,85	23,67
<b>E80T</b>	21,76	11,25	13,66	13,40
<b>E60T</b>	22,01	19,20	19,65	19,27
<b>EM</b>	8,65	5,58	7,35	5,93
<b>EU</b>	9,05	7,70	7,35	4,53
<b>MM</b>	12,75	11,85	13,55	9,87
<b>MU</b>	11,93	8,35	11,95	9,20
<b>M80M</b>	19,65	12,55	16,50	18,66
<b>M80U</b>	13,30	13,70	16,55	13,93

#### 4.3. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA U EKSTRAKTIMA *Salvia sclarea* L.

Ekstrakti *S. sclarea* se karakterišu visokim sadržajem polifenolnih jedinjenja. Ukupni fenoli određeni su Folin-Ciocalteu metodom koja se zasniva na merenju redukcionih kapaciteta jedinjenja fenolnih struktura iz ekstrakata (Singleton i sar., 1999). Rezultati se najčešće izražavaju preko ekvivalenata galne kiseline (GAE), a u ovom istraživanju su sadržaji fenola predstavljeni i preko katehinskih ekvivalenata (CE) (Tabela 4.3.1. i Tabela 4.3.2).

**Tabela 4.3.1.** Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima biljne vrste *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi preko ekvivalenata galne kiseline (GAE)

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	mg GAE/g			
<b>E80U</b>	129,87±3,25 <sup>aA</sup>	160,86±10,23 <sup>aB</sup>	169,81±4,21 <sup>aB</sup>	174,33±3,95 <sup>abB</sup>
<b>E60U</b>	112,48±2,63 <sup>bcA</sup>	165,27±2,40 <sup>abB</sup>	152,03±7,75 <sup>bc</sup>	166,05±1,29 <sup>acB</sup>
<b>E80T</b>	107,22±1,72 <sup>cA</sup>	162,46±4,85 <sup>ab</sup>	213,05±1,15 <sup>cC</sup>	174,82±5,30 <sup>bd</sup>
<b>E60T</b>	125,07±3,88 <sup>abA</sup>	180,91±10,36 <sup>bcB</sup>	196,55±2,08 <sup>dB</sup>	160,71±8,10 <sup>cC</sup>
<b>EM</b>	107,01±3,07 <sup>cA</sup>	134,85±11,13 <sup>dB</sup>	141,11±0,63 <sup>eB</sup>	142,80±3,31 <sup>dB</sup>
<b>EU</b>	107,94±0,76 <sup>cA</sup>	136,68±1,43 <sup>dB</sup>	140,23±2,61 <sup>eB</sup>	139,13±1,21 <sup>deB</sup>
<b>MM</b>	145,49±9,52 <sup>dA</sup>	160,73±1,98 <sup>ab</sup>	145,79±2,68 <sup>beA</sup>	133,44±4,64 <sup>eA</sup>
<b>MU</b>	147,98±8,34 <sup>dA</sup>	206,63±5,38 <sup>eB</sup>	124,93±7,31 <sup>fC</sup>	165,97±0,57 <sup>acD</sup>
<b>M80M</b>	171,17±5,30 <sup>eA</sup>	134,69±4,61 <sup>dB</sup>	153,71±6,71 <sup>bc</sup>	145,03±0,92 <sup>dB</sup>
<b>M80U</b>	151,03±14,29 <sup>dA</sup>	189,11±3,43 <sup>cB</sup>	165,97±1,51 <sup>aC</sup>	170,18±1,23 <sup>acBC</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

U svim ekstraktima je kvantifikovana značajna količina ukupnih fenola koja se kretala od 107,01±3,07 mg GAE/g (92,14±5,39 mg CE/g) do 213,05±1,15 mg GAE/g (180,99±1,13 mg CE/g). Kod grupe etanolnih ekstrakata najmanje fenola je određeno kod onih koji su pripremljeni koncentrovanim etanolom (EM i EU). Kod etanolno-vodenih ekstrakata su obe ekstrakcione tehnike i oba tipa rastvarača bili slične efikasnosti, pri čemu je najviše polifenola kvantifikovano u ekstraktu E80T iz 2013. godine (213,05±1,15 mg GAE/g ili 180,99±1,13 mg CE/g). Etanolni ekstrakti iz 2011. godine su sadržali najmanje količine ukupnih fenola. Kod metanolnih ekstrakata je takođe zabeležena slična efikasnost izolovanja polifenola između rastvarača i ekstrakcionih tehnika, pri čemu je ekstrakt MU iz 2012. godine sadržao najveću količinu ovih jedinjenja (206,63±5,38 mg GAE/g ili 179,56±5,28 mg CE/g).

**Tabela 4.3.2.** Sadržaj ukupnih fenola u ekstraktima biljne vrste *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi preko ekvivalenata katehina (CE)

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	mg CE/g			
<b>E80U</b>	105,92±3,20 <sup>acA</sup>	131,83±10,06 <sup>aB</sup>	143,36±4,14 <sup>aB</sup>	143,10±3,88 <sup>abB</sup>
<b>E60U</b>	99,87±3,82 <sup>abA</sup>	141,20±2,35 <sup>abB</sup>	125,88±7,62 <sup>bC</sup>	136,30±1,26 <sup>abB</sup>
<b>E80T</b>	96,39±1,45 <sup>abA</sup>	136,62±4,76 <sup>aB</sup>	180,99±1,13 <sup>cC</sup>	149,25±5,21 <sup>bD</sup>
<b>E60T</b>	102,72±2,58 <sup>abA</sup>	151,54±10,18 <sup>bdAB</sup>	168,08±2,05 <sup>dB</sup>	136,23±7,96 <sup>aB</sup>
<b>EM</b>	95,96±3,02 <sup>abA</sup>	105,63±10,05 <sup>cAB</sup>	111,78±0,62 <sup>eB</sup>	116,32±3,26 <sup>cdB</sup>
<b>EU</b>	92,14±5,39 <sup>bA</sup>	107,72±2,32 <sup>cB</sup>	114,74±2,56 <sup>efC</sup>	112,18±1,19 <sup>cdBC</sup>
<b>MM</b>	117,29±9,36 <sup>cdAB</sup>	129,42±5,19 <sup>aB</sup>	121,57±2,64 <sup>bfAB</sup>	109,43±4,57 <sup>cA</sup>
<b>MU</b>	124,53±8,22 <sup>dA</sup>	179,56±5,28 <sup>eB</sup>	100,20±7,19 <sup>gC</sup>	138,57±0,56 <sup>aD</sup>
<b>M80M</b>	143,12±5,21 <sup>eA</sup>	108,34±4,54 <sup>cB</sup>	128,49±6,59 <sup>bC</sup>	117,98±0,90 <sup>dBC</sup>
<b>M80U</b>	120,33±10,33 <sup>dA</sup>	162,34±3,38 <sup>dB</sup>	140,07±1,48 <sup>aC</sup>	143,22±1,21 <sup>abC</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih fenola u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.4. SADRŽAJ UKUPNIH TANINA U EKSTRAKTIMA *Salvia sclarea* L.

Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima određen je u nastavku određivanja ukupnih fenola pomoću istog Folin-Ciocalteu reagensa uz prethodno dodavanje PVPP koji je imao ulogu vezivanja tanina iz ekstrakta. U ekstraktima *S. sclarea* zabeleženo je prisustvo značajnih količina ukupnih tanina čiji su sadržaji izraženi, kao i kod ukupnih polifenola, preko ekvivalenata galne kiseline i katehina (Tabela 4.4.1. i Tabela 4.4.2).

Sadržaji ukupnih tanina u ekstraktima muskatne žalfije su bili u visokoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih fenola, i kada su rezultati izraženi preko ekvivalenata galne kiseline i preko ekvivalenata katehina ( $r=0,852$ ;  $p < 0,001$  i  $0,844$ ;  $p < 0,001$ , redom). U ekstraktima su bili zastupljeni u količini od  $27,25 \pm 1,07$  mg GAE/g do  $79,02 \pm 1,62$  mg GAE/g odnosno od  $28,28 \pm 1,01$  mg CE/g do  $77,68 \pm 1,60$  mg CE/g.

**Tabela 4.4.1.** Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi preko ekvivalenata galne kiseline (GAE)

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	mg GAE/g			
<b>E80U</b>	33,07±1,07 <sup>aA</sup>	54,12±0,10 <sup>aB</sup>	73,18±2,93 <sup>aC</sup>	58,39±2,83 <sup>abcD</sup>
<b>E60U</b>	28,64±2,63 <sup>bA</sup>	69,26±1,12 <sup>bB</sup>	53,70±5,11 <sup>bcA</sup>	63,11±1,31 <sup>cB</sup>
<b>E80T</b>	27,30±1,72 <sup>cA</sup>	57,31±2,58 <sup>cB</sup>	72,87±0,52 <sup>aC</sup>	77,52±3,15 <sup>dC</sup>
<b>E60T</b>	31,85±0,88 <sup>bA</sup>	76,48±4,32 <sup>dB</sup>	79,02±1,62 <sup>aB</sup>	63,41±6,02 <sup>cC</sup>
<b>EM</b>	27,25±1,07 <sup>cdA</sup>	51,04±0,31 <sup>aB</sup>	47,82±0,53 <sup>bdB</sup>	52,09±2,81 <sup>aeB</sup>
<b>EU</b>	27,48±0,76 <sup>eA</sup>	46,45±1,43 <sup>aB</sup>	50,66±1,72 <sup>bC</sup>	44,83±2,68 <sup>fB</sup>
<b>MM</b>	55,84±2,81 <sup>eA</sup>	56,83±1,74 <sup>cA</sup>	58,59±0,61 <sup>ceA</sup>	31,41±1,24 <sup>gB</sup>
<b>MU</b>	45,74±0,48 <sup>bA</sup>	60,09±0,77 <sup>cB</sup>	42,13±2,58 <sup>dC</sup>	59,66±2,11 <sup>bcB</sup>
<b>M80M</b>	41,47±1,76 <sup>dA</sup>	43,36±4,02 <sup>aAB</sup>	60,75±5,95 <sup>efC</sup>	51,43±0,61 <sup>eB</sup>
<b>M80U</b>	43,08±3,85 <sup>bA</sup>	76,95±5,61 <sup>dB</sup>	65,04±1,40 <sup>fC</sup>	54,52±0,45 <sup>abeD</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih tanina između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih tanina u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

Ekstrakti iz 2011. godine su uglavnom sadržali manje tanina u odnosu na 2012, 2013. i 2014. godinu. Kod grupe etanolnih ekstrakata najmanje ukupnih tanina je kvantifikovano kod EM i EU ekstrakata koji su pripremani koncentrovanim etanolom. Najviše ukupnih tanina je zabeleženo u ekstraktu E60T iz 2013. godine sa količinom od 79,02±1,62 mg GAE/g (77,68±1,60 mg CE/g). Kod etanolno-vodenih ekstrakata su obe ekstrakcione tehnike i oba tipa rastvarača bili slični po efikasnosti, mada je tehnika digestija bila uglavnom nešto uspešnija u ekstrahovanju tanina. Koncentrovani i 80% metanol su takođe bili vrlo slični po količini izolovanih tanina sa izuzetkom ekstrakta M80U iz 2012. godine koji je bio visoko efikasan 76,95±5,61 mg GAE/mg (75,65±5,51 mg CE/mg).

**Tabela 4.4.2.** Sadržaj ukupnih tanina u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi preko ekvivalenta katehina (CE)

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	mg CE/g			
<b>E80U</b>	32,51±1,05 <sup>aA</sup>	48,47±4,73 <sup>abB</sup>	71,95±2,88 <sup>abC</sup>	57,41±2,74 <sup>abD</sup>
<b>E60U</b>	30,65±1,64 <sup>abA</sup>	69,91±1,70 <sup>dcB</sup>	52,79±5,03 <sup>dcC</sup>	62,25±1,17 <sup>aD</sup>
<b>E80T</b>	29,58±0,73 <sup>abA</sup>	60,44±3,41 <sup>eB</sup>	71,63±0,51 <sup>abC</sup>	57,43±4,58 <sup>abB</sup>
<b>E60T</b>	31,53±2,46 <sup>abA</sup>	75,89±3,22 <sup>cB</sup>	77,68±1,60 <sup>aB</sup>	62,33±5,91 <sup>aC</sup>
<b>EM</b>	29,45±2,42 <sup>abA</sup>	43,48±1,21 <sup>aB</sup>	47,02±0,51 <sup>cfB</sup>	51,22±2,76 <sup>bC</sup>
<b>EU</b>	28,28±1,01 <sup>bA</sup>	43,80±1,69 <sup>aBC</sup>	49,81±1,70 <sup>cC</sup>	40,89±4,98 <sup>cB</sup>
<b>MM</b>	55,33±2,17 <sup>fAB</sup>	50,85±2,81 <sup>bA</sup>	57,61±0,61 <sup>edB</sup>	30,88±3,18 <sup>dC</sup>
<b>MU</b>	48,18±2,75 <sup>eA</sup>	63,65±3,59 <sup>edB</sup>	41,41±2,54 <sup>fcC</sup>	58,16±0,56 <sup>abB</sup>
<b>M80M</b>	40,77±1,73 <sup>dA</sup>	44,89±2,11 <sup>abAB</sup>	59,71±5,85 <sup>eC</sup>	50,57±1,17 <sup>bB</sup>
<b>M80U</b>	36,23±0,22 <sup>cA</sup>	75,65±5,51 <sup>cB</sup>	66,32±2,17 <sup>bC</sup>	53,60±0,44 <sup>bD</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih tanina između ekstraktata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih tanina u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.5. SADRŽAJ UKUPNIH FLAVONOIDA U EKSTRAKTIMA *Salvia sclarea* L.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima prikazan je u Tabeli 4.5.1. Količina flavonoida određenih u ekstraktima varirala je u uskom opsegu od 21,76±1,19 µg LE/mg do 38,52±2,39 µg LE/mg, sa izuzecima ekstrakta EM iz 2013. godine sa najmanjom količinom flavonoida od 18,59±1,50 µg LE/mg i ekstrakta MU iz 2012. godine sa najviše flavonoida u količini od 53,97±0,53 µg LE/mg. Etanol 80% je bio efikasniji u ultrazvučnoj tehnici ekstrakcije dok je 60% u metodi digestije. Kod ekstraktata koji su dobijeni pomoću koncentrovanog etanola je ultrazvučna ekstrakcija uspešnija od metode maceracije. Metoda ultrazvuka se, kada su u pitanju metanolni ekstrakti, uglavnom pokazala efikasnijom u odnosu na maceraciju kod oba tipa metanolnih rastvarača. Veza između sadržaja ukupnih fenola i ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima je bila jaka, sa vrednostima Pirsonovih koeficijenata nešto većim od 0,5 ( $r=0,571$ ;  $p < 0,001$  kod sadržaja fenola izraženih u ekvivalentima galne kiseline i  $r=0,586$ ;  $p < 0,001$  kod sadržaja fenola izraženi u ekvivalentima katehina).

**Tabela 4.5.1.** Sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi preko ekvivalenata luteolina (LE)

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	µg LE/mg			
E80U	30,43±1,62 <sup>aA</sup>	33,34±1,27 <sup>aA</sup>	31,86±1,41 <sup>aA</sup>	36,23±1,01 <sup>aA</sup>
E60U	21,76±1,19 <sup>bA</sup>	32,38±0,90 <sup>aB</sup>	30,84±0,32 <sup>abBC</sup>	28,41±2,29 <sup>bcC</sup>
E80T	27,13±0,99 <sup>cA</sup>	29,72±1,99 <sup>bA</sup>	29,09±0,00 <sup>bcA</sup>	34,79±2,72 <sup>adB</sup>
E60T	26,49±1,17 <sup>cA</sup>	32,53±0,63 <sup>aB</sup>	34,03±1,64 <sup>dB</sup>	31,63±1,12 <sup>acB</sup>
EM	21,55±1,59 <sup>bA</sup>	27,69±0,15 <sup>bcB</sup>	18,53±1,50 <sup>bA</sup>	28,87±1,85 <sup>bcB</sup>
EU	29,28±1,37 <sup>acA</sup>	29,48±2,10 <sup>bA</sup>	21,99±1,95 <sup>eB</sup>	29,11±1,78 <sup>bcA</sup>
MM	30,71±1,89 <sup>aA</sup>	33,02±1,12 <sup>aA</sup>	22,36±0,47 <sup>eB</sup>	26,64±1,95 <sup>bc</sup>
MU	28,44±0,61 <sup>acA</sup>	53,97±0,53 <sup>cB</sup>	28,35±0,04 <sup>cA</sup>	38,52±2,39 <sup>dC</sup>
M80M	31,22±0,88 <sup>aA</sup>	22,86±0,82 <sup>dB</sup>	23,69±0,13 <sup>eB</sup>	25,26±0,54 <sup>bc</sup>
M80U	23,01±0,80 <sup>bA</sup>	26,04±0,72 <sup>eB</sup>	28,42±0,94 <sup>cB</sup>	27,15±1,94 <sup>bB</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih flavonoida između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih flavonoida u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.6. SADRŽAJ UKUPNIH DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE U EKSTRAKTIMA (UDHK) *Salvia sclarea* L.

Važna farmakološki aktivna jedinjenja u *Salvia* vrstama pripadaju grupi jedinjenja koji u svojoj osnovi sadrže hidroksicimetnu kiselinu, sa ruzmarinskom kao dominantnim derivatom. Rezultati se prema farmakopejskom propisu izražavaju upravo na procenat (%) ruzmarinske kiseline (Ph. Eur. 9,0, 2017). U ekstraktima muskatne žalfije se sadržaj ovih jedinjenja kretao u rasponu od 3,92±0,33% do 13,37±0,24% ruzmarinske kiseline (Tabela 4.6.1). Najmanje UDHK određeno je u ekstraktu EM iz 2011. godine, a najviše u E60T iz 2013. godine. Sa visokim sadržajem ovih jedinjenja ističu se još i E80T iz 2013. (11,30±0,13%) i MU iz 2012. godine (12,18±0,13%). Kod vodeno-etanolnih ekstrakata je metoda digestije bila efikasnija u odnosu na ekstrakciju ultrazvukom pri korišćenju oba tipa rastvarača i u svim godinama. Metoda ultrazvuka je bila uspešnija u izolovanju ovih jedinjenja u odnosu na maceraciju pri korišćenju koncentrovanog etanola (osim kod ekstrakata iz 2012. godine). Kod metanolnih ekstrakata je najbogatiji bio MU iz 2012. godine sa vrednošću od 12,18±0,13%. Metoda ultrazvuka je bila

efikasnija od maceracije pri korišćenju apsolutnog metanola u 2012. i 2013. godini, kao i pri korišćenju 80% metanola u 2011, 2012. i 2013. godini. Sadržaji ukupnih derivata hidroksicimetine kiseline su jako pozitivno korelirali sa sadržajem ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima sa vrednostima ( $r=0,622$ ;  $p<0,001$  kod sadržaja fenola izraženi u ekvivalentima galne kiseline i  $r=0,643$ ;  $p<0,001$  kod sadržaja fenola izraženi u ekvivalentima katehina).

**Tabela 4.6.1.** Sadržaj ukupnih derivata hidroksicimetine kiseline u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. izraženi u procentima (%) ruzmarinske kiseline

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	% ruzmarinske kiseline			
E80U	6,89±0,15 <sup>aA</sup>	6,17±0,29 <sup>aB</sup>	8,11±0,16 <sup>aC</sup>	5,28±0,28 <sup>aD</sup>
E60U	5,00±0,05 <sup>bA</sup>	5,66±0,26 <sup>bB</sup>	6,43±0,20 <sup>bcC</sup>	5,52±0,27 <sup>aB</sup>
E80T	7,47±0,30 <sup>cA</sup>	6,94±0,07 <sup>cB</sup>	11,30±0,13 <sup>dC</sup>	9,02±0,14 <sup>bD</sup>
E60T	5,82±0,08 <sup>dA</sup>	8,53±0,13 <sup>dB</sup>	13,37±0,24 <sup>eC</sup>	8,63±0,10 <sup>bcB</sup>
EM	3,92±0,33 <sup>eA</sup>	7,64±0,07 <sup>eB</sup>	6,31±0,15 <sup>bc</sup>	4,80±0,14 <sup>dD</sup>
EU	4,95±0,08 <sup>bA</sup>	4,25±0,06 <sup>fB</sup>	7,30±0,15 <sup>fgC</sup>	7,26±0,34 <sup>eC</sup>
MM	7,12±0,21 <sup>acA</sup>	6,53±0,07 <sup>gB</sup>	6,74±0,46 <sup>chB</sup>	8,24±0,05 <sup>cC</sup>
MU	6,77±0,10 <sup>aA</sup>	12,18±0,13 <sup>hB</sup>	7,55±0,29 <sup>gC</sup>	8,20±0,12 <sup>cD</sup>
M80M	6,07±0,04 <sup>dfA</sup>	6,78±0,09 <sup>cgB</sup>	7,11±0,17 <sup>fhB</sup>	6,79±0,36 <sup>fB</sup>
M80U	6,26±0,12 <sup>fA</sup>	7,61±0,06 <sup>eB</sup>	7,96±0,23 <sup>aB</sup>	5,56±0,21 <sup>aC</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih derivata hidroksicimetine kiseline između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p<0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ukupnih derivata hidroksicimetine kiseline u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p<0,05$ ).

#### 4.7. HPLC KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

Svi ispitivani ekstrakti su hemijski okarakterisani pomoću precizne HPLC tehnike. Na snimljenim hromatogramima (Prilog; Slika 8.1-8.41) se jasno uočava dominantnost ruzmarinske kiseline u odnosu na sva ostala jedinjenja. Definisana je i sadržaj kafene kiseline kao i flavonoidnih aglikona, apigenina, luteolina i salvigenina, i flavonoidnih heterozida, apigenin-7-*O*-glukozida i luteolin-7-*O*-glukozida. Ruzmarinska kiselina se na hromatogramu pojavljuje na 33,5 min, a kafena kiselina na 20,5 min. Kod flavonoida retenciona vremena (RT) su bila: 39,3 min kod luteolina, 42,7 min kod apigenina, 53 min kod salvigenina, 29 min kod luteolin-7-*O*-



glukozida, i 32,5 min kod apigenin-7-*O*-glukozida. U Tabelama 4.7.1-4.7.4. prikazani su sadržaji svih navedenih jedinjenja u ekstraktima ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) po godinama sakupljanja materijala, dok su na Slikama 4.7.1-4.7.7. (histogramima) predstavljeni rezultati tako da prezentuju uporedni sadržaj svakog od jedinjenja u ekstraktu kroz godine sakupljanja biljnog materijala. Na Slikama 4.7.8-4.7.14. predstavljeni su UV/Vis hromatogrami svakog od jedinjenja u ekstraktima, a koji su predstavljali osnov za njihovu identifikaciju. Najveća količina ruzmarinske kiseline je zabeležena u ekstraktu E80T iz 2013. godine ( $279,82 \pm 1,20 \mu\text{g}/\text{mg}$ ) dok je kafena bila najzastupljenija u ekstraktu E80T iz 2011. godine sa količinom od  $1,32 \pm 0,00 \mu\text{g}/\text{mg}$ . Luteolin je bio najzastupljeniji u ekstraktu EM iz 2012 ( $4,98 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), dok su apigenin i salvigenin u najvećoj količini određeni u ekstraktu EU iz iste godine ( $4,98 \pm 0,22 \mu\text{g}/\text{mg}$  i  $13,24 \pm 0,26 \mu\text{g}/\text{mg}$ , redom). U ekstraktu E60T iz 2012. godine je kvantifikovana najveća količina luteolin-7-*O*-glukozida ( $12,07 \pm 0,81 \mu\text{g}/\text{mg}$ ), a u E60U iz 2013. godine najveća količina apigenin-7-*O*-glukozida ( $11,55 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{mg}$ ).

Sadržaj ruzmarinske kiseline u ekstraktima je visoko korelirao sa sadržajem ukupnih fenola ( $r=0,716$ ;  $p<0,001$  kada su ukupni fenoli izraženi preko ekvivalenata galne kiseline i  $r=0,703$ ;  $p<0,001$  preko katehnskih ekvivalenata), dok kod kafene kiseline to nije bio slučaj ( $r<0,15$ ). Heterozidi luteolina i apigenina su takođe bili u pozitivnoj korelaciji sa ukupnim fenolima. Snažna veza je potvrđena između ukupnih fenola i luteolin-7-*O*-glukozida sa vrednostima Pirsonovih koeficijenata od  $r=0,734$ ;  $p<0,001$  (GAE) i  $r=0,779$ ;  $p<0,001$  (CE). Korelacija sa apigenin-7-*O*-glukozidom je bila umerena sa vrednostima  $r=0,39$ ;  $p<0,001$  (GAE) i  $r=0,413$ ;  $p<0,001$  (CE). Vrednosti Pirsonovih koeficijenata koji predstavljaju korelaciju ukupnih fenola sa najmanje polarnim jedinjenjima, aglikonima (luteolinom, apigeninom i salvigeninom), su imali negativan smer.

**Tabela 4.7.1.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoidnih aglikona i flavonoidnih heterozida u ekstraktima *Salvia sclarea* L. iz 2011. godine

EKSTRAKT 2011	Rk	Kk	Lu	Ap	Sa	LuG	ApG
	µg/mg						
E80U*	179,00±1,00 <sup>a</sup>	0,95±0,02 <sup>a</sup>	1,58±0,17 <sup>a</sup>	1,06±0,01 <sup>a</sup>	1,72±0,07 <sup>a</sup>	6,31±0,62 <sup>a</sup>	8,93±0,77 <sup>a</sup>
E60U	136,30±1,22 <sup>b</sup>	0,78±0,04 <sup>b</sup>	0,72±0,06 <sup>b</sup>	0,65±0,02 <sup>b</sup>	1,23±0,06 <sup>b</sup>	6,03±0,33 <sup>af</sup>	5,93±0,23 <sup>b</sup>
E80T	167,81±1,10 <sup>c</sup>	1,32±0,06 <sup>c</sup>	1,21±0,03 <sup>c</sup>	0,97±0,01 <sup>c</sup>	1,86±0,02 <sup>c</sup>	6,30±0,26 <sup>ab</sup>	6,68±0,20 <sup>c</sup>
E60T	136,16±0,11 <sup>b</sup>	0,96±0,03 <sup>ad</sup>	0,78±0,04 <sup>b</sup>	0,69±0,01 <sup>bd</sup>	1,16±0,05 <sup>b</sup>	6,82±0,43 <sup>b</sup>	6,70±0,22 <sup>c</sup>
EM	78,37±0,22 <sup>d</sup>	1,02±0,01 <sup>d</sup>	1,66±0,03 <sup>a</sup>	1,19±0,06 <sup>e</sup>	6,38±0,11 <sup>d</sup>	1,68±0,01 <sup>c</sup>	2,16±0,04 <sup>d</sup>
EU	85,65±0,38 <sup>e</sup>	0,60±0,01 <sup>e</sup>	4,16±0,09 <sup>d</sup>	2,39±0,04 <sup>f</sup>	9,97±0,13 <sup>e</sup>	1,50±0,02 <sup>c</sup>	2,66±0,07 <sup>d</sup>
MM	175,66±2,02 <sup>f</sup>	0,79±0,02 <sup>b</sup>	1,45±0,01 <sup>e</sup>	0,78±0,01 <sup>g</sup>	3,72±0,09 <sup>f</sup>	5,18±0,21 <sup>d</sup>	5,63±0,21 <sup>b</sup>
MU	177,77±1,89 <sup>af</sup>	0,63±0,04 <sup>e</sup>	1,13±0,01 <sup>c</sup>	0,78±0,00 <sup>g</sup>	4,05±0,02 <sup>g</sup>	5,65±0,34 <sup>df</sup>	4,56±0,02 <sup>e</sup>
M80M	197,48±2,00 <sup>g</sup>	0,97±0,07 <sup>ad</sup>	0,96±0,02 <sup>f</sup>	0,72±0,00 <sup>d</sup>	2,54±0,04 <sup>h</sup>	8,84±0,54 <sup>e</sup>	7,00±0,55 <sup>c</sup>
M80U	171,99±1,88 <sup>h</sup>	0,81±0,01 <sup>b</sup>	0,80±0,02 <sup>b</sup>	0,53±0,00 <sup>h</sup>	2,27±0,01 <sup>i</sup>	5,61±0,31 <sup>df</sup>	4,45±0,18 <sup>e</sup>

Rk – ruzmarinska kiselina; Kk – kafena kiselina; Lu – luteolin; Ap – apigenin; Sa – salvigenin; LuG – luteolin-7-O-glukozid; ApG – apigenin-7-O-glukozid

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju jedinjenja između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

\*E80U ekstrakt je ispitan i u vodenom rastvoru (Rk=165,30±0,60 µg/mg; Kk=0,95±0,03 µg/mg; Lu=0,50±0,02 µg/mg; Ap=0,22±0,01 µg/mg; Sa=0,42±0,01 µg/mg; LuG=5,55±0,46 µg/mg; ApG=8,51±0,80 µg/mg)

**Tabela 4.7.2.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoidnih aglikona i flavonoidnih heterozida u ekstraktima *Salvia sclarea* L. iz 2012. godine

EKSTRAKT 2012	Rk	Kk	Lu	Ap	Sa	LuG	ApG
	µg/mg						
E80U	223,46±0,98 <sup>a</sup>	0,82±0,01 <sup>a</sup>	1,78±0,01 <sup>a</sup>	1,50±0,00 <sup>a</sup>	6,16±0,03 <sup>a</sup>	9,15±0,08 <sup>a</sup>	7,54±0,65 <sup>ab</sup>
E60U	184,55±0,87 <sup>b</sup>	0,68±0,02 <sup>b</sup>	1,24±0,02 <sup>b</sup>	1,13±0,02 <sup>b</sup>	3,98±0,01 <sup>b</sup>	10,46±0,76 <sup>bc</sup>	7,57±0,33 <sup>ab</sup>
E80T	224,06±1,02 <sup>a</sup>	1,18±0,03 <sup>c</sup>	0,83±0,03 <sup>c</sup>	1,05±0,00 <sup>bc</sup>	3,77±0,01 <sup>c</sup>	9,95±0,73 <sup>ab</sup>	6,98±0,31 <sup>ab</sup>
E60T	174,21±0,87 <sup>c</sup>	0,73±0,02 <sup>f</sup>	0,79±0,01 <sup>c</sup>	0,95±0,03 <sup>c</sup>	3,63±0,02 <sup>c</sup>	12,07±0,81 <sup>d</sup>	6,82±0,32 <sup>a</sup>
EM	155,02±0,99 <sup>d</sup>	0,61±0,00 <sup>d</sup>	4,98±0,22 <sup>d</sup>	2,76±0,09 <sup>d</sup>	9,89±0,20 <sup>d</sup>	1,69±0,05 <sup>e</sup>	2,60±0,03 <sup>c</sup>
EU	120,64±0,61 <sup>e</sup>	0,41±0,01 <sup>e</sup>	3,72±0,21 <sup>e</sup>	2,80±0,11 <sup>d</sup>	13,24±0,26 <sup>e</sup>	1,79±0,11 <sup>e</sup>	1,89±0,00 <sup>c</sup>
MM	190,45±0,87 <sup>f</sup>	0,75±0,03 <sup>f</sup>	3,26±0,05 <sup>f</sup>	2,20±0,11 <sup>e</sup>	6,74±0,09 <sup>f</sup>	4,68±0,22 <sup>f</sup>	4,94±0,13 <sup>d</sup>
MU	251,04±1,23 <sup>g</sup>	0,54±0,00 <sup>g</sup>	0,93±0,04 <sup>c</sup>	1,51±0,01 <sup>a</sup>	7,72±0,06 <sup>g</sup>	11,19±0,99 <sup>cd</sup>	7,80±0,55 <sup>b</sup>
M80M	154,28±0,88 <sup>d</sup>	0,82±0,03 <sup>a</sup>	4,51±0,02 <sup>g</sup>	1,78±0,09 <sup>f</sup>	2,31±0,01 <sup>h</sup>	3,84±0,22 <sup>f</sup>	9,27±0,85 <sup>e</sup>
M80U	217,66±1,65 <sup>h</sup>	0,67±0,02 <sup>b</sup>	1,52±0,00 <sup>h</sup>	1,42±0,00 <sup>a</sup>	6,23±0,03 <sup>a</sup>	9,69±0,22 <sup>ab</sup>	6,70±0,58 <sup>a</sup>

Rk – ruzmarinska kiselina; Kk – kafena kiselina; Lu – luteolin; Ap – apigenin; Sa – salvigenin; LuG – luteolin-7-O-glukozid; ApG – apigenin-7-O-glukozid

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju jedinjenja između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

**Tabela 4.7.3.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoidnih aglikona i flavonoidnih heterozida u ekstraktima *Salvia sclarea* L. iz 2013. godine

EKSTRAKT 2013	Rk	Kk	Lu	Ap	Sa	LuG	ApG
	µg/mg						
E80U	217,53±1,12 <sup>a</sup>	0,91±0,02 <sup>a</sup>	2,08±0,18 <sup>a</sup>	1,45±0,11 <sup>a</sup>	3,96±0,02 <sup>a</sup>	6,25±0,35 <sup>a</sup>	7,77±0,35 <sup>a</sup>
E60U	164,57±1,00 <sup>b</sup>	0,88±0,03 <sup>b</sup>	1,61±0,11 <sup>b</sup>	1,08±0,09 <sup>b</sup>	2,20±0,01 <sup>b</sup>	7,33±0,55 <sup>b</sup>	11,55±0,09 <sup>b</sup>
E80T	279,82±1,20 <sup>c</sup>	1,15±0,00 <sup>c</sup>	1,07±0,09 <sup>c</sup>	0,92±0,02 <sup>c</sup>	3,46±0,04 <sup>c</sup>	11,20±0,10 <sup>c</sup>	8,85±0,45 <sup>c</sup>
E60T	191,60±1,01 <sup>d</sup>	0,94±0,03 <sup>a</sup>	0,60±0,01 <sup>d</sup>	0,73±0,01 <sup>d</sup>	2,41±0,03 <sup>d</sup>	11,99±0,08 <sup>d</sup>	7,75±0,44 <sup>a</sup>
EM	124,80±0,87 <sup>e</sup>	0,55±0,02 <sup>d</sup>	4,67±0,18 <sup>e</sup>	2,09±0,12 <sup>e</sup>	5,10±0,20 <sup>e</sup>	1,23±0,03 <sup>e</sup>	2,59±0,11 <sup>d</sup>
EU	208,98±1,00 <sup>e</sup>	0,49±0,00 <sup>e</sup>	3,58±0,05 <sup>f</sup>	2,07±0,01 <sup>e</sup>	9,82±0,23 <sup>f</sup>	2,26±0,11 <sup>f</sup>	2,88±0,09 <sup>d</sup>
MM	187,77±0,77 <sup>f</sup>	0,63±0,02 <sup>f</sup>	2,82±0,20 <sup>g</sup>	1,62±0,01 <sup>f</sup>	3,85±0,05 <sup>a</sup>	3,60±0,11 <sup>g</sup>	6,83±0,33 <sup>e</sup>
MU	188,59±0,89 <sup>g</sup>	0,44±0,01 <sup>g</sup>	2,77±0,19 <sup>g</sup>	1,43±0,00 <sup>a</sup>	4,00±0,12 <sup>a</sup>	5,22±0,38 <sup>h</sup>	8,99±0,56 <sup>c</sup>
M80M	204,22±0,09 <sup>h</sup>	0,89±0,02 <sup>b</sup>	2,52±0,08 <sup>h</sup>	1,61±0,02 <sup>f</sup>	2,72±0,06 <sup>g</sup>	5,60±0,35 <sup>h</sup>	10,65±0,66 <sup>f</sup>
M80U	200,96±1,19 <sup>i</sup>	0,66±0,02 <sup>f</sup>	1,72±0,01 <sup>b</sup>	0,96±0,04 <sup>c</sup>	1,79±0,06 <sup>h</sup>	6,09±0,22 <sup>a</sup>	9,89±0,31 <sup>g</sup>

Rk – ruzmarinska kiselina; Kk – kafena kiselina; Lu – luteolin; Ap – apigenin; Sa – salvigenin; LuG – luteolin-7-O-glukozid; ApG – apigenin-7-O-glukozid

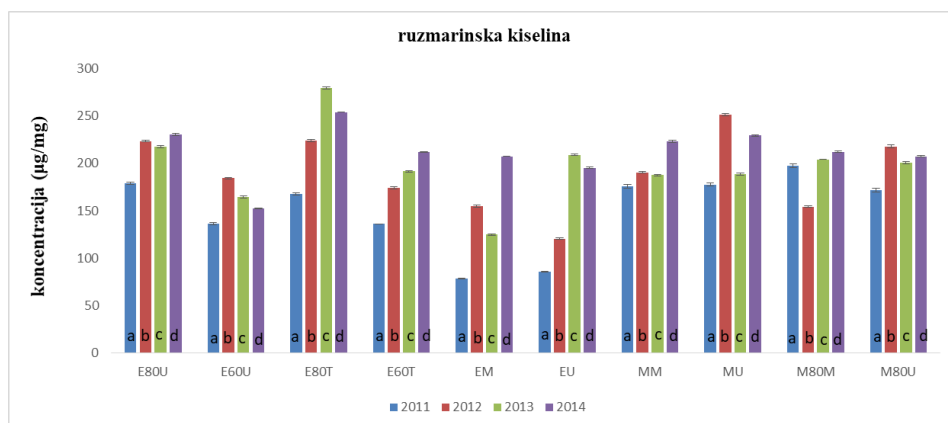
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju jedinjenja između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

**Tabela 4.7.4.** Sadržaj fenolnih kiselina, flavonoidnih aglikona i flavonoidnih heterozida u ekstraktima *Salvia sclarea* L. iz 2014. godine

EKSTRAKT 2014	Rk	Kk	Lu	Ap	Sa	LuG	ApG
	µg/mg						
E80U	230,41±1,11 <sup>a</sup>	1,01±0,00 <sup>abc</sup>	1,00±0,02 <sup>a</sup>	0,98±0,03 <sup>a</sup>	2,53±0,06 <sup>a</sup>	7,86±0,22 <sup>a</sup>	8,01±0,65 <sup>a</sup>
E60U	152,42±0,11 <sup>b</sup>	0,91±0,00 <sup>a</sup>	0,93±0,04 <sup>b</sup>	0,72±0,01 <sup>b</sup>	1,69±0,01 <sup>b</sup>	7,82±0,22 <sup>a</sup>	6,84±0,33 <sup>b</sup>
E80T	254,02±0,22 <sup>c</sup>	1,27±0,00 <sup>d</sup>	0,65±0,01 <sup>c</sup>	0,70±0,04 <sup>b</sup>	2,59±0,06 <sup>a</sup>	7,61±0,29 <sup>a</sup>	5,61±0,44 <sup>c</sup>
E60T	211,97±0,16 <sup>d</sup>	1,08±0,01 <sup>bc</sup>	0,52±0,01 <sup>d</sup>	0,59±0,00 <sup>c</sup>	1,96±0,01 <sup>bc</sup>	6,80±0,43 <sup>b</sup>	5,27±0,32 <sup>cd</sup>
EM	207,32±0,17 <sup>e</sup>	0,99±0,05 <sup>ab</sup>	1,29±0,01 <sup>e</sup>	1,81±0,02 <sup>d</sup>	8,03±0,55 <sup>d</sup>	1,43±0,04 <sup>c</sup>	1,59±0,06 <sup>e</sup>
EU	195,31±1,02 <sup>f</sup>	0,51±0,02 <sup>e</sup>	1,38±0,01 <sup>f</sup>	1,82±0,03 <sup>d</sup>	9,01±0,69 <sup>e</sup>	2,28±0,01 <sup>d</sup>	1,85±0,06 <sup>e</sup>
MM	223,16±1,00 <sup>g</sup>	0,71±0,04 <sup>f</sup>	0,55±0,00 <sup>d</sup>	0,52±0,00 <sup>e</sup>	2,16±0,08 <sup>abc</sup>	2,48±0,04 <sup>d</sup>	1,90±0,03 <sup>e</sup>
MU	229,25±0,55 <sup>a</sup>	0,55±0,01 <sup>e</sup>	1,15±0,03 <sup>g</sup>	0,93±0,03 <sup>f</sup>	4,03±0,16 <sup>f</sup>	6,07±0,56 <sup>e</sup>	5,66±0,32 <sup>d</sup>
M80M	212,27±0,99 <sup>d</sup>	1,11±0,02 <sup>c</sup>	0,83±0,04 <sup>h</sup>	0,71±0,01 <sup>b</sup>	1,97±0,01 <sup>bc</sup>	3,80±0,22 <sup>f</sup>	4,51±0,32 <sup>f</sup>
M80U	207,16±0,80 <sup>e</sup>	0,71±0,03 <sup>f</sup>	0,71±0,01 <sup>i</sup>	0,63±0,01 <sup>g</sup>	2,40±0,05 <sup>ac</sup>	5,39±0,43 <sup>g</sup>	4,84±0,22 <sup>cf</sup>

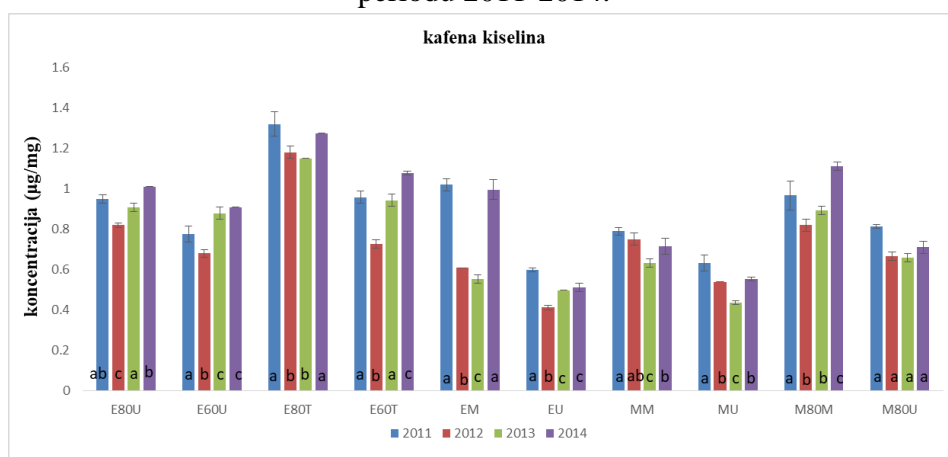
Rk – ruzmarinska kiselina; Kk – kafena kiselina; Lu – luteolin; Ap – apigenin; Sa – salvigenin; LuG – luteolin-7-O-glukozid; ApG – apigenin-7-O-glukozid

Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju jedinjenja između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).



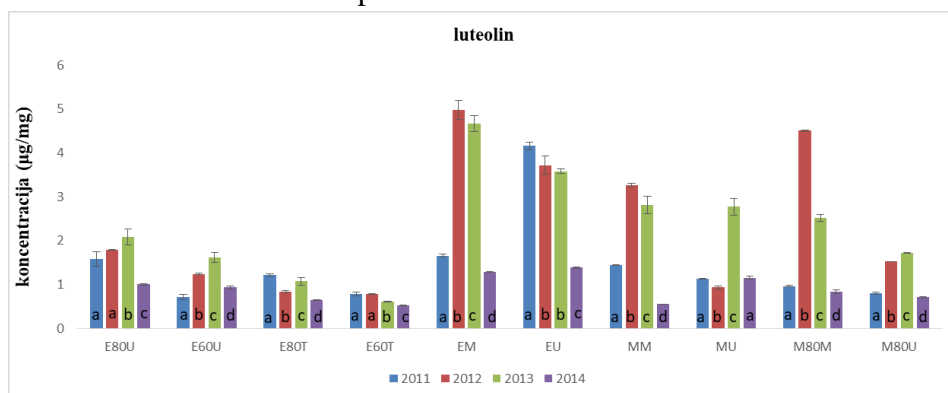
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju ruzmarinske kiseline u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.1.** Sadržaj ruzmarinske kiseline ( $\mu\text{g/mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



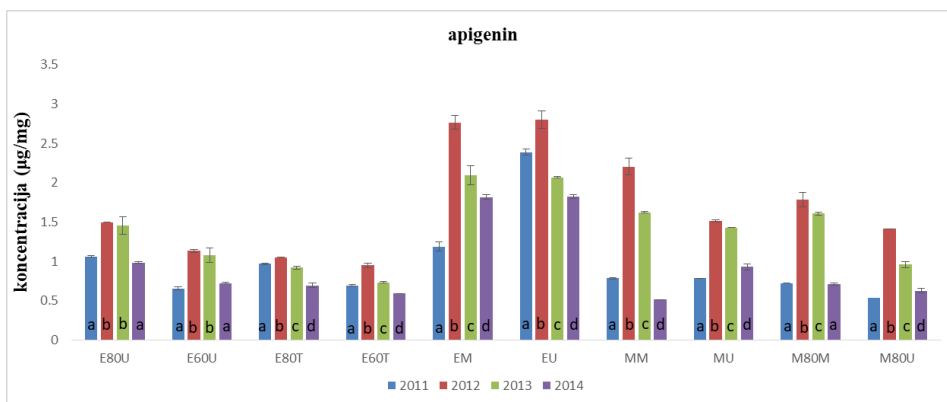
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju kafene kiseline u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.2.** Sadržaj kafene kiseline ( $\mu\text{g/mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



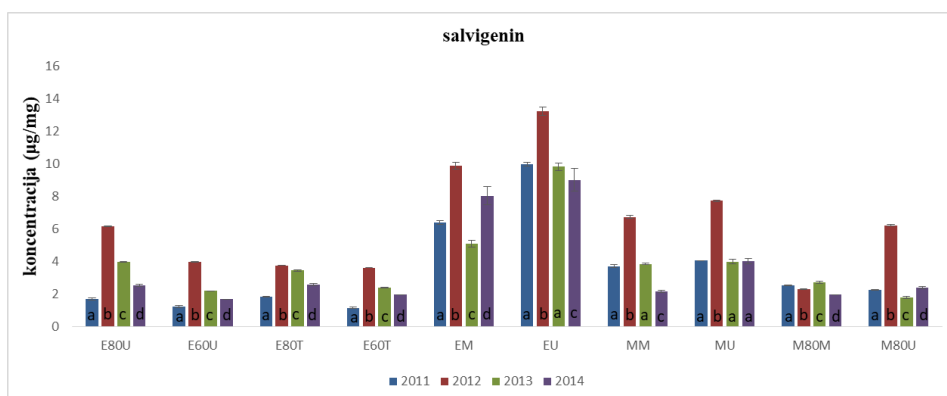
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju luteolina u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.3.** Sadržaj luteolina ( $\mu\text{g/mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



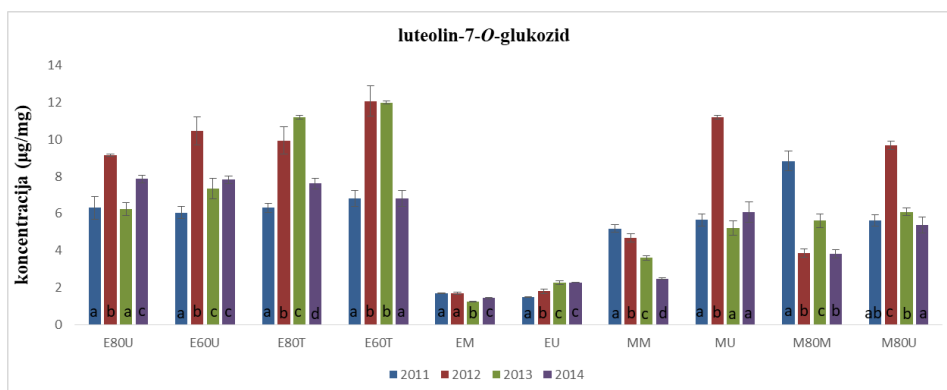
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju apigenina u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.4.** Sadržaj apigenina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



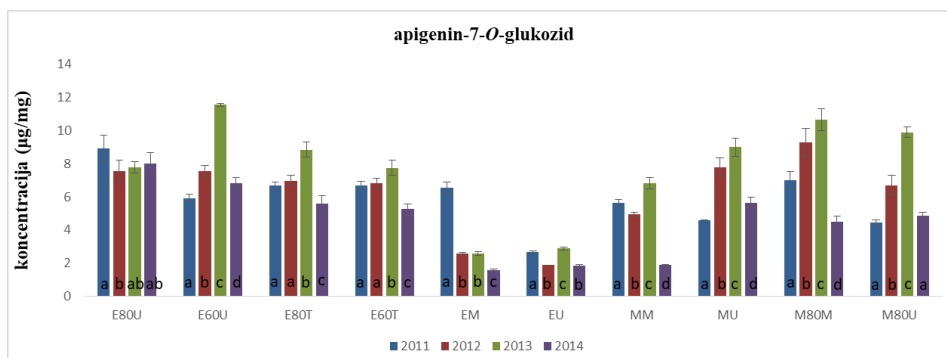
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju salvigenina u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.5.** Sadržaj salvigenina ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



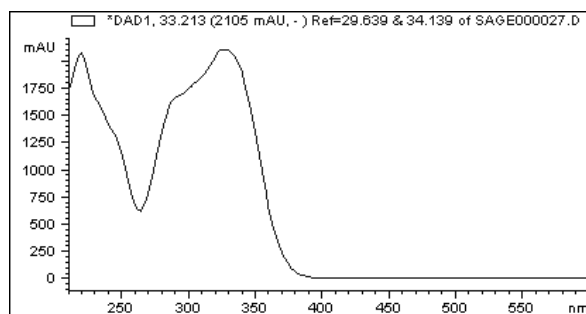
Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju luteolin-7-O-glukoizida u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

**Slika 4.7.6.** Sadržaj luteolin-7-O-glukoizida ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.

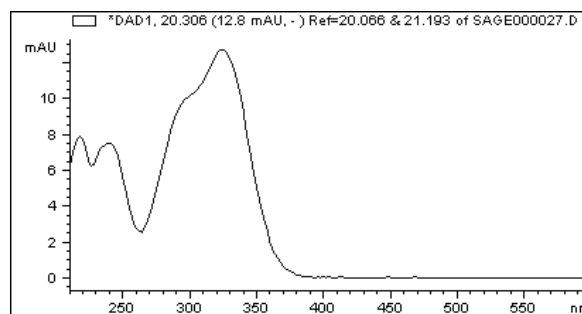


Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita slova u stubovima označavaju statistički značajnu razliku u sadržaju apigenin-7-O-glukozida u istim ekstraktima između godina (2011-2014) (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

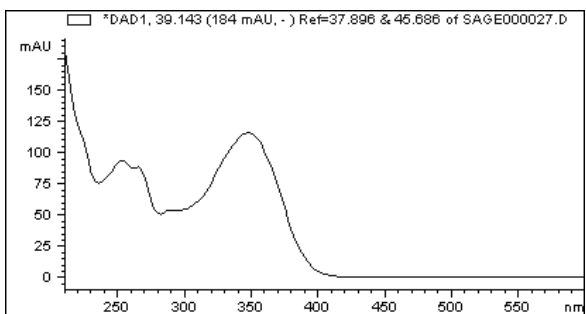
**Slika 4.7.7.** Sadržaj apigenin-7-O-glukozida ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) u ekstraktima *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014.



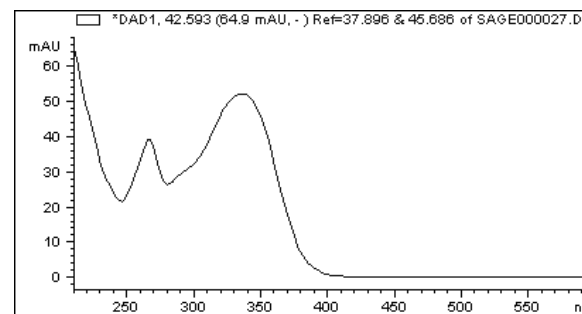
**Slika 4.7.8.** UV/Vis spektar ruzmarinske kiseline



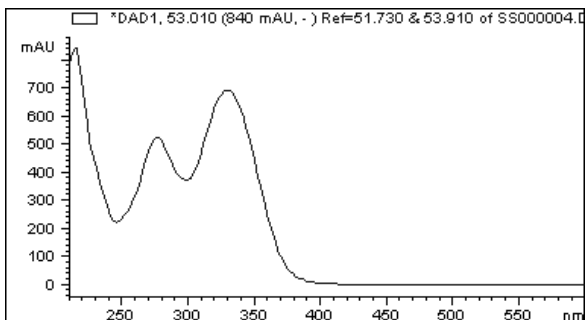
**Slika 4.7.9.** UV/Vis spektar kafene kiseline



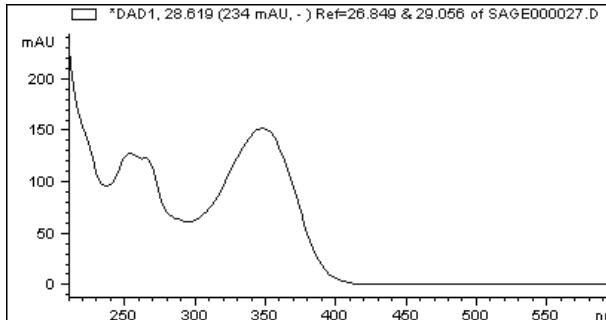
**Slika 4.7.10.** UV/Vis spektar luteolina



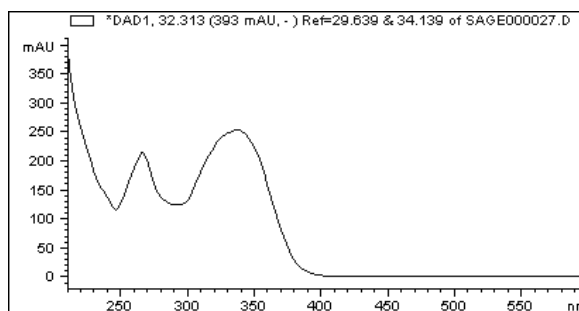
**Slika 4.7.11.** UV/Vis spektar apigenina



**Slika 4.7.12.** UV/Vis spektar salvigenina



**Slika 4.7.13.** UV/Vis spektar luteolin-7-O-gluk.



Slika 4.7.14. UV/Vis spektar apigenin-7-*O*-gluk.

#### 4.8. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

Antioksidativna aktivnost ekstrakata ispitivana je u dva *in vitro* test sistema, DPPH i  $\beta$ -karoten/linolna kiselina (BKL). Metodom DPPH procenjen je efekat "hvatanja" ili neutralizacije slobodnih radikala, dok je BKL metodom određena sposobnost inhibiranja obezbojavanja  $\beta$ -karotena odnosno antilipoperoksidna aktivnost ekstrakata. U Tabelama 4.8.1. i 4.8.2. su prikazane vrednosti IC<sub>50</sub> ( $\mu$ g/ml) ekstrakata, koje su poređene sa vrednostima pozitivnih kontrola odnosno standarda (ruzmarinska kiselina, BHT, BHA, askorbinska kiselina i  $\alpha$ -tokoferol).

##### 4.8.1. Antioksidativna aktivnost ekstrakata u DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) sistemu

Ekstrakti muskatne žalfije su se pokazali efikasnim antiradikalnim agensima čiji je opseg inhibitornih koncentracija (IC<sub>50</sub>) varirao od 16,83 do 58,89  $\mu$ g/ml (Tabela 4.8.1). Ekstrakt sa najistaknutijom aktivnošću bio je MU iz 2012. godine sa najnižom IC<sub>50</sub> vrednošću od 16,83 $\pm$ 1,44  $\mu$ g/ml. Najmanje aktivni ekstrakti su bili EM i EU iz 2011. godine zbog visokih vrednosti inhibitornih koncentracija koje su premašivale 50  $\mu$ g/ml. Metanolni ekstrakti su generalno bili efikasniji od etanolnih u ispoljavanju antiradikalne aktivnosti čije su pojedine inhibitorne koncentracije iznosile i <20  $\mu$ g/ml. Među etanolnim ekstraktima jaču antioksidativnu aktivnost ispoljili su oni pripremljeni 80% etanolom, u odnosu na 60% i koncentrovani etanol, bez značajne razlike između primenjenih ekstrakcionih tehnika. S druge strane kod metanolnih ekstrakata je ultrazvučna ekstrakcija bila efikasnija u izolovanju antioksidativnih jedinjenja, sa sličnom efikasnošću apsolutnog i 80% metanola. Očekivano, korišćeni standardi su u DPPH testu imali izuzetne antioksidativne efekte sa inhibitornim koncentracijama nižim u odnosu na

ekstrakte. Izuzetak je bila aktivnost BHT-a čija je vrednost  $IC_{50}$  bila slična ili čak veća od pojedinih ekstrakata.

Povezanost DPPH inhibitornih koncentracija,  $IC_{50}$ , sa sadržajem određivanih individualnih fenolnih jedinjenja tj. grupa jedinjenja u ekstraktima je značajna kada je koeficijent korelacije visok i kada je negativnog smera. Veza između ukupnih fenola i ispoljene antioksidativne aktivnosti u DPPH sistemu je jaka i statistički je značajna ( $r=-0,558$ ;  $p<0,001$  kod fenola izraženi preko GAE i  $r=-0,526$ ;  $p<0,001$  kod fenola izraženi preko CE). Dobra povezanost sa ovom vrstom antioksidativne aktivnosti uočava se takođe i sa ukupnim derivatima hidroksicmetne kiseline ( $r=-0,522$ ;  $p<0,001$ ), i nešto slabije sa ukupnim flavonoidima ( $r=-0,388$ ;  $p<0,05$ ), i taninima ( $r=-0,404$ ;  $p<0,001$  kod tanina izraženi preko GAE i  $r=-0,368$ ;  $p<0,001$  kod tanina izraženi preko CE). Kada su u pitanju konkretna jedinjenja od značaja je spomenuti da je za ispoljavanje antiradikalske aktivnosti u visokom procentu odgovorna ruzmarinska kiselina ( $r=-0,836$ ;  $p<0,001$ ). Sa kafenom kiselinom je korelacija bila veoma niska, pa se ona ne povezuje značajno sa antiradikalnom aktivnošću. Luteolin- i apigenin-7-*O*-glukozid su u manjoj meri povezani sa DPPH antioksidativnom aktivnošću ( $r=-0,332$ ;  $p<0,05$  i  $r=-0,310$ ;  $p<0,05$ , redom), dok je sa aglikonima korelacija bila slična ali pozitivnog smera, pa se stoga može smatrati da oni nisu odgovorni za ispoljavanje ove aktivnosti.

#### 4.8.2. Antioksidativna aktivnost ekstrakata u $\beta$ -karoten/linolna kiselina sistemu

Ekstrakti su ispoljili i odlične efekte u inhibiciji stvaranja lipoperoksidu u BKL modelu (Tabela 4.8.2). Veliki broj uzoraka je pokazao efekte koji su čak jači u poređenju sa nekim korišćenim standardima (ruzmarinska i askorbinska kiselina) dok su standardi  $\alpha$ -tokoferol, BHT i BHA bili značajno efikasniji. Ekstrakt E60U iz 2011. godine je najjače inhibirao proces lipoperoksidacije sa vrednošću  $IC_{50}$  od  $10,61\pm 0,54$   $\mu\text{g/ml}$ . Među etanolnim ekstraktima EM i EU ekstrakti su se pokazali kao najslabiji, sa vrednostima  $IC_{50}$  od  $34,86\pm 1,11$  do  $66,62\pm 1,28$   $\mu\text{g/ml}$ . Ekstrakti koji su pripremljeni 60% etanolom se karakterišu značajno nižim vrednostima  $IC_{50}$  u odnosu na one izrađene sa 80% ukazujući na bolju antilipoperoksidnu efikasnost. Ove razlike se uočavaju kod obe korišćene ekstrakcione tehnike. Metanolni ekstrakti se takođe karakterišu dobrim antioksidativnim osobinama koje su uporedive sa E60 i E80 ekstraktima, u opsegu od  $12,53\pm 0,20$  do  $23,53\pm 1,69$   $\mu\text{g/ml}$ . Oba tipa metanolnih rastvarača i obe metode ekstrakcije su bile slične po efikasnosti.



Kod ovog tipa antioksidativne aktivnosti je povezanost inhibitornih koncentracija ekstrakata,  $IC_{50}$ , sa sadržajem određivanih individualnih jedinjenja tj. grupa jedinjenja značajna ukoliko je koeficijent korelacije visok, i kada je negativnog smera. Za antilipoperoksidnu aktivnost je značajna jaka povezanost sa sadržajem luteolin- i apigenin-7-*O*-glukozida ( $r=-0,540$ ;  $p<0,001$  i  $r=-0,601$ ;  $p<0,001$ ) i ukupnim fenolima izraženih preko GAE ( $r=-0,317$ ;  $p<0,05$ ). Sa ostalim jedinjenjima tj. grupama jedinjenja veza sa ovom aktivnošću nije bila značajna.

**Tabela 4.8.1.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. u 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) testu

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )*			
E80U	27,82±2,05 <sup>aA</sup>	27,70±0,40 <sup>aA</sup>	28,07±0,95 <sup>aA</sup>	29,22±1,03 <sup>aA</sup>
E60U	36,07±0,86 <sup>bA</sup>	40,73±0,59 <sup>bB</sup>	40,77±1,27 <sup>bB</sup>	35,36±2,55 <sup>bA</sup>
E80T	35,13±1,01 <sup>bA</sup>	32,77±1,75 <sup>cA</sup>	20,34±1,66 <sup>cB</sup>	22,38±1,98 <sup>cB</sup>
E60T	36,07±1,17 <sup>bA</sup>	35,71±2,56 <sup>dA</sup>	30,17±0,40 <sup>aB</sup>	32,01±0,47 <sup>dB</sup>
EM	58,89±2,42 <sup>cA</sup>	36,24±0,48 <sup>dB</sup>	45,17±0,55 <sup>dC</sup>	29,53±1,62 <sup>adD</sup>
EU	58,18±4,05 <sup>cA</sup>	41,05±0,31 <sup>bB</sup>	36,32±0,82 <sup>eC</sup>	27,00±0,64 <sup>adD</sup>
MM	31,57±0,96 <sup>dA</sup>	22,91±2,03 <sup>eB</sup>	35,45±0,73 <sup>eC</sup>	18,79±1,16 <sup>eD</sup>
MU	29,17±1,23 <sup>adA</sup>	16,83±1,44 <sup>fB</sup>	27,92±2,78 <sup>aA</sup>	19,34±1,94 <sup>eB</sup>
M80M	30,83±0,79 <sup>adA</sup>	28,08±2,08 <sup>aB</sup>	23,83±0,70 <sup>fC</sup>	22,60±0,89 <sup>cC</sup>
M80U	31,40±0,94 <sup>dA</sup>	24,08±1,99 <sup>eB</sup>	21,10±1,48 <sup>cC</sup>	20,25±1,09 <sup>ceC</sup>
RK	6,09±0,48*			
BHA	2,44±0,09*			
BHT	22,82±2,07 <sup>‡</sup>			
AK	4,74±0,34 <sup>†</sup>			
$\alpha$ -TOK	10,40±1,73 <sup>†</sup>			

\* $IC_{50}$  = koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% slobodnih DPPH radikala izraženih u  $\mu\text{g/ml}$ ; RK-ruzmarinska kiselina; BHA-butilhidroksianizol; BHT-butilhidroksitoluol; AK-askorbinska kiselina;  $\alpha$ -TOK-  $\alpha$ -tokoferol Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita mala slova (simboli) u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $IC_{50}$  vrednostima između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p<0,05$ ). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u  $IC_{50}$  vrednostima u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test,  $p<0,05$ ).

**Tabela 4.8.2.** Antioksidativna aktivnost ekstrakata *Salvia sclarea* L. sakupljane u periodu 2011-2014. u  $\beta$ -karoten/linolna kiselina (BKL) testu

EKSTRAKT	2011	2012	2013	2014
	IC <sub>50</sub> (µg/ml)*			
E80U	19,13±1,70 <sup>aA</sup>	23,76±0,06 <sup>aB</sup>	22,57±1,20 <sup>aB</sup>	21,89±0,84 <sup>aB</sup>
E60U	10,61±0,54 <sup>bA</sup>	13,50±1,09 <sup>bB</sup>	15,89±0,21 <sup>bcC</sup>	14,56±1,19 <sup>bBC</sup>
E80T	24,78±1,88 <sup>cAB</sup>	22,76±1,08 <sup>aA</sup>	18,84±0,56 <sup>dC</sup>	27,29±1,85 <sup>cB</sup>
E60T	13,36±0,00 <sup>dA</sup>	15,41±0,75 <sup>bB</sup>	14,94±0,35 <sup>bB</sup>	11,12±0,37 <sup>dC</sup>
EM	29,76±1,20 <sup>eA</sup>	66,00±2,22 <sup>cB</sup>	46,26±1,08 <sup>eC</sup>	37,62±0,91 <sup>eD</sup>
EU	34,86±1,11 <sup>fA</sup>	50,78±1,33 <sup>dB</sup>	31,76±1,03 <sup>fC</sup>	66,62±1,28 <sup>fD</sup>
MM	13,35±1,01 <sup>dA</sup>	18,15±1,08 <sup>eB</sup>	17,33±0,22 <sup>cB</sup>	16,81±0,69 <sup>gB</sup>
MU	20,90±0,98 <sup>agA</sup>	19,43±0,14 <sup>eB</sup>	16,02±0,85 <sup>bcC</sup>	15,56±0,15 <sup>bgC</sup>
M80M	21,79±0,88 <sup>gA</sup>	19,54±0,35 <sup>eB</sup>	15,41±1,27 <sup>bC</sup>	16,81±1,05 <sup>gC</sup>
M80U	14,57±0,62 <sup>dA</sup>	23,53±1,69 <sup>aB</sup>	14,72±0,78 <sup>bA</sup>	12,53±0,20 <sup>dC</sup>
RK	32,55±1,62*			
BHA	0,04±0,01‡			
BHT	0,03±0,00‡			
AK	22,95±1,52†			
$\alpha$ -TOK	0,15±0,00 <sup>§</sup>			

\*IC<sub>50</sub> = koncentracija ekstrakta koja inhibira 50% slobodnih DPPH radikala izraženih u µg/ml; RK-ruzmarinska kiselina; BHA-butilhidroksianizol; BHT-butilhidroksitoluen; AK-askorbinska kiselina;  $\alpha$ -TOK-  $\alpha$ -tokoferol Rezultati prikazuju srednju vrednosti tri merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita mala slova (simboli) u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u IC<sub>50</sub> vrednostima između ekstrakata u istoj godini sakupljanja biljnog materijala (Duncan test, p<0,05). Različita velika slova u redovima označavaju statistički značajnu razliku u IC<sub>50</sub> vrednostima u istim ekstraktima između različitih godina sakupljanja biljnog materijala (Duncan test, p<0,05).

#### 4.9. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

Ispitivanjem antimikrobne aktivnosti utvrđeno je da su ekstrakti muskatne žalfije varijabilne efikasnosti (Tabele 4.9.1-4.9.4). Gram (+) bakterije su bile osetljivije na delovanje ispitivanih ekstrakata u poređenju sa Gram (-). Za razliku od inhibitornih, baktericidne koncentracije svih ekstrakata uglavnom nisu bile značajne i iznosile su, sa par izuzetaka, 100 ili >100 mg/ml. Najznačajniji antibakterijski efekti ispoljeni su prema *S. aureus* kod koje se minimalna inhibitorna koncentracija kretala od 6,25 do 25 mg/ml, izuzev ekstrakata EM iz 2013. i 2014. godine (50 mg/ml) i E60U i E80T iz 2014. godine (100 mg/ml). Ekstrakt sa najistaknutijom aktivnošću prema ovoj bakteriji kao i prema ostalim mikroorganizmima je E60T

iz 2012. godine čija je MIC/MBC vrednost bila najniža (6,25/12,5 mg/ml). Na ostale Gram (+) bakterije ekstrakti su imali umerenu aktivnost i to prema *B. cereus* i *L. monocytogenes*, ali i slabu prema *E. faecalis*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes*. Ruzmarinska kiselina je ispoljila odlične antimikrobne efekte, značajno bolje u odnosu na ekstrakte. Gram (+) bakterije koje su se pokazale kao najsenzitivnije na delovanje ruzmarinske kiseline bile su *S. pneumoniae*, *E. faecalis* i *B. cereus* sa MIC vrednostima od 0,06 mg/ml. Ostale tri bakterije su bile takođe osetljive, ali su njihove MIC vrednosti bile četiri puta veće.

Ekstrakti muskatne žalfije su na Gram (-) bakterije imali prilično skromne efekte jer se MIC vrednosti nisu spuštale na nivo ispod 50 mg/ml, a kod ekstrakata iz 2014. godine čak ni ispod 100 mg/ml. Ekstrakti su najaktivnije delovali na *P. aeruginosa*, a najmanje su inhibirali rast *K. pneumoniae*. Ekstrakti iz 2011. su bili najaktivniji prema *E. aerogenes*, ekstrakti iz 2012. prema *E. coli* i *S. enteritidis*, a iz 2013. prema *P. mirabilis*. Ekstrakti EM i EU iz 2012. godine se ističu po svojoj antimikrobnoj efikasnosti jer su inhibirali rast pet od šest sojeva Gram (-) bakterija sa MIC vrednostima od 50 mg/ml, za razliku od ostalih koji su sprečili razvoj maksimalno do tri soja ovih mikroorganizama. Ruzmarinska kiselina je bila nešto manje aktivna prema Gram (-) bakterijama u odnosu na Gram (+). Najosetljivije Gram (-) bakterije na dejstvo ruzmarinske kiseline bile su *E. coli* i *S. enteritidis* sa MIC vrednostima od po 0,13 mg/ml. Nešto manje osetljive bile su *P. mirabilis* i *P. aeruginosa*, dok su najmanje bile osetljive bakterije *K. pneumoniae* i *E. aerogenes*. Baktericidne koncentracije ruzmarinske kiseline bile su veće od 1 mg/ml.

Efekti prema kandidi, kao predstavniku fungalnog soja, nisu bili značajni zbog visokih vrednosti MIC i MFC svih ekstrakata koje su iznosile 100 i/ili >100 mg/ml. Međutim ruzmarinska kiselina se pokazala jako dobrim antifungalnim sredstvom jer su vrednosti MIC/MFC iznosile 0,25/2,00 mg/ml (Tabela 4.9.5).

**Tabela 4.9.1.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata *Salvia sclarea* L. iz 2011. godine na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i kvasac

EKSTRAKTI - 2011		E80U	E60U	E80T	E60T	EM	EU	MM	MU	M80M	M80U	S
Bakterijski sojevi	Izvor	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (µg/ml)
<b>Gram (+)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Hlor.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	25/>100	12,5/>100	6,25/>100	6,25/100	25/>100	25/100	12,5/>100	6,25/>100	12,5/100	25/>100	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	9433	50/>100	50/>100	100/>100	50/100	50/>100	50/>100	100/>100	100/>100	50/>100	100/100	3,91/7,81
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6301	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,06/0,12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	50/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,25/0,49
<i>Bacillus cereus</i>	11778	50/>100	12,5/>100	12,5/>100	12,5/>100	25/>100	25/>100	25,0/>100	12,5/>100	12,5/>100	50/>100	7,81/15,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	50/>100	50/>100	12,5/100	25/100	25/>100	25/100	25,0/>100	25/>100	50/>100	50/>100	0,25/0,49
<b>Gram (-)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Str.</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	100/>100	100/>100	50/>100	100/>100	50/>100	50/>100	100/>100	50/>100	50/50	100/100	0,60/0,60
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	50/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/100	100/>100	0,30/0,30
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	50/100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/100	100/>100	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,16/0,16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	100/>100	100/>100	50/>100	100/>100	50/>100	50/>100	100/>100	50/>100	100/>100	100/>100	0,60/0,60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	50/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	0,30/0,30
<b>Fungalni soj</b>	<b>Izvor</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (µg/ml)</b>
<b>Kvasac</b>	<b>ATCC</b>											<b>Nis.</b>
<i>Candida albicans</i>	24433	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	3,91/7,81

S – standard; Hlor. – hloramfenikol; Str. – streptomycin; Nis. – nistatin

**Tabela 4.9.2.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata *Salvia sclarea* L. iz 2012. godine na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i kvasac

EKSTRAKTI - 2012		E80U	E60U	E80T	E60T	EM	EU	MM	MU	M80M	M80U	S
Bakterijski sojevi	Izvor	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (µg/ml)	MIC/MBC µg/ml
<b>Gram (+)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Hlor.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	12,5/>100	6,25/50	12,5/>100	6,25/12,5	6,25/100	12,5/100	12,5/>100	12,5/>100	6,25/100	6,25/100	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	9433	50/>100	50/>100	100/>100	50/100	50/100	50/100	>100/>100	>100/>100	50/100	>100/>100	3,91/7,81
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6301	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,06/0,12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	50/>100	50/>100	50/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	0,25/0,49
<i>Bacillus cereus</i>	11778	25/>100	12,5/>100	12,5/>100	12,5/>100	25/>100	25/>100	12,5/>100	6,25/100	12,5/>100	6,25/100	7,81/15,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	100/>100	50/100	25/100	25/100	25/>100	>100/>100	12,5/100	12,5/50	12,5/50	50/100	0,25/0,49
<b>Gram (-)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Str.</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	100/>100	50/100	50/>100	50/100	50/100	50/100	>100/>100	>100/>100	50/100	>100/>100	0,60/0,60
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	50/>100	50/100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	0,30/0,30
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/100	50/100	50/100	>100/>100	>100/>100	50/100	>100/>100	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	50/100	50/100	>100/>100	>100/>100	50/>100	>100/>100	0,16/0,16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	50/>100	>100/>100	>100/>100	100/100	>100/>100	0,60/0,60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	50/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,30/0,30
<b>Fungalni soj</b>	<b>Izvor</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (µg/ml)</b>
<b>Kvasac</b>	<b>ATCC</b>											<b>Nis.</b>
<i>Candida albicans</i>	24433	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	3,91/7,81

S – standard; Hlor. – hloramfenikol; Str. – streptomycin; Nis. – nistatin

**Tabela 4.9.3.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata *Salvia sclarea* L. iz 2013. godine na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i kvasac

EKSTRAKTI - 2013		E80U	E60U	E80T	E60T	EM	EU	MM	MU	M80M	M80U	S
Bakterijski sojevi	Izvor	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (µg/ml)
<b>Gram (+)</b>	ATCC											<b>Hlor.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	25/100	6,25/>100	6,25/>100	6,25/>100	50/100	12,5/100	25/>100	12,5/>100	12,5/100	25/>100	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	9433	>100/>100	50/100	>100/>100	50/100	50/>100	>100/>100	50/>100	50/>100	50/100	>100/>100	3,91/7,81
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6301	100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	50.0/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	0,06/0,12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	50/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	0,25/0,49
<i>Bacillus cereus</i>	11778	12,5/>100	12,5/>100	12,5/>100	6,25/100	25/100	12,5/100	12,5/100	50/>100	12,5/100	12,5/100	7,81/15,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	100/100	50/100	100/>100	100/>100	50/100	25/100	50/100	50/100	25/100	50/>100	0,25/0,49
<b>Gram (-)</b>	ATCC											<b>Str.</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	50/100	100/>100	50/>100	100/100	50/100	>100/>100	50/50	100/100	100/100	>100/>100	0,60/0,60
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	50/100	>100/>100	50/>100	100/>100	50/>100	>100/>100	0,30/0,30
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	50/100	>100/>100	>100/>100	100/100	100/>100	>100/>100	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	0,16/0,16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	0,60/0,60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	0,30/0,30
<b>Fungalni soj</b>	<b>Izvor</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (µg/ml)</b>
<b>Kvasac</b>	ATCC											<b>Nis.</b>
<i>Candida albicans</i>	24433	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	3,91/7,81

S – standard; Hlor. – hloramfenikol; Str. – streptomycin; Nis. – nistatin

**Tabela 4.9.4.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ekstrakata *Salvia sclarea* L. iz 2014. godine na bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i kvasac

EKSTRAKTI - 2014		E80U	E60U	E80T	E60T	EM	EU	MM	MU	M80M	M80U	S
Bakterijski sojevi	Izvor	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (mg/ml)	MIC/MBC (µg/ml)
<b>Gram (+)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Hlor.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	25/>100	100/>100	100/>100	6,25/25	50/>100	25/>100	25/>100	25/>100	6,25/25	25/>100	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	9433	>100/>100	>100/>100	50.0/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	3,91/7,81
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6301	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	0,06/0,12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	50.0/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	0,25/0,49
<i>Bacillus cereus</i>	11778	50/>100	50/>100	50/>100	6,25/>100	12,5/>100	25/>100	50/>100	50/>100	12,5/>100	100/>100	7,81/15,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	50/100	100/100	100/100	12,5/100	12,5/100	100/100	100/100	100/100	12,5/100	100/100	0,25/0,49
<b>Gram (-)</b>	<b>ATCC</b>											<b>Str.</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	100/100	>100/>100	100/100	100/100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	0,60/0,60
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	100/>100	>100/>100	100/>100	100/100	100/100	100/100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	0,30/0,30
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	0,16/0,16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	100/>100	>100/>100	100/>100	100/100	>100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	0,60/0,60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	100/>100	100/>100	0,30/0,30
<b>Fungalni soj</b>	<b>Izvor</b>	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (mg/ml)	MIC/MFC (µg/ml)
<b>Kvasac</b>	<b>ATCC</b>											<b>Nis.</b>
<i>Candida albicans</i>	24433	>100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	>100/>100	100/>100	>100/>100	>100/>100	3,91/7,81

S – standard; Hlor. – hloramfenikol; Str. – streptomycin; Nis. – nistatin

**Tabela 4.9.5.** Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne/fungicidne (MBC/MFC) koncentracije ruzmarinske kiseline na testirane bakterijske Gram (+) i Gram (-) sojeve i kvasac

	ruzmarinska kiselina		S
<b>Bakterijski sojevi</b>	<b>Izvor</b>	<b>MIC/MBC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MBC (µg/ml)</b>
<b>Gram (+)</b>	<b>ATCC</b>		<b>Hlor.</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	0,25/1,00	7,81/15,61
<i>Enterococcus faecalis</i>	9433	0,06/0,50	3,91/7,81
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	6301	0,06/0,25	0,06/0,12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	19615	0,25/2,00	0,25/0,49
<i>Bacillus cereus</i>	11778	0,06/2,00	7,81/15,61
<i>Listeria monocytogenes</i>	15313	0,25/0,50	0,25/0,49
<b>Gram (-)</b>	<b>ATCC</b>		<b>Str.</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	0,50/1,00	0,60/0,60
<i>Proteus mirabilis</i>	12453	0,25/2,00	0,30/0,30
<i>Salmonella enteritidis</i>	13076	0,13/1,00	0,30/0,30
<i>Escherichia coli</i>	8739	0,13/1,00	0,16/0,16
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	1,00/>2,00	0,60/0,60
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	1,00/2,00	0,30/0,30
<b>Fungalni soj</b>	<b>Izvor</b>	<b>MIC/MFC (mg/ml)</b>	<b>MIC/MFC (µg/ml)</b>
<b>Kvasac</b>	<b>ATCC</b>		<b>Nis.</b>
<i>Candida albicans</i>	24433	0,25/2,00	3,91/7,81

S – standard; Hlor. – hloramfenikol; Str. – streptomycin; Nis. – nistatin

#### 4.10. ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST ETANOLNOG ESKTRAKTA *Salvia sclarea* L.

##### 4.10.1. Efekti ekstrakta na histopatološke karakteristike parodontopatije kod pacova

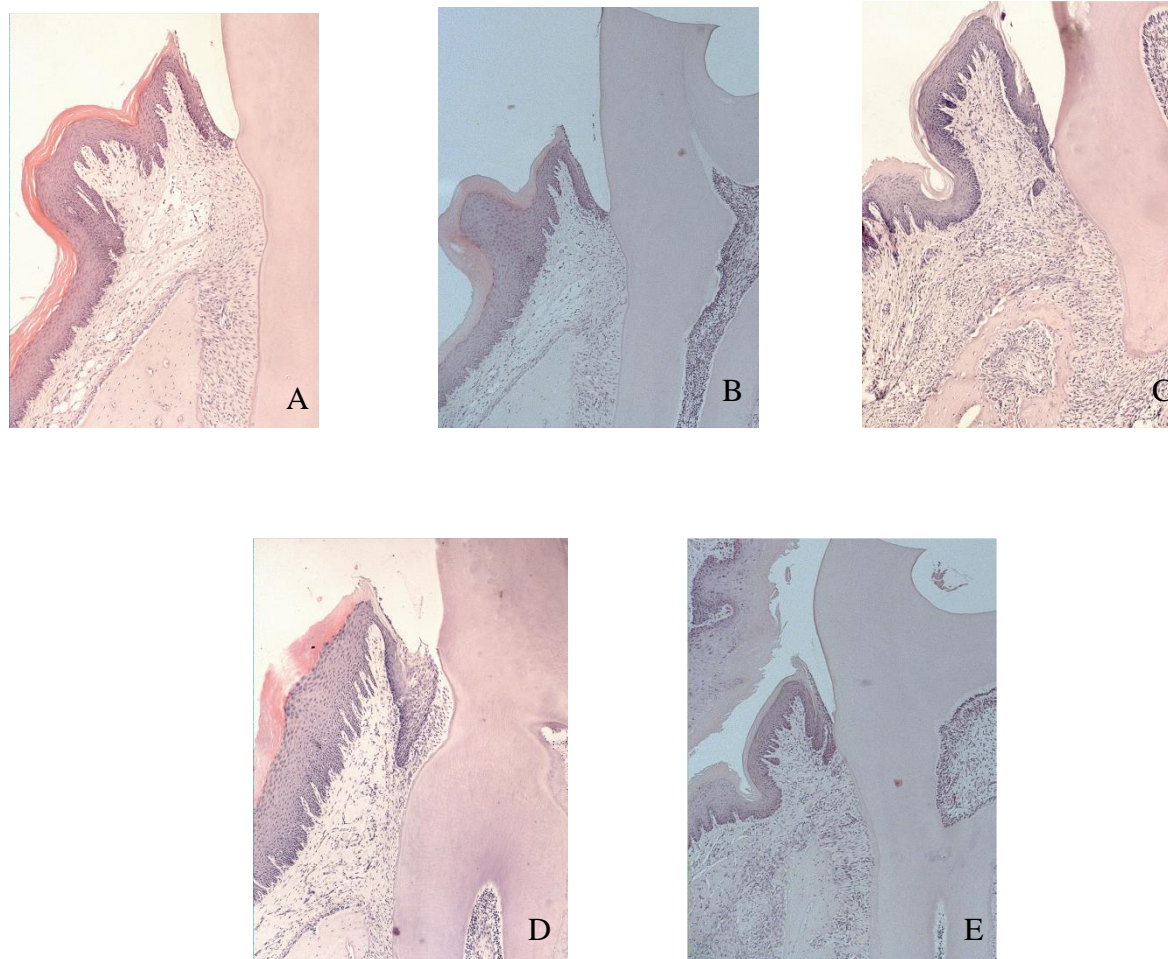
U I grupi pacova morfološke promene na hematoksilin-eozin (HE) preparatima nisu vidljive. Slika 4.10.1. A. prikazuje poprečni presek molara pacova sa očuvanom morfološkom strukturom tkiva pulpe zuba i periodontalnog ligamenta sa blagim porastom broja neutrofila, bez vidljivih promena u alveolarnoj kosti. Histološke karakteristike grupe II u potpunosti odgovaraju zdravom tkivu (Slika 4.10.1. B). U poređenju sa kontrolnim životinjama (I i II grupa),



histopatološka analiza životinja sa indukovanom parodontopatijom, koje su primale samo medijum (III grupa), pokazuje značajne promene na HE preparatima. Promene se karakterišu proširenjem krvnih sudova u tkivu parodontocijuma i povećanjem broja neutrofila i limfocita u gingivi. Uočena je i inflamacija koja je praćena resorpcijom alveolarne kosti sa vidljivim osteoklastima na površini kosti i povećanim prostorom koštane srži, obimnim produbljivanjem gingivalnog sulkusa i njegovim odvajanjem od zubnog cementa u pravcu korena zuba. Prisustvo eritrocita izvan krvnih sudova ukazuju na evidentno krvarenje (Slika 4.10.1. C). Kod eksperimentalnih grupa IV i V (Slika 4.10.1. D i E) gde su životinje podvrgnute efektima LPS-a i terapijom ekstraktom *S. sclarea*, uočava se mnogo manji broj inflamatornih ćelija u odnosu na treću grupu pacova. U periodoncijumu i gingivalnom tkivu primećuju se veći broj fibroblasta u poređenju sa drugim grupama životinja, dok je gingivalni sulkus u normalnom položaju. Znaci resorpcije kostiju nisu uočljivi.

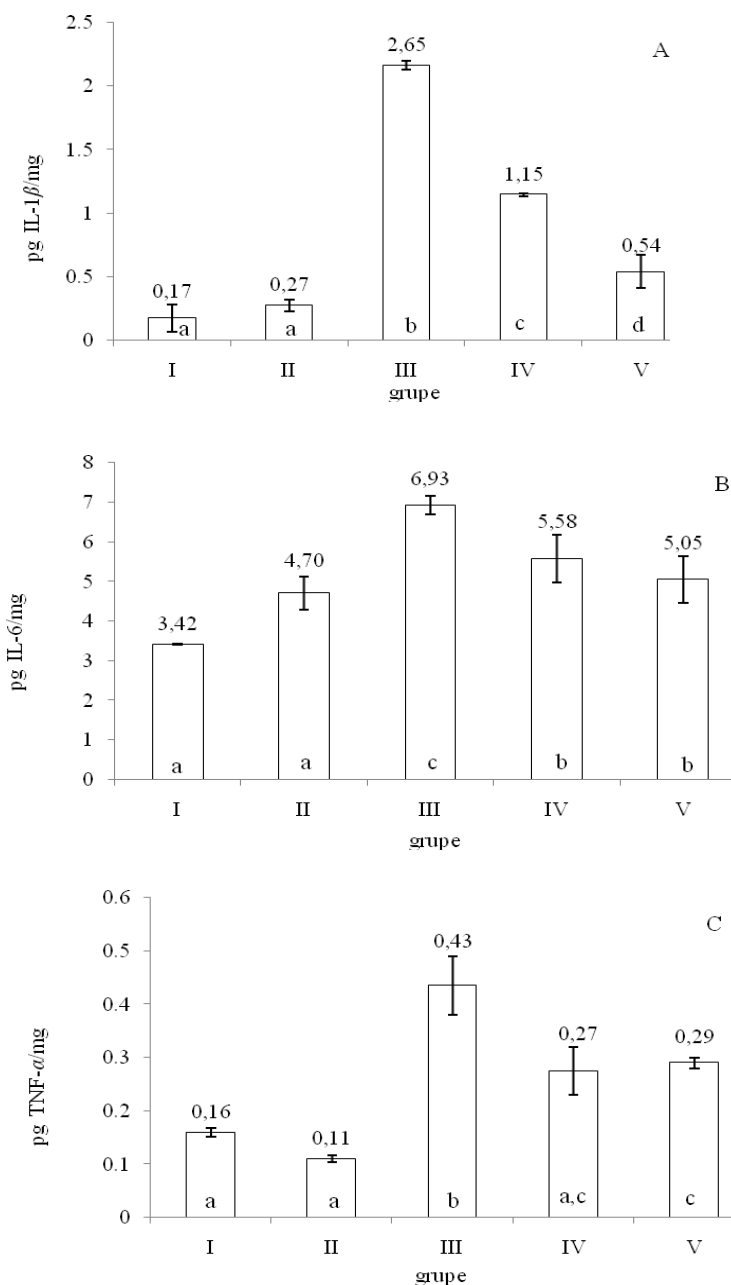
#### **4.10.2. Efekti ekstrakta na koncentraciju TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ i IL-6 u gingivalnom tkivu u indukovanoj parodontopatiji pacova**

*Per os* tretman etanolnim ekstraktom *S. sclarea* (IV i V grupa) značajno je smanjio nivoe TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-1 $\beta$  u gingivalnom tkivu pacova sa parodontopatijom u poređenju sa netretiranom grupom (III) (TNF- $\alpha$ : 0,27 i 0,29 vs 4,35 pg/mg; IL-6: 5,58 i 5,05 vs 6,93 pg/mg; i IL-1 $\beta$ : 1,15 i 0,54 vs 2,16 pg/mg;  $p < 0,05$ ). Nije postojala statistički značajna razlika u nivoima citokina između grupa koje nisu primile LPS (I i II). Preventivna administracija ekstrakta (V grupa) značajno je smanjila nivo IL-1 $\beta$  ( $p < 0,05$ ), ali ne IL-6 i TNF- $\alpha$ , u poređenju sa grupom čija je terapija započeta istog dana kada je injektovan LPS (IV) (Slika 4.10.2. A-C).



Poprečni presek molara i parodontijuma pacova (hematoksilin i eozin). Prvoj grupi pacova (I) je injektovan fiziološki rastvor i tretirana je destilovanom vodom (A); II grupa – pacovima je ubrizgavan fiziološki rastvor i tretirani su ekstraktom *S. sclarea* L. (B); III grupa – pacovima je injektiran LPS i tretirani su medijumom (C); IV grupa – pacovima je injektiran LPS i tretirani su ekstraktom (D); V grupa – pacovima je injektiran LPS, i tretirani su ekstraktom tri dana pre injektovanja LPS-a kao i tokom eksperimentalnog perioda (E). (A) i (B) Uočava se deo zubne pulpe (B) i cementa zuba sa periodontalnim ligamentom čije morfološke karakteristike odgovaraju normalnom tkivu. (C) U tkivu parodontijuma je uočljiv veći broj proširenih krvnih sudova, dok je u gingivi vidljiv povećan broj neutrofila i limfocita. U donjem desnom delu slike se uočava resorpcija alveolarne kosti sa vidljivim osteoklastima na površini kosti, produbljen gingivalni sulkusa, kao i njegovo odvajanje od zubnog cementa u pravcu korena zuba. (D) i (E) U poređenju sa prethodnim slikama, u periodoncijumu i gingivalnom tkivu primećuju se veći broj fibroblasta, manji broj leukocita, dok je gingivalni sulkus u normalnom položaju. Takođe, ne uočava se resorpcija kosti.

**Slika 4.10.1.** Histopatološki aspekt efekta etanolnog ekstrakta (E80U 2011) *Salvia sclarea* L. na lipopolisaharidom (LPS)-indukovanoj parodontopatiji pacova



Prvoj grupi pacova (I) je injektovan fiziološki rastvor i tretirana je destilovanom vodom (A); II grupa – pacovima je ubrizgavan fiziološki rastvor i tretirani su ekstraktom *S. sclarea* L. (B); III grupa – pacovima je injektiran LPS i tretirani su medijumom (C); IV grupa – pacovima je injektiran LPS i tretirani su ekstraktom (D); V grupa – pacovima je injektiran LPS, i tretirani su ekstraktom tri dana pre injektovanja LPS-a kao tokom eksperimentalnog perioda (E). Ekstrakt je značajno snizio vrednosti citokina (IV i V grupa) u poređenju sa netretiranom grupom životinja (III) ( $p < 0,05$ ). Vrednosti prikazuju srednju vrednost  $\pm$  standardnu devijaciju (N=6). Stubovi predstavljaju srednje vrednosti, a vertikalne linije standardne devijacije. Različita slova u stubovima pokazuju statistički značajnu razliku u nivou citokina između grupa ( $p < 0,05$ ; Duncan test).

**Slika 4.10.2.** Nivoi citokina IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B) i TNF- $\alpha$  (C) u gingivalnom tkivu pacova

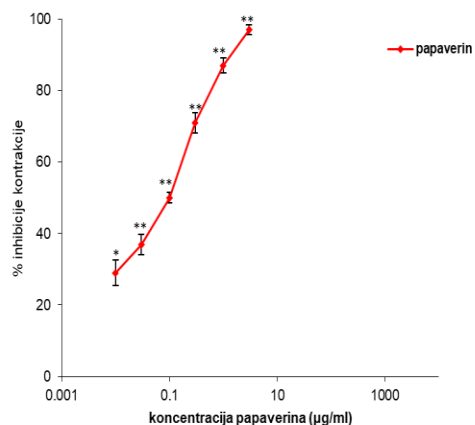
## 4.11. SPAZMOLITIČKI EFEKTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA IZOLOVANOM ILEUMU PACOVA

### 4.11.1. Efekti ekstrakata na spontane kontrakcije ileuma

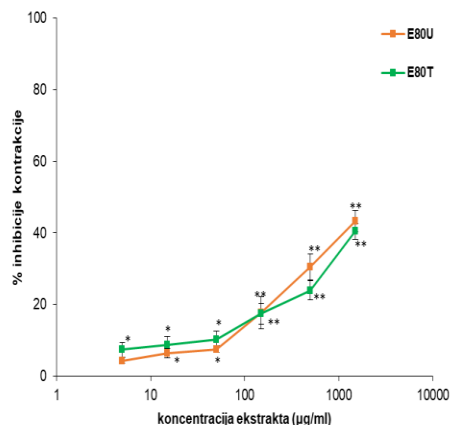
Ekstrakti muskatne žalfije su ispoljili značajnu dozno-zavisnu relaksaciju glatkih mišića ileuma *in vitro* tokom ispitivanja njihovog uticaja na spontane kontrakcije (0,005-1,5 mg/ml) (Slike 4.11.1-4.11.8). Ispitivani su svi ekstrakti iz početne 2011. godine, a takođe su upoređivani E80U ekstrakti kroz sve četiri godine sakupljanja biljnog materijala. Kako je ekstrakt E80U 2011 ispoljio najjaču antiradikalnu aktivnost među ekstraktima iz iste godine, on je dalje odabran i za ispitivanje spazmolitičkih efekata kroz godine (2011-2014). Iako su spazmolitički efekti ekstrakata bili značajni, ipak su u poređenju sa nespecifičnim miorelaksansom, papaverinom, bili slabijeg intenziteta. Papaverin je sa maksimalnom primenjenom koncentracijom od 0,003 mg/ml inhibisao 97% kontrakcija, dok su ekstrakti sa maksimalnom koncentracijom od 1,5 mg/ml redukovali kontrakcije u opsegu od  $20,13 \pm 1,02$  do  $51,16 \pm 2,56\%$ . Bolje efekte su ispoljili etanolni ekstrakti u poređenju sa metanolnim, a posebno se ističe ekstrakt EU 2011 sa  $EC_{50}$  vrednošću od  $1,33 \pm 0,09$  mg/ml. Maksimalna koncentracija ovog ekstrakta od 1,5 mg/ml inhibisala je spontane kontrakcije za  $51,16 \pm 2,56\%$ . Kod vodeno-etanolnih ekstrakata nešto jaču spazmolitičku aktivnost su pokazali oni koji su izrađeni ultrazvučnom tehnikom. Efikasnost metanolnih ekstrakata je bila značajno niža jer su inhibicije bile od 20,13 do 34,73%. Ekstrakt E80U iz 2011. godine je bio najaktivniji u odnosu na naredne tri godine sakupljanja (43,25% vs 25,75%, 34,27%, 30,85%, redom). Pirsonovim koeficijentima korelacije određena je mera zavisnosti ispitivanih jedinjenja iz ekstrakata *S. sclarea* i ispoljene spazmolitičke aktivnosti kod spontanih kontrakcija. Na ovaj tip spazmolitičke aktivnosti najveći uticaj imao je flavonoidni aglikon apigenin. Naime, najjača statistički značajna veza utvrđena je između apigenina i procenata inhibisanih kontrakcija gde je Pirsonov koeficijent iznosio  $r=0,693$  ( $p<0,05$ ).

U Tabeli 4.11.1. su prikazane  $EC_{50}$  vrednosti i maksimalne inhibicije kontrakcija svih ekstrakata muskatne žalfije iz 2011. godine, kao i E80U ekstrakata kroz period 2011-2014. godine. Takođe, na graficima (Slike 4.11.1-4.11.8) je prikazana dozna zavisnost spazmolitičke aktivnosti ispitivanih ekstrakata i papaverina.

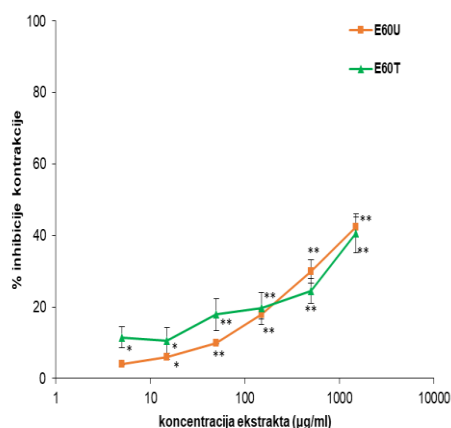
Spontane kontrakcije ileuma relaksirane su maksimalnom koncentracijom ruzmarinske kiseline od 0,3 mg/ml za  $27,01 \pm 3,94\%$ , pri čemu je  $EC_{50}$  vrednost iznosila  $0,58 \pm 0,01$  mg/ml (Slika 4.11.9).



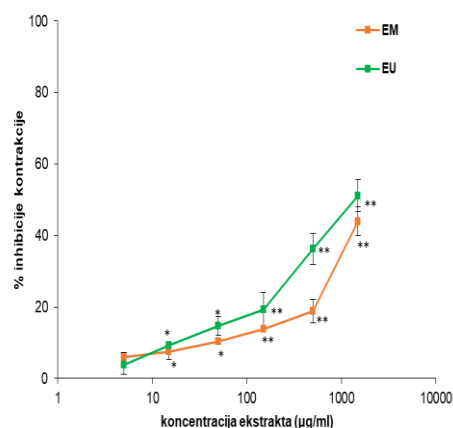
**Slika 4.11.1.** Relaksantni efekti papaverina na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



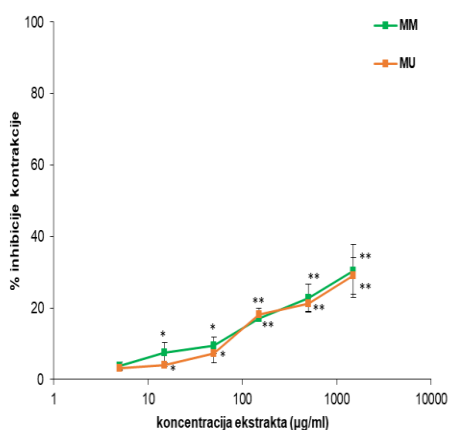
**Slika 4.11.2.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U i E80T na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



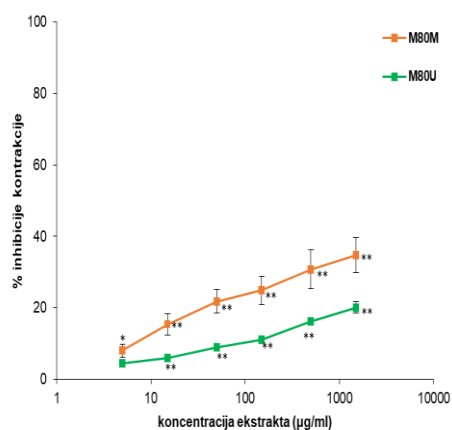
**Slika 4.11.3.** Relaksantni efekti ekstrakata E60U i E60T na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



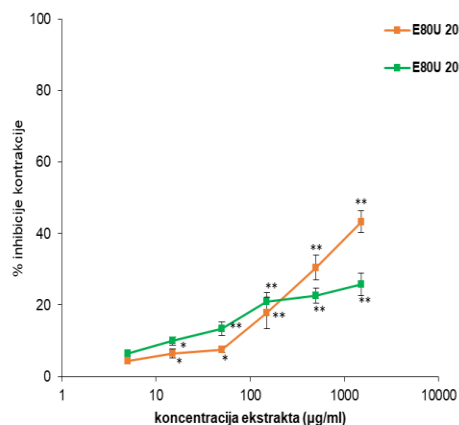
**Slika 4.11.4.** Relaksantni efekti ekstrakata EU i EM na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



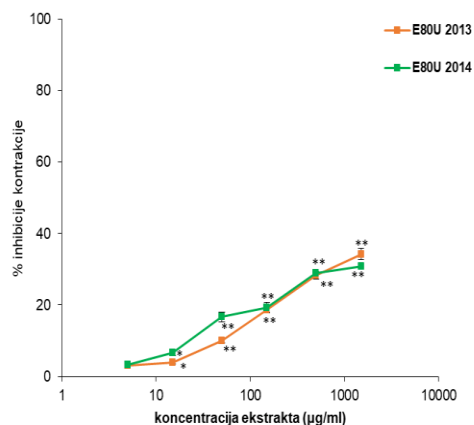
**Slika 4.11.5.** Relaksantni efekti ekstrakata MU i MM na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



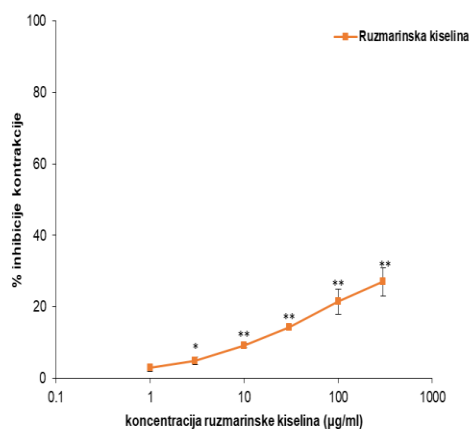
**Slika 4.11.6.** Relaksantni efekti ekstrakata M80U i M80M na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.7.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2011 i 2012 na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.8.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2013 i 2014 na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.9.** Relaksantni efekti ruzmarinske kiseline na spontane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

**Tabela 4.11.1.** Vrednosti efektivnih koncentracija (mg/ml) ekstrakata *Salvia sclarea* L. (A. ekstrakti iz 2011. i B. ekstrakti E80U iz 2011-2014) i odgovor maksimalne koncentracije ekstrakata (1,5 mg/ml) (%) na inhibiciju spontanijih kontrakcija ileuma pacova

A.	EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
	E80U	1,63±0,25 <sup>ab</sup>	43,25±2,50 <sup>a</sup>
	E60U	1,68±0,15 <sup>b</sup>	42,37±2,01 <sup>a</sup>
	E80T	1,89±0,12 <sup>b</sup>	40,45±2,06 <sup>a</sup>
	E60T	1,97±0,11 <sup>b</sup>	40,60±1,22 <sup>a</sup>
	EM	1,75±0,15 <sup>b</sup>	43,98±1,69 <sup>a</sup>
	EU	1,33±0,09 <sup>a</sup>	51,16±2,56 <sup>b</sup>
	MM	2,62±0,24 <sup>c</sup>	30,36±2,66 <sup>c</sup>
	MU	2,69±0,22 <sup>c</sup>	28,96±1,86 <sup>c</sup>
	M80M	2,44±0,10 <sup>c</sup>	34,73±1,20 <sup>d</sup>
	M80U	4,59±0,33 <sup>d</sup>	20,13±1,02 <sup>e</sup>

B.	EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
	E80U 2011	1,63±0,25 <sup>a</sup>	43,25±2,50 <sup>a</sup>
	E80U 2012	3,69±0,26 <sup>b</sup>	25,75±1,69 <sup>b</sup>
	E80U 2013	2,13±0,08 <sup>c</sup>	34,27±1,11 <sup>c</sup>
	E80U 2014	2,54±0,16 <sup>d</sup>	30,85±1,66 <sup>d</sup>

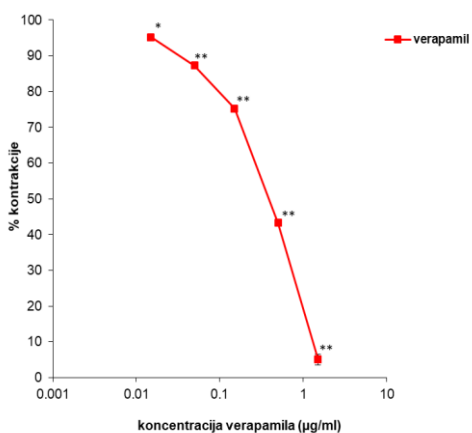
Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u EC<sub>50</sub> (mg/ml) vrednostima i odgovorima maksimalne koncentracije (%) (1,5 mg/ml) između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

#### 4.11.2. Efekti ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma

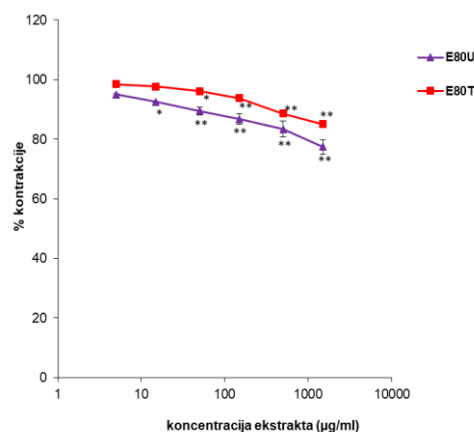
Kao i na spontane, ekstrakti su delovali inhibitoryno i na kontrakcije koje su indukovane primenom rastvora KCl (80 mM). Relaksacija glatke muskulature ileuma je bila dozno-zavisna, pri čemu su maksimalne koncentracije ekstrakata od 1,5 mg/ml smanjile indukovane kontrakcije na nivo od 85,26% do 48,75% (Tabela 4.11.2). Kao kontrola u ovom ispitivanju korišćen je verapamil koji je sa maksimalnom koncentracijom od 0,0015 mg/ml kontrakciju sveo na čak 5%. Ekstrakti izrađeni koncentrovanim etanolom, EM i EU, pokazali su najjaču inhibiciju sa EC<sub>50</sub> vrednostima 1,75±0,11 i 1,32±0,07 mg/ml, redom. Među vodeno-etanolnim ekstraktima E60U i E60T su ispoljili značajnije efekte u poređenju sa E80U i E80T, pri čemu su ekstrakti izrađeni ultrazvučnom metodom bili aktivniji. Efikasnost metanolnih ekstrakata je bila slična etanolnim. Ekstrakt E80U iz 2013. i 2014. godine su bili značajno aktivniji u odnosu na prethodne dve godine sakupljanja. Pirsonovim koeficijentima korelacije je utvrđeno da su na ovaj tip spazmolitičke aktivnosti u najvećoj meri, takođe, uticali flavonski aglikoni, apigenin, luteolin i salvigenin, čineći ih najodgovornijim za ovaj tip efekata (r=-0,721, p<0,05; r=-0,695, p<0,05 i r=-0,723, p<0,05).

Tabelarno su prikazane  $EC_{50}$  vrednosti i maksimalne inhibicije kontrakcija svih ekstrakata muskatne žalfije iz 2011. godine, kao i E80U kroz period 2011-2014. godine (Tabela 4.11.2). Graficima su predstavljene dozno-zavisne spazmolitičke aktivnosti svih ispitivanih ekstrakata i verapamila (Slike 4.11.10-4.11.17).

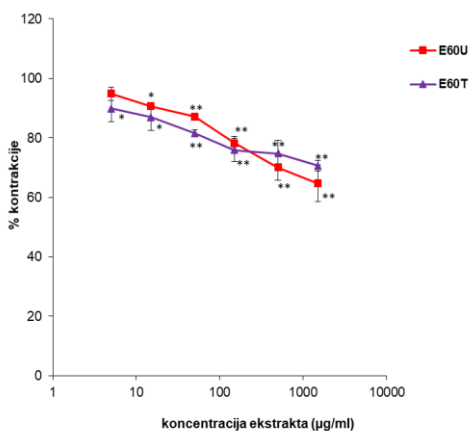
Ruzmarinska kiselina je značajno uticala na smanjenje kontrakcija ileuma nastale dodavanjem kalijum-hlorida. U maksimalnoj koncentraciji od 0,3 mg/ml kontrakcije su redukovane na  $49,86 \pm 3,32\%$ , dok je  $EC_{50}$  iznosila  $0,27 \pm 0,01$  mg/ml (Slika 4.11.18).



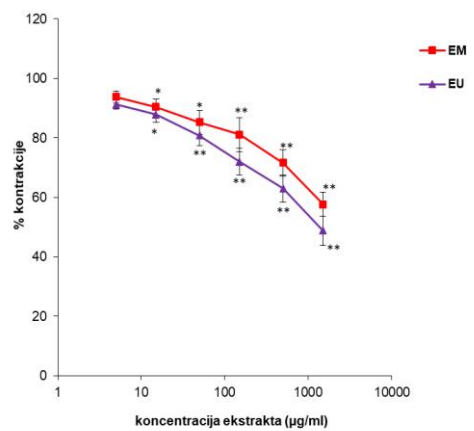
**Slika 4.11.10.** Relaksantni efekti verapamila na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.11.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U i E80T na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

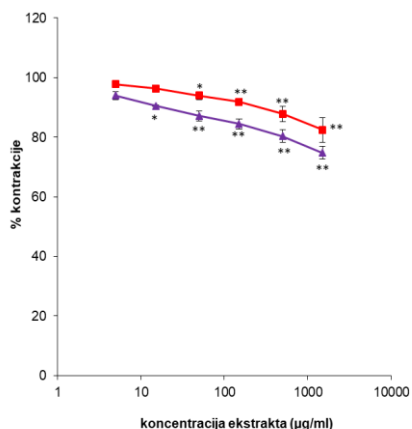


**Slika 4.11.12.** Relaksantni efekti ekstrakata E60U i E60T na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

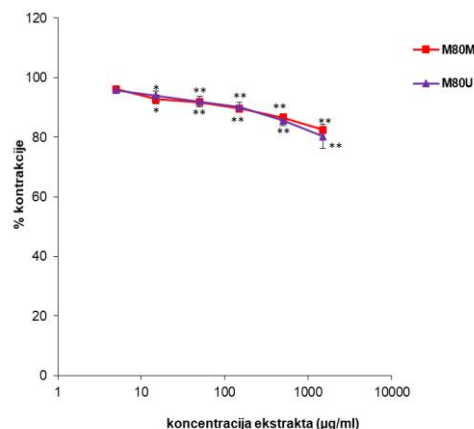


**Slika 4.11.13.** Relaksantni efekti ekstrakata EM i EU na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

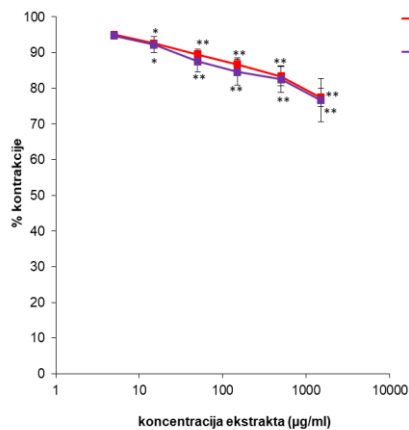




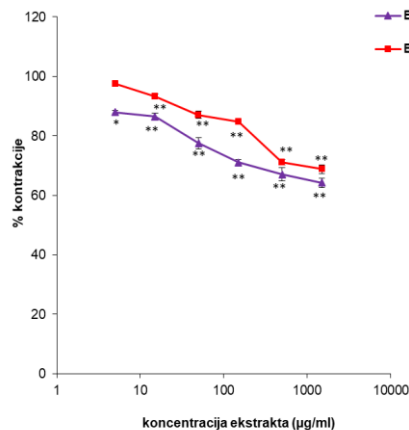
**Slika 4.11.14.** Relaksantni efekti ekstrakata MM i MU na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



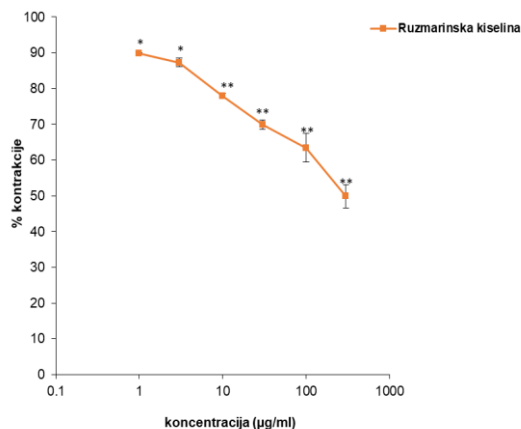
**Slika 4.11.15.** Relaksantni efekti ekstrakata M80M i M80U na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.16.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2011 i E80U 2012 na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.17.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2013 i E80U 2014 na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.18.** Relaksantni efekti ruzmarinske kiseline na KCl-indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

**Tabela 4.11.2.** Vrednosti efektivnih koncentracija (mg/ml) ekstrakata *Salvia sclarea* L. (A. ekstrakti iz 2011. i B. ekstrakti E80U iz 2011-2014) i odgovor maksimalne koncentracije ekstrakata (1,5 mg/ml) (%) kod kalijum-hloridom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

A.	EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
	E80U	4,15±0,26 <sup>a</sup>	77,40±3,22 <sup>ab</sup>
	E60U	2,15±0,18 <sup>b</sup>	64,68±2,10 <sup>c</sup>
	E80T	5,50±0,36 <sup>c</sup>	85,26±3,21 <sup>d</sup>
	E60T	3,39±0,23 <sup>d</sup>	70,63±2,96 <sup>e</sup>
	EM	1,75±0,11 <sup>bc</sup>	57,66±3,44 <sup>f</sup>
	EU	1,32±0,07 <sup>e</sup>	48,75±1,96 <sup>g</sup>
	MM	3,69±0,30 <sup>d</sup>	74,71±2,29 <sup>ae</sup>
	MU	4,90±0,33 <sup>f</sup>	82,42±3,22 <sup>bd</sup>
	M80M	5,76±0,34 <sup>c</sup>	82,43±3,56 <sup>bd</sup>
	M80U	4,63±0,26 <sup>f</sup>	80,20±3,44 <sup>bd</sup>

B.	EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
	E80U 2011	4,15±0,26 <sup>a</sup>	77,40±3,22 <sup>a</sup>
	E80U 2012	4,12±0,06 <sup>a</sup>	76,67±1,30 <sup>a</sup>
	E80U 2013	2,36±0,08 <sup>b</sup>	64,17±1,55 <sup>b</sup>
	E80U 2014	2,40±0,11 <sup>b</sup>	68,76±3,65 <sup>b</sup>

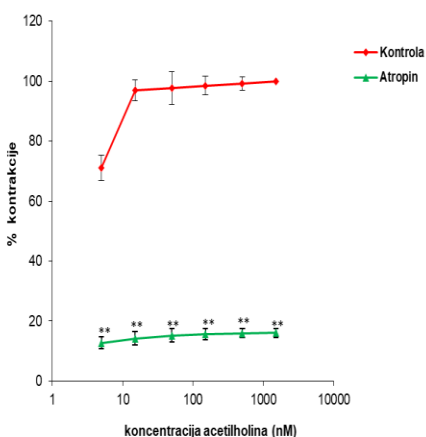
Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u EC<sub>50</sub> (mg/ml) vrednostima i odgovorima maksimalne koncentracije (%) (1,5 mg/ml) između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

### 4.11.3. Efekti ekstrakata na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma

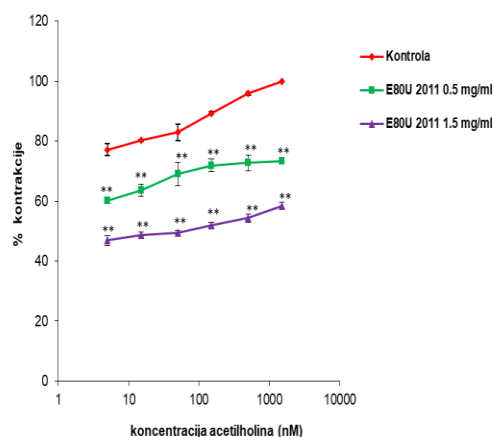
Ekstrakti muskatne žalfije su statistički značajno redukovale kontrakcije ileuma izazvane kumulativnim dozama rastvora acetilholina (5-1500 nM) modifikujući kontrolnu vrednost efektivne koncentracije, EC<sub>50</sub>, acetilholina (Tabela 4.11.3-4.11.5. i Slike 4.11.20-4.11.32). Povećavanje EC<sub>50</sub> vrednosti acetilholina (kontrola) dodavanjem ekstrakta u koncentracijama 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml označavalo je redukciju indukovanih kontrakcija. U ovoj seriji eksperimenata najbolje efekte su pokazali ekstrakti pripremljeni 60% etanolom. Ekstrakt E60U je modifikovao kontrolnu vrednost EC<sub>50</sub> acetilholina sa 1,08±0,01 nM na 3,54±0,01 nM, odnosno na 645,05±2,21 nM. Sto procenata kontrakcije nastale maksimalnom dozom acetilholina od 1500 nM smanjena je na 75,03±2,11% sa 0,5 mg/ml i 49,89±0,25% sa 1,5 mg/ml ovog ekstrakta. E60T je bio još efikasniji jer je kontrolna vrednost acetilholina od 1,05±0,06 nM bila povećana na 9,57±0,12 nM kao i na čak 3,08·10<sup>3</sup>±5,50 nM, približavajući se efektima atropina koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Kontrakcije nastale acetilholinom smanjene su dodatkom

0,5 mg/ml ekstrakta na  $61,50 \pm 5,74\%$ , a sa 1,5 mg/ml na  $33,62 \pm 0,43\%$ . Aktivnost ostalih etanolnih ekstrakata opadala je sledećim redom E80U>EU>EM>E80T (Tabela 4.11.3. i 4.11.6). Među metanolnim ekstraktima posebno se ističe ekstrakt M80U kod kog je kontrolna vrednost  $EC_{50}$  acetilholina ( $0,17 \pm 0,00$  nM) povećana duplo dodavanjem ekstrakta koncentracije 0,5 mg/ml ( $0,36 \pm 0,00$  nM) odnosno 350 puta ekstraktom koncentracije 1,5 mg/ml ( $62,15 \pm 3,22$  nM). Efekti ostalih metanolnih ekstrakata su bili značajno niži: M80M>MM>MU (Tabela 4.11.4. i 4.11.6). Pozitivna kontrola, atropin (140 nM), je maksimalnu kontrakciju ileuma (100%) svela na 16,02% (Slika 4.11.19). U Tabeli 4.11.6. su prikazani procenti inhibicije acetilholin-indukovanih kontrakcija sa koncentracijama ekstrakata od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml.

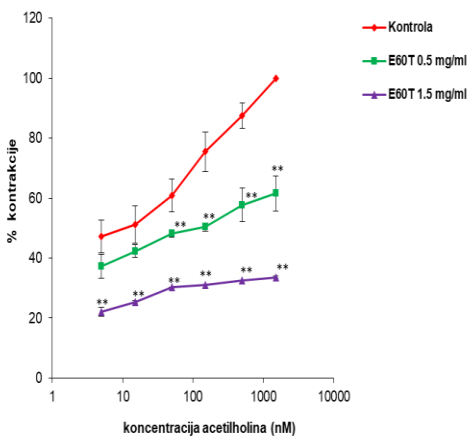
Ekstrakt E80U iz 2011. godine je ispoljio najjači spazmolitički efekat u poređenju sa ostalim godinama sakupljanja, a slede ga ekstrakt iz 2013, 2014, i 2012. godine (Tabela 4.11.5. i 4.11.6). Ovaj tip indukovanih kontrakcija je značajno redukovan aplikovanjem rastvora ruzmarinske kiseline.  $EC_{50}$  vrednost acetilholina je modifikovan sa 2,27 nM na 8,25 nM sa koncentracijom od 0,1 mg/ml i na 2480,59 nM sa 0,3 mg/ml ruzmarinske kiseline (Slika 4.11.33), dok su kontrakcije svedene na  $65,86 \pm 3,40\%$  odnosno na  $48,70 \pm 1,89\%$ .



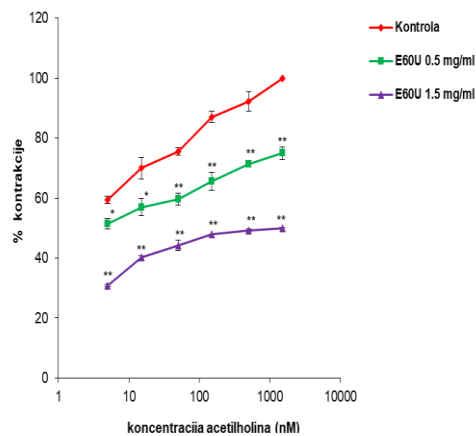
**Slika 4.11.19.** Inhibitorni efekti atropina na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \*\* $p < 0,01$ )



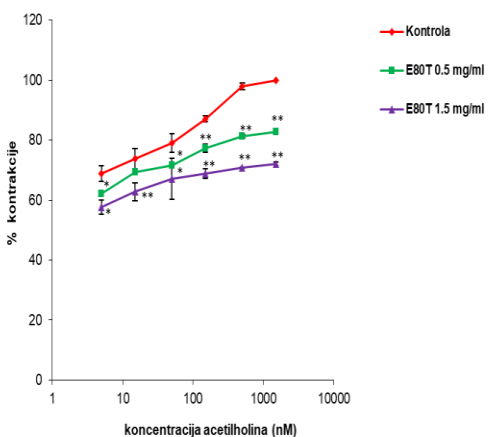
**Slika 4.11.20.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2011 na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \*\* $p < 0,01$ )



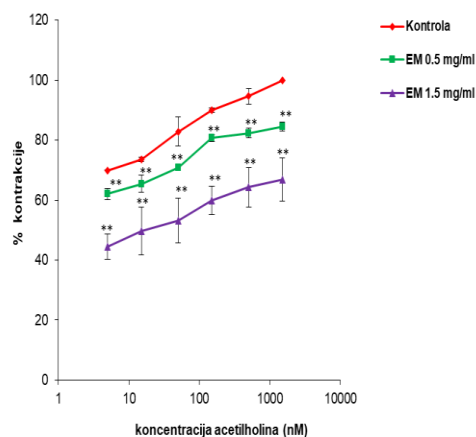
**Slika 4.11.21.** Inhibitorni efekti ekstrakata E60U na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



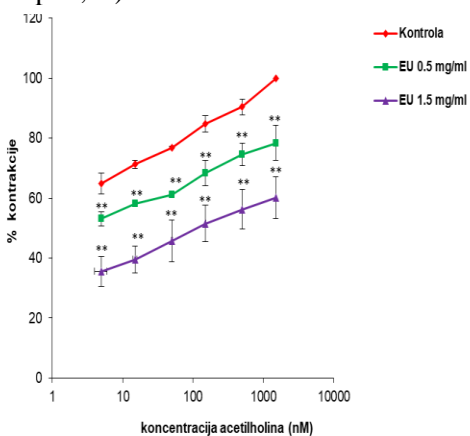
**Slika 4.11.22.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80T na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



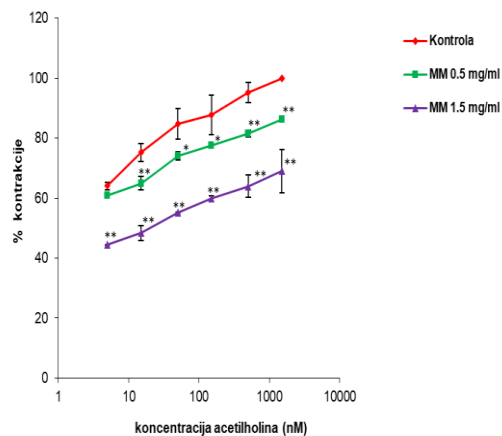
**Slika 4.11.23.** Inhibitorni efekti ekstrakata E60T na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



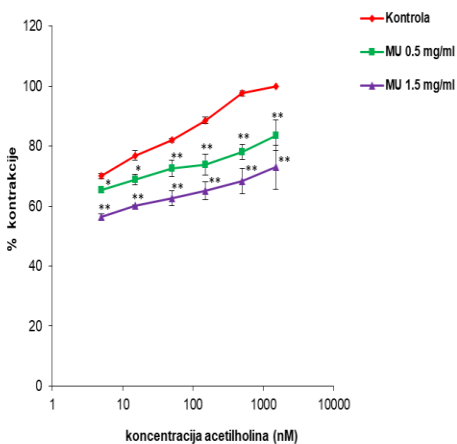
**Slika 4.11.24.** Inhibitorni efekti ekstrakata EM na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



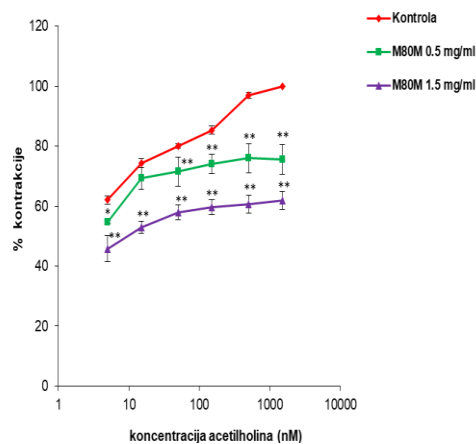
**Slika 4.11.25.** Inhibitorni efekti ekstrakata EU na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



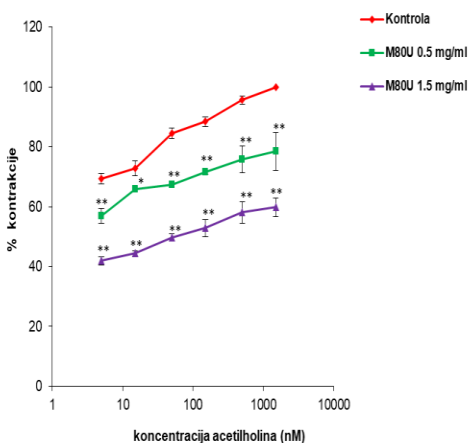
**Slika 4.11.26.** Inhibitorni efekti ekstrakata MM na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



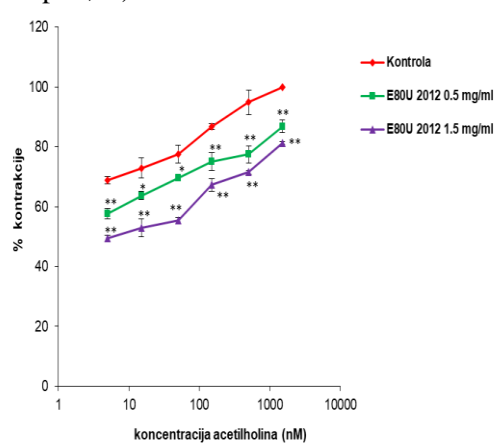
**Slika 4.11.27.** Inhibitorni efekti ekstrakata MU na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



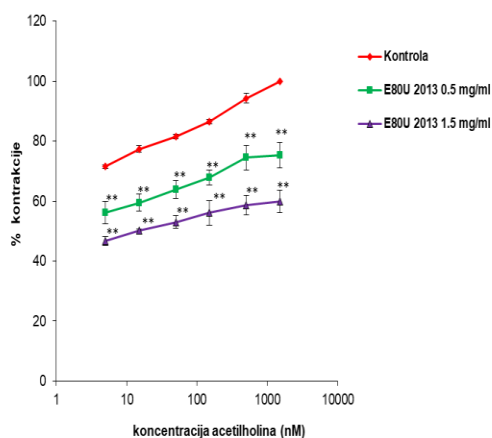
**Slika 4.11.28.** Inhibitorni efekti ekstrakata M80M na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



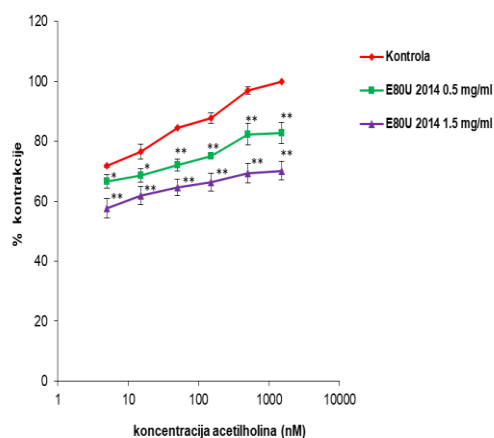
**Slika 4.11.29.** Inhibitorni efekti ekstrakata M80U na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



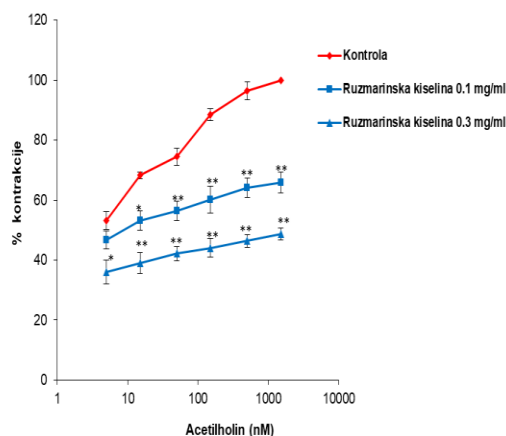
**Slika 4.11.30.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2012 na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.31.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2013 na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.32.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2014 na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.33.** Inhibitorni efekti ruzmarinske kiseline na acetilholinom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )

**Tabela 4.11.3.** Vrednosti  $EC_{50}$  acetilholina bez ekstrakta (kontrola) i vrednosti  $EC_{50}$  acetilholina dodatkom etanolnih ekstrakata *Salvia sclarea* L. u koncentracijama 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml kod acetilholinom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

EKSTRAKT	E80U	E60U	E80T	E60T	EM	EU
<b><math>EC_{50}</math> acetilholina (nM)</b>						
<b>Kontrola</b>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	1,08±0,01 <sup>a</sup>	0,09±0,00 <sup>a</sup>	1,05±0,06 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	0,46±0,01 <sup>a</sup>
<b>0,5 mg/ml</b>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	3,54±0,01 <sup>b</sup>	0,11±0,00 <sup>b</sup>	9,57±0,12 <sup>b</sup>	0,30±0,01 <sup>b</sup>	2,82±0,11 <sup>b</sup>
<b>1,5 mg/ml</b>	37,29±0,26 <sup>c</sup>	645,05±2,21 <sup>c</sup>	0,25±0,01 <sup>c</sup>	3,08·10 <sup>3</sup> ±5,50 <sup>c</sup>	17,71±0,47 <sup>c</sup>	4,88±0,53 <sup>c</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $EC_{50}$  (nM) vrednostima između kontrole i različitih koncentracija ekstrakta (Duncan test,  $p<0,05$ ).

**Tabela 4.11.4.** Vrednosti  $EC_{50}$  acetilholina bez ekstrakta (kontrola) i vrednosti  $EC_{50}$  acetilholina dodatkom metanolnih ekstrakata *Salvia sclarea* L. u koncentracijama 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml kod acetilholinom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

EKSTRAKT	MM	MU	M80M	M80U
<b><math>EC_{50}</math> acetilholina (nM)</b>				
<b>Kontrola</b>	0,29±0,01 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,17±0,00 <sup>a</sup>
<b>0,5 mg/ml</b>	0,40±0,01 <sup>b</sup>	0,12±0,00 <sup>b</sup>	0,15±0,00 <sup>b</sup>	0,36±0,00 <sup>b</sup>
<b>1,5 mg/ml</b>	18,21±0,65 <sup>c</sup>	0,47±0,01 <sup>c</sup>	7,25±0,22 <sup>c</sup>	62,15±3,22 <sup>c</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $EC_{50}$  (nM) vrednostima između kontrole i različitih koncentracija ekstrakta (Duncan test,  $p<0,05$ ).

**Tabela 4.11.5.** Vrednosti EC<sub>50</sub> acetilholina bez ekstrakta (kontrola) i vrednosti EC<sub>50</sub> acetilholina dodatkom E80U ekstrakata biljne vrste *Salvia sclarea* L., sakupljane u periodu 2011-2014, u koncentracijama 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml kod acetilholinom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

EKSTRAKT	E80U 2011	E80U 2012	E80U 2013	E80U 2014
<b>EC<sub>50</sub> acetilholina (nM)</b>				
<b>Kontrola</b>	0,01±0,00 <sup>a</sup>	0,26±0,00 <sup>a</sup>	0,07±0,00 <sup>a</sup>	0,03±0,00 <sup>a</sup>
<b>0,5 mg/ml</b>	0,04±0,00 <sup>b</sup>	0,92±0,01 <sup>b</sup>	0,98±0,01 <sup>b</sup>	0,07±0,00 <sup>b</sup>
<b>1,5 mg/ml</b>	37,29±0,98 <sup>c</sup>	8,72±0,21 <sup>c</sup>	14,83±0,56 <sup>c</sup>	0,09±0,01 <sup>c</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u EC<sub>50</sub> (nM) vrednostima između kontrole i različitih koncentracija ekstrakta (Duncan test, p<0,05).

**Tabela 4.11.6.** Vrednosti (%) inhibisanih maksimalnih kontrakcija (100%) dodatkom ekstrakata *Salvia sclarea* L. u koncentracijama od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml (A. ekstrakti iz 2011. i B. ekstrakti E80U iz 2011-2014) kod acetilholinom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

A.

EKSTRAKT	0,5 mg/ml	1,5 mg/ml
<b>%</b>		
<b>E80U</b>	73,38±0,67 <sup>a</sup>	58,33±1,27 <sup>a</sup>
<b>E60U</b>	75,03±2,11 <sup>a</sup>	49,89±0,25 <sup>b</sup>
<b>E80T</b>	82,85±0,03 <sup>bde</sup>	72,06±0,59 <sup>c</sup>
<b>E60T</b>	61,50±5,74 <sup>c</sup>	33,62±0,43 <sup>d</sup>
<b>EM</b>	84,44±1,47 <sup>de</sup>	66,93±1,21 <sup>ce</sup>
<b>EU</b>	78,38±5,84 <sup>abd</sup>	60,07±7,00 <sup>a</sup>
<b>MM</b>	86,23±0,94 <sup>e</sup>	68,99±1,25 <sup>c</sup>
<b>MU</b>	83,54±5,12 <sup>de</sup>	73,02±7,31 <sup>c</sup>
<b>M80M</b>	75,60±5,00 <sup>ab</sup>	61,78±3,00 <sup>ae</sup>
<b>M80U</b>	78,45±6,27 <sup>abd</sup>	59,78±3,10 <sup>a</sup>

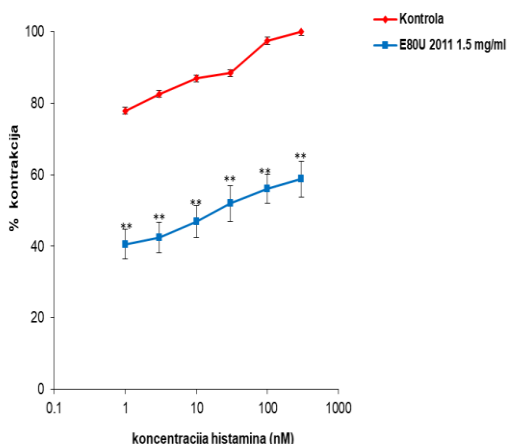
B.

EKSTRAKT	0,5 mg/ml	1,5 mg/ml
<b>%</b>		
<b>E80U 2011</b>	73,38±0,67 <sup>a</sup>	58,33±1,27 <sup>a</sup>
<b>E80U 2012</b>	86,84±2,02 <sup>b</sup>	81,21±0,46 <sup>b</sup>
<b>E80U 2013</b>	75,33±4,18 <sup>a</sup>	59,83±3,72 <sup>a</sup>
<b>E80U 2014</b>	82,73±3,52 <sup>b</sup>	70,19±3,05 <sup>c</sup>

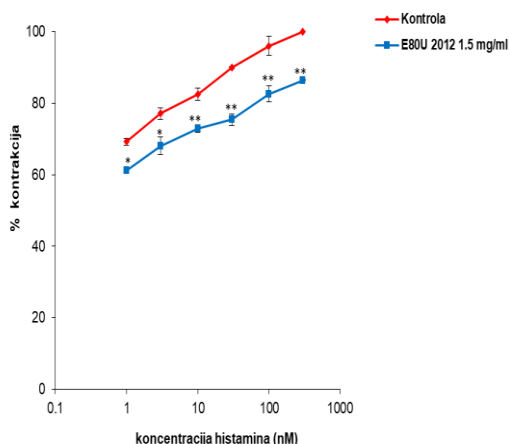
Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u procentima inhibisanih maksimalnih kontrakcija dodatkom ekstrakata u koncentraciji od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml (Duncan test, p<0,05).

#### 4.11.4. Efekti ekstrakata na histaminom indukovane kontrakcije ileuma

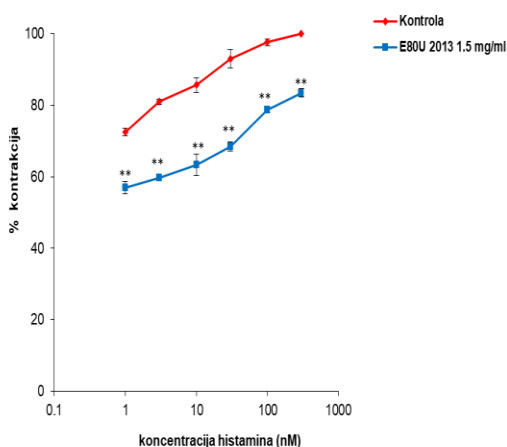
U ovoj seriji eksperimenata ispitivani su ekstrakti E80U iz sve četiri godine sakupljanja biljnog materijala, kao i ekstrakt EU iz 2011. godine koji je odabran zbog izuzetnih rezultata u inhibiciji spontanah i KCl-indukovanih kontrakcija ileuma pacova (Slike 4.11.34-4.11.38). Ekstrakt E80U 2011 (1,5 mg/ml) je u odnosu na ostale bio najefikasniji jer je modifikovao  $EC_{50}$  histamina sa  $8,13 \cdot 10^{-4} \pm 0,00$  nM na  $20,33 \pm 1,03$  nM (Tabela 4.11.7), pri čemu je 100% kontrakcija nastalih maksimalnom koncentracijom histamina od 300 nM smanjena na  $58,83 \pm 5,01\%$ . Ostali ekstrakti su bili niže efikasnosti tako da su maksimalne histamin-indukovane kontrakcije (100%) svedene na  $86,42 \pm 0,07\%$  za E80U 2012,  $83,47 \pm 1,25\%$  za E80U 2013,  $64,96 \pm 4,80\%$  za E80U 2014, i  $92,01 \pm 0,37\%$  za EU 2011.



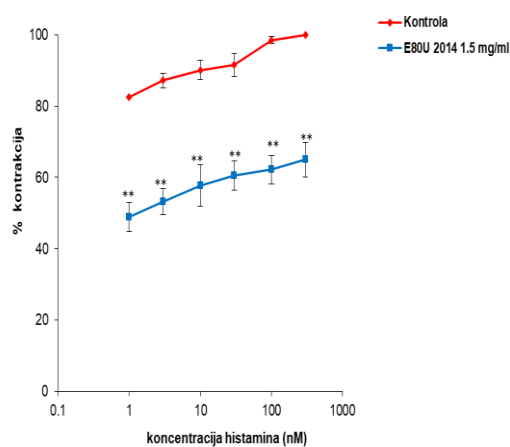
**Slika 4.11.34.** Inhibični efekti ekstrakata E80U 2011 na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.35.** Inhibični efekti ekstrakata E80U 2012 na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )

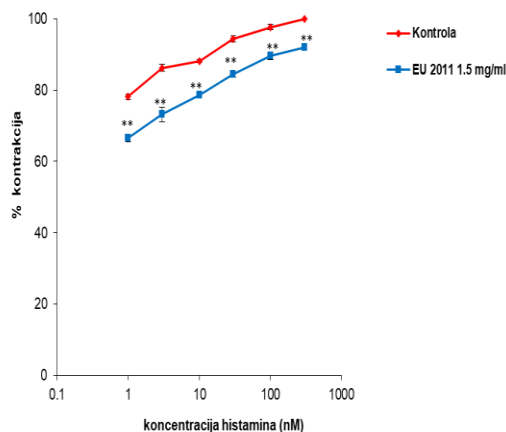


**Slika 4.11.36.** Inhibični efekti ekstrakata E80U 2013 na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.37.** Inhibični efekti ekstrakata E80U 2014 na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )





**Slika 4.11.38.** Inhibitorni efekti ekstrakata EU 2011 na histaminom indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p<0,01$ )

**Tabela 4.11.7.** Vrednosti  $EC_{50}$  histamina bez ekstrakta (kontrola) i  $EC_{50}$  histamina dodatkom ekstrakta *Salvia sclarea* L. (E80U 2011-2014 i EU 2011) u koncentraciji od 1,5 mg/ml, i vrednosti (%) inhibisanih maksimalnih kontrakcija (100%) kod histaminom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

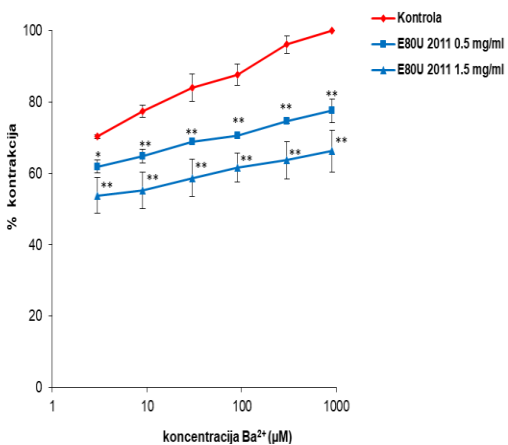
EKSTRAKT	E80U 2011	E80U 2012	E80U 2013	E80U 2014	EU 2011
<b><math>EC_{50}</math> histamina (nM)</b>					
<b>Kontrola</b>	$8,13 \cdot 10^{-4} \pm 0,00^a$	$2,40 \cdot 10^{-2} \pm 0,00^a$	$6,50 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^a$	$2,01 \cdot 10^{-5} \pm 0,00^a$	$2,18 \cdot 10^{-4} \pm 0,00^a$
<b>1,5 mg/ml</b>	$20,33 \pm 1,03^b$	$0,06 \pm 0,01^b$	$0,39 \pm 0,04^b$	$0,95 \pm 0,06^b$	$0,02 \pm 0,00^b$
<b>%</b>					
<b>1,5 mg/ml</b>	$58,83 \pm 5,01^A$	$86,42 \pm 0,07^B$	$83,47 \pm 1,25^B$	$64,96 \pm 4,80^C$	$92,01 \pm 0,37^{BD}$

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $EC_{50}$  (nM) vrednostima između kontrole i ekstrakta (Studentov t-test,  $p<0,05$ ). Velika slova u redu (%) označavaju statistički značajnu razliku smanjenja kontrakcija između različitih ekstrakata (Duncan test,  $p<0,05$ ).

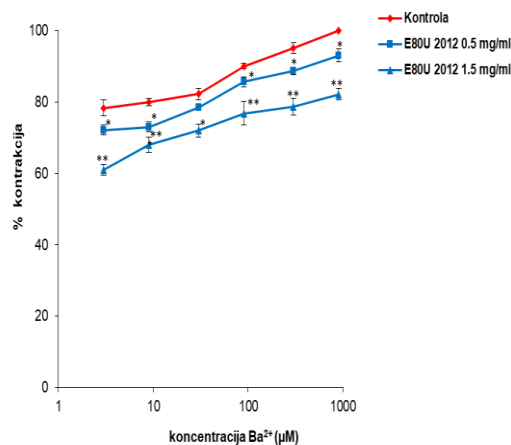
#### 4.11.5. Efekti ekstrakata na barijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma

Ekstrakt E80U 2011 je u ovom eksperimentu pokazao najbolje efekte jer je  $EC_{50}$  vrednost kontrolne serije rastvora  $BaCl_2$  najviše porasla, sa  $5,20 \cdot 10^{-5} \pm 0,00$  nM na  $0,66 \pm 0,04$  nM (12692 puta) (Tabela 4.11.8. i Slike 4.11.39-4.11.43). Maksimalne kontrakcije ileuma izazvane najvećom koncentracijom barijum-hlorida (900  $\mu$ M), ovaj ekstrakt je snizio na  $77,75 \pm 3,24\%$  (0,5 mg/ml), odnosno na  $66,23 \pm 5,86\%$  (1,5 mg/ml). Ostali ekstrakti su bili manje efikasnosti jer su maksimalne kontrakcije smanjene, sa koncentracijom od 1,5 mg/ml, na  $82,21 \pm 1,54\%$  kod

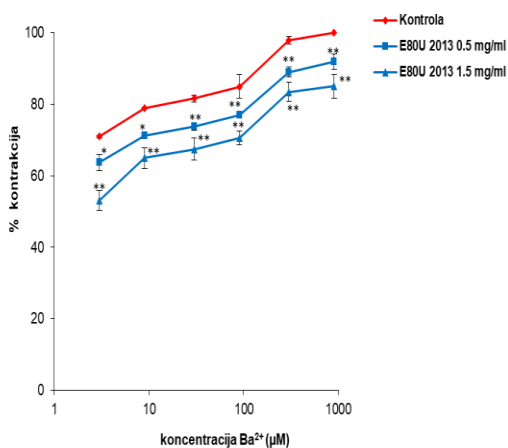
ekstrakta E80U 2012,  $85,00 \pm 3,29\%$  kod ekstrakta E80U 2013,  $91,05 \pm 0,63\%$  kod ekstrakta E80U 2014, i  $81,57 \pm 1,00\%$  kod EU 2011.



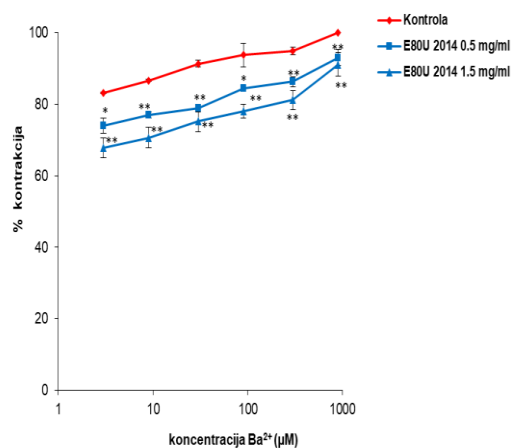
**Slika 4.11.39.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2011 na  $\text{BaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



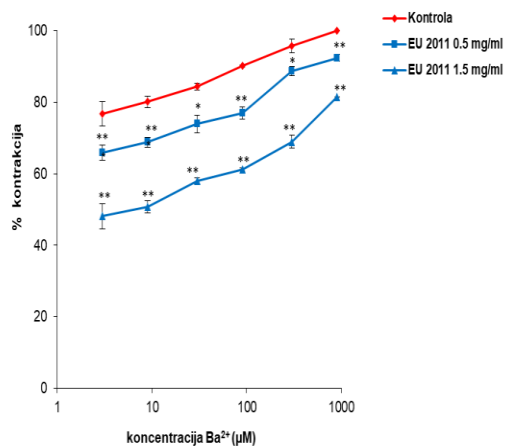
**Slika 4.11.40.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2012 na  $\text{BaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.41.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2013 na  $\text{BaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.42.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2014 na  $\text{BaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.43.** Inhibitorni efekti ekstrakata EU 2011 na  $\text{BaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

**Tabela 4.11.8.** Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  barijuma bez ekstrakta (kontrola) i  $\text{EC}_{50}$  barijuma dodatkom ekstrakata *Salvia sclarea* L. (E80U 2011-2014 i EU 2011) u koncentracijama od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml, i vrednosti (%) inhibisanih maksimalnih kontrakcija (100%) kod barijum-hloridom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

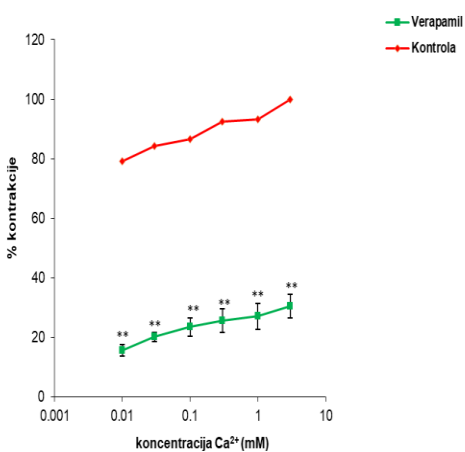
EKSTRAKT	E80U 2011	E80U 2012	E80U 2013	E80U 2014	EU 2011
<b><math>\text{EC}_{50}</math> barijuma (<math>\mu\text{M}</math>)</b>					
<b>Kontrola</b>	$5,20 \cdot 10^{-5} \pm 0,00^a$	$4,50 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^a$	$0,05 \pm 0,00^a$	$1,50 \cdot 10^{-5} \pm 0,00^a$	$6,41 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^a$
<b>0,5 mg/ml</b>	$0,04 \pm 0,00^b$	$0,02 \pm 0,00^b$	$0,18 \pm 0,01^b$	$2,20 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^b$	$0,17 \pm 0,01^b$
<b>1,5 mg/ml</b>	$0,66 \pm 0,04^c$	$0,08 \pm 0,01^c$	$1,14 \pm 0,02^c$	$3,5 \cdot 10^{-2} \pm 0,06^c$	$6,74 \pm 0,22^c$
<b>%</b>					
<b>0,5 mg/ml</b>	$77,75 \pm 3,24^A$	$93,08 \pm 1,73^B$	$91,91 \pm 2,16^B$	$93,08 \pm 1,41^B$	$92,39 \pm 0,92^B$
<b>1,5 mg/ml</b>	$66,23 \pm 5,86^A$	$82,21 \pm 1,54^B$	$85,00 \pm 3,29^B$	$91,05 \pm 0,63^C$	$81,57 \pm 1,00^B$

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) vrednostima između kontrole i različitih koncentracija ekstrakta (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Velika slova u redovima (%) označavaju statistički značajnu razliku smanjenja kontrakcija između različitih ekstrakata (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

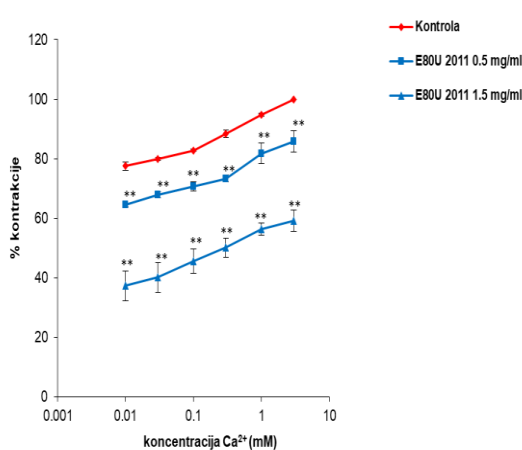
#### 4.11.6. Efekti ekstrakata na kalcijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma

Inhibicije kontrakcija ileuma nastale delovanjem jona kalcijuma (0,01-3 mM) praćene su kod ekstrakata E80U iz sve četiri godine, kao i ekstrakt EU 2011 (Slike 4.11.45-4.11.49). Ekstrakt koji je pokazao najbolje efekte je EU 2011 koji je modifikovao  $\text{EC}_{50}$  vrednost kalcijuma sa 0,03 mM na 1,42 mM. Sa ovim ekstraktom, u koncentraciji od 0,5 mg/ml, su maksimalne kontrakcije ileuma (100%) snižene na  $84,87 \pm 0,90\%$ , a sa 1,5 mg/ml na  $56,90 \pm 1,79\%$ . Odličnu

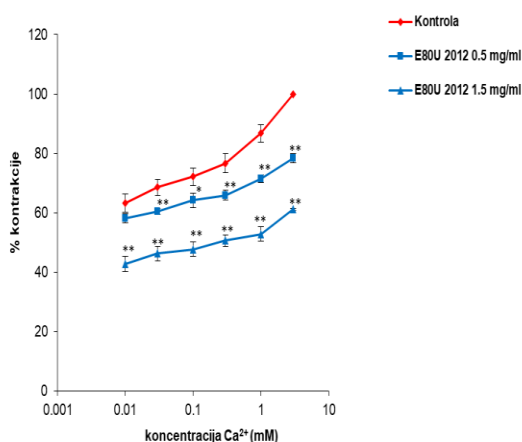
aktivnost ispoljio je i ekstrakt E80U 2011 kod kog je koncentracija od 1,5 mg/ml maksimalnu kontrakciju svela na  $59,14 \pm 3,05\%$ . Ostali E80U ekstrakti su ispoljili slabije relaksantne efekte, sledećim redom E80U 2012 > E80U 2014 > E80U 2013. Njihove inhibicije maksimalnih kontrakcija sa koncentracijom od 1,5 mg/ml bile su umanjene na vrednosti koje su prikazane u Tabeli 4.11.9. Verapamil, antagonist kalcijumovih kanala, je očekivano bio najbolji inhibitor kontrakcija izazvane rastvorom  $\text{CaCl}_2$  pri čemu su kontrakcije bile redukovane na  $30,54 \pm 3,92\%$  sa aplikovanom dozom od  $0,3 \mu\text{M}$  (Slika 4.11.44).



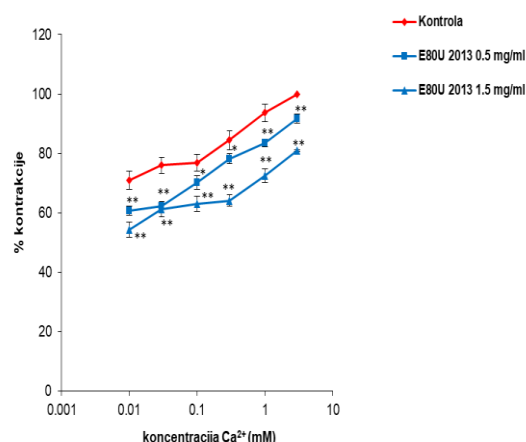
**Slika 4.11.44.** Inhibitorni efekti verapamila na kalcijum  $\text{CaCl}_2$ -kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



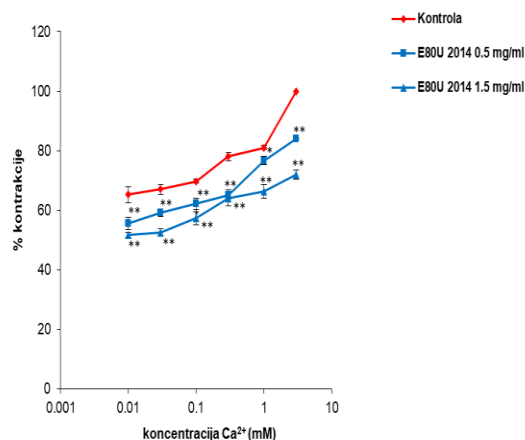
**Slika 4.11.45.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2011 na  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $**p < 0,01$ )



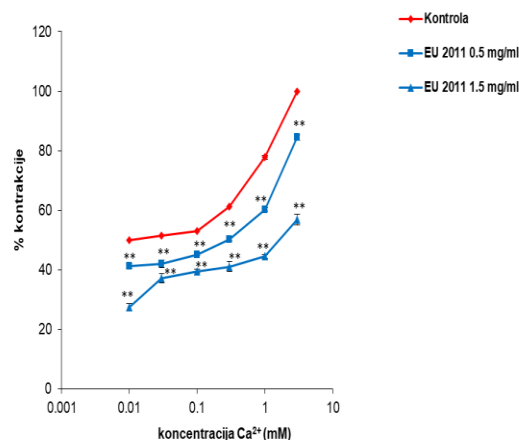
**Slika 4.11.46.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2012 na  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.47.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2013 na  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test,  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ )



**Slika 4.11.48.** Inhibitorni efekti ekstrakata E80U 2014 na  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



**Slika 4.11.49.** Inhibitorni efekti ekstrakata EU 2011 na  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije ileuma pacova (Studentov t-test, \*\* $p < 0,01$ )

**Tabela 4.11.9.** Vrednosti  $\text{EC}_{50}$  kalcijuma bez ekstrakta (kontrola) i  $\text{EC}_{50}$  kalcijuma dodatkom ekstrakata *Salvia sclarea* L. (E80U 2011-2014 i EU 2011) u koncentracijama od 0,5 mg/ml i 1,5 mg/ml, i vrednosti (%) inhibisanih maksimalnih kontrakcija (100%) kod kalcijum-hloridom indukovanih kontrakcija ileuma pacova

EKSTRAKT	E80U 2011	E80U 2012	E80U 2013	E80U 2014	EU 2011
<b><math>\text{EC}_{50}</math> kalcijuma (mM)</b>					
<b>Kontrola</b>	$1,70 \cdot 10^{-5} \pm 0,00^a$	$1,70 \cdot 10^{-4} \pm 0,00^a$	$2,40 \cdot 10^{-4} \pm 0,00^a$	$1,40 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,00^a$
<b>0,5 mg/ml</b>	$3,00 \cdot 10^{-4} \pm 0,00^b$	$1,30 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^b$	$2,30 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^b$	$5,20 \cdot 10^{-3} \pm 0,00^b$	$0,10 \pm 0,01^b$
<b>1,5 mg/ml</b>	$0,27 \pm 0,01^c$	$0,16 \pm 0,01^c$	$0,04 \pm 0,01^c$	$0,01 \pm 0,00^c$	$1,42 \pm 0,01^c$
%					
<b>0,5 mg/ml</b>	$85,88 \pm 3,60^A$	$78,32 \pm 1,50^B$	$91,65 \pm 1,68^C$	$84,01 \pm 0,35^A$	$84,47 \pm 0,90^A$
<b>1,5 mg/ml</b>	$59,14 \pm 3,05^A$	$61,12 \pm 0,29^A$	$80,92 \pm 3,30^B$	$71,94 \pm 1,63^C$	$56,90 \pm 1,79^A$

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja  $\pm$  standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $\text{EC}_{50}$  (mM) vrednostima između kontrole i različitih koncentracija ekstrakta (Duncan test,  $p < 0,05$ ). Različita velika slova u redovima (%) označavaju statistički značajnu razliku smanjenja kontrakcija između ekstrakata (Duncan test,  $p < 0,05$ ).

#### 4.11.7. Efekti ekstrakata na kontrakcije ileuma pacova indukovane blokatorom azot-oksida sinteze (L-NAME)

Kao i u prethodne tri serije eksperimenata, za ispitivanje uticaja ekstrakata na kontrakcije izolovanog ileuma u prisustvu blokatora azot-oksida sinteze (L-NAME), korišćeni su ekstrakti

E80U 2011-2014, i ekstrakt EU 2011. Kontrakcije ileuma pacova su dodatkom ispitivanih ekstrakata u prisustvu blokatora azot-oksida sintetaze (L-NAME) bile redukovane, pa se zaključuje da ekstrakti svoj mehanizam delovanja ne ostvaruju posredstvom azot-monoksida. U Tabeli 4.11.10. predstavljene su  $EC_{50}$  vrednosti ekstrakata i odgovori maksimalnih koncentracija (1,5 mg/ml) u odsustvu L-NAME (inhibicija spontanij kontrakcija), i u prisustvu L-NAME, kada je ponovo došlo do inhibicije kontrakcija upućujući na to da ekstrakti ne utiču na kontraktilnost glatkih mišića ileuma posredstvom azot-monoksida.

**Tabela 4.11.10.** Vrednosti efektivnih koncentracija  $EC_{50}$  (mg/ml) ekstrakata *Salvia sclarea* L. i odgovor maksimalne koncentracije ekstrakata (1,5 mg/ml) (E80U 2011-2014 i EU 2011) (%) na inhibiciju kontrakcija u odsustvu<sup>1</sup> i u prisustvu L-NAME<sup>2</sup>

EKSTRAKT	$EC_{50}^1$ (mg/ml)	1,5 mg/ml <sup>1</sup> (%)	$EC_{50}^2$ (mg/ml)	1,5 mg/ml <sup>2</sup> (%)
<b>E80U 2011</b>	1,68±0,01 <sup>a</sup>	46,33±1,22 <sup>a</sup>	2,29±0,11 <sup>a</sup>	36,22±5,01 <sup>a</sup>
<b>E80U 2012</b>	3,93±0,11 <sup>b</sup>	26,19±0,28 <sup>b</sup>	4,33±0,25 <sup>b</sup>	26,26±2,40 <sup>b</sup>
<b>E80U 2013</b>	2,22±0,18 <sup>c</sup>	35,43±1,00 <sup>c</sup>	2,87±0,06 <sup>c</sup>	36,03±1,00 <sup>c</sup>
<b>E80U 2014</b>	3,01±0,06 <sup>d</sup>	33,33±0,09 <sup>d</sup>	3,85±0,02 <sup>d</sup>	34,33±0,80 <sup>d</sup>
<b>EU 2011</b>	1,42±0,01 <sup>e</sup>	50,49±2,03 <sup>e</sup>	1,89±0,08 <sup>e</sup>	45,03±1,09 <sup>e</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u  $EC_{50}$  (mg/ml) vrednostima i odgovoru maksimalne koncentracije (%) između ekstrakta (Duncan test,  $p < 0,05$ )

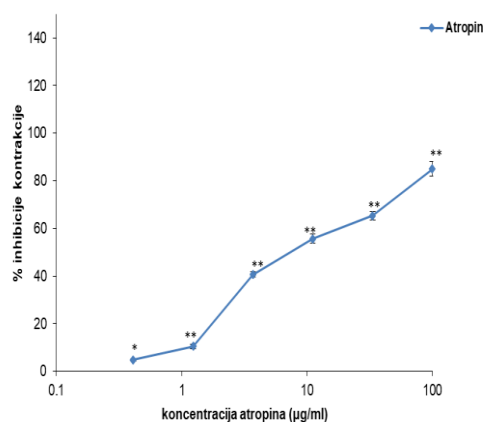
## 4.12. SPAZMOLITIČKI EFEKTI EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA IZOLOVANOJ TRAHEJI PACOVA

### 4.12.1. Efekti ekstrakata na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova

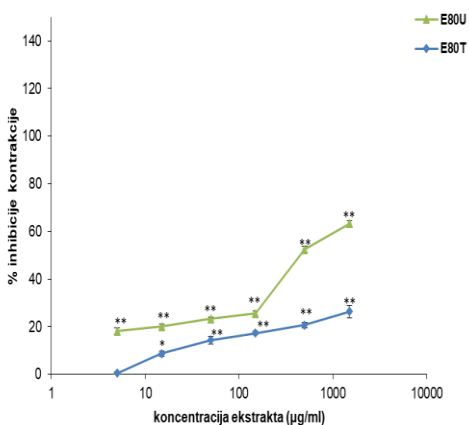
Ekstrakti *S. sclarea* su delovali relaksantno i na kontrakcije glatke muskulature traheje koje su izazvane primenom karbahola (1  $\mu$ M). Rezultati su predstavljeni kroz odgovorajuće efektivne koncentracije ekstrakata koje su inhibirale 50% indukovanih kontrakcija ( $EC_{50}$ ), i kroz procenat inhibicije kontrakcija maksimalnim primenjenim dozama (1,5 mg/ml). Relaksacija glatke muskulature traheje ekstraktima je bila dozno-zavisna, gde su se  $EC_{50}$  vrednosti kretale u rasponu od 0,91±0,01 do 6,92±0,04 mg/ml. Najbolji relaksantni efekat među deset ispitivanih ekstrakata iz iste godine postignut je ekstraktom E80U 2011 sa najnižom  $EC_{50}$ , a koji je u

maksimalnoj koncentraciji od 1,5 mg/ml dao inhibiciju kontrakcija od  $63,23 \pm 2,02\%$ . Ekstrakt MM se karakterisao najslabijom bronhodilatatornom aktivnošću sa maksimalnom inhibicijom kontrakcija od  $11,82 \pm 0,16\%$  (Tabela 4.12.1). Ekstrakt E80U iz 2013. godine se takođe značajno istakao u ispoljavanju spazmolitičkog dejstva sa vrlo niskom  $EC_{50}$  od  $0,97 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$  i efektom od  $65,59 \pm 2,66\%$ . Inhibitorni efekti E80U ekstrakata iz različitih godina opadali su sledećim redom E80U 2011  $\approx$  E80U 2013 > E80U 2014 > E80U 2012. Veza između ispoljene bronhodilatatorne aktivnosti i sadržaja ispitivanih jedinjenja iz ekstrakata nije bila od značaja ( $r < 0,3$ ). Atropin, koji je korišćen kao pozitivna kontrola je sa maksimalnom koncentracijom (100  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibirao  $84,89 \pm 2,00\%$  kontrakcija sa  $EC_{50}$  vrednošću od  $9,78 \pm 0,00 \mu\text{g/ml}$  (Slika 4.12.1).

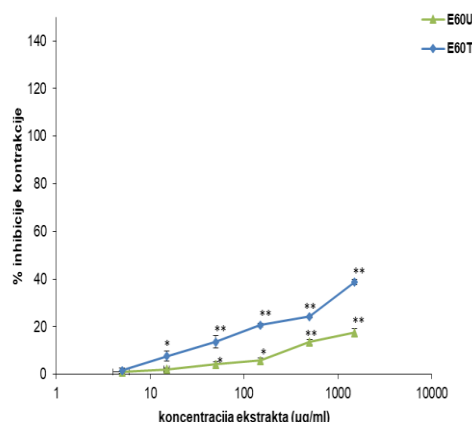
U Tabeli 4.12.1. su prikazane  $EC_{50}$  vrednosti (mg/ml) i odgovori maksimalne koncentracije od 1,5 mg/ml izraženi u procentima. Graficima (Slike 4.12.2-4.12.7) su predstavljeni dozno-zavisni spazmolitički efekti svih ispitivanih ekstrakata.



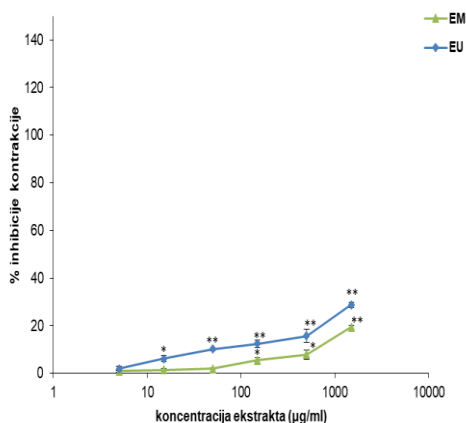
**Slika 4.12.1.** Relaksantni efekti atropina na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



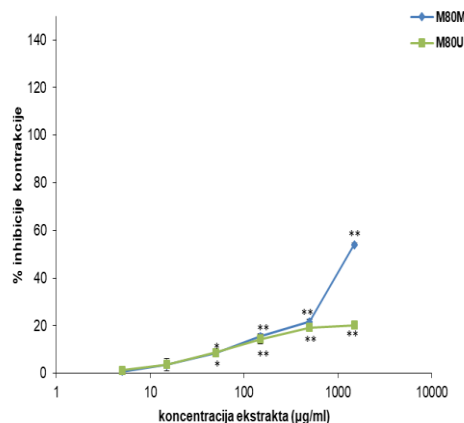
**Slika 4.12.2.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U i E80T na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



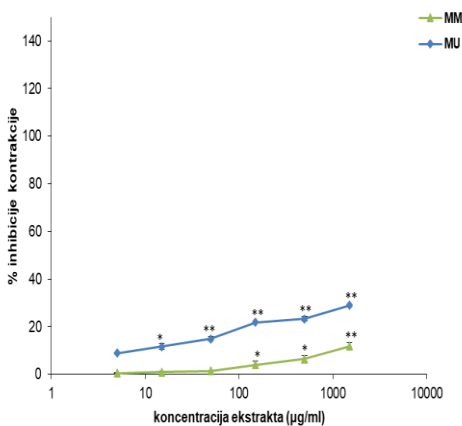
**Slika 4.12.3.** Relaksantni efekti ekstrakata E60U i E60T na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



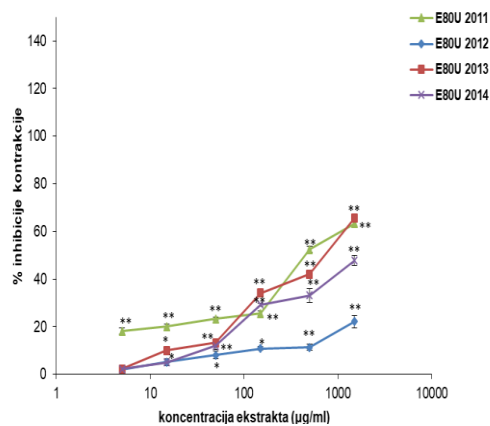
**Slika 4.12.4.** Relaksantni efekti ekstrakata EM i EU na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ )



**Slika 4.12.5.** Relaksantni efekti ekstrakata M80U i M80M na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ )



**Slika 4.12.6.** Relaksantni efekti ekstrakata MM i MU na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ )



**Slika 4.12.7.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2011-2014 na karbaholom indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test  $*p<0,05$ ;  $**p<0,01$ )



**Tabela 4.12.1.** Vrednosti efektivnih koncentracija (mg/ml) ekstrakata *Salvia sclarea* L. (A. ekstrakti iz 2011. i B. ekstrakti E80U iz 2011-2014) i odgovor maksimalne koncentracije ekstrakata (1,5 mg/ml) (%) kod karbaholom-indukovanih kontrakcija traheje pacova

A.

EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
E80U	0,91±0,01 <sup>a</sup>	63,23±2,02 <sup>a</sup>
E60U	4,65±0,15 <sup>b</sup>	17,46±0,87 <sup>b</sup>
E80T	3,32±0,01 <sup>a</sup>	26,31±0,99 <sup>c</sup>
E60T	1,99±0,08 <sup>a</sup>	38,69±1,01 <sup>d</sup>
EM	4,38±0,12 <sup>a</sup>	19,45±0,87 <sup>e</sup>
EU	2,87±0,03 <sup>a</sup>	28,73±0,77 <sup>f</sup>
MM	6,92±0,04 <sup>c</sup>	11,82±0,16 <sup>g</sup>
MU	3,26±0,02 <sup>a</sup>	28,91±0,88 <sup>f</sup>
M80M	1,36±0,01 <sup>a</sup>	54,09±1,66 <sup>h</sup>
M80U	4,26±0,04 <sup>a</sup>	20,25±1,01 <sup>e</sup>

B.

EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
E80U 2011	0,91±0,01 <sup>a</sup>	63,23±2,02 <sup>a</sup>
E80U 2012	4,01±0,03 <sup>b</sup>	22,15±0,88 <sup>b</sup>
E80U 2013	0,97±0,01 <sup>a</sup>	65,59±2,66 <sup>a</sup>
E80U 2014	1,45±0,03 <sup>c</sup>	47,78±2,03 <sup>c</sup>

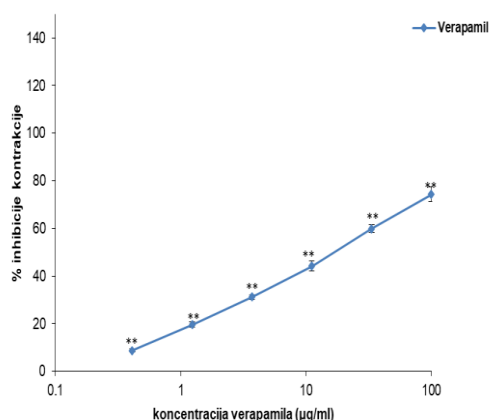
Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u EC<sub>50</sub> (mg/ml) vrednostima i odgovorima maksimalne koncentracije (%) (1,5 mg/ml) između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

#### 4.12.2. Efekti ekstrakata na kalijum-hloridom indukovane kontrakcije traheje pacova

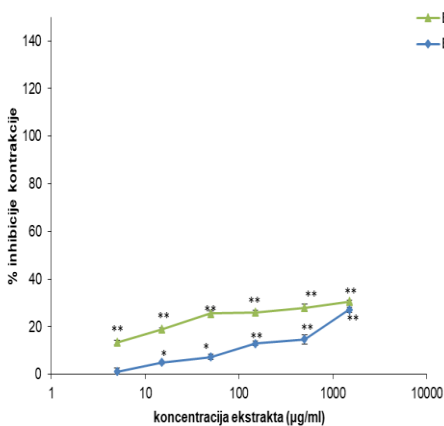
Dejstvo ekstrakata *S. sclarea* na kontraktibilnost glatkih mišića traheje pacova praćeno je i na KCl-indukovanim kontrakcijama. Ekstrakti su različitim intenzitetom delovali relaksantno na kontrakcije glatke muskulature traheje nakon jednodozne primene KCl (80 nM). Rezultati inhibicija kontrakcija predstavljeni su preko EC<sub>50</sub> vrednosti ekstrakta i maksimalnog odgovora ekstrakta (1,5 mg/ml) na nastale na kontrakcije (Tabela 4.12.2). Relaksacija glatke muskulature traheje ekstraktima bila je dozno-zavisna, gde su se EC<sub>50</sub> vrednosti kretale u rasponu od 1,03±0,03 do 15,39±0,31 mg/ml. Najbolji inhibitorski efekat kod kalijum-hloridom indukovanih kontrakcija među deset ispitivanih ekstrakata iz iste godine postignut je ekstraktom E80U sa najnižom EC<sub>50</sub>, a koji je u maksimalnoj koncentraciji od 1,5 mg/ml dao inhibiciju kontrakcija od 30,35±1,88%. Među ekstraktima E80U kroz godine, najbolji efekat je ostvaren kod ekstrakta iz 2013. godine, sa vrlo istaknutom aktivnošću (EC<sub>50</sub>=1,03±0,03 mg/ml i maksimalnom inhibicijom od 64,37±2,74%). Inhibitorski efekti ovih ekstrakata, iz različitih godina, opadali su sledećim

redom E80U 2013>E80U 2014>E80U 2011>E80U 2012. Ekstrakti sa najslabijim bronhodilatatornim efektima bili su MU i E60U sa maksimalnim inhibicijama kontrakcija od  $8,69 \pm 0,66\%$  i  $8,57 \pm 0,21\%$ , redom (Tabela 4.12.2). Veza između ispoljene dilatatorne aktivnosti na izolovanoj traheji i sadržaja ispitivanih jedinjenja iz ekstrakata nije bila od značaja ( $r < 0,3$ ). Verapamil, koji je korišćen kao pozitivna kontrola, je sa maksimalnom koncentracijom (100  $\mu\text{g/ml}$ ) inhibirao  $74,23 \pm 1,20\%$  kontrakcija sa  $EC_{50}$  vrednošću od  $15,23 \pm 0,08 \mu\text{g/ml}$  (Slika 4.12.8).

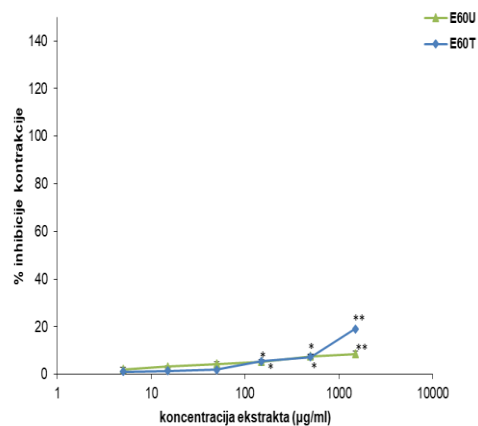
U Tabeli 4.12.2. su prikazane  $EC_{50}$  vrednosti i odgovori maksimalne koncentracije od 1,5 mg/ml izraženi u procentima. Graficima (Slike 4.12.9-4.12.14) su predstavljene dozno-zavisni spazmolitčki efekti svih ispitivanih ekstrakata.



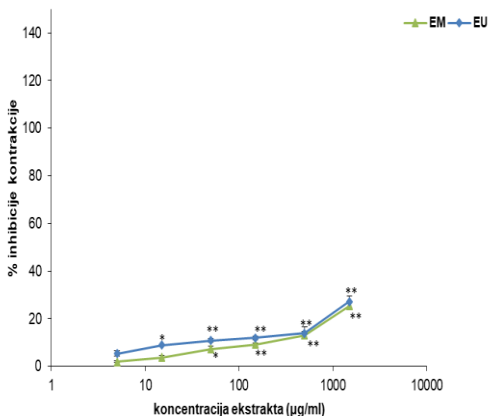
**Slika 4.12.8.** Relaksantni efekti ekstrakata verapamila na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



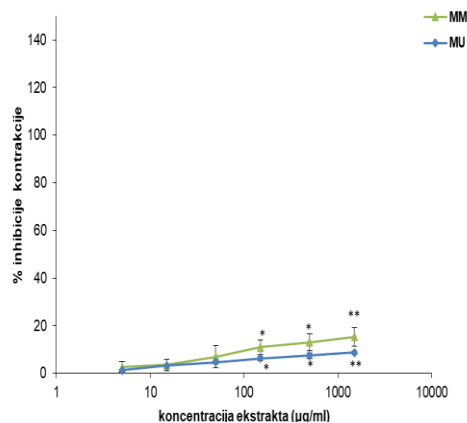
**Slika 4.12.9.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U i E80T na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



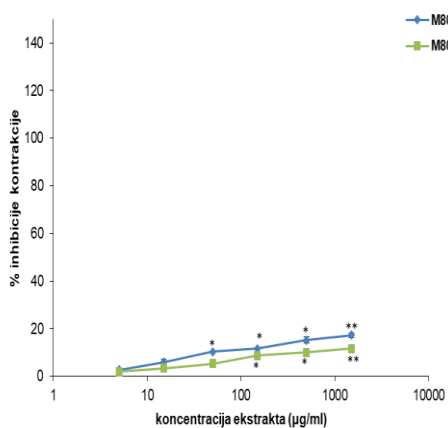
**Slika 4.12.10.** Relaksantni efekti ekstrakata E60U i E60T na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )



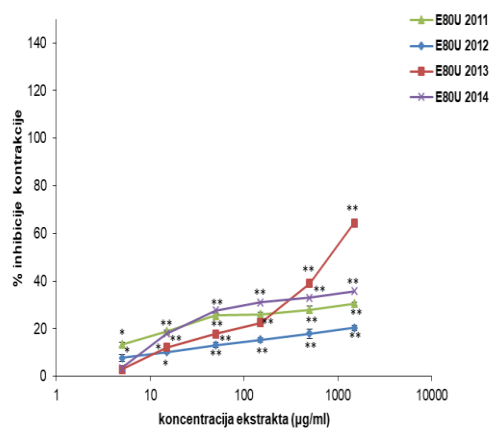
**Slika 4.12.11.** Relaksantni efekti ekstrakata EM i EU na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



**Slika 4.12.13.** Relaksantni efekti ekstrakata MM i MU na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



**Slika 4.12.12.** Relaksantni efekti ekstrakata M80M i M80U na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )



**Slika 4.12.14.** Relaksantni efekti ekstrakata E80U 2011-2014 na KCl-indukovane kontrakcije traheje pacova (Studentov t-test \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ )

**Tabela 4.12.2.** Vrednosti efektivnih koncentracija (mg/ml) ekstrakata *Salvia sclarea* L. (A. ekstrakti iz 2011. i B. ekstrakti E80U iz 2011-2014) i odgovor maksimalne koncentracije ekstrakata (1,5 mg/ml) (%) kod KCl-indukovanih kontrakcija traheje pacova

A.

EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
<b>E80U</b>	3,14±0,02 <sup>a</sup>	30,35±1,88 <sup>a</sup>
<b>E60U</b>	15,39±0,31 <sup>b</sup>	8,57±0,21 <sup>b</sup>
<b>E80T</b>	3,15±0,02 <sup>a</sup>	27,10±1,22 <sup>c</sup>
<b>E60T</b>	4,39±0,13 <sup>c</sup>	19,05±0,78 <sup>d</sup>
<b>EM</b>	3,22±0,16 <sup>a</sup>	25,41±1,28 <sup>c</sup>
<b>EU</b>	3,47±0,11 <sup>a</sup>	27,17±1,30 <sup>c</sup>
<b>MM</b>	6,27±0,16 <sup>d</sup>	15,37±0,81 <sup>e</sup>
<b>MU</b>	15,38±1,02 <sup>b</sup>	8,69±0,66 <sup>b</sup>
<b>M80M</b>	6,03±0,33 <sup>d</sup>	17,22±0,99 <sup>e</sup>
<b>M80U</b>	9,02±0,11 <sup>e</sup>	11,56±0,45 <sup>f</sup>

B.

EKSTRAKT	EC <sub>50</sub> (mg/ml)	1,5 mg/ml (%)
<b>E80U 2011</b>	3,14±0,02 <sup>a</sup>	30,35±1,88 <sup>a</sup>
<b>E80U 2012</b>	6,39±0,23 <sup>b</sup>	20,32±0,97 <sup>b</sup>
<b>E80U 2013</b>	1,03±0,03 <sup>c</sup>	64,37±2,74 <sup>c</sup>
<b>E80U 2014</b>	2,48±0,10 <sup>d</sup>	35,81±1,36 <sup>d</sup>

Rezultati prikazuju srednju vrednosti šest merenja ± standardna devijacija. Različita mala slova u kolonama označavaju statistički značajnu razliku u EC<sub>50</sub> (mg/ml) vrednostima i odgovorima maksimalne koncentracije (%) (1,5 mg/ml) između ekstrakata (Duncan test, p<0,05).

## 5. DISKUSIJA

### 5.1. MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA BILJNE DROGE (*Salviae sclareae herba*)

Podaci o morfologiji i karakteristikama anatomske građe muskatne žalfije se mogu sresti u većem broju naučnih i stručnih radova (Diklić, 1974; Ozdemir i Senel, 1999). Međutim, makroskopske i mikroskopske karakteristike droge koja se dobija od pomenute biljne vrste do sada nisu bile dovoljno istražene. Iz tog razloga je u ovoj disertaciji posebna pažnja posvećena morfološkoj karakterizaciji droge *Salviae sclareae herba*, a pre svega deskripciji i klasifikaciji žlezdanih i nežlezdanih (mehaničkih) struktura epidermisa koje odlikuju elemente iz kojih je ona sastavljena. Trihomi, koji se nalaze na površinama vegetativnih i reproduktivnih organa biljaka, imaju veliki taksonomski i filogenetski značaj, pa se tip i distribucija trihoma, naročito glandularnih, može koristiti za diferencijaciju srodnih taksona (Krstić i sar., 2006; Stojičić i sar., 2016). Poznavanje karakteristika i distribucije trihoma naročito je važno prilikom identifikacije usitnjenih delova biljnih droga (Chakalova i sar., 1993), čemu je u ovoj studiji posvećena posebna pažnja.

Na stereomikroskopu su praćene površinske strukture droge *Salviae sclareae herba*, koje su naknadno, sa znatno više detalja, definisane posmatranjem trajnih mikroskopskih preparata. Prisustvo oba funkcionalna tipa trihoma (žlezdani i nežlezdani), kao i većeg broja podtipova trihoma ukazuje na visok diverzitet epidermalnih struktura koje učestvuju u izgradnji karakterističnog indumentuma (dlakavog omotača) muskatne žalfije (Tabela 4.1.1.). Raznovrsnost, kao i funkcionalna i morfološka specifičnost pomenutih struktura kod ove biljke otvaraju veliku mogućnost njihove primene u taksonomiji i klasifikaciji biljnih droga koje se dobijaju od nadzemnih delova vrsta roda *Salvia*, familije usnatica, kao i drugih biljaka. Trihomi su specijalizovane ćelije epidermisa koje biljnom organizmu pružaju izvesnu zaštitu, dopunjujući mehaničku i biohemijsku barijeru za patogene mikroorganizme, herbivore, ali ostvaruju ulogu i u procesu smanjenja intenziteta transpiracije i sušenja biljke na toplijim staništima (Jančić, 2002). Osobenost anatomske građe trihoma kod biljaka ponekad može biti veoma raznovrsna i složena, što je svakako slučaj kod brojnih vrsta iz familije Lamiaceae. Prilikom ispitivanja i deskripcije trihoma treba se pre svega rukovoditi sledećim osobinama, navedenim u odnosu na potencijalni značaj koji imaju za biljku: 1) žlezdani ili nežlezdani; 2) uniceularni ili multiceularni; 3)

uniserijatni i multiserijatni; 4) prisustvo površinskih ultrastruktura (npr. bradavica, papila ili pruga); 5) voluminoznost - kolabiranost ili nabubrelost ćelija; 6) broj i tip ćelija koje grade trihom (baza, telo i vršni deo). Kao dodatne osobine u njihovoj karakterizaciji mogu se posmatrati razlike u debljini zida, prisustvu lignifikacije, kristala ili cistolita, debljini kutikule, impregnaciji kalcijum-karbonatom i ispunjenosti segmenata ćelijskim sadržajem (Metcalf i Chalk, 1950).

Prisustvo glandularnih i mehaničkih trihoma je odlika skoro svih biljnih vrsta porodice Lamiaceae (Stojičić i sar., 2016). Vegetativni i reproduktivni delovi svih *Salvia* vrsta karakterišu se bogato razvijenim indumentumom koji čini mešavinu nežlezdanih i žlezdanih trihoma. U istraživanju iranskih vrsta roda *Salvia* nežlezdani, prosti, trihomi su kategorisani u kratke, duge, ekstremno duge i razgranate trihome (Eiji i Salmaki, 2016). Sa druge strane, žlezdani trihomi su podeljeni u kapitatne i peltatne. Kapitatni žlezdani trihomi su u istoj studiji opisani kao sesilni ili subsesilni, kao i sa kratkom i dugom drškom. Uobičajeni tipovi trihoma koji su zastupljeni kod većine vrsta roda *Salvia* su kratki jednostavni trihomi praćeni kratkim kapitatnim. Među kratkim, jednostavnim trihomima, bicelularni i multiselularni oblici su zastupljeniji od unicelularnog. Razgranati nežlezdani trihomi se sreću jedino kod *S. multicaulis*, dok se ekstremno dugi uočavaju kod *S. sclareopsis*, *S. mirzayanii*, *S. syriaca*, *S. leriifolia*, *S. xanthocheila*, *S. verbascifolia*, *S. ceratophylla*, *S. atropatana* i *S. aethiopsis*. Drška kapitatnih trihoma može biti jedno-, dvo- i višecelijska, a glavica jedno- ili višecelijska. Peltatni žlezdani trihomi se kod vrsta roda *Salvia* najčešće sastoje iz kratke jednoćelijske drške i višecelijske glavice, izgrađene od četiri do osam ćelija. Za razliku od kapitatnih, ove žlezde nisu uočene kod svih vrsta pomenutog roda, kao što su *S. bracteata*, *S. macrochlamys*, *S. sclarea*, *S. aethiopsis* i *S. oligophylla*. Eiji i Salmaki (2016) su na površinama čašice i listova *S. sclarea* iz Irana zabeležili prisustvo kratkih i dugih nežlezdanih trihoma, što je u saglasnosti sa rezultatima prikazanim u ovoj doktorskoj disertaciji. Od kapitatnih, ovi istraživači su zabeležili prisustvo sesilnih, subsesilnih i dugih žlezdanih trihoma, koji su prisutni i u našem biljnom materijalu. Za razliku od široke distribucije peltatnih žlezda na svim analiziranim nadzemnim organima muskatne žalfije sa područja Srbije, zanimljivo je da peltatni trihomi nisu zastupljeni u tolikoj meri u materijalu sa područja Irana, gde se pojedinačni trihomi tog tipa uglavnom sreću na listu i čašici. Rezultati istraživanja pomenutih autora ukazuju da mikromorfologija trihoma pruža veoma pouzdane podatke za

morfološku diferencijaciju vrsta, međutim da se zbog njegove visoke varijabilnosti ovaj karakter ne može koristiti u rasvetljavanju filogenetskih odnosa u okviru roda *Salvia*.

Druga grupa autora, Ozdemir i Senel (1999) je analizirala muskatnu žalfiju sa područja Turske, a zaključili su da peltatanih žlezda ima samo na površini listova i cvetova, ali ne i na stabljici. Međutim, u analiziranom biljnom materijalu koji je predmet istraživanja doktorata peltatni trihomi su uočeni na svim nadzemnim organima, uključujući i stablo. Pomenuti autori navode da se na površini biljnih organa kod muskatne žalfije mogu naći tri tipa kapitatnih trihoma, i to sa kratkom drškom i velikom okruglom glavicom, sa kraćom ili dužom drškom, ali sa glavicom kod koje je kutikula otpala, kao i kapitatne kod kojih je glavica peharastog izgleda. Analiza žlezdanih struktura *S. sclarea* iz Austrije potvrđuje prisustvo peltatnih i nekoliko vrsta kapitatnih trihoma. Naime, Schmiderer i saradnici (2008) su utvrdili da se listovi ove muskatne žalfije, za razliku od materijala analiziranog u ovoj studiji, karakterišu prisustvom skoro isključivo peltatnih trihoma, naročito na naličju. Kapitatni trihomi tipa I (veoma male žlezde sa uskom glavicom) su bili retko prisutni i pojavljivali su se samo na mladim listovima. Na abaksijalnoj površini čašice kapitatne žlezde su gusto raspoređene na nervima, sa manjim brojem peltatnih žlezdi između njih, u odnosu oko 10:1, dok su na adaksijalnoj površini čašice uočene male kapitatne žlezde tipa I i kapitatne sa kratkom drškom. Abaksijalna površina krunice ove muskatne žalfije imala je oba tipa žlezda, nejednako raspoređenih, sa sličnim odnosom, dok je adaksijalna strana bila bez trihoma. Peltatne žlezde su akumulirane na bočnim rubovima donje usne, dok su kapitatne pretežno raspoređene na rubovima i vrhu gornje usne cveta. Kapitatne uljane žlezde su uvek bile providne i bezbojne, dok su peltatne žlezde bile transparentne, beličaste, neprozirne ili žućkaste na listovima (Schmiderer i sar., 2008), što se samo u izvesnoj meri podudara sa našim uzorcima jer su peltatni trihomi uvek, u svim delovima biljke, bili ispunjeni narandžasto-žutim sadržajem.

Morfologiju, distribuciju i tip sekrecije žlezdanih trihoma listova i cvetova muskatne žalfije sa područja Italije ispitaio je Bini Maleci (1988). Na osnovu histohemijskih i morfoloških razlika on je zaključio da se jedna vrsta žlezdanih trihoma karakteriše hidrofilnom sekrecijom, a tri vrste lipofilnom. Hidrofilni trihomi su kapitatni i kratki, i karakterišu se sekrecijom mucilaginoznog sadržaja. Ovi trihomi su veličine do 45 µm, i sastoje se od jedne bazalne epidermalne ćelije, ćelije – drške, ćelije – vrata, i jedne okrugle vakuolizovane, sekretorne, ćelije. One su zastupljene na svim organima muskatne žalfije, a naročito su brojne na licu listova

i braktejama. Lipofilni trihomi su peltatni i kapitatni, i u njima je smešteno etarsko ulje. Kapitatne uljane žlezde su, prema ovom autoru, podeljene na tip I i tip II. Tip I je zastupljen na mladim izdancima, odnosno na naličju kotiledona i mladih listova, i zadržavaju se do prve godine. Dužine su do 140  $\mu\text{m}$ , i sastoje se iz jedne bazalne epidermalne ćelije, dugačke drške od 2-3 ćelije, jedne ćelije vrata i vršne kutinizovane sekretorne ćelije. Tip II kapitatnih žlezdanih ćelija se sreće na cvetovima. Ovi trihomi su veličine 50-150  $\mu\text{m}$ , i njih karakteriše baza sa jednom ili dve ćelije, dugačka ćelija drške, jako kutinizovana ćelija vrata i okrugla sekretorna ćelija. Peltatni trihomi muskatne žalfije sa područja Italije su uočeni na naličju listova i na čitavom cvetu. Sastoje se iz epidermalne, bazalne ćelije, ravne kutinizovane ćelije vrata i 12-16 sekretornih ćelija. Cvetovi su najbogatiji etarskim uljem jer sadrže žlezdaste trihome sa lipofilnom sekrecijom (Bini Maleci, 1988). Najveća gustina peltatnih trihoma sa uočljivim uljanim sadržajem u subkutikularnom prostoru, kao i kapitatnih trihoma zabeležena je upravo na kruničnim i čašićnim delovima i tokom naših istraživanja.

## 5.2. EKSTRAKCIJA BILJNOG MATERIJALA

Mnogi faktori ekstrakcije igraju važne uloge u njenoj efikasnosti, kao što su vrsta i koncentracija rastvarača, temperatura ekstrakcije, vreme ekstrakcije, veličina čestica, i pH. Među ovim faktorima, rastvarač je jedan od najuticajnijih (Chew i sar., 2011). Voda, kao rastvarač, ima veliku sposobnost ekstrakcije, međutim ima i određene nedostatke. Ona može izazvati hidrolitičku i fermentativnu razgradnju, dovesti do adsorpcije aktivne materije na nabubrelu drogu, rastvarati balastne materije, a takođe i omogućiti razvoj mikroorganizama. Zbog ovih nedostataka vode češće se koriste vodeno-etanolne smeše, odnosno rastvori etanola različitih koncentracija. Etanol je mnogo selektivniji rastvarač jer odlično izoluje aktivne, a vrlo malo balastne materije (Jovanović, 2004). Kod ispitivanih ekstrakata *S. sclarea* se kao najefikasniji rastvarač, u smislu prinosa, pokazao 60% etanol (etanol:voda=60:40; v:v) u okviru svake godine sakupljanja biljnog materijala. Niži prinosi su zabeleženi kada je kao rastvarač korišćen 80% etanol, a još niži pri korišćenju koncentrovanog etanola (96%), što upućuje na to da se porastom polarnosti vodeno-etanolnih smeša povećavao i prinos ekstrakcije. Povećanje sadržaja vode u sistemu rastvarača izaziva bubrenje biljnog materijala i rezultira povećanjem kontakta između biljnog matriksa i rastvarača, kao i porastom prinosa (Sulaiman i sar., 2017). Drugi organski rastvarači kao što su metanol, etar, hloroform, aceton i drugi, se mogu upotrebljavati, ali uz



obavezno uklanjanje iz gotovog proizvoda (Jovanović, 2004). Prilikom korišćenja metanola kao ekstrakcionog sredstva zaključak je isti, odnosno ekstrakcija apsolutnim metanolom je u odnosu na 80% metanol (metanol:voda=80:20; v:v) bila manje efikasna, što je takođe u skladu sa nižom polarnošću solvensa. I ostali istraživači su u svojim studijama dolazili do sličnih rezultata i zaključaka o uticaju promene polarnosti rastvarača na stepen prinosa ekstrakcije (Ahmad, 2009; Amirah i Khan, 2012; Anwar i Przybylski, 2012; Arya i sar., 2012; Bimakr i sar., 2011; Dent i sar., 2013; Dhanani i sar., 2017; Hijazi i sar., 2015; Kamarudin i sar., 2016; Perez-Bonilla i sar., 2013; Sruthi i Indira, 2016; Tan i sar., 2013)

Odabir odgovarajuće tehnike ekstrakcije i optimizacija različitih parametara su veoma važni za standardizaciju biljnih proizvoda zbog izolovanja željenih aktivnih sastojaka ostavljajući one koji nisu potrebni. Različite ekstrakcione metode koje se najčešće koriste uključuju konvencionalne tehnike kao što su maceracija, perkolacija, infuzija, decokcija ili vruća kontinuirana ekstrakcija. Međutim, poslednje tri decenije stalno raste broj novih, alternativnih tehnika kao što su npr. ultrazvučna i mikrotalasna ekstrakcija, ili ekstrakcija superkritičnim tečnostima (Dhanani i sar., 2017). U okviru doktorske disertacije korišćene su tri metode ekstrakcije: ultrazvučna, maceracija i digestija. Ekstrakcija uz pomoć ultrazvuka je tehnika kojom se postiže visoka reproduktivnost u kratkom vremenskom periodu i visok prinos bioaktivnih jedinjenja. Takođe, ova tehnika se karakteriše prostom manipulacijom, niskom temperaturom tokom obrade i smanjenom potrošnjom rastvarača i energije (Dent i sar., 2015). Ona podrazumeva upotrebu ultrazvuka u rasponu od 20 kHz do 2000 kHz kada nastaju tzv. kavitacioni mehurići. Mehanički efekat akustične kavitacije iz ultrazvuka povećava površinski kontakt između rastvarača i biljnog materijala i tada dolazi do promena njegovih fizičkih i hemijskih osobina, remećenja strukture ćelijskog zida, lakšeg oslobađanja sastojaka i povećanja transporta rastvarača u biljne ćelije. S druge strane, nedostatak ove ekstrakcione tehnike je rizik od eventualnog nastanka slobodnih radikala kada ultrazvučna energija prelazi 20 kHz (Azwanida, 2015; Dent i sar., 2015). Metoda ultrazvuka se u prethodnim studijama pokazala jako dobrom u smislu prinosa ekstrakcije, mada je neka istraživanja pokazuju slabijom u poređenju sa Soksletovom ekstrakcijom, maceracijom ili mikrotalasnom ekstrakcijom (de Lima Silva i sar., 2015; Sruthi i Indira, 2016). Druga korišćena ekstrakciona tehnika je jednostruka maceracija. To je tradicionalna metoda koja podrazumeva ekstrakciju biljnog materijala na sobnoj temperaturi u trajanju od minimum tri dana. Tokom postupka maceracije dolazi do

omekšavanja, bubrenja, dezintegracije ćelijskog zida i izlaska rastvorljivih fitojedinjenja (Azwanida, 2015). Njena prednost se ogleda u korišćenju hladnog rastvarača čime se umanjuje mogućnost razgradnje aktivnih jedinjenja. Digestija je jednokratna ekstrakcija kod koje se koristi toplota na temperaturi do 50°C (Savić, 2014). Promena temperature može poboljšati proces ekstrakcije i smanjiti potrebnu količinu solvensa za ekstrakciju (Kostić i sar., 2015; Azwanida, 2015).

Najmanji prinosi ekstrakcije u svim godinama sakupljanja muskatne žalfije postignuti su koncentrovanim etanolom kao najmanje polarnim rastvaračem. Kod ovih ekstrakata je metoda ultrazvuka uglavnom bila nešto efikasnija u odnosu na maceraciju (osim kod ekstrakata iz 2014. godine). Dodatkom vode koncentrovanom etanolu značajno su porasli prinosi, tako da su najveći zabeleženi prilikom ekstrakcije biljnog materijala 60% etanolom, rastvaračem visoke polarnosti. Ultrazvučna i metoda digestije su kod vodeno-etanolnih ekstrakata muskatne žalfije dale visoke i slične prinose, sa nešto većom efikasnošću 60% etanola u odnosu na 80%, u skladu sa njihovim različitim polarnostima. Kod ovih ekstrakata je metoda digestije, sa povećanom temperaturom od 40°C, uglavnom bila uspešnije u izolovanju ekstraktibilnih materija u odnosu na ultrazvučnu, osim ekstrakata iz 2014. u kojoj je i zabeležen najveći prinos (E60U). Kod metanolnih ekstrakata je metoda maceracije bila uglavnom efikasnija od ultrazvučne tehnike. S druge strane, ekstrakcija apsolutnim metanolom je u odnosu na 80% metanol bila manje efikasna, što je ponovo u skladu sa nižom polarnošću rastvarača. Još je značajno pomenuti da je apsolutni metanol u poređenju sa koncentrovanim etanolom ekstrahovao veću količinu materija, i da je porast prinosa signifikantnije rastao dodavanjem vode kod etanolnih u odnosu na metanolne ekstrakte. Istraživači Jasicka-Misiak i saradnici (2018) su ispitivali kinetiku ultrazvučne ekstrakcije listova *S. sclarea* vodom, metanolom i etanolom, mereći prinose nakon 5, 15, 30 i 60 minuta na temperaturama od 20°C i 40°C. Oni su utvrdili da se biljni materijal najbolje ekstrahuje metanolom kao i da su ekstrakcije značajno efikasnije nakon 60 minuta. Istraživači su zaključili i da su ekstrakcije na 40°C bile uspešnije od onih na 20°C, potvrđujući činjenicu da umerena promena temperature poboljšava proces ekstrakcije (Jasicka-Misiak i sar., 2018).

### 5.3. SADRŽAJ UKUPNIH FENOLA, TANINA, FLAVONOIDA I DERIVATA HIDROKSICIMETNE KISELINE U EKSTRAKTIMA *Salvia sclarea* L.

Svrha optimizacije ekstrakcionih tehnika i selekcije rastvarača je maksimalna izolacija željenih aktivnih principa uz postizanje njihovih očekivanih farmakoloških efekata (Sruthi i Indira, 2016). Upotreba polarnih rastvarača iz ovog istraživanja je imalo za cilj ekstrakciju polifenolnih jedinjenja kojim muskatna žalfija, kao i druge vrste roda *Salvia*, obiluje.

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima se kretao u opsegu od  $107,01 \pm 3,07$  mg GAE/g ( $92,14 \pm 5,39$  mg CE/g) do  $213,05 \pm 1,15$  mg GAE/g ( $180,99 \pm 1,13$  mg CE/g). Kod grupe etanolnih ekstrakata najmanje fenola je određeno kod onih koji su pripremljeni koncentrovanim etanolom, i sa najnižim prinosima, bez značajne razlike u metodi ekstrakcije. Kod polarnijih, vodeno-etanolnih, ekstrakata su obe ekstrakcione tehnike i oba tipa rastvarača, 80% i 60% etanol, bili slični po efikasnosti, pri čemu je najviše polifenola kvantifikovano u ekstraktu E80T iz 2013. godine ( $213,05 \pm 1,15$  mg GAE/g ili  $180,99 \pm 1,13$  mg CE/g). Apsolutni i 80% metanol su, takođe, kao polarni rastvarači ekstrahovali značajne količine fenolnih jedinjenja, koristeći obe ekstrakcione tehnike, sa vrednostima od  $124,93 \pm 7,31$  mg GAE/g ( $100,20 \pm 7,19$  mg CE/g) do  $206,63 \pm 5,38$  mg GAE/g ( $179,56 \pm 5,28$  mg CE/g). Od svih posebno se istakao ekstrakt MU 2012. godine koji je sadržao najveću količinu ovih jedinjenja.

Etanolni ekstrakti iz 2011. godine su sadržali najmanje ukupnih fenola u odnosu na ostale etanolne ekstrakte iz narednih godina sakupljana biljnog materijala, dok kod metanolnih ekstrakata ove razlike nisu uočene. Prema podacima Republičkog hidrometeorološkog zavoda Srbije (RHMZ), juna i jula meseca 2011. godine je na teritoriji Niša i okoline srednja prosečna temperatura iznosila  $21,2$  i  $23,5^{\circ}\text{C}$ , slično kao i vrednosti iz 2013. i 2014. godine ( $20,6^{\circ}\text{C}$  i  $22,8^{\circ}\text{C}$ , i  $20,2^{\circ}\text{C}$  i  $22,3^{\circ}\text{C}$ , redom), dok je 2012. godina u ovim mesecima bila značajno toplija  $23,8^{\circ}\text{C}$  i  $26,5^{\circ}\text{C}$ . Prosečna količina padavina u junu i julu 2011. godine je iznosila  $42,50$  i  $67,96$  mm, što se smatra da je nešto ispod ili oko granica normale. Pored toga što se 2012. godina smatrala ekstremno toplom, karakterisala se i vrlo sušnim periodima sa padavinama od  $5,9$  mm i  $36,7$  mm u junu i julu. Dok se 2013. godina smatrala u ovim mesecima sušnom do normalnom ( $48$  mm i  $20$  mm), 2014. godina je bila izuzetno kišovita sa prosečnim količinama padavina od  $77,5$  mm i  $141,5$  mm (RHMZ, 2011-2014). Na osnovu podataka RHMZ i raznolikosti rezultata ukupnih fenola ovi klimatski faktori nisu od značajnog uticaja na sadržaj pomenutih jedinjenja.

Na različit sadržaj aktivnih jedinjenja u ekstraktima čiji su ispitivanim biljnim materijalima, stoga, utiču drugi abiotski i biotski faktori (npr. svetlost, zemljište) (Janković i Đorđević, 1981). Do sličnih rezultata došli su Tulukcu i saradnici (2009) koji su sprovedi studiju koja je ispitala efekat sezonskih varijacija na sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima herbe turske muskatne žalfije. Naime, ovi istraživači su sakupljali biljni materijal ujutru, u podne i uveče 15. juna i 15. jula 2005. i 2006. godine od kog su pripremali metanolne ekstrakte Soksletovom ekstrakcijom. Nije pronađena statistički značajna razlika u sadržaju fenola u ovim ekstraktima, pri čemu se zaključuje da ove sezonske varijacije ne utiču na sadržaj ovih jedinjenja (Tulukcu i sar., 2009).

Ispitivani ekstrakti muskatne žalfije se u odnosu na ekstrakte iz dosadašnjih studija uglavnom odlikuju značajno višim sadržajem ukupnih fenola. Ogutcu i saradnici (2008) su sadržaj ukupnih fenola određivali u metanolnom, heksanskom i dihlorometanolnom ekstraktu lista *S. sclarea* sa područja Turske. Ekstrakti su dobijeni Soksletovom ekstrakcijom, a vrednosti ukupnih fenola su iznosili 4,9% (49 mg GAE/g), 2,7% (27 mg GAE/g) i 2,8% (28 mg GAE/g), redom (Ogutcu i sar., 2008). Kao i u slučaju sa ekstraktima muskatne žalfije sa našeg područja, najveća količina ekstrahovanih fenola postignuta je najpolarnijim rastvaračem. Dudonne i saradnici (2009) su u vodenom ekstraktu herbe žalfije iz Francuske, dobijen metodom digestije, odredili veoma nisku količinu fenola sa vrednošću od  $17,56 \pm 0,24$  mg GAE/g. Takođe, značajno manje fenola kvantifikovali su i Derakhshani i saradnici (2012) koji su u metanolnom ekstraktu herbe muskatne žalfije iz Irana odredili količinu od  $16,24 \pm 0,30$  mg GAE/g. Tulukcu i saradnici (2009) su u metanolnim ekstraktima herbe turske muskatne žalfije, pripremljeni Soksletovom ekstrakcijom, pratili sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u odnosu na godinu i period dana sakupljanja biljnog materijala. Vrednosti sadržaja ovih jedinjenja su se kretale od  $38,34 \pm 1,01$  do  $97,84 \pm 1,17$  mg GAE/g. Autori ovog istraživanja, takođe, zaključuju da nije bilo značajne razlike u količinama fenola u odnosu na godinu i period dana sakupljanja materijala (Tulukcu i sar., 2009). Zengin i saradnici (2018) su takođe ispitali sadržaj fenola u ekstraktima herbe turske muskatne žalfije. Prema njihovim rezultatima metanolni ekstrakt sadrži najviše fenola,  $81,78 \pm 2,66$  mg GAE/g, zatim vodeni,  $74,08 \pm 3,90$  mg GAE/g, i na kraju etil-acetatni  $29,32 \pm 0,72$  mg GAE/g, što je u saglasnosti sa niskom polarnošću korišćenog rastvarača. Dalje, Miliauskas je sa svojim istraživačima (2004) ispitivao sadržaj ukupnih fenola u ekstraktu litvanske muskatne žalfije, koji je dobijen dvostepenom ekstrakcijom korišćenjem tri rastvarača

acetona, etil-acetata i metanola, dvosatnom maceracijom. Količina ukupnih fenola u ovom ekstraktu je bila  $24 \pm 1,1$  mg GAE/g. Istraživanje Jasicka-Misiak i saradnika (2018), međutim, pokazuje da sadržaj ukupnih fenola može biti i veći, kao što je i u mukstanoj žalfiji sa našeg podneblja, sa vrednošću od  $134,4 \pm 9,7$  mg GAE/g kod metanolnog ekstrakta *S. sclarea* poreklom iz Ukrajine. Iako se najčešće vrednosti ukupnih fenola izražavaju u ekvivalentima galne kiseline, rezultati pojedinih istraživanja iskazani su preko ekvivalenta drugih fenolnih jedinjenja. Gulcin i saradnici (2004) su svoje rezultate prikazali kroz ekvivalente pirokatehola (PE). U acetonskom i hloroformskom ekstraktu herbe *S. sclarea* sa područja Turske, dobijeni postupkom maceracije, količina fenola iznosila je  $35,24 \pm 4,48$  mg PE/g i  $28,91 \pm 3,12$  mg PE/g. Sharopov i saradnici (2018) su u metanolnom ekstraktu herbe i korena (Nemačka) odredili 1771,9 i 658,3 mg fenola/100 g, izraženih na ekvivalentne kafe kiseline (mg CAE/100 g).

Tanini su značajno prisutni u biljnim vrstama roda *Salvia*, naročito grupa kondenzovanih tanina odnosno proantocijanidina (Lu i Foo, 2002). Sadržaj ukupnih tanina u ispitivanim ekstraktima *S. sclarea* se kretao u opsegu od  $27,25 \pm 1,07$  mg GAE/g do  $79,02 \pm 1,62$  mg GAE/g odnosno od  $28,28 \pm 1,01$  mg CE/g do  $77,68 \pm 1,60$  mg CE/g. Ekstrakti iz 2011. godine su sadržali manje tanina u poređenju sa ostalim godinama sakupljanja biljnog materijala, pa je tako najmanje fenola određeno u ekstraktu iz ove godine, EM. Kod grupe etanolnih ekstrakata su oni izrađeni koncentrovanim etanolom, EM i EU, sadržali manje tanina (osim ekstrakta E80T 2011 sa  $27,30 \pm 1,72$  mg GAE/g odnosno  $29,58 \pm 0,73$  mg CE/g fenola). Najviše ukupnih tanina je zabeleženo takođe u etanolnom, ali polarnijem ekstraktu, E60T, iz 2013. godine sa količinom od  $79,02 \pm 1,62$  mg GAE/g ( $77,68 \pm 1,60$  mg CE/g). Kod etanolno-vodenih ekstrakata su oba tipa rastvarača bila slična po efikasnosti, pri čemu je tehnika digestije kod ovih ekstrakata bila nešto uspešnija u ekstrahovanju tanina. Apsolutni i 80% metanol su takođe u obe metode ekstrakcije bili vrlo slični po količini izolovanih tanina sa izuzetkom ekstrakta M80U iz 2012. godine koji je bio visoko efikasan  $76,95 \pm 5,61$  mg GAE/mg ( $75,65 \pm 5,51$  mg CE/mg) i ekstrakta MM 2014 sa minimalnim sadržajem tanina,  $31,41 \pm 1,24$  mg GAE/g ( $30,88 \pm 3,18$  mg CE/g). Posmatrajući podatke RHMZ (2011-2014) o vrednostima srednjih prosečnih mesečnih temperatura i prosečnih padavina, ovi klimatski faktori verovatno nisu od posebnog uticaja na sadržaj ukupnih tanina.

Sadržaj ukupnih flavonoida u ispitivanim ekstraktima *S. sclarea* su se kretali u opsegu od  $18,59 \pm 1,50$  do  $53,97 \pm 0,53$  µg LE/mg, iako se većina ekstrakata karakterisala sadržajem koji je usko varirao od  $21,76 \pm 1,19$  do  $38,52 \pm 2,39$  µg LE/mg. Svi korišćeni rastvarači i ekstrakcione

tehnike su bili slične efikasnosti, osim izuzetaka sa najmanjom (EM 2013) odnosno najvećom količinom flavonoida (MU 2012). U okviru vodeno-etanolnih ekstrakata kod svih godina sakupljanja biljnog materijala primećeno je da 80% etanol ultrazvučnom tehnikom ekstrahovao više flavonoidnih jedinjenja u odnosu na 60% etanol istom metodom. S druge strane kod metode digestije efikasniji rastvarač je bio 60% etanol. To, zapravo, znači da je 80% etanol bio efikasniji u ultrazvučnoj tehnici ekstrakcije, a 60% u metodi digestije. Kod ekstrakata koji su dobijeni koncentrovanim etanolom se, kod svih godina sakupljanja muskatne žalfije, uočava da je ultrazvučna ekstrakcija uspešnija od metode maceracije. Kada su u pitanju metanolni ekstrakti, metoda ultrazvuka se uglavnom pokazala efikasnijom u odnosu na maceraciju kod oba tipa metanolnih rastvarača. Po osnovu statističkih podataka RHMZ (2011-2014) o količini prosečnih mesečnih padavina i temperature, ovi klimatski faktori verovatno nemaju uticaj na sadržaj ukupnih flavonoida. Podaci o sadržaju ukupnih flavonoida su u literaturi vrlo limitirani u odnosu na ukupne fenole. Miliauskas i saradnici (2004) su odredili sadržaj ukupnih flavonoida u ekstraktu herbe muskatne žalfije iz Litvanije, ali izraženi preko ekvivalenata rutina (RE) ( $4,8 \pm 0,5$  mg RE/g). U vodenom, etil-acetatnom i metanolnom ekstraktu herbe turske *S. sclarea* je određeno više flavonoida, sa vrednostima od  $32,69 \pm 3,78$ ,  $35,77 \pm 0,08$  i  $40,59 \pm 0,34$  mg RE/g, redom (Zengin i sar., 2018). Metanolni ekstrakt herbe i korena žalfije sa područja Nemačke su sadržali ukupne flavonoide u količini od 95,4 i 13 mg kvercetin ekvivalenata/100 g, redom (Sharopov i sar., 2018). U istraživanjima se ukupni flavonoidi u ekstraktima najčešće izražavaju upravo preko rutin ekvivalenata kao i preko kvercetin ili katehin ekvivalenata (Marinova i sar., 2005; Pourmorad i sar., 2006; Rolim i sar., 2005), međutim kako naši ekstrakti ne sadrže ove heterozide i aglikone, rezultati su iskazani koristeći luteolin ekvivalente.

Ukupni derivati hidroksicimetne kiseline do sada nisu određivani u ekstraktima *S. sclarea*. Količina ovih jedinjenja je u ispitivanim ekstraktima muskatne žalfije varirala u opsegu od  $3,92 \pm 0,33\%$  do  $13,37 \pm 0,24\%$ . Najmanje UDHK određeno je u ekstraktu EM iz 2011. godine, a najviše u E60T iz 2013. godine. Kod vodeno-etanolnih ekstrakata je metoda digestije bila efikasnija u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju pri korišćenju oba tipa rastvarača i u svim godinama sakupljanja materijala. U ultrazvučnoj ekstrakciji je 80% etanol bio nešto efikasniji, dok je u okviru digestije 80% etanol bio efikasniji u 2011. i 2014. godini, a 60% etanol u 2012. i 2013. godini. S druge strane, metoda ultrazvuka je bila uspešnija u izolovanju derivata cimetne kiseline u odnosu na maceraciju pri korišćenju koncentrovanog etanola (osim kod ekstrakata iz

2012. godine). Ultrazvučna metoda je bila bolja od maceracije pri korišćenju apsolutnog metanola u 2012. i 2013. godini, kao i pri korišćenju 80% metanola u 2011, 2012. i 2013. godini. Sagledavajući statističke podatke RHMZ (2011-2014) i rezultate ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline, količina padavina i temperatura nisu od značajnog uticaja na njihov sadržaj u ekstraktima.

#### **5.4. HPLC KARAKTERIZACIJA EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.**

U ispitivanim ekstraktima *S. sclarea* detektovane su dve fenolne kiseline, ruzmarinska i kafena, kao i tri flavonoidna aglikona flavonskog tipa apigenin, luteolin i salvigenin, i heterozidi apigenin-7-*O*-glukozid i luteolin-7-*O*-glukozid. Najzastupljenije jedinjenje je bila ruzmarinska kiselina.

Količine ruzmarinske kiseline kretale su se u opsegu između  $78,37 \pm 0,22$  i  $279,82 \pm 1,20$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ . Najmanje količine su kvantifikovane u ekstraktima pripremljenim koncentrovanim etanolom iz 2011, naročito u EM ekstraktu, a kod kojih je određeno i najmanje ukupnih fenola i tanina. Najviši nivo ruzmarinske kiseline određen je u ekstraktu E80T iz 2013 kod kog čak 28% ( $279,82 \pm 1,20$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mase čini ovo jedinjenje. Kod vodeno-etanolnih ekstrakata je u ekstrakciji ruzmarinske kiseline bio značajno efikasniji 80% etanol u odnosu na 60%, pri čemu je metoda digestije generalno dala bolje rezultate. Kod metanolnih ekstrakata su obe metode ekstrahovanja i oba tipa rastvarača bile uglavnom slične efikasnosti. Za razliku od ruzmarinske, količine kafene kiseline su bile značajno niže i kretale su se u prilično uskom opsegu od  $0,41 \pm 0,01$  (EU 2012) do  $1,32 \pm 0,06$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (E80T 2011). Ekstrakti pripremljeni 80% etanolom su značajno više sadržali kafenu kiselinu u odnosu na 60%, pri čemu je metoda sa povišenom temperaturom ekstrakcije bila uspešnija u odnosu na ultrazvučnu. Kod metanolnih ekstrakata je 80% metanol bio efikasniji od apsolutnog, kao i metoda maceracije u odnosu na ultrazvučnu. U odnosu na druge godine sakupljanja biljnog materijala, niži nivoi ruzmarinske kiseline su zabeleženi u ekstraktima iz 2011. godine (osim M80M) koja je juna i jula bila topla i sa padavinama nešto ispod, odnosno oko granica normale, redom (RHMZ, 2011). Kafena kiselina je bila dominantnija u ekstraktima iz 2011. i 2014. godine u odnosu na one iz 2012. i 2013. godine koje su prema podacima RHMZ bile sušnije (naročito 2012. godina) (RHMZ, 2012; RHMZ 2013.).

Prema podacima dosadašnjih ispitivanja u ekstraktima muskatne žalfije su pored ruzmarinske i kafene kiseline identifikovane i galna, hlorogenska, ferulinska, elagna, *p*-kumarinska, *o*-kumarinska, vanilinska, siringinska, cimetna, benzoeva, 3-hidroksibenzoeva, 3,4-dihidroksibenzoeva, i *p*-hidroksibenzoeva kiselina (Jasicka-Misiak i sar., 2018; Kan i sar., 2007; Sharopov i sar., 2018; Zengin i sar., 2018). U istraživanju Kan i saradnika (2007) definisan je sadržaj ovih fenolnih jedinjenja u pojedinačnim biljnim organima (listu, korenu, cvetu i stablu) žalfije sa područja Turske. Najviša koncentracija ruzmarinske kiseline određena je u stablu (5,961 ng/g), zatim u cvetovima (3,54 ng/g) i korenu (2,921 ng/g), a najmanje je bila zastupljena u listu (2,21 ng/g). Kafena kiselina je s druge strana bila najzastupljenija u listu sa koncentracijom od 444 ng/g, potom u stablu, cvetovima i korenu (103 ng/g, 88 ng/g i 79 ng/g, redom). Galna kiselina je bila dominantna u listovima (8,686 ng/g), dok je hlorogenska u najvećoj količini kvantifikovana u stablu (252 ng/g) (Kan i sar., 2007). Za razliku od lista turske muskatne žalfije u listu litvanske kvantifikovana je značajnija količina ruzmarinske kiseline od 41,10 mg/g (Bandoniene i sar., 2005). Kada su u pitanju nivoi fenolnih kiselina u ekstraktima *S. sclarea* iz dosadašnjih istraživanja primetno je da su njihovi sadržaji niži od onih iz našeg ispitivanja. Konkretno, u metanolnom ekstraktu herbe turske muskatne žalfije zabeleženo je svega 56,30 mg/g ruzmarinske kiseline, a u vodenom 37,70 mg/g (Ozturk i sar., 2011). Janicsak i saradnici (1999) su u metanolnom ekstraktu lista mađarske žalfije kvantifikovali samo 3,9 mg/g ruzmarinske i 0,08 mg/g kafene kiseline (Janicsak i sar., 1999). U istraživanju Zengin i saradnika (2018) turske *S. sclarea* primećena je značajna razlika u sadržaju ruzmarinske i kafene kiseline u odnosu na primenjeni rastvarač i njihovu polarnost. Najveća količina ruzmarinske kiseline izolovana je metanolom (26610±408 µg/g), zatim vodom (10104±166 µg/g), a najmanja etil- acetatom kao najmanje polarnim ekstrakcionim sredstvom (620±14 µg/g). Kod kafene kiseline je vodeni ekstrakt bio najbogatiji (398±8 µg/g), zatim metanolni (270±6 µg/g), i na kraju etil-acetatni koji je, ponovo, kao izrazito nepolaran rastvarač ekstrahovao najmanju količinu aktivnog principa (42±4 µg/g). Od ostalih fenolnih kiselina u ovim ekstraktima su kvantifikovane i hlorogenska, ferulinska, *p*-kumarinska, *o*-kumarinska, siringinska, cimetna, benzoeva, 3,4-dihidroksibenzoeva (protokatehinska), i *p*-hidroksibenzoeva kiselina, pri čemu je etil-acetat ekstrahovao najniže količine ovih metabolita (Zengin i sar., 2018). Sharopov i saradnici (2018) su u metanolnom ekstraktu herbe i korena nemačke žalfije određivali sadržaj tri fenolne kiseline. Ekstrakt herbe je sadržao najviše ruzmarinske (54,5%), potom *p*-kumarinske (9,4%), pa kafene



kiseline (3,1%). S druge strane u ekstraktu korena je bila zastupljenija kafena (8,8%), manje ružmarinska (1,2%) i najmanje *p*-kumarinska kiselina (0,5%) (Sharopov i sar., 2018).

U ekstraktima muskatne žalfije iz našeg istraživanja potvrđeno je prisustvo flavonoida flavonskog tipa, luteolina, apigenina i njihovih 7-*O*-glukozida, i salvigenina. Kada je u pitanju sadržaj flavonoidnih aglikona u ispitivanim ekstraktima primetno je da je koncentrovani etanol, u obe ekstrakcione metode, izolovao najveću količinu ovih jedinjenja u svim godinama sakupljanja biljnog materijala. Aglikoni su u najvećoj količini određeni u ekstraktima EM i EU iz 2012. godine (luteolin u EM:  $4,98 \pm 0,22$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ; apigenin i salvigenin u EU:  $2,80 \pm 0,11$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  i  $13,24 \pm 0,26$ , redom). S druge strane, ovaj rastvarač je bio najmanje efikasnosti u ekstrakciji heterozida, glukozida. S obzirom na to da su aglikoni jedinjenja niže polarnosti u odnosu na odgovarajuće heterozide očekivano je i da rastvarač sa najmanjom polarnošću, koncentrovani etanol, bude najefikasniji u njihovom izolovanju iz biljnog materijala. Prednost se, kod većeg broja ekstrakata pripremljenih koncentrovanim etanolom, u izolovanju flavonoida pripisuje ultrazvučnoj metodi. Kod vodeno-etanolnih ekstrakata je uspešnost ekstrahovanja aglikona bila veća sa 80% etanolom u odnosu na 60% i kod ultrazvučne i kod metode digestije, dok je kod heterozida bila slična sa oba rastvarača. Za razliku od etanolnih, kod metanolnih ekstrakata nije uočena razlika u ekstrakciji aglikona i heterozida između apsolutnog i 80% metanola, kao i između primenjenih ekstrakcionih tehnika. Najveće količine aglikona i glukozida su, sa par izuzetaka, određene u ekstraktima iz 2012. i 2013. godine. Prema podacima RHMZ u junu i julu 2012. i 2013. su na teritoriji Niša i niškog okruga zabeležene niže količine prosečnih padavina u odnosu na 2011. i 2014, pri čemu se 2012. godine smatrala i ekstremno toplom (RHMZ, 2011-2014). U studiji Zengin i saradnika (2018) zabeležena je uglavnom niža koncentracija apigenina i luteolina u ekstraktima *S. sclarea* iz Turske u odnosu na ekstrakte iz našeg istraživanja. Naime, etil-acetat kao najmanje polaran rastvarač nije bio uspešan u ekstrakciji luteolina, dok su polarni metanol i voda izolovali ovaj flavon tako da je koncentracija iznosila  $1314 \pm 112$   $\mu\text{g}/\text{g}$  odnosno  $658 \pm 56$   $\mu\text{g}/\text{g}$ , redom. S druge strane, etil-acetat je uspeo da ekstrahuje apigenin ali u manjoj količini u odnosu na metanol i vodu ( $932 \pm 24$  vs  $1744 \pm 48$  i  $948 \pm 14$   $\mu\text{g}/\text{g}$ ). Na osnovu ovih rezultata zaključuje se da je metanol optimalan rastvarač za ekstrakciju apigenina i luteolina (Zengin i sar., 2018).

Prema dosadašnjim literaturnim podacima kod biljne vrste *S. sclarea* su upravo prisutna flavonoidna jedinjenja flavonskog tipa (Adzet i sar., 1988; Lu i Foo, 2002; Ulubelen i sar.,

1994). Ulubelen i saradnici (1994) su u acetonском ekstraktu herbe identifikovali i izolovali flavone: apigenin, luteolin, 4'-metilapigenin, salvigenin, 6-hidroksiluteolin-6,7,3',4'-tetrametil etar i 6-hidroksi apigenin-7,4'-dimetil etar. Adzet i saradnici (1988) su u vodeno-metanolnom ekstraktu lista žalfije iz Španije detektovali takođe apigenin, luteolin i salvigenin, kao i genkvanin i krizoeriol. Međutim, u istraživanjima novijeg datuma primećeno je i prisustvo drugih tipova flavonoida u ekstraktima *S. sclarea*. Jasicka-Misiak i saradnici (2018) u metanolnom ekstraktu lista (Ukrajina i Poljska) pored flavona luteolina i krizina detektovali i flavonole, kempferol i miricetin i flavanon pinocembrin. U još jednom ispitivanju novijeg datuma Zengin i saradnici (2018) prikazuju da metanolni ekstrakt herbe žalfije sa područja Turske pored apigenina i luteolina sadrži i katehin, kvercetin, hesperidin i rutin.

### 5.5. ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

Slobodni radikali su poslednjih decenija sve više prepoznati u etiologiji mnogih bolesti, što je dovelo je do razvoja novih pristupa u biohemijskim procenama povezanih sa mutagenezom, tumorogenezom i promocijom kancera. Stoga unos prirodnih antioksidanasa u dovoljnim količinama može delovati protektivno u smislu uklanjanja slobodnih radikala pre nego što do oštećenja tkiva dođe (Baricevic i Bartol, 2000). Kao što je poznato, biljne vrste roda *Salvia* se karakterišu aktivnim principima polifenolne i terpenke prirode koji su upravo odgovorni za snažne antioksidativne efekte (Alimpić, 2016). Iako je antioksidativna aktivnost polifenola povezana sa različitim mehanizmima, njihova povišena reaktivnost prema slobodnim radikalima se smatra najvažnijim mehanizmom (Roginsky i Lissi, 2005).

U ovom istraživanju je antioksidativna aktivnost ekstrakata *S. sclarea* procenjivana u dva *in vitro* test sistema. U DPPH testu ekstraktima je određivan kapacitet hvatanja slobodnih radikala odnosno praćena je antiradikalska aktivnost ekstrakata. Fenolna jedinjenja prisutna u ekstraktima su tokom eksperimenta reagovala sa stabilnim DPPH· radikalom ljubičaste boje koji je nakon primanja protona (vodonika) preveden u DPPH redukovanu formu koja je praćena promenom boje u žutu (Molyneux, 2003). DPPH molekul ne može stupiti u reakciju sa flavonoidima koji u B prstenu ne sadrže OH- grupe, kao ni sa aromatičnim kiselinama koje imaju samo jednu OH- grupu (Roginsky i Lissi, 2005). Svi ispitivani ekstrakti muskatne žalfije su ispoljili antiradikalsku aktivnost u ovom test sistemu sa opsegom IC<sub>50</sub> vrednosti 16,83-58,89 µg/ml. Tako je najefikasniji ekstrakt bio MU iz 2012. godine koji se karakterisao

vrlo visokim sadržajem ruzmarinske kiseline ( $251,04 \pm 1,23 \mu\text{g/ml}$ ) koji je bio najviši u 2012. godini, kao i drugi po redu od svih ispitivanih ekstrakata, nakon E80T iz 2013 ( $279,82 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$ ). U ekstraktu MU 2012, je određena i visoka koncentracija flavonoidnih heterozida, dok su ostala jedinjenja bila prosečno zastupljena. Najmanji antiradikalni kapacitet imali su ekstrakti EU i EM iz 2011. godine sa  $IC_{50}$  vrednostima  $>50 \mu\text{g/ml}$ . U njima je određena najniža količina ruzmarinske kiseline u okviru 2011. godine, ali i u odnosu na sve ostale ekstrakte. Količine heterozida su takođe bile niske što je u skladu sa korišćenim tipom rastvarača. S druge strane količina izolovanih flavonoidnih aglikona je bila značajna, kao i kod ostalih ekstrakata koji su izrađeni koncentrovanim etanolom. Metanolni ekstrakti su uglavnom bili potentniji od etanolnih u ispoljavanju antiradikalne aktivnosti u DPPH testu, sa pojedinim  $IC_{50}$  vrednostima i  $<20 \mu\text{g/ml}$ . Ultrazvučna ekstrakcija je kod metanolnih ekstrakata bila efikasnija u izolovanju antioksidativnih jedinjenja, sa sličnom aktivnošću apsolutnog i 80% metanola. Kod etanolnih ekstrakata su jaču antioksidativnu aktivnost u ovom testu ispoljili oni koji su pripremljeni 80% etanolom, u odnosu na 60% i koncentrovani etanol. Kod vodenometanolnih ekstrakata je metoda digestije bila uglavnom efikasnija u izolovanju supstanci sa antiradikalnim dejstvom. Korišćeni standardni antioksidansi su u DPPH test modelu imali izuzetne antioksidativne efekte sa  $IC_{50}$  vrednostima koje su bile značajno niže od ekstrakata. Međutim, izuzetak je bila aktivnost BHT-a čija je vrednost inhibitorne koncentracije bila slična ili čak veća od pojedinih ekstrakata. Razlog ove niže antioksidantne aktivnosti jedinjenja BHT najverovatnije leži u sporijem reagovanju sa  $DPPH\cdot$  molekulom koje uključuje kompleksniji mehanizam reakcije. On podrazumeva najpre klasičnu reakciju neutralizacije  $DPPH$  radikala nakon čega može nastati keto forma BHT molekula koja nakon regeneracije OH grupe i dimerizacije ponovo može reagovati sa  $DPPH\cdot$ . Takođe može doći i do trećeg procesa tj. kompleksiranja (Bondet i sar., 1997).

Drugi metod testiranja antioksidativne efikasnosti ekstrakata muskatne žalfije odnosio se na ispitivanje antilipoperoskidne aktivnosti u BKL sistemu. Ovaj test antioksidativne aktivnosti se zasniva na kompetitivnom obezbojavanju  $\beta$ -karotena tokom oksidacije linolne kiseline oksigenisanom vodom. Ovaj karotenoid, kao efikasan antioksidans, sprečava formiranje peroksida linolne kiseline "trošeći se" i obezbojavajući se. Međutim, dodavanjem potencijalnih antioksidanasa (npr. ekstrakata), čija se efikasnost ispituje, zaustavlja se raspadanje  $\beta$ -karotena i zadržava žuta boja sistema (Roginsky i Lissi, 2005). Ekstrakti muskatne žalfije su se pokazali

vrlo aktivnim u BKL modelu testiranja antilipoperoksidne aktivnosti sa opsegom  $IC_{50}$  vrednosti od  $10,61 \pm 0,54$  do  $66,00 \pm 2,22$   $\mu\text{g/ml}$ . Pojedini ekstrakti su bili efikasniji i od primenjenih standarda, kao što su askorbinska i ruzmarinska kiselina čije su  $IC_{50}$  vrednosti bile  $22,95 \pm 1,52$   $\mu\text{g/ml}$  i  $32,55 \pm 1,62$   $\mu\text{g/ml}$ , redom. S druge strane su BHT, BHA i  $\alpha$ -tokoferol, jedinjenja značajno niže polarnosti, bila izrazito jaka antilipoperoksidna sredstva. Kod etanolnih ekstrakata su oni izrađeni 60% etanolom bili najaktivniji u inhibiciji produkcije peroksida kod obe ekstrakcione tehnike. Najistaknutiji etanolni ekstrakt u BKL test sistemu bio je E60U 2011 sa najnižom  $IC_{50}$  od  $10,61 \pm 0,54$   $\mu\text{g/ml}$ . Ovaj ekstrakt je sadržao umerene koncentracije ispitivanih fenolnih kiselina i flavonoida, i nije se posebno istakao u sadržaju nekog od njih, te se upravo ovakav sastav i odnos aktivnih jedinjenja može smatrati najpovoljnijim za ovu vrstu antioksidativne aktivnosti. Ekstrakti pripremljeni koncentrovanim etanolom su u svakoj godini bili najlošiji antioksidansi u BKL testu, pri čemu su se karakterisali uglavnom nižom koncentracijom ukupnih fenola i tanina, fenolnih kiselina i flavonoidnih heterozida u odnosu na sve ostale ekstrakte. Metanolni ekstrakti su bili približnih  $IC_{50}$  vrednosti kao i vodeno-etanolni pri čemu su obe tehnike ekstrakcije i oba rastvarača bile slične efikasnosti. M80U iz 2014. godine je sa  $IC_{50}$  od  $12,53 \pm 0,20$   $\mu\text{g/ml}$  bio najbolji sa umerenim sadržajem ispitivanih jedinjenja.

Ukupna fenolna jedinjenja se mogu u značajnoj meri smatrati odgovornim za ispoljenu antiradikalnu aktivnost ekstrakata u DPPH sistemu. Dobra povezanost sa ovom vrstom aktivnosti uočava se takođe i sa ukupnim derivatima hidroksicimne kiseline i nešto slabije sa ukupnim flavonoidima i taninima. Fenolna jedinjenja, u koje spadaju i tanini i flavonoidi kao i ostali derivati cimene kiseline inače visoko koreliraju sa dobrom antioksidativnom aktivnošću (Amarowicz i sar., 2005; Cao i sar., 1997; Zheng i Wang, 2001). Međutim, njihova povezanost sa antilipoperoksidnim efektom nije uočena. Kada su u pitanju konkretna jedinjenja najbolja veza antiradikalne DPPH aktivnosti je uočena sa ruzmarinskom kiselinom, ali njen uticaj na aktivnost u BKL sistemu nije od značaja. Sa kafenom kiselinom su korelacije bile veoma niske, stoga se ona ne povezuje sa antioksidativnim efektima. Luteolin- i apigenin-7-*O*-glukozid su u manjoj meri odgovorni za DPPH antioksidativnu aktivnost, za razliku od BKL sistema u kom je veza sa ovim heterozidima bila snažnija. Aglikoni nisu korelirali sa ispoljenom antioksidativnom aktivnošću pa se ne smatraju odgovornim za ovu aktivnost.

Antioksidativne karakteristike muskatne žalfije su najispitanije kod ekstrakata čiji su biljni materijali sakupljeni sa različitih lokaliteta Turske. Ogutcu i saradnici (2008) su ispitivali antioksidativnu aktivnost ekstrakata lista *S. sclarea* sa područja Turske u istim test sistemima kao i kod ispitivanih ekstrakata sa našeg podneblja. U odnosu na ekstrakte muskatne žalfije sa našeg podneblja, ovi ekstrakti se mogu smatrati slabijim antioksidansima. Naime, heksanski i dihlormetanolni ekstrakti listova su bili potpuno inaktivni u DPPH sistemu, dok je metanolni bio aktivan sa inhibitornom koncentracijom  $IC_{50}=69,30\pm 1,50$   $\mu\text{g/ml}$ . U metodi  $\beta$ -karoten/linolna kiselina su sva tri ekstrakta, pri koncentraciji od 2 g/l, ispoljila antilipoperoksidne osobine sa vrednostima inhibicija od 31% za heksanski, 60,9% za dihlormetanolni i 76,6% za metanolni ekstrakt. Rezultati ove studije ukazuju da su polarna jedinjenja koja se ekstrahuju metanolom najvećim delom odgovorna za antioksidativne, naročito antiradikalske, efekte muskatne žalfije (Ogutcu i sar., 2008). Slične zaključke doneli su i Orhan i saradnici (2007), (Turska) jer je metanolni ekstrakt lista bio signifikantno aktivniji u DPPH testu ( $87,8\pm 1,13\%$ ) u odnosu na nepolarni petroletarski, hloroformski i etil-acetatni ekstrakt sa inhibicijama od  $22,6\pm 0,73\%$ ,  $54,2\pm 3,93\%$  i  $72,8\pm 2,66\%$ , redom. S druge strane, međutim, u testu inhibicije ksantin oksidaze metanolni ekstrakt je ispoljio nešto slabije efekte u poređenju sa etil-acetatnim, što upućuje da su nepolarna jedinjenja odgovorna za efekat inhibicije enzima, dok su polarna za antiradikalski (Orhan i sar., 2007). Gulcin i saradnici (2004) su antioksidativne karakteristike acetonskog i hlorofomskog ekstrakta herbe istraživali sa više aspekata. Antiradikalska aktivnost ispitana je u DPPH test sistemu gde je hloroformski bio aktivniji od acetonskog ekstrakta, dok je inhibicija lipoperoksidacije praćena u tiocijanatnoj metodi gde su oba ekstrakta bila izuzetne aktivnosti, veće čak i od  $\alpha$ -tokoferola (93% i 68%, redom vs. 46%). Pored slobodnih DPPH· radikala ekstrakti su bili aktivni i u hvatanju superoksid anjon radikala i vodonik-peroksida. Oba ekstrakta su bila vrlo sličnih redukcionih osobina u metodi transformacije  $\text{Fe}^{3+}$  u  $\text{Fe}^{2+}$ , kao i helirajućih u testu sposobnosti vezivanja jona  $\text{Fe}^{2+}$  (Gulcin i sar., 2004). Podrobna ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata turske *S. sclarea* prikazali su i Zengin i saradnici (2018). Ukupan antioksidativni kapacitet definisan je u fosfomolibdenskoj analizi gde je najistaknutiji bio metanolni, a zatim vodeni i etil-acetatni ekstrakt. Redukcione osobine pomenutih ekstrakata praćene su u FRAP i CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) testu u kojima se vodeni ekstrakt pokazao najuspešnijim. Ovaj ekstrakt je takođe bio i najbolje helirajuće sredstvo i hvatač ABTS radikala, dok je u DPPH testu to bio metanolni sa aktivnom koncentracijom od

192,58±0,44 mg Trolox ekvivalenta (TE)/g (kod etil-acetatnog je iznosila 66,09±2,02 mg TE/g, a kod vodenog 166,34±5,57 mg TE/g) (Zengin i sar., 2018). U studiji Bozan i saradnika (2002) *S. sclarea*, takođe sa područja Turske, nije pokazala zavidne rezultate u poređenju sa drugim *Salvia* vrstama koje su ispitivane. U DPPH antiradikalnoj aktivnosti metanolni ekstrakt herbe nije pokazivao aktivnost veću od 20% čak i pri najvećoj koncentraciji od 200 g/kg. U odnosu na ostale žalfije muskatna je zauzela predzadnje mesto: *S. crhysophylla*>*S. halophila*>*S. tomentosa*>*S. fruticosa*>*S. cryptacantha*>*S. cilicica*>*S. sclarea*>*S. palaestina*. Ekstrakt je slične antioksidativne karakteristike pokazao i u testu ispitivanja kapaciteta inhibicije formiranja peroksida linolne kiseline sa Fe<sup>2+</sup>, dok je bio potpuno inaktivan u tzv. Rancimat metodi (Bozan i sar., 2002). Praćen je i antioksidativni kapacitet metanolnih ekstrakata herbe muskatne žalfije koja je sakupljana u tri različita perioda dana (ujutru, podne i uveče) u julu i junu, dve uzastopne godine, ponovo sa područja Turske. Tulukcu i saradnici (2009) nisu primetili značajnu razliku u vrednostima IC<sub>50</sub> kod DPPH testa i vrednostima mg ekvivalenta askorbinske kiseline/g kod fosfomolibdenske metode u odnosu na prethodno navedene parametre. Inhibitorne koncentracije, IC<sub>50</sub>, su se kretale u uskom opsegu od 23,49 do 45,70 µg/ml i u saglasnosti su sa rezultatima naših ekstrakata (Tulukcu i sar., 2009). Yuce i saradnici (2014) su u ABTS test sistemu odredili ukupni antioksidativni status ekstrakata dobijenih ekstrakcijom listova turske muskatne žalfije. Autori su utvrdili da etanolni ekstrakt ispoljava najjaču aktivnost, iako ona nije bila značajno veća od aktivnosti polarnijeg vodenog i nepolarnijeg heksanskog ekstrakta (Yuce i sar., 2014).

Loizzo i saradnici (2014) su utvrdili da metanolni ekstrakt herbe muskatne žalfije, u grupi od devet ispitanih *Salvia* vrsta iz Irana, ispoljava odličan efekat hvatanja slobodnih radikala u DPPH testu (IC<sub>50</sub>=4,8±0,1 µg/ml), koji se čak poredi sa antiradikalnom aktivnošću askorbinske kiseline čija je IC<sub>50</sub> vrednost iznosila 5,0±0,8 µg/ml. Ekstrakt *S. sclarea* je bio značajno aktivniji od ekstrakata *S. atropana*, *S. ahendica*, *S. xanthochelia*, *S. macrosiphon*, *S. chloroleuca*, *S. ceratophylla* i *S. hydrangea*, ali i nešto slabiji u poređenju sa *S. glutinosa* ekstraktom (IC<sub>50</sub>=3,2±0,3 µg/ml). U poređenju sa ekstraktima sa našeg područja ova iranska muskatna žalfija je ispoljila snažniju antiradikalnu aktivnost iako je sadržaj ukupnih polifenola bio značajno niži. U istoj studiji ekstrakti su ispitani i na antioksidativnu aktivnost u ABTS testu koji podrazumeva relativnu procenu sposobnosti ekstrakta da neutrališe ABTS<sup>•+</sup> radikal u odnosu na Trolox, hidrosolubilnu formu vitamina E. Metanolni ekstrakt herbe *S. sclarea* se i u ovom testu pokazao izuzetnim, jer je bio efikasniji od ekstrakata svih spomenutih *Salvia* vrsta, osim

*S. glutinosa*, slično kao kod DPPH modela. S druge strane, u FRAP test sistemu, u kom se meri redukciona moć ekstrakta jona  $Fe^{3+}$  do jona  $Fe^{2+}$ , ekstrakt *S. sclarea* je bio niže efikasnosti u poređenju sa ekstraktima *S. hydrangea*, *S. glutinosa* i *S. ceratophylla* (Loizzo i sar., 2014). Još jedna studija sa iranskom muskatnom žalfijom pokazuje da je u FRAP metodi ona manje aktivna u odnosu na *S. officinalis* i *S. nemorosa*. Ovi FRAP antioksidativni efekti žalfija praćeni su u metanolnim ekstraktima herbe (Derakhshani i sar., 2012).

Stagos i saradnici (2012) su kod metanolnog i vodenog ekstrakta herbe muskatne žalfije sa teritorije Grčke definisali DPPH antiradikalske aktivnosti koje su generalno bliske aktivnostima naših ekstrakata. Njihove  $IC_{50}$  vrednosti iznosile su  $25 \pm 0,5 \mu\text{g/ml}$  kod metanolnog i  $27 \pm 0,6 \mu\text{g/ml}$  kod vodenog ekstrakta. Efekti ovih ekstrakata u DPPH modelu su bili slični ili nešto slabiji od drugih ispitivanih grčkih *Salvia* vrsta: *S. argentea*, *S. pomifera* ssp. *calycina*, *S. pomifera* ssp. *pomifera*, i *S. fruticosa*. Metanolni ekstrakt grčke muskatne žalfije je bio efikasniji od vodenog i u ABTS testu, kao i u specifičnim testovima u kojima praćena sposobnost ekstrakata da spreče oštećenje DNK molekula dejstvom hidroksil- i peroksil- radikala (Stagos i sar., 2012). Prethodno su Couladis i saradnici (2003) u specifičnom antioksidativnom testu, u kome je određivan stepen inhibicije superoksidacije arahidonske kiseline bleomicin-Fe (II) kompleksom, procenili efekte metanolnih ekstrakata *Salvia* vrsta iz Grčke. Oni su utvrdili da ekstrakt *S. sclarea* ima istovetne efekte kao i standard  $\alpha$ -tokoferol, ekstrakt *S. ringens* i *S. pomifera* ssp. *calycina*, kao i bolje od ekstrakta *S. fruticosa* (Couladis i sar., 2003).

U ispitivanju DPPH antioksidativne aktivnosti listova četiri *Salvia* vrste iz Litvanije uočeni su odlični kapaciteti hvatanja slobodnih radikala od strane metanolnih ekstrakata *S. officinalis*, *S. glutinosa* i *S. sclarea*. Ekstrakti su već sa koncentracijom od  $50 \mu\text{g/ml}$  postigli kompletnu inhibiciju DPPH molekula, dok je ekstrakt *S. aethiopsis* dostigao do 64% inhibicije (Bandoniene i sar., 2002). Odlične antiradikalske efekte u DPPH sistemu ispoljili su i metanolni ekstrakti listova iz Indije, sa tri različita lokaliteta, sa vrednostima inhibicija od 71,9%, 80,4% i 89,5%. Oni su bili efikasni i u neutralisanju superoksid radikala ( $O_2^-$ ) i redukciji oštećenja DNK molekula dejstvom hidroksil- radikala. Biljni materijal sa lokaliteta Srinagar sa umerenim klimatskim faktorima se pokazao optimalnim u fiziološkim i biohemijskim ispitivanjima za ispoljavanje maksimalne antioksidativne aktivnosti (Kaur i sar., 2015). Litvanska muskatna žalfija se takođe može smatrati dobrima antioksidansom, naročito kada je reć o metanolnom ekstraktu herbe, sa visokim stepenom inhibicije u DPPH testu od  $92,9 \pm 0,4\%$ , i ABTS testu

(64%). Etil-acetatni i acetonski ekstrakti su bili niže efikasnosti sa vrednostima inhibicija od  $21,5 \pm 1,8\%$  i  $17,8 \pm 3,4\%$ , redom (DPPH) (Miliauskas i sar., 2004). Metanolni ekstrakt herbe je u odnosu na ekstrakt korena muskatne žalfije iz Nemačke bio potentniji u antiradikalskom DPPH testu ( $IC_{50} = 21,6 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$  vs.  $65,9 \pm 5,3 \mu\text{g/ml}$ ), a takođe i u ABTS sistemu. S druge strane, ekstrakt korena je bio efikasniji kod antilipoperoksidnog Fe-tiocijanatnog testa. Sharopov i saradnici (2018) ističu da je herba značajno bogatija ruzmarinskom i *p*-kumarinskom, a koren kafenom kiselinom. Značajne DPPH - antioksidativne efekte ispoljili su i metanolni ekstrakti listova ukrajinskog (C785) i poljskog varijeteta (Aj-Todor) *S. sclarea* sa inhibicijama od  $83,4 \pm 3,7\%$  i  $67,7 \pm 2,1\%$ , redom (Jasicka-Misiak i sar., 2018). S druge strane, vodeni ekstrakt herbe *S. sclarea* sa teritorije Francuske nije pokazao značajne antioksidativne sposobnosti u DPPH i ABTS testu, sa svega  $0,19 \pm 0,08\%$  i  $0,15 \pm 0,26\%$  inhibicije, redom, za razliku od ekstrakata ostalih ispitivanih biljnih vrsta čije su se vrednosti inhibicija kretale i do  $94,51 \pm 0,01\%$  odnosno  $99,80 \pm 0,07\%$ . Takođe, i u ORAC, FRAP i testu inhibicije superoksid dizmutaze ekstrakt nije imao značajnih efekata (Dudonne i sar., 2009).

## 5.6. ANTIMIKROBNA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.

Aromatične biljne vrste su od davnina prepoznate i široko se koriste kao antibakterijska, antifungalna, antivirusna ili antiparazitna sredstva (Khoury i sar., 2016). Antimikrobna svojstva ovih vrsta se pripisuju prisustvu sekundarnih metabolita: terpena, flavonoida, fenolnih kiselina, tanina i drugih fenola. Etarska ulja zbog svoje lipofilnosti i sadržaja nisko-molekularnih lipofilnih jedinjenja lakše prodiru kroz ćelijsku membranu mikroorganizma u odnosu na ekstrakte (Alimpić, 2016).

Obimni literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti biljnih vrsta roda *Salvia* pokazuju široku varijabilnost u pogledu osetljivosti mikroorganizama (Baricevic i Bartol, 2000). Žalfije, slično kao i većina biljnih vrsta, efikasnije utiču na rast Gram (+) bakterija u odnosu na Gram (-) (Alimpić, 2016). Antimikrobna aktivnost etarskih ulja žalfija nastaje usled sinergističkog delovanja glavnih jedinjenja kao što su limonen, linalool, 1,8-cineol, kariofileni i dr., dok su kod ekstrakata za ove efekte zaduženi, pre svega, flavonoidi, fenolne kiseline i tanini (Cowan, 1999; Lee i sar., 2010; Sonboli i sar., 2006). U poređenju sa ekstraktima etarska ulja pokazuju snažnije antimikrobne efekte iz razloga što njihov sastav čine lipofilni molekuli sa malom molekulskom masom koji kao takvi lakše prolaze kroz membranu patogena (Cowan, 1999). Ekstrakti i etarska



ulja *Salvia* vrsta efikasno deluju na rast i razvoj mnogih bakterijskih vrsta i gljivica, a naročito je od značaja što svoju aktivnost ispoljavaju na frekventne patogene kao što su *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichophyton* spp., *Cryptococcus* spp., *Microsporium* spp., *Fusarium* spp. i dr. (Alimpić i sar., 2017; Delamare i sar., 2007; Dulger i sar., 2008; Ebrahimabadi i sar., 2010; Haznedaroglu i sar., 2001; Kamatou i sar., 2005; Kamatou i sar., 2007; Kamatou i sar., 2008; Karatas, 2010; Khan i sar., 2002; Kostić i sar., 2015; Salah i sar., 2006; Tan i sar., 2016; Tepe i sar., 2005).

Antibakterijska aktivnost ekstrakata muskatne žalfije ispitana je na Gram (+) i Gram (-) bakterije. Značajna razlika u antimikrobnoj aktivnosti nije uočena u odnosu na tipove ekstrakata. Mada nema velikih razlika u efektima ekstrakata između godina sakupljanja biljnog materijala, generalno se može smatrati da su ekstrakti iz 2012. godine bili najaktivniji. Zaključak ove studije je i da se ekstrakti mogu smatrati boljim bakteriostatskim agensima nego baktericidnim, kao i da su Gram (+) bakterije osetljivije na delovanje ekstrakata u poređenju sa Gram (-). S obzirom na veliku zastupljenost i sve veću rezistentnost stafilokoka vrlo je značajno da ekstrakti muskatne žalfije ispoljavaju dobra antibakterijska svojstva prema *S. aureus*. Najefikasniji ekstrakt u smislu bakteriostatskog i baktericidnog delovanja je ekstrakt E60T 2012, sa MIC/MBC vrednostima od 6,25/12,5 mg/ml. Ovaj ekstrakt je bio efikasan i prema ostalim Gram (+) bakterijama. U njemu je zabeležena visoka koncentracija ruzmarinske kiseline, ali se u odnosu na druge uzorke karakteriše visokim sadržajem luteolin-7-*O*-glukozida. Na ostale Gram (+) bakterije ekstrakti muskatne žalfije su imali umerenu aktivnost prema *B. cereus* i *L. monocytogenes*, dok su *E. faecalis*, *S. pneumoniae* i *S. pyogenes* bile manje osetljive. MIC vrednosti ekstrakata za *B. cereus* varirale su u rasponu od 6,25-50 mg/ml, osim za M80U kod koga je 100 mg/ml. S druge strane, MIC ruzmarinske kiseline je, očekivano, bio dosta niži i iznosio je čak 0,06 mg/ml. Značaj bakteriostatke aktivnosti prema ovoj bakteriji je u tome što može biti uzročnik alimentarnih infekcija praćenih mučninom, gađenjem i povraćanjem (Kotiranta i sar., 2000). Inhibitorna aktivnost prema bakteriji *L. monocytogenes* (opseg MIC vrednosti 12,5-100 mg/ml) može biti od koristi u sprečavanju nastanka listerioza, koje su takođe povezane sa kontaminacijom hrane (Ramaswamy i sar., 2007). Iako su ekstrakti bili slabi u uništavanju *E. faecalis* i *S. pneumoniae*, ruzmarinska kiselina je, s druge strane, ispoljila veoma snažnu

bakteriostatsku i baktericidnu aktivnost sa MIC/MBC vrednostima koje se približavaju standardima. Izuzetni antimikrobni efekti ruzmarinske kiseline su potvrđeni i kod drugih Gram (+) bakterija: *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. warneri*, *Corynebacterium*, sa MIC i MBC vrednostima u opsegu od 0,6 do 2,5 mg/ml (Abedini i sar., 2013). Dihlormetanske frakcije acetonskih ekstrakata korena muskatne žalfije (gajena na polju i u laboratorijskim uslovima) iz Poljske su u odnosu na ekstrakte iz ovog istraživanja pokazale značajno bolje efekte na Gram (+) ekstrakte. MIC vrednosti ovih ekstrakata za *S. aureus* su iznosile 150 i 75 µg/ml, redom, dok su za *E. faecalis* bile 75 µg/ml (Kuzma i sar., 2007). Autori posebno ističu snažnu aktivnost prema bakteriji *Staphylococcus epidermidis* sa MIC vrednostima od 37,5 µg/ml. Chovanova i saradnici (2013) su utvrdili da i ekstrakt i etarsko ulje *S. sclarea*, sa područja Slovačke, usporavaju rast i razvoj kliničkih izolata i meticilin-rezistentnog *S. epidermidis* ostvarujući sinergistički efekat sa oksacilinom. Metanolni ekstrakti herbe muskatne žalfije sa područja Turske su bili veoma efikasni u inhibiciji rasta Gram (+) bakterija *B. cereus* i *B. brevis* u svim testiranim koncentracijama (1, 2,5, 5 i 10%) u disk-difuzionom testu sa zonama inhibicije od 7,5 do 33 mm. Značajno su manje efikasni bili protiv *L. monocytogenes* i *S. aureus* gde su aktivnosti bile zabeležene samo kod 5% i 10% razblaženja ekstrakata (Tulukcu i sar., 2009). Gulcin i saradnici (2004) takođe potvrđuju antibakterijsku efikasnost turske muskatne žalfije sa drugog lokaliteta disk-difuzionom metodom. Aplikovanjem 30 mg acetonskog ili hloroformskog ekstrakta herbe postignuti su efekti protiv Gram (+) bakterija: *S. aureus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. brevis* i *Micrococcus luteus*, ali za razliku od naših ekstrakata bez efekata na *L. monocytogenes*. Na *Bacillus* vrste aktivniji je bio acetonski ekstrakt sa zonama inhibicije od 8 do 9 mm, a na *S. aureus* hloroformski (7 mm). Ovi ekstrakti su bili efikasni i u supresiji rasta *Mycobacterium smegmatis* bakterije (Gulcin i sar., 2004). Ona za razliku od *M. tuberculosis* nije patogena, pa se zbog toga često koristi kao povoljnija varijanta u laboratorijskoj analizi *Mycobacteria* vrsta (King, 2003).

Kao što su i drugi istraživači utvrdili kada su u pitanju antibakterijski efekti biljnih ekstrakata, aktivnost na Gram (-) bakterije je signifikantno slabija u poređenju sa Gram (+) (Cowan, 1999). MIC vrednosti nisu bile niže od 50 mg/ml, a kod ekstrakata iz 2014. godine čak i od 100 mg/ml. Ekstrakti EM i EU iz 2012. godine se ističu po svojoj antibakterijskoj aktivnosti prema Gram (-) bakterijama jer su inhibirali rast pet od šest sojeva sa vrednostima inhibitorne koncentracije od 50 mg/ml, dok su ostali sprečili razvoj maksimalno do tri vrste ovih

mikroorganizama. Za ova dva ekstrakta, EM 2012 i EU 2012 je značajno da, u odnosu na ostale ekstrakte, sadrže veće količine flavonoidnih aglikona, naročito apigenina i salvigenina. Sveuzevši, kada je reč o Gram (-) bakterijama ekstrakti su najaktivniji bili prema *P. aeruginosa*, a najmanje su inhibirali rast *K. pneumoniae*. Efekti prema *P. aeruginosa* mogu biti od značaja u smislu potencijalne zaštite hrane prilikom njenog čuvanja na niskim temperaturama. Naime, bakterija *P. aeruginosa* ima sposobnost rasta pri niskim temperaturama i jedna je od najčešćih uzroka kvarenja namirnica u zamrzivaču (Lerner i Lerner, 2003). Takođe, ona je poznata i kao oportunistička i česta nozokomijalna bakterija (Curran i sar., 2004). Iako se antibakterijske aktivnosti ne smatraju dovoljno značajnim, ekstrakti iz 2011. su bili najaktivni prema *E. aerogenes*, ekstrakti iz 2012. prema *E. coli* i *S. enteritidis*, a iz 2013. prema *P. mirabilis*. Od izuzetnog je značaja je to što je ruzmarinska kiselina bila aktivna i prema Gram (-) bakterijama, a posebno prema *E. coli* i *S. enteritidis*. Ove bakterije su vrlo česti kontaminanti hrane i vode i uzročnici su raznih oblika infekcija alimentarnog trakta, pri čemu je *E. coli* odgovorna i za infekcije urogenitalnog trakta, meningitis, pneumoniju i sepsu (Mihajilov-Krstev, 2009). Abedini i saradnici (2013) su takođe procenili odličnu aktivnost ruzmarinske kiseline na Gram (-) bakterije, odnosno na *P. aeruginosa* sa MIC/MBC vrednošću nešto višom od one iz našeg istraživanja ( $2,5 / > 2,5$  mg/ml). I ekstrakti muskatne žalfije sa drugih područja imaju slabo izraženu aktivnost ka Gram (-) negativnim bakterijama. Kuzma i saradnici (2007) su utvrdili da dihlormetanske frakcije acetonskih ekstrakata korena muskatne žalfije iz Poljske nemaju efekte na *P. aeruginosa* i *E. coli* (Kuzma i sar., 2007). Metanolni ekstrakti herbe muskatne žalfije sa područja Turske su se u disk-difuzionom testu pokazali jako dobrim u antimikrobnom delovanju prema bakteriji *Aeromonas hydrophila* u testiranim koncentracijama ekstrakta (1-10%) sa zonama inhibicije od 6 do 24,5 mm, ali su i bili skromniji prema *E. coli* i *K. pneumoniae* i skoro bez efekta na *Salmonella typhimurium* (Tulukcu i sar., 2009). Acetonski i hloroformski ekstrakt herbe, takođe turske žalfije, u primenjenoj količini od 30 mg, pokazuju aktivnost na Gram (-) sojeve u disk-difuzionom sistemu: *P. vulgaris*, *K. pneumoniae* i *P. aeruginosa* sa zonama inhibicije od 7 do 9 mm, ali bez efekata na *E. coli* za razliku od naših uzoraka (Gulcin i sar., 2004). Od velike važnosti je da su metanolni i etanolni ekstrakt herbe *S. sclarea* iz Irana pokazali antibruceloznu aktivnost (tetraciklin rezistentan-*Brucella melitensis*) u disk metodi, u koncentracijama od 50, 100, 200 i 400 mg/ml (Motamedi i sar., 2010).

*C. albicans* se pokazala rezistentnom na ispitivane uzorke u našem istraživanju, stoga se ekstrakti muskatne žalfije ne mogu okarakterisati kao dobra antifungalna sredstva. S druge strane, ruzmarinska kiselina je ispoljila jako dobar antikandidijalni efekat i može se smatrati potencijalnim antifungalnim agensom. Slab antikandidijalni efekat ispoljile su dihlormetanske frakcije acetonskog ekstrakta gajene i genetski transformisane muskatne žalfije sa MIC vrednostima  $>150 \mu\text{g/ml}$  (Kuzma i sar., 2007). Metanolni ekstrakti herbe turske muskatne žalfije nisu imali antifungalni efekat kako prema *C. albicans* tako i prema *Saccharomyces cerevisiae* (Tulukcu i sar., 2009). S druge strane, kandida vrste su osetljive na delovanje većine etarskih ulja *S. sclarea* (Džamić i sar., 2008; Hristova i sar., 2013; Kuzma i sar., 2009; Peana i sar., 1999; Schwiertz i sar., 2006). Blasko i saradnici (2017) su utvrdili da etarsko ulje muskatne žalfije, kao i izolovana jedinjenja linalol i linalil acetat, indukuju promene u sastavu i hemijskoj strukturi plazma membrane kandidate zbog čega ona postaje propustljiva za intracelularni sadržaj bez kojeg gljiva dalje ne može opstati. Od značaja je da je acetonski ekstrakt herbe, takođe sa područja Turske, ispoljio jak inhibitorni efekat na rast i razvoj gljive *Byssochlamys fulva* sa zonom inhibicije od 22 mm (Gulcin i sar., 2004). Ova gljiva je kontaminant voća i sposobna je da preživi u sredini siromašnoj kiseonikom (npr. konzerve) (Pitt i Hocking, 1997). Neki izolati ove gljive su produkovali mikotoksin patulin, koji se generalno ne karakteriše velikom toksičnošću, iako su neke studije pokazale potencijlanu genotoksičnost (Hopmans, 1997; Pitt i Hocking, 1997). Hloroformski ekstrakt herbe iste muskatne žalfije ispoljava dejstvo i na *Aspergillus candidus*, dok su oba ekstrakta bila inaktivna prema *Penicillium frequentans* i *Fusarium equiseti* (Gulcin i sar., 2004). Yuze i saradnici (2014) su procenjivali antifungalnu aktivnost vodenog, etanolnog i heksanskog ekstrakta lista turske muskatne žalfije i utvrdili da je na ispitivane gljive, fitopatogene, *Epicoccum nigrum* i *Colletotrichum coccodes* naročito efikasno delovao etanolni sa inhibicijom od 65,2% i koncentracijom ekstrakta od 2,5%. Miao-feng i saradnici (2003, 2005) su ispitivali antifungalne efekte petroletarskog ekstrakta cvasti *S. sclarea* iz Kine i utvrdili izuzetnu aktivnost protiv fitopatogena *Erysiphe graminis*, *Scerotinia sclerotiorum* ( $EC_{50}=26,98 \mu\text{g/ml}$ ) i *Botrytis cinerea* ( $EC_{50}=77,20 \mu\text{g/ml}$ ). Na fitopatogene utiču i kiseli i puferski ekstrakt ploda žalfije sa Urugvajskog područja. Naime, ovi ekstrakti redukuju rast *Alternaria* spp. sa MIC vrednostima 1,25 i 5  $\mu\text{g/ml}$ , redom, dok je fungicidno delovao samo kiseli ekstrakt sa MFC od 2,5  $\mu\text{g/ml}$  (Dellavalle i sar., 2011).

Polifenoli biljaka se karakterišu dobrim antimikrobnim osobinama i njihovo prisustvo u ekstraktima značajno doprinosi inhibiciji rasta i uništavanju mikroorganizama (Rauha i sar., 2000). Prema brojnim *in vitro* studijama polifenoli, identifikovani u ispitivanim ekstraktima *S. sclarea*, ispoljavaju ovakve efekte naročito prema Gram (+) bakterijama. Ruzmarinska kiselina bila efikasna protiv *Bacillus megaterium*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Phytophthora drechsleri*, *P. megasperma*, *P. parasitica*, *A. niger*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora ultimum*, *Versicillium dahailia*, *Alternaria solani*, *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Pestalotiopsis mangiferae*, *Penicillium citrinum* and *Alternaria kikuchiana* (Abedini i sar., 2013; Bais i sar., 2002; Ertas i sar., 2015; Gohari i sar., 2009; Guo i sar., 2004; Moreno i sar., 2006). Kafena kiselina je u dosadašnjim *in vitro* studijama pokazala aktivnost prema *S. aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *E. faecalis*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *Serratia marcescens*, *L. monocytogenes*, *Aspergillus flavus* i *A. parasiticus* (Aziz i sar., 1998; Ozcelik i sar., 2011; Panizzi i sar., 2000; Stojković i sar., 2013; Vaquero i sar., 2007; Wen i sar., 2003). Luteolin i apigenin su odlični inhibitori rasta *S. aureus*, a naročito je od važnosti što deluju i na meticilin rezistentne sojeve *S. aureus* sa MIC vrednostima 62,5-125 µg/ml i 3,9-15,6 µg/ml, redom (Cushnie i sar., 2003; Liu i sar., 2010; Rashed i sar., 2014; Sato i sar., 2000; Schinor i sar., 2007; Yan i sar., 2006). Apigenin bakteriostatski deluje i na *E. faecalis*, *E.coli*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus blanc*, *Morganella morgani*, *K. penumoniae*, *P. mirabilis*, *B. subtilis*, *Acinetobacter baumannii*, *S. typhimurium* i *Enterobacter aerogenes* (Koo i sar., 2003; Moussaoui i sar., 2010; Nayaka i sar., 2014; Ozcelik i sar., 2011; Schinor i sar., 2007). Luteolin inhibira rast *E. coli*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae*, *Micrococcus flavus*, *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *Enterobacter cloacae* i *P. aeruginosa* (Liu i sar., 2010; Miski i sar., 1983; Rashed i sar., 2014; Yan i sar., 2006). Posebno je značajno što deluje i na mikobakterije *M. smegmatis* i *M. tuberculosis* sa niskim MIC vrednostima, 78,12 µg/ml (Kuete i sar., 2008). Luteolin svoje antifungalne efekte ispoljava prema *Trychophyton metagrophytes*, *Fusarium graminearium*, *Septoria zeicola*, *Aspergillus fumigatus*, *A. versicolor*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *Penicillium verucosum*, *P. ochrochloron*, *P. funiculosum*, *Trichoderma viride* ali i prema najfrekventnijim gljivama, *Candida* spp. (Rashed i sar., 2014; Sartori i sar., 2003; Wang i sar., 2010). Najaktivniji je u inhibiciji *C. albicans* (MIC=625 µg/ml), a manje *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* (MIC=1250 µg/ml) (Alves i sar., 2014). Apigenin se kao antifungalno sredstvo pokazao aktivnim

prema *Alternaria tenuissima*, *Trichophyton mentagrophytes*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* (Singh i sar., 1988; Singh i sar., 2014; Smiljković i sar., 2017). Antimikrobni efekti heterozida apigenina i luteolina su značajno manje ispitivani. Luteolin-7-*O*-glukozid je inhibirao rast *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *P. vulgaris*, *B. subtilis*, *E. coli*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, dok je apigenin-7-*O*-glukozid delovao na *Bacillus lentus*, *Alternaria tenuissima*, *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata* i *C. tropicalis* (Chiruvella i sar., 2007; Cottigli i sar., 2001; Miski i sar., 1983; Singh i sar., 1988; Smiljković i sar., 2017). Podaci o antimikrobnom delovanju salvigenina do sada nisu zabeleženi.

### 5.7. ANTIINFLAMATORNA AKTIVNOST ETANOLNOG EKSTRAKTA *Salvia sclarea* L.

Lipopolisaharidi eksperimentalno izazivaju snažan imunski odgovor u tkivu periodoncijuma i gingive pacova i miševa, kako topikalnom aplikacijom tako i njegovim injektovanjem, razvijajući uobičajene inflamacijske promene kao što je infiltracija leukocita, prekid pripojnog epitela i edem subepitelnog vezivnog tkiva (Dumitrescu i sar., 2004.; Ijuhin i sar., 1992; Miyauchi i sar., 1998). Injektovanje LPS u periodontalno tkivo i gingivu uzrokuje i gubitak alveolarne kosti počevši od drugog dana nakon indukovanja parodontopatije sa maksimalnim promenama koje se javljaju sedmog dana (Dumitrescu, 2006). Histopatološki nalaz parodontalnog tkiva i gingive iz III grupe životinja pokazuje slične promene. Iako postoje podaci da LPS ne može indukovati parodontopatiju (Bentzen i sar., 2005), intragingivalna aplikacija LPS rastvora, dva puta tokom ovog eksperimenta, indukovala je inflamatorni odgovor sa brojnim histopatološkim promenama, aktivacijom ćelija imunskog sistema i produkcijom proinflamatornih citokina. Dumitrescu i saradnici (2004) su utvrdili da je upravo količina aplikovanog rastvora LPS-a od 1  $\mu$ l adekvatna za indukciju inflamacije, jer se veće zapremine teško mogu rasporediti po čvrsto vezanom tkivu gingive, a postoji i mogućnost prosipanja injektovane tečnosti duž igle.

Bakterijskom ili LPS-stimulacijom povećava se sekrecija proinflamatornih citokina, naročito ključnih TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6, od strane gingivalnih inflamatornih ćelija koji deluju i sinergistički (Vahabi i sar., 2011). Ovi citokini imaju veoma važnu ulogu u iniciranju i razvoju parodontopatije pojačavajući imunski odgovor i aktiviranjem imunskih i ne-imunskih ćelija (Vahabi i sar., 2011; Agarwal i sar., 1995). Takođe su sposobni da izazivaju značajna tkivna

oštećenja indukovanjem kolagenaze u fibroblastima i aktivaciju osteoklasta (Agarwal i sar., 1995; Howells, 1995). Ovi citokini su prisutni i u zdravom gingivalnom tkivu, ali u manjim količinama (Jandinski i sar., 1991), što znači da su značajni faktori u održavanju normalne tkivne homeostaze (Ejeil i sar., 2003).

Prilikom odabira ekstrakta za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti (među ekstraktima iz 2011. godine) kriterijum je bio najpre visok sadržaj ruzmarinske kiseline, dobra antioksidativna aktivnost, a zatim upotreba prihvatljivijeg rastvarača u smislu toksičnosti i eventualnih reziuda. Stoga je finalni izbor bio ekstrakt pripremljen etanolnim rastvaračem, E80U, koji je sadržao  $179,00 \pm 1,00$   $\mu\text{g}$  ruzmarinske kiseline po mg ekstrakta. Ovom studijom je utvrđeno da etanolni ekstrakt *S. sclarea* ispoljava antiinflamatorne efekte na modelu indukovane parodontopatije pacova, smanjujući nivoe proinflamatornih citokina IL- $1\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.10.2.) sa vidljivim histološkim promenama. Primenom ovog ekstrakta grupama IV i V moduliran je odgovor sa značajnom redukcijom inflamatornog infiltrata, u poređenju sa grupom III. ELISA testovima nije uočena statistički značajna razlika u nivoima IL-6 i TNF- $\alpha$  između IV i V grupe pacova. Između ovih grupa nije primećena ni razlika u histopatološkim karakteristikama, što implicira da preventivna primena ekstrakta nije imala efekta. Da bi se utvrdili mogući štetni efekti samog injektovanja i igle formirane su kontrolne grupe pacova koje su primile fiziološki rastvor umesto LPS-a (I – tretirana vodom i II – tretirana ekstraktom). Histološki nalaz parodontocijuma grupe I i II potpuno odgovara zdravom tkivu tako da traumatski efekti igle nisu uočeni. Razlika u nivoima citokina u tkivima grupe I i II nisu bile statistički značajne, ali su bile signifikantno niže u odnosu na netretiranu grupu III.

Imajući u vidu da se različiti oblici parodontopatije često javljaju kod ljudi, raste i potraga za adekvatnim pre svega preventivnim, ali i terapijskim prirodnim agensima. Dokazano je da neka prirodna jedinjenja, kao što je katehin iz zelenog čaja, imaju zaštitne efekte na tkivo periodoncijuma i alveolarnu kost kada se primenjuju nakon aplikovanja LPS-a. Pretpostavlja se da katehin ima imunomodulatorne osobine zbog svoje sposobnosti da kod miševa inhibira resorpciju alveolarne kosti i formiranje osteoklasta u prisustvu RANKL-a *in vivo* (Nakamura i sar., 2010). Katehin takođe može redukovati ekspresiju proinflamatornih citokina, kao i da zbog izuzetnih antioksidativnih svojstava smanji oksidativni stres u gingivalnom tkivu (Maruyama i sar., 2011). Kurkumin i njegov modifikovani oblik fenilamino-karbonil kurkumin značajno redukuju stvaranje inflamatornih medijatora u LPS-indukovanoj parodontopatiji pacova

(Guimaraes i sar., 2012; Elburki i sar., 2014). Flavonoid baikalin u istom test modelu na miševima inhibira proces inflamacije i gubitak alveolarne kosti najverovatnije posredstvom supresije produkcije TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i IL-6 (Chen i sar., 2008).

Poznato je da prekomerna proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta može doprineti razvoju inflamacije i parodontopatije, stoga sredstva sa odličnim antioksidativnim svojstvima mogu biti od pomoći kod parodontalnih poremećaja. Na primer tretman Angiparsom, ekstraktom *Melilotus officinalis*, je smanjio nivoe markera oksidativnog oštećenja u gingivalnom tkivu kod LPS-izazvane parodontopatije pacova (Mousavi-Jazi i sar., 2010). Ispitivani ekstrakt muskatne žalfije E80U je pokazao odlični antioksidativni potencijal stoga efekti na smanjenje inflamacije mogu biti povezani sa ispoljavanjem ove aktivnosti. Ruzmarinska kiselina koja je dominantna u ekstraktu ispoljava i odlične antioksidativne i antiinflamatorne efekte (Petersen i Simmonds, 2003). Na osnovu značajne količine ruzmarinske kiseline (165,30 $\pm$ 0,60  $\mu$ g/mg) i literaturnih podataka o njoj farmakološkoj aktivnosti, može se smatrati da je ona primarno odgovorna za efekte ekstrakta u ovom eksperimentu. Ova fenolna kiselina redukuje iscrpljivanje glutaciona, proizvodnju slobodnih radikala, proces lipoperoksidacije i ekspresiju IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u humanim gingivalnim fibroblastima tretiranih LPS-om (Zdarilova i sar., 2009). Iako su apigenin, luteolin i kafena kiselina manje zastupljeni, njihov doprinos efektu ekstrakta ne treba zanemariti. Naime, Gutiérrez-Venegas i saradnici (2006) su utvrdili da luteolin kod humanih gingivalnih fibroblasta, tretirani LPS-om, blokira sintezu azot-oksida i ćelijsku aktivaciju nekih mitogenom aktiviranih protein kinaza, i inhibira translokaciju NF- $\kappa$ B. Jeong i saradnici (2009) su otkrili da apigenin kod LPS-tretiranih humanih periodontalnih ćelija ligamenata suprimira proizvodnju azot-oksida, prostaglandina E2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-12. Iako podataka o delovanju kafene kiseline na dentalne ćelija nema, poznato je da ona snižava nivoe citokina i proizvodnju azot-oksida (Ogiwara i sar., 2003; Miles i sar., 2005). U LPS-inflamaciji mononuklearnih humanih ćelija kafena kiselina značajno snižava nivo IL-1 $\beta$ , ali bez efekata na TNF- $\alpha$ , IL-6 i prostaglandin E2 (Miles i sar., 2005).

## **5.8. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA ILEUMU PACOVA**

Biljne vrste roda *Salvia* se tradicionalno koriste u terapiji raznih gastrointestinalnih tegoba kao odlična karminativna, stomahična i spazmolitička sredstva (Wu i sar., 2012).



Mehanizmi kojim se ovi efekti ostvaruju se intenzivno ispituju poslednjih godina, a zasnivaju se na različitim vrstama relaksacionih odgovora ekstrakata ili etarskih ulja na glatke mišiće tankog creva. U ovim istraživanjima spazmolitička aktivnost uglavnom je ispitivana u *in vitro* uslovima na izolovanom ileumu pacova ili zamorca. Todorov i saradnici (1984) su prvi dokazali spazmolitičke efekte *Salvia* vrsta i utvrdili da ekstrakti *S. officinalis* i *S. triloba* značajno inhibišu kontrakcije glatke muskulature ileuma zamorca indukovane acetilholinom, histaminom, serotoninom i barijum-hloridom (Todorov i sar., 1984). Metanolni ekstrakti lista i stabla *S. cinnabarina* i *S. rubiginosa* su efikasno redukovali elektro-indukovane kontrakcije ileuma zamorca u koncentracijama od 62-250 mg/ml. Posebno se isticao ekstrakt lista *S. cinnabarina* koji je u maksimalnoj koncentraciji potpuno inhibisao intestinalne kontrakcije (Tortoriello i sar., 1995). Khan i saradnici (2011) su ispitivali spazmolitičke efekte metanolnog ekstrakta herbe *S. officinalis* na izolovanom jejunuma zeca i ustanovili statistički značajnu inhibiciju spontanih i kalijum-hloridom indukovanih kontrakcija. Kontrakcije jejunuma su bile smanjenje i dodatkom 4-aminopiridina (1 mM) dok su dodatkom glibenklamida (10 µM) efekti bili zanemarljivi (Khan i sar., 2011). Infuz *S. officinalis* (2 mg/ml) je delovao inhibitorno na histaminom izazvane kontrakcije jejunuma zeca, ali nije bilo efekata kod pilokarpinom indukovanih kontrakcija (Dizaye, 2005). Pored ekstrakta spazmolitičke efekte pokazuje i etarsko ulje *S. officinalis*. Giachetti i saradnici (1986) su utvrdili da intravenska primena emulzije etarskog ulja žalfije relaksira Odijev sfinkter (hepatopankreatični sfinkter) zamorca čija je kontrakcija izazvana aplikacijom morfin-hidrohlorida. Etarsko ulje je delimično (10-25 mg/kg) ili potpuno (50 mg/kg) blokiralo spazam mišića ovog sfinktera koji se nalazi na završnom delu žučnog i pankreasnog kanala na ulazu u duodenum (Giachetti i sar., 1986; Stanković, 1950). Ekstrakti lista *S. fruticosa* su delovali relaksantno na spontane i acetilholin-indukovane kontrakcije glatke muskulature ileuma zeca. Posebno su bili aktivni metanolni i etarski ekstrakt u koncentracijama višim od 0,1 mg/ml odnosno 0,2 mg/ml, redom, dok vodeni nisu dali nikakvu inhibiciju (Al-Khalil i Suleiman, 1992). Ekstrakti *S. gesneriflora* su delovali spazmolitički na kontrakcije ileuma zamorca. Heksanski, dihlormetanolni i metanolni ekstrakti herbe ove vrste žalfije (200 µg/ml) delovali su na elektro-stimulisane kontrakcije (Gomez-Rivera i sar., 2018). Iako su ovim studijama potvrđeni spazmolitički efekti koji se tradicionalno pripisuju *Salvia* vrstama, postoje i izuzeci kao što su vrste *S. verbenaca* i *S. miltiorrhiza* (kineska žalfija). Ekstrakti *S. verbenaca* su potencirali spazmogene efekte aplikovanih spazmogenih supstanci kao što je acetilholin,

histamin, serotonin i barijum-hlorid na ileumu zamorca (Todorov i sar., 1984). Etanolni ekstrakt korena kineske žalfije je izazvao spazmodične efekte izolovanog ileuma pacova preko  $Ca^{2+}$ -kalmodulin puta (Tsai i sar., 2012).

Kada se radi o muskatnoj žalfiji, efekte na glatku muskulaturu ileuma njenog etarskog ulja ispitali su Lis-Balchin i Hart (1997). Ovi istraživači su efekat etarskog ulja *S. sclarea* okarakterisali kao spazmolitički jer je ulje u koncentracijama  $4 \cdot 10^{-6}$  -  $8 \times 10^{-5}$  g/ml značajno redukovalo elektro-stimulisane kontrakcije ileuma zamorca (Lis-Balchin i Hart, 1997). Efekti ekstrakata muskatne žalfije na glatku muskulaturu do sada nisu ispitivani. S obzirom na tradicionalnu upotrebu muskatne žalfije kao spazmolitik i karminativ, očekivanja da će ispitivani ekstrakti pokazati relaksantne efekte su bila opravdana. Svi ekstrakti su u manjoj ili većoj meri ispoljili inhibitorne efekte u svim eksperimentalnim modelima.

Kontrakcija izolovanog preparata creva nastaje povećanjem koncentracije slobodnog  $Ca^{2+}$  u citoplazmi koji aktivira elemente kontrakcije. Povećanje koncentracije intracelularnog kalcijuma ostvaruje se posredstvom voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala L-tipa ili oslobađanjem iz intracelularnog depoa, sarkoplazmatskog retikuluma. Periodična depolarizacija reguliše spontane pokrete creva, pri čemu na vrhu depolarizacije nastaje akcioni potencijal u vidu brzog influksa  $Ca^{2+}$  preko pomenutih kanala (Grasa i sar., 2004; Karaki i Weiss, 1998). Spontane kontrakcije ileuma pacova efikasno su inhibisane svim ispitivanim ekstraktima muskatne žalfije. Posebno su se istakli etanolni ekstrakti od kojih je EU, izrađen koncentrovanim etanolom ultrazvučnom metodom, bio najpotentniji. Ovaj ekstrakt se karakteriše značajno nižim sadržajem ružmarinske i kafene kiseline kao i apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozida u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte. Međutim, karakteriše se značajno višim sadržajem flavonoidnih aglikona, luteolina, apigenina i salvigenina, pa se stoga efekti mogu uglavnom pripisati njihovom prisustvu u ekstraktu. Određivanjem Pirsonovog koeficijenta korelacije određeno je da je apigenin u najjačoj vezi sa ovim tipom spazmolitičke aktivnosti. Lemmens-Gruber i saradnici (2006) i Abdalla i saradnici (1994) su pokazali da flavoni pokazuju odlične spazmolitičke aktivnosti na izolovanom ileumu zamorca. Standard ružmarinske kiseline se u ovoj seriji eksperimenata pokazao kao odlično spazmolitičko sredstvo, što su takođe dokazali Bazylo i saradnici (2009) i dobili slične rezultate. Pored EU, spazmolitički efekti svih ostalih etanolnih ekstrakata su bili međusobno veoma slični i signifikantno bolji u odnosu na metanolne. Najslabiji u ispoljavanju inhibicije bio je ekstrakt M80U koji je sadržao visoku koncentraciju fenolnih kiselina i

heterozida, ali niske nivoe apigenina i luteolina. Kada su u pitanju ekstrakti E80U čiji su efekti praćeni kroz godine, najaktivniji je bio E80U iz 2011, a zatim oni iz 2013, 2014 i 2012. Ekstrakt E80U 2011 je u odnosu na ova tri ekstrakta sadržao manju količinu ruzmarinske kiseline, apigenina, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, ali značajniju količinu apigenin-7-*O*-glukozida i kafene kiseline.

Ekstrakti *S. sclarea* su takođe ispoljili i značajne relaksantne efekte glatke muskulature ilema čija su kontrakcije stimulisane visokom koncentracijom KCl. Visoka koncentracija kalijumovih jona izaziva toničke kontrakcije glatke muskulature usled depolarizacije membrane, otvaranja voltažno-zavisnih kalcijumskih kanala L-tipa i ulaska  $Ca^{2+}$  u ćeliju (Mori i sar., 2015). Kako ekstrakti muskatne žalfije inhibiraju KCl-indukovane kontrakcije oni se mogu smatrati blokatorima kalcijumskih kanala. Ovaj mehanizam spazmolitičke aktivnosti, koji podrazumeva otvaranje kalijumovih kanala i blokadu kalcijumskih, je i najčešći tip delovanja ekstrakata i etarskih ulja na kontrakcije glatkih mišića (Branković i sar., 2009; Gilani i sar., 2006; Khan i sar., 2011). U ovoj seriji eksperimenata se ekstrakt EU ponovo istakao svojom aktivnošću. Uz njega slične efekte ispoljio je i ekstrakt EM koji se karakteriše takođe nižim sadržajem ruzmarinske kiseline, i apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozida u odnosu na ostale, ali sadrži značajniju količinu flavonoidnih aglikona i kafene kiseline. Apigeninu i luteolinu se može pripisati značajan doprinos u ovoj seriji spazmolitičke aktivnosti jer je potvrđeno da oni signifikantno inhibiraju kontraktilnost glatke muskulature indukovane visokim koncentracijama kalijuma (Sadraei i sar., 2018). Kod vodeno-etanolnih ekstrakata muskatne žalfije je primećeno da su oni izrađeni 60% etanolom bili nešto efektivniji u odnosu na one sa 80% etanolom, kao i da su ekstrakti pripremljeni metodom ultrazvuka aktivniji u odnosu na digestiju. Metanolni ekstrakti su neznatno slabije aktivnosti od etanolnih, pri čemu je M80M bio najslabiji. U ovom ekstraktu je određena najveća količina ruzmarinske kiseline, i apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozida, ali su nivoi aglikona bili niži. Ekstrakti E80U 2011 i E80U 2012 su bili slabije aktivnosti u odnosu na E80U 2013 i E80U 2014, sa  $EC_{50}$  vrednostima koje su duplo slabije. Ruzmarinska kiselina je u ovoj seriji eksperimenata pokazala izuzetnu aktivnost sa značajno nižom  $EC_{50}$  vrednošću u odnosu na ekstrakte.

Kontraktilnost gastrointestinalnog sistema regulisan je brojnim fiziološkim mehanizmima. Nervni i humoralni faktori, odnosno neurotransmiteri enteričkog nervnog sistema, regulišu ritmičke kontrakcije i relaksaciju glatkih mišića tankog creva, stoga ekstrakti koji utiču

na kontraktilnost creva ispoljavaju neurofiziološku aktivnost (Pilija i sar., 2010; Radenković i sar., 2006; Wood, 2016). Radi utvrđivanja uticaja ekstrakata na holinergički sistem u tankom crevu pacova, praćeni su efekti na acetilholinom indukovane kontrakcije. Svi ispitivani ekstrakti su pokazali inhibitorne efekte na ovaj tip kontrakcija ileuma što je posledica blokiranja muskarinskih receptora. Acetilholin svoje efekte na ileumu ostvaruje posredstvom M<sub>3</sub> receptora u ileumu, a podrazumeva indukovanje signalne transdukcije preko G-proteina, aktiviranja fosfolipaze-C, i produkcije inozitol trifosfata i diacilglicerola. Inozitol trifosfat povećava koncentraciju kalcijumovih jona u ćeliji glatkog mišićnog tkiva i dovodi do kontrakcije (Eglen i sar., 2006; Kirschstein i sar., 2009; Unno i sar., 2005). Ekstrakt koji je u ovoj seriji eksperimenata bio najaktivniji i najpribližniji efektima atropina je E60T, pripremljen 60% etanolom na povišenoj temperaturi. Ono što ovaj ekstrakt ističe u pogledu hemijskog sastava, jeste visoka koncentracija apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozida. Ekstrakt sadrži priličnu količinu ruzmarinske kiseline (13,61%), sadržaj kafene kiseline je bio sličan kao i kod ostalih ekstrakata, ali je količina aglikona, apigenina i luteolina, bila među najnižima. Standard ruzmarinske kiseline je signifikantno snizio kontrakcije ileuma izazvane acetilholinom. Sadraei i saradnici (2018) su utvrdili da kontrakcije izazvane acetilholinom apigenin i luteolin mogu značajno da inhibiraju. Prema istraživačima Fler i Verspohl (2007), luteolin je nekompetitivni inhibitor fosfodiesteraza što je takođe od značaja u ispoljavanju spazmolitičke aktivnosti. Od ostalih ispitivanih ekstrakata muskatne žalfije ističe se i E60U sa sličnim hemijskim karakteristikama. Ekstrakti sa najslabijom aktivnošću su bili MU i E80T koji su najmanje modulirali EC<sub>50</sub> vrednost acetilholina. Ekstrakti EU i EM, koji su bili najefikasniji kod spontanih i KCl-indukovanih kontrakcija, su u ovom modelu ispitivanja spazmolitičke ativnosti bili nešto slabiji. Od metanolnih ekstrakata M80M pokazuje najbolji efekat pri čemu je EC<sub>50</sub> vrednost acetilholina povećana 725 puta. Metanolni ekstrakti pripremljeni metodom maceracije su bili nešto efikasniji od onih izrađeni ultrazvukom. Kada je reč o E80U ekstraktima, najboljim spazmolitičkim sredstvom se može smatrati ekstrakt iz 2011. godine jer je EC<sub>50</sub> vrednost kontrole modulirana u najvećoj meri (3729 puta), a onda slede E80U 2013>E80U 2014>E80U 2012. Kao što je već spomenuto, E80U 2011 je u odnosu na ostala tri ekstrakta sadržao manju količinu ruzmarinske kiseline, apigenina, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, ali veću količinu kafene kiseline i apigenin-7-*O*-glukozida. Standard ruzmarinske kiseline je ispoljio značajno bolje efekte u poređenju sa ekstraktima.

Još jedan od mogućih mehanizama spazmolitičke aktivnosti jeste inhibicija histaminskih receptora. Prethodne studije pokazuju da stimulacija kontrakcija glatkih mišića nastupa vezivanjem histamina za H<sub>1</sub> receptore (Kiyochiro i Kenji, 1987). Histamin je značajan medijator u parakrinoj kontroli u gastrointestinalnom sistemu (Branković, 2016). Ovaj biogeni amin izaziva kontrakcije glatke muskulature tankog creva tako što dovodi do depolarizacije membrane i povećanja ekscitabilnosti (Bigović i sar., 2010). Ispitivani ekstrakti muskatne žalfije uspešno su inhibirale kontrakcije ileuma pacova indukovane histaminom. Najbolje efekte ispoljio je ekstrakt E80U 2011 koji je maksimalnu kontrakciju umanjio na nivo od 58,83%. Kao što je već pomenuto, ekstrakt E80U 2011 je u odnosu na ostale E80U ekstrakte sadržao manju količinu ruzmarinske kiseline, apigenina, luteolina i luteolin-7-*O*-glukozida, ali značajniju količinu apigenin-7-*O*-glukozida i kafene kiseline. Sandor i saradnici (2018) su dokazali da flavonoidi apigenin i luteolin uspešno inhibiraju kontrakcije ileuma zamorca izazvane histaminom. Naročitu dobru spazmolitičku aktivnost ispoljio je apigenin koji redukovao nastale kontrakcije za 81,9% pri koncentraciji od 20 µM. Matsumoto i saradnici (2009) su u svojoj studiji na ileumu zamorca zaključili da kafena kiselina nema uticaja na ovaj tip kontraktilnosti. Povećane koncentracije histamina su relevantne najpre zbog svojih efekata u reakcijama hipersenzitivnosti, međutim njegov značaj je i u drugim patološkim stanjima koji nisu potpuno razjašnjeni, kao što su neki poremećaji u gastrointestinalnom traktu, inflamatornoj bolesti creva i sindromu nadraženih creva (Smolinska i sar., 2014).

Kod odabranih ekstrakata su ispitivani efekti na BaCl<sub>2</sub>- i CaCl<sub>2</sub>-stimulisane kontrakcije ileuma pacova. Barijum je nespecifičan blokator kalijumovih kanala (Liu i sar., 2001) i on izaziva depolarizaciju membrane i kontrakciju glatke muskulature ileuma. Mehanizam ovog efekta se najverovatnije ostvaruje otvaranjem voltažno-zavisnih kalcijumovih kanala i ulaskom kalcijuma u ćeliju (Miladinović i sar., 2018). Ekstrakti su uspeli da ublaže kontrakcije stimulisane jonom barijuma, mada su relaksantni efekti bili umereni i kretali su se u opsegu 8,95-33,77% kada je primenjen ekstrakt u koncentraciji od 1,5 mg/ml. Među E80U ekstraktima ponovo se istakao E80U 2011 koji je u najvećoj meri modulirao EC<sub>50</sub> vrednost kontrole, tj. BaCl<sub>2</sub>. Kontrakcije izazvane dodatkom rastvora CaCl<sub>2</sub> značajno su ublažene ispitivanim ekstraktima što ponovo dokazuje da se efekti ostvaruju smanjenjem aktivnosti kalcijumovih kanala L-tipa. Maksimalne koncentracije ekstrakata su redukovale nastale kontrakcije glatke muskulature ileuma u opsegu od 19,08 do 43,10%. Ekstrakt EU 2011 je i ovoga puta bio

najaktivniji. Od prisutnih fenolnih jedinjenja u ekstraktima, jedino je za luteolin ispitivan uticaj na ovaj tip izazvanih kontrakcija. Naime, Gorzalczany i saradnici (2013) su pokazali da je luteolin efikasno i dozno-zavisno inhibisao  $\text{CaCl}_2$ -indukovane kontrakcije, pri čemu je maksimalna koncentracija od 30  $\mu\text{g/ml}$  umanjila kontraktilnost na 77%.

Relaksacija posredovana putem NO predstavlja jednu od najvažnijih neurotransmisija u gastrointestinalnom sistemu (Jalali-Nezhad i sar., 2016). Azot-monoksid na nivou glatke muskulature ileuma ostvaruje relaksantni efekat povećavajući nivoe cGMP-a. Da bi se utvrdili eventualni spazmolitički efekti ekstrakata koji se ostvaruju preko NO, sistemu sa izolovanim ileumom dodaje se blokator NO sintaze, L-NAME, kojim se zaustavlja njegova dalja produkcija. U ovom eksperimentu su nakon dodavanja L-NAME i svih ekstrakata pojedinačno nastala opuštanja glatke muskulature što upućuje da se relaksantni efekti ne ostvaruju pomoću NO mehanizma, odnosno da se nastali relaksacioni efekti, stoga, odvijaju drugim putem.

## 5.9. SPAZMOLITIČKA AKTIVNOST EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L. NA TRAHEJI PACOVA

Opstrukcija respiratornih disajnih puteva i oštećenja sistema mukocilijarnog transporta su deo respiratornih oboljenja, koji se tretiraju različitim lekovima. Sekretolitici, kao što su isparljiva etarska ulja ili saponozidi iz različitih biljaka, koriste se za povećanje lučenja seroznog mukusa u peharastim ćelijama. Sekretomotorici se, s druge strane, koriste za ubrzanje čišćenja mukocilija, čime se povećava cilijarna aktivnost i transport mucina, a ponovo etarska ulja i saponozidi, kao i  $\beta_2$ -simpatikomimetici mogu da modifikuju ovaj efekat. Takođe kod ovakvih respiratornih smetnji koriste se i mukolitici (npr. acetilcistein) koji depolimerizuju mucin, čime se smanjuje viskoznost sloja sluzi. Kod specifičnog respiratornog oboljenja alergijske astme od važnosti je i inhibicija interleukina, interferona- $\gamma$  ili TNF- $\alpha$  (Engelbertz i sar., 2012). Neke biljne vrste familije Lamiaceae se tradicionalno koriste u terapiji respiratornih oboljenja zbog svojih bronholitičkih, sekretomotoričkih i spazmolitičkih dejstava, i kao suportivna terapija kašlja (Ben-Arye i sar., 2011; Engelbertz i sar., 2012).

Eksperimentalne studije pokazuju da biljne vrste roda *Salvia* ispoljavaju bronhodilatatorne efekte *in vivo*, kao i na izolovanim preparatima traheje. Dizaye (2005) je utvrdio da infuz pripremljen od lista *S. officinalis* (Irak) deluje bronhodilatatorno *in vitro* kod izolovanih bronhija zeca u koncentraciji od 2 mg/ml. Primećeno je da su efekti prisutni samo kod

histamin-indukovanih kontrakcija glatke muskulature, ali bez efekta ne pilokarpin-indukovane. Vodeno-metanolni ekstrakt herbe *S. officinalis* je u dozama od 1-10 mg/kg uspešno, u dozno-zavisnom režimu, inhibirao karbahol-indukovane kontrakcije trahealnih glatkih mišića anestetiziranih pacova. Postignuti spazmolitički efekat je bio tri puta jači u poređenju sa pozitivnom kontrolom, aminofilinom. Kod izolovane traheje, u *in vitro* uslovima, ekstrakt je inhibirao kontrakcije nastale dejstvom jona kalijuma u niskim koncentracijama (25 mM). Inhibicija kontrakcija je bila prekinuta dodatkom 4-aminopiridina, pri čemu glibenklamid nije imao efekta, sugerišući da mehanizam delovanja ekstrakta uključuje voltažno-zavisne kalijumove kanale. Kod karbahol-indukovanih kontrakcija ekstrakt je u dozama od 0,03 do 0,1 mg/ml dozno-zavisno pomerio krivulju odgovora izoprenalina u levo, pokazujući efekte slične papaverinu odnosno pokazujući inhibitorno-fosfodiesteraznu aktivnost (Gilani i sar., 2015).

Efekti muskatne žalfije i njenih ekstrakata na inhibiciju bronhokonstrikcije do sada nisu ispitivani, iako se tradicionalno u pojedinim sredinama koristi za ublažavanje nekih respiratornih smetnji (kašalj) (Koutsaviti i sar., 2016). Ispitivani ekstrakti su delovali relaksantno na kontrakcije glatke muskulature traheje koje su izazvane jednodoznom primenom karbahola i KCl. Relaksacija glatke muskulature traheje, kod karbaholom indukovanih kontrakcija, je bila dozno-zavisna, pri čemu su se efektivne koncentracije ekstrakata,  $EC_{50}$ , kretale u opsegu od  $0,91 \pm 0,01$  do  $6,92 \pm 0,04$  mg/ml. Takođe, i kod KCl-izazvanih kontrakcija su ekstrakti ispoljili dozno-zavisne efekte sa opsegom  $EC_{50}$  vrednosti od  $1,03 \pm 0,03$  do  $15,39 \pm 0,31$  mg/ml. Najbolje bronhodilatatorne efekte u oba test sistema među deset ispitivanih ekstrakata iz iste godine (2011) ostavreni su ekstraktom E80U 2011 sa najnižom  $EC_{50}$ , a koji je u maksimalnoj koncentraciji od 1,5 mg/ml dao inhibiciju kontrakcija od  $63,23 \pm 2,02\%$  kod karbaholom indukovanih i  $30,35 \pm 1,88\%$  kod KCl-indukovanih kontrakcija. Ovaj ekstrakt je imao značajne količine ruzmarinske i kafene kiseline, ali se posebno se isticao, u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte iz 2011, količinom apigenin-7-O-glukozida. Korelacionom analizom nije pokazana jaka veza ispitivanih jedinjenja iz ekstrakata na bronhodilatatornu aktivnost, jer su vrednosti Pirsonovih koeficijenata bile ispod 0,3. Iako je statistički značajna razlika u  $EC_{50}$  vrednostima i procentima inhibicije indukovanih kontrakcija između ekstrakata ( $p < 0,05$ ), nije primećena razlika u primeni određenog ekstrakcionog sredstva i tehnike.

Kada su u pitanju ekstrakti E80U iz različitih godina, najbolje efekte kod karbaholom indukovanih kontrakcija su ispoljili E80U 2011 i E80U 2013, sa vrlo sličnim aktivnostima, dok je kod KCl-indukovanih dominantan bio E80U 2013. Za ekstrakt E80U 2013 koji se u ovim serijama eksperimenata značajno isticao, karakterističan je najviši sadržaj ukupnih tanina i derivata hidroksicimetne kiseline, i luteolina, u odnosu na E80U iz 2011, 2012, i 2014. godine. Luteolin je u više eksperimenata ispoljio bronhodilatatorne karakteristike. Abdalla i saradnici (1994) su pokazali da luteolin u koncentracijama od  $10^{-5}$  do  $3 \cdot 10^{-4}$  M može umereno da relaksira acetilholinom indukovane kontrakcije traheje zamorca. Fleeer i saradnici (2007) su s druge strane utvrdili da ovaj flavonoid u koncentraciji od  $68 \mu\text{M}$  može efikasno ublažiti barijum-indukovane kontrakcije traheje zamorca sa 100% na  $45 \pm 2,4\%$ , i modifikujući  $\text{EC}_{50}$  vrednost barijuma sa  $2,71 \pm 0,30 \mu\text{M}$  na  $7,86 \pm 0,51 \mu\text{M}$ . U ovom eksperimentu efekte, međutim, nisu pokazali heterozidi luteolin-7-gukuronid i -3',7-diglukuronid (Fleeer i sar., 2007). Ko i saradnici (2005) su, takođe, potvrdili spazmolitičke efekte luteolina. Ovi istraživači su utvrdili da luteolin može inhibirati kontrakcije koje su izazvane karbaholom, histaminom,  $\text{Ca}^{2+}$  i KCl. Od značaja je da je luteolin potencirao relaksantne efekte nifedipina, forskolina i nitroprusida, i da je inhibirao aktivnost cAMP- i cGMP-fosfodiesteraze u koncentracijama od 10-300  $\mu\text{M}$  (Ko i sar., 2005). U prethodnim ispitivanjima je pokazano da i apigenin koncentracijski-zavisno inhibira histamin-, karbahol-, kalijum- i kalcijum-indukovane kontrakcije trahealne muskulature zamorca u koncentracijama od 10 do 200  $\mu\text{M}$ . U koncentracijama od 15  $\mu\text{M}$  i 30  $\mu\text{M}$  apigenin potencira relaksantne efekte forskolina i nitroprusida kod histaminom indukovanih kontrakcija, a u koncentracijama od 10-300  $\mu\text{M}$  inhibira aktivnost cAMP- i cGMP-fosfodiesteraze u glatkim mišićima (Chen i sar., 2017). Eftekar i saradnici (2018) ističu efikasnost ruzmarinske kiseline u inhibiciji trahealnih kontrakcija izazvane rastućim koncentracijama metaholina ( $10^{-8}$  do  $10^{-3}$  M). U odnosu na kontrolu, koncentracije ruzmarinske kiseline od 0,25 mg/ml i 0,5 mg/ml su statistički značajno relaksirale nastale kontrakcije glatkih mišića traheje. Ruzmarinska kiselina je sličnu aktivnost pokazala i nakon tretiranja traheje ovoalbuminom (proteinom belanceta koji izaziva alergijske reakcije), zbog čega se smatra potencijalnim efikasnim sredstvom u tretmanu inflamatornih reakcija, naročito astme (Eftekar i sar., 2018).



## 6. ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva, primenjene metodologije i rezultata dobijenih ispitivanjem muskatne žalfije (*Salvia sclarea* L.), odnosno biljne droge *Salviae sclareae herba* i njenih ekstrakata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Nakon postupka primarne prerade i sušenja biljnog materijala, u sastavu usitnjene biljne droge *Salviae sclareae herba*, konstatovano je prisustvo delova listova, brakteja, cvetova (čašica, krunica), stabla i osovine cvasti, kao i manja količina zrelih orašica. Analiza površinskih struktura delova droge na stereomikroskopu, a zatim i na trajnim mikroskopskim preparatima ukazuje na prisustvo dva funkcionalna tipa trihoma (žlezdani i nežlezdani). Prisutni su jednoćelijski i višćelijski nežlezdani (mehanički) trihomi, kao i kapitatni i peltatni (žlezdani) trihomi, sa većim brojem podtipova.
- Nakon ekstrakcije biljnog materijala primećen je značajan uticaj primenjenog rastvarača, kao i ekstrakcione tehnike na prinos ekstrakcije. U opštem smislu, dodavanje vode i povećanje polarnosti rastvarača doprinose porastu prinosa ekstrakcije. Kod etanolno-vodenih rastvarača, metoda ultrazvuka, kao i metoda digestije daju visoke i slične prinose. Sa druge strane, metoda maceracije se kod metanolnih ekstrakata uglavnom pokazala efikasnijom u poređenju sa ultrazvučnom.
- U svim ekstraktima muskatne žalfije je kvantifikovana značajna količina ukupnih fenola. U grupi etanolnih ekstrakata najmanje fenola je određeno kod onih koji su pripremljeni koncentrovanim etanolom. Kod etanolno-vodenih ekstrakata su obe ekstrakcione tehnike i oba tipa rastvarača bili slične efikasnosti, što je zabeleženo i u grupi metanolnih ekstrakata. Najviše fenolnih jedinjenja je kvantifikovano u ekstraktu koji je pripremljen 80% etanolom postupkom digestije iz 2013. godine.
- Ekstrakti *S. sclarea* sadržali su značajne količine tanina, a najviše ih je određeno u ekstraktu pripremljenim 60% etanolom postupkom digestije iz 2013. godine. Kod etanolno-vodenih ekstrakata su obe tehnike i oba tipa rastvarača bili slični po efikasnosti, kao i kod metanolnih.
- Najviše ukupnih flavonoida je određeno u metanolnom ekstraktu iz 2012. godine pripremljenim apsolutnim metanolom ultrazvučnom metodom. Etanol 80% je bio efikasniji u ultrazvučnoj tehnici, a 60% u metodi digestije. Ultrazvučna metoda

ekstrakcije se, generalno, pokazala boljom u izolovanju flavonoidnih jedinjenja kada je kao rastvarač korišćen koncentrovani etanol i oba tipa metanolnih rastvarača.

- Najviši sadržaj ukupnih derivata hidroksicimetne kiseline zabeležen je u ekstraktu muskatne žalfije koji je izrađen 60% etanolom, digestijom, iz 2013. godine. Metoda digestije je bila efikasnija kod vodeno-etanolnih ekstrakata u odnosu na ultrazvučnu ekstrakciju, a kod metanolnih ekstrakata uglavnom ultrazvučna ekstrakcija u odnosu na maceraciju.
- U ekstraktima muskatne žalfije je HPLC metodom identifikovano sedam jedinjenja: dve fenolne kiseline, ruzmarinska kiselina kao dominantno jedinjenje i kafena kiselina, tri flavonoidna aglikona (apigenin, luteolin i salvigenin) i dva flavonoidna heterozida (apigenin- i luteolin-7-*O*-glukozid).
- Najviši sadržaj ruzmarinske kiseline određen je u etanolnom ekstraktu koji je pripremljen 80% etanolom postupkom digestije iz 2013. godine. Manji sadržaj ruzmarinske kiseline je zabeležen u skoro svim ekstraktima iz 2011. godine koja je u letnjem periodu bila toplija sa padavinama koje su bile oko granica normale.
- Količine kafene kiseline u ekstraktima su bile značajno niže. Ova fenolna kiselina je bila dominantnija u ekstraktima iz 2011. i 2014. godine u odnosu na druge dve godine koje su bile sa manje padavina u periodu jun-jul.
- Sadržaj flavonoidnih aglikona u ispitivanim ekstraktima je bio značajno veći u ekstraktima pripremljenim koncentrovanim etanolom, za razliku od flavonoidnih heterozida koji su ovim rastvaračem ekstrahovani u najmanjoj meri, a što je u skladu sa polarnošću jedinjenja. Najviši nivoi aglikona i glukozida su, sa par izuzetaka, određeni u ekstraktima iz 2012. i 2013. godine u kojima su tokom letnjih meseci količine prosečnih padavina bile niže, pri čemu se 2012. godina smatrala i ekstremno toplom.
- Ekstrakti muskatne žalfije su se pokazali efikasnim antiradikalnim agensima u DPPH test sistemu. Metanolni ekstrakti, čije su pojedine inhibitorne koncentracije iznosile i <20 µg/ml, su generalno bili aktivniji. Ekstrakt sa najboljom aktivnošću je pripremljen ultrazvučnom metodom pomoću apsolutnog metanola iz 2012. godine. Veza između ukupnih fenola i derivata hidroksicimetne kiseline, ruzmarinske kiseline i ispoljene antioksidativne aktivnosti u DPPH sistemu je bila jaka i statistički značajna.

- Ekstrakti su ispoljili i odlične efekte u inhibiciji lipoperoksidacije u  $\beta$ -karoten/linolna kiselina modelu. Veliki broj ekstrakata je pokazao bolje efekte u poređenju sa nekim korišćenim standardima (ruzmarinskom i askorbinskom kiselinom). Ekstrakt pripremljen 60% etanolom, ultrazvukom, iz 2011. godine je najjače inhibirao proces lipoperoksidacije. Za antilipoperoksidnu aktivnost je značajna jaka povezanost sa sadržajem ukupnih fenola i luteolin- i apigenin-7-O-glukozida.
- Ekstrakti *S. sclarea* su se pokazali kao bolji bakteriostatski nego baktericidni agensi. Gram (+) bakterije su bile osetljivije na delovanje ekstrakata u poređenju sa Gram (-) bakterijama. Najefikasniji su bili ekstrakti iz 2012. godine. Veoma je značajno da su ekstrakti muskatne žalfije ispoljili dobra antibakterijska svojstva prema *S. aureus*.
- Ekstrakti muskatne žalfije se ne mogu okarakterisati kao dobra antifungalna sredstva. Ispitivana gljiva, *C. albicans*, se pokazala rezistentnom na ekstrakte *S. sclarea* sa visokim MIC/MBC vrednostima.
- Etanolni ekstrakt muskatne žalfije iz 2011. godine, koji je pripremljen 80% etanolom tehnikom ultrazvuka, je ispoljio značajan antiinflamatorni efekat u modelu LPS-indukovane parodontopatije. Ekstrakt je značajno smanjio proces inflamacije redukujući gingivalne lezije i resorpciju alveolarne kosti. Nivoi citokina IL-1 $\beta$ , IL-6 i TNF- $\alpha$  u gingivalnom tkivu pacova sa indukovanom parodontopatijom koji su tretirani ekstraktom *S. sclarea* su bili znatno niži u poređenju sa netretiranom grupom.
- Imajući u vidu da je preterana produkcija reaktivnih kiseoničnih vrsta u vezi sa parodontopatijom, snažan antioksidativni kapacitet ekstrakta može biti odgovoran za antiinflamatorni efekat ekstrakta *S. sclarea*.
- Muskatna žalfija može biti potencijalni terapijski i komplementarni agens u tretmanu parodontalnih bolesti. Dalja istraživanja u tom smislu bi trebalo da budu usmerena ka ispitivanju efikasnosti njenih ekstrakata kod ljudi, u kliničkim studijama.
- Spontane kontrakcije glatke muskulature ileuma pacova efikasno su inhibisane svim ispitivanim ekstraktima muskatne žalfije, pri čemu se posebno ističe efekat ekstrakta koji je izrađen koncentrovanim etanolom ultrazvučnom metodom. Najjača statistički značajna veza između ispoljene aktivnosti i sadržaja ispitivanih sekundarnih metabolita ekstrakata utvrđena je sa apigeninom.

- Ekstrakti *S. sclarea* su efikasno inhibisali kalijum-hloridom indukovane kontrakcije ileuma. Kao najjači inhibitori pokazali su se ekstrakti koji su izrađeni koncentrovanim etanolom, ultrazvučnom i metodom maceracije. Na ovaj tip spazmolitičke aktivnosti u najvećoj meri utiču apigenin, luteolin i salvigenin.
- Svi ispitivani ekstrakti su ispoljili spazmolitičke efekte na acetilholinom indukovanim kontrakcijama ileuma. U ovoj seriji eksperimenata najbolje efekte su pokazali ekstrakti pripremljeni 60% etanolom.
- Ekstrakti su ispoljili spazmolitičke efekte kod histaminom indukovanih kontrakcija glatke muskulature ileuma, a najefikasniji je bio etanolni iz 2011. godine, koji je pripremljen 80% etanolom tehnikom ultrazvuka.
- Spazmolitički efekti ekstrakata kod barijum-hloridom indukovanih kontrakcija ileuma su bili umereni pri čemu se ekstrakt izrađen 80% etanolom tehnikom ultrazvuka iz 2011. godine pokazao najefikasnijim.
- Kontrakcije ileuma izazvane kalcijum-hloridom značajno su ublažene ispitivanim ekstraktima. Ekstrakt pripremljen koncentrovanim etanolom ultrazvučnom metodom se pokazao najboljim kod ovih kontrakcija.
- Mehanizam delovanja ekstrakata *S. sclarea* se ne ostvaruje posredstvom azot-monoksida jer su kontrakcije ileuma pacova dodatkom ispitivanih ekstrakata u prisustvu blokatora azot-oxid sintetaze (L-NAME) bile i dalje redukovane.
- Ekstrakti *S. sclarea* su delovali bronhodilatatorno i relaksantno na kontrakcije glatke muskulature traheje izazvane primenom karbahaola i KCl. Najbolji efekti među deset ispitivanih ekstrakata iz iste godine postignut je ekstraktom izrađen 80% etanolom tehnikom ultrazvuka.
- Na osnovu hemijske karakterizacije i ostvarenih farmakoloških aktivnosti zaključuje se da pojedini ekstrakti *S. sclarea*, kao izvor značajnih aktivnih jedinjenja, mogu biti potencijalna terapijska sredstva sa efikasnim antioksidantnim, spazmolitičkim, antiinflamatornim i antimikrobnim dejstvom. S tim u vezi, neophodno je dalje sprovođenje *in vivo* i kliničkih studija kako bi se sagledala njihova primena u smislu novih lekovitih preparata.

## 7. LITERATURA

- Abedini A, Roumy V, Mahieux S, Biabiany M, Standaert-Vitse A, Rivière C, i sar. Rosmarinic acid and its methyl ester as antimicrobial components of the hydromethanolic extract of *Hyptis atrorubens* Poit. (Lamiaceae). *Evid-Based Compl and Alt* 2013; 2013:604536.
- Abdalla S, Zarga A, Sabri S. Effects of the flavone luteolin, isolated from *Colchicum richii*, on guinea-pig isolated smooth muscle and heart and on blood pressure and blood flow. *Phytother Res* 1994; 8(5):265-70.
- Agarwal S, Piesco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of IL-1 *beta*, TNF-*alpha*, IL-6, and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *J Dent Res* 1995; 74(4):1057-65.
- Adzet T, Cainigueral S, Iglesias J. A chromatographic survey of polyphenols from *Salvia* species. *Biochem System Ecol* 1988; 16(1):29-32.
- Agullo G, Gamet-Payraastre L, Fernandez Y, Anciaux N, Demigne C, Remesy C. Comparative effects of flavonoids on the growth, viability and metabolism of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29 cells). *Cancer Lett* 1996; 105(1):61-70.
- Ahmad A, Alkarkhi AF, Hena S, Khim LH. Extraction, separation and identification of chemical ingredients of *Elephantopus scaber* L. using factorial design of experiment. *Int J Chem* 2009; 1(1):36-49.
- Ahn K. The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Rep* 2017; 50(3):111-6.
- Akomolafe SF, Akinyemi AJ, Ogunsuyi OB, Oyeleye SI, Oboh G, Adeoyo OO, i sar. Effect of caffeine, caffeic acid and their various combinations on enzymes of cholinergic, monoaminergic and purinergic systems critical to neurodegeneration in rat brain - *in vitro*. *Neurotoxicology* 2017; 62:6-13.
- Al Sheef NB. Micromorphological and cytological analysis of trichomes and biological effects of extracts of *Salvia aegyptiaca* L., *S. fruticosa* Mill. and *S. lanigera* Poir. (Lamiaceae) from Libya. Beograd: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2015.
- Ali B, Al-Wabel NA, Shams S, Ahamad A, Khan SA, Anwar F. Essential oils used in aromatherapy: A systemic review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2015; 5(8):601-11.

- Alimpić A. Mikromorfološke karakteristike *Salvia amplexicaulis* Lam., *S. jurisicii* Košanin i *S. ringens* Sibth. & Sm. (Lamiaceae), hemijski sastav i biološka aktivnost njihovih etarskih ulja i ekstrakata. Beograd: Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu; 2016.
- Alimpić A, Knežević A, Milutinović M, Stević T, Šavikin K, Stajić M, i sar. Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. Ind Crop Prod 2017; 105:1-9.
- Al-Khalil S, Suleiman S. The effect of organic and aqueous extracts of *Salvia fruticosa* on intestinal motility. An-Najah J Res 1992; 2(7):45-50.
- Alves CT, Ferreira IC, Barros L, Silva S, Azeredo J, Henriques M. Antifungal activity of phenolic compounds identified in flowers from North Eastern Portugal against *Candida* species. Future Microbiol 2014; 9(2):139-46.
- Alzand KI, Mohamed MA. Flavonoids: Chemistry, biochemistry and antioxidant activity. J Pharm Res 2012; 5(8):4013-20.
- Amarowicz R, Troszyńska A, Baryłko-Pikielna N, Shahidi F. Polyphenolics extracts from legume seeds: correlations between total antioxidant activity, total phenolics content, tannins content and astringency. J Food Lipids 2004; 11(4):278-86.
- Amer A, Mehlhorn H. Repellency effect of forty-one essential oils against *Aedes*, *Anopheles*, and *Culex mosquitoes*. Parasitol Res 2006; 99(4):478-90.
- Amirah DM, Khan MR. Comparison of extraction techniques on extraction of gallic acid from stem bark of *Jatropha curcas*. J Applied Sci 2012; 12(11):1106-11.
- Amorati R, Foti MC, Valgimigli L. Antioxidant activity of essential oils. J Agric Food Chem 2013; 61(46):10835-47.
- An SM, Kim HJ, Kim JE, Boo YC. Flavonoids, taxifolin and luteolin attenuate cellular melanogenesis despite increasing tyrosinase protein levels. Phytotherapy Res 2008; 22(9):1200-7.
- Angelini P, Pagiotti R, Menghini A, Vianello B. Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. Ann Microbiol 2006; 56(1):65-9.
- Anwar F, Przybylski R. Effect of solvents extraction on total phenolics and antioxidant activity of extracts from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). Acta Sci Pol Technol Aliment 2012; 11(3):293-301.

- Anwar J, Spanevello RM, Thomé G, Stefanello N, Schmatz R, Gutierrez J, i sar. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. *Pharmacol Biochem Be* 2012; 103(2):386-94.
- Arts IC, Hollman PC. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The Am J Clin Nutr* 2005; 81(1):317S-25S.
- Arts IC, Hollman PC, Feskens EJ, Bueno de Mesquita HB, Kromhout D. Catechin intake might explain the inverse relation between tea consumption and ischemic heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(2):227-32.
- Arya V, Thakur N, Kashyap CP. Preliminary phytochemical analysis of the extracts of *Psidium* leaves. *J Pharmacogn Phytochem* 2012; 1(1):1-5.
- Ayoub NM, Yucel YY, Alkan M, Polatoglu K. Essential oil composition of *Salvia sclarea* L. aerial parts and its AChE inhibitory properties. *Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology* 2018; 16(1):80.
- Ashokkumar P, Sudhandiran G. Protective role of luteolin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against azoxymethane-induced experimental colon carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(9):590-7.
- Ashurst JV, Dawson A. *Pneumonia, Klebsiella*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
- Atkinson RG. Phenylpropenes: Occurrence, distribution, and biosynthesis in fruit. *J Agric Food Chem* 2018; 66(10):2259-72.
- Avallone R, Zanolli P, Puia G, Kleinschnitz M, Schreier P, Baraldi M. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. *Biochem Pharmacol* 2000; 59(11):1387-94.
- Azcan N, Ertan A, Demirci B, Baser KHC. Fatty acid composition of seed oils of twelve *Salvia* species growing in Turkey. *Chem Nat Compd* 2004; 40(3):218-21.
- Aziz NH, Farag SE, Mousa LA, Abo-Zaid MA. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios* 1998; 93(374):43-54.
- Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants* 2015; 4(3):3-8.

- Bahadoran Z., Mirmiran P, Azizi F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. *J Diabetes Metab Disord* 2013; 12(1):43.
- Bahmani M, Eftekhari Z, Jelodari M, Saki K, Abdollahi R, Majlesi M, i sar. Effect of Iranian herbal medicines in dysmenorrhea phytotherapy. *J Chem Pharm Res* 2015; 7(2):519-26.
- Bais HP, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Plant Physiol Bioch* 2002; 40(11):983-95.
- Bandoniene D, Murkovic M, Venskutonis PR. Determination of rosmarinic acid in sage and borage leaves by high-performance liquid chromatography with different detection methods. *J Chromatogr Sci* 2005; 43(7):372-6.
- Bandoniene D, Murkovic M, Pfannhauser W, Venskutonis P, Gruzdiene D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *Eur Food Res Technol* 2002; 214(2):143-7.
- Baolin L, Weiwei W, Ning T. Topical application of luteolin inhibits scratching behavior associated with allergic cutaneous reaction in mice. *Planta Med* 2005; 71:424-8.
- Baricevic D, Bartol T. The biological/pharmacological activity of the *Salvia* genus. U: Kintzios SE, urednik. *Sage: the genus Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. s. 143.
- Bacsi A, Pan L, Ba X, Boldogh I. Pathophysiology of bronchoconstriction: role of oxidatively damaged DNA repair. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2016; 16(1):59-67.
- Baskar AA, Ignacimuthu S, Michael GP, Al Numair KS. Cancer chemopreventive potential of luteolin-7-O-glucoside isolated from *Ophiorrhiza mungos* Linn. *Nutrition Cancer* 2011; 63(1):130-8.
- Bazylko A, Zygmunt M, Sapa J, Strzelecka H, Filipek B. Determination of spasmolytic and antispasmodic activities of thyme extracts and one of their major components, rosmarinic acid, in isolated rabbit ileum and isolated rat aorta. *Acta Biol Cracov Ser Zool* 2009; 51:49-54.
- Bekmambetov TR, Tonkovtseva VV, Litvinchuk NI, Yarosh AM. Essential oil of *Salvia sclarea* and its effect on psychophysiological state of people breathing it in different concentration during exercise. *Bull of the State Nikit Botan Gard* 2015; 117:23-9.



- Ben-Arye E, Dudai N, Eini A, Torem M, Schiff E, Rakover Y. Treatment of upper respiratory tract infections in primary care: a randomized study using aromatic herbs. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011; 2011:690346.
- Bentzen BH, Grauballe MCB, Björnsson MJ, Stoltze K., Hjørting-Hansen E, Holmstrup P. A comparison of two models of experimental periodontitis in rats. *Scand J Lab Anim Sci* 2005; 32(2):73-80.
- Berger EG. Tn-syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1455:255-68.
- Bhullar KS, Lassalle-Claux G, Touaibia M, Rupasinghe HV. Antihypertensive effect of caffeic acid and its analogs through dual renin–angiotensin–aldosterone system inhibition. *Eur J Pharmacol* 2014; 730:125-32.
- Bigović D, Branković S, Kitić D, Radenković M, Janković T, Šavikin K, i sar. Relaxant effect of the ethanol extract of *Helichrysum plicatum* (Asteraceae) on isolated rat ileum contractions. *Molecules* 2010; 15(5):3391-401.
- Bimakr M, Rahman RA, Taip FS, Ganjloo A, Salleh LM, Selamat J, i sar. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food Bioprod Process* 2011; 89(1):67-72.
- Bini Maleci L. Structure and mode of secretion of glandular trichomes in clary sage (*Salvia sclarea* L.) *Mem Atti Soc Tosc Sci Nat B* 1988; 95:183-97.
- Bird GWG, Wingham J. Haemagglutinins from *Salvia*. *Vox Sang* 1974; 26(2):163-6.
- Blasko Á, Gazdag Z, Grof P, Mate G, Sarosi S, Krisch J, sar. Effects of clary sage oil and its main components, linalool and linalyl acetate, on the plasma membrane of *Candida albicans*: an *in vivo* EPR study. *Apoptosis* 2017; 22(2):175-87.
- Blažeković B, Stanić G, Vladimir-Knežević S. Morphology, anatomy and phytochemistry of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus pulegioides* L. *Farmaceutski Glasnik* 2006; 62(3):121-30.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; 91(2):179-94.
- Blomhoff R. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16(1):47-54.
- Bogdanović D. Anatomija grudnog koša. Beograd: Savremena administracija; 2003.

- Bondet V, Brand-Williams W, Berset CL. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method. *LWT-Food Sci Technol* 1997; 30(6):609-15.
- Bone K, Mills SY. Principles and practice of phytotherapy, modern herbal medicine. Drugo izdanje. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2013.
- Bosetti C, La Vecchia C, Negri E, Franceschi S. Wine and other types of alcoholic beverages and the risk of esophageal cancer. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54:918-20.
- Botden IP, Langendonk JG, Meima ME, Boomsma F, Seynhaeve AL, Hagen TLT i sar. Daily red wine consumption improves vascular function by a soluble guanylyl cyclase-dependent pathway. *Am J Hypertens* 2011; 24(2):162-8.
- Bottone EJ. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(2):382-98.
- Bozan B, Ozturk N, Kosar M, Tunalier Z, Baser KHC. Antioxidant and free radical scavenging activities of eight *Salvia* species. *Chem Nat Compd* 2002; 38(2):198-200.
- Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2008; 6(Suppl 5):S344-9.
- Branković S. Fiziologija gastrointestinalnog sistema. U: Veljković S, Radenković M. urednici. Medicinska fiziologija, Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2016.
- Branković S, Kitić D, Radenković M, Veljković S, Golubović T. Calcium blocking activity as a mechanism of the spasmolytic effect the essential oil of *Calamintha glandulosa* Silic on isolated rat ileum. *Gen Physiol Biophys* 2009; 28:174-8.
- Branković S, Kitić D, Radenković M, Veljković S, Janković T, Šavikin K, i sar. Spasmolytic activity of the ethanol extract of *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* Boiss & Heldr on the isolated rat ileum contractions. *J Med Food* 2011; 14(5):495-8.
- Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Compr Rev Food Sci F* 2011; 10(4):221-47.
- Brisse S, Milatovic D, Fluit AC, Verhoef J, Martin N, Scheuring S, i sar. Comparative *in vitro* activities of ciprofloxacin, clinafloxacin, gatifloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, and trovafloxacin against *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella xyloca*, *Enterobacter cloacae*, and *Enterobacter aerogenes* clinical isolates with alterations in GyrA and ParC proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(8):2051-5.

- Brooks GF, Carrol KC, Butel JS, Morse AS. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th Edition. New York: McGraw Hill; 2007.
- Bruneton J. Pharmacognosy – Phytochemistry Medicinal Plants. 2nd edition. Pariz: Lavoisier Publishers; 1999.
- Burns E, Zobbi V, Panzeri D, Oskrochi R, Regalia A. Aromatherapy in childbirth: a pilot randomised controlled trial. *Bjog-Int J Obstet Gy* 2007; 114(7):838-44.
- Cai J, Lin P, Zhu X, Su Q. Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC–FTIR and GC–MS. *Food Chem* 2006; 99(2):401-7.
- Caniard A, Zerbe P, Legrand S, Cohade A, Valot N, Magnard JL, i sar. Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture. *BMC Plant Biol* 2012; 12:119.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biol Med* 1997; 22(5):749-60.
- Carlile MJ, Watkinson SC, Gooday GW. The fungi. Second edition. London, San Diego: Academic Press; 2001.
- Carović-Stanko K, Petek M, Martina G, Pintar J, Bedeković D, Čustić MH, i sar. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—a review. *Czech J Food Sci* 2016; 34(5):377-90.
- Carrubba A, La Torre R, Piccaglia R, Marotti M. Characterization of an Italian biotype of clary sage (*Salvia sclarea* L.) grown in a semi-arid Mediterranean environment. *Flavour Frag J* 2002; 17(3):191-4.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bohn SK, Dragland S, Sampson L, i sar. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J* 2010; 9:3.
- Cekici A, Kantarci A, Hasturk H, Van Dyke TE. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000* 2014; 64(1):57-80.
- Centre for Clinical Practice at NICE (UK). Respiratory tract infections - antibiotic prescribing: prescribing of antibiotics for self-limiting respiratory tract infections in adults and children in primary care. NICE Clinical Guidelines, No. 69. London: National Institute for Health and Clinical Excellence (UK); 2008.

- Ceschel GC, Maffei P, Moretti MDL, Peana A2T, Demontis S. *In vitro* permeation through porcine buccal mucosa of *Salvia sclarea* L. essential oil from topical formulation. STP Pharma Sciences 1998; 8(2):103-6.
- Cetin H, Cinbilgel I, Yanikoglu A, Gokceoglu M. Larvicidal activity of some Labiatae (Lamiaceae) plant extracts from Turkey. Phytother Res 2006; 20(12):1088-90.
- Chakalova ES, Genova EM, Thuy NT. Comparative anatomical investigations on leaves of *Salvia officinalis* L. and *S. tomentosa* Mill. Fitologija 1993; 46:3-11.
- Chao PC, Hsu CC, Yin MC. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. Nutr Metab (Lond) 2009; 6(1):33.
- Chen JL, Ko WC. Relaxation of isolated guinea-pig trachea by apigenin, a constituent of celery, via inhibition of phosphodiesterase. Eur J Pharmacol 2017; 811:129-33.
- Chen Y, Wu ZF, Yang LJ. Influence of baicalin on alveolar bone resorption in rat experimental periodontitis. Sci Pharm 2008; 76: 689-98.
- Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A, Mallea M, Barbe J, Pages J. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(3):1043-6.
- Chew KK, Khoo MZ, Ng SY, Thoo YY, Aida WW, Ho CW. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Orthosiphon stamineus* extracts. Int Food Res J 2011; 18(4):1427-35.
- Chiang LC, Ng LT, Lin IC, Kuo PL, Lin CC. Anti-proliferative effect of apigenin and its apoptotic induction in human Hep G2 cells. Cancer Lett 2006; 237(2):207-14.
- Chiruvella KK, Mohammed A, Dampuri G, Ghanta RG, Raghavan SC. Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-O-glucoside isolated from callus cultures of *Soymida febrifuga*. Int J Biomed Sci 2007; 3(4):269-78.
- Chovanova R, Mikulašova M, Vaverkova Š. *In vitro* antibacterial and antibiotic resistance modifying effect of bioactive plant extracts on methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. Int J Microbiol 2013; 2013:760969.

- Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, i sar. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *FASEB J* 2004; 18(14):1670-81.
- Cinar OG, Kirmizibekmez H, Akaydin G, Yesilada E. Investigation of *in vitro* opioid receptor binding activities of some Turkish *Salvia* species. *Rec Nat Prod* 2011; 5(4):281-9.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th informational supplement, M100-S15. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005.
- Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moysés F, Basso C, Papke DKM, i sar. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci* 2015; 122:65-71.
- Cohen L. A power primer. *Psychol Bull* 1992; 112(1):155-9.
- Cohen K, Nyska A. Oxidation of biological system: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and method for their quantification. *Toxicol Path* 2002; 30(6):620-50.
- Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues J.F. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur J Epidemiol* 2000; 16(4):357-63.
- Cordain L, Toohey L, Smith MJ, Hickey MS. Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. *Br J Nutr* 2007; 83(3):207-17.
- Cosio BG, Rosado JR, Rossi FF. Asthma: Epidemiology, pathophysiology, and risk factors. U: Spiro SG, Silvestri GA, Agusti A, urednici. *Clinical Respiratory Medicine*. 4. izdanje. Amsterdam: Elsevier; 2012.
- Costa RS, Carneiro TCB, Cerqueira-Lima AT, Queiroz NV, Alcântara-Neves NM, Pontes-de-Carvalho LC, i sar. *Ocimum gratissimum* Linn. and rosmarinic acid, attenuate eosinophilic airway inflammation in an experimental model of respiratory allergy to *Blomia tropicalis*. *Int Immunopharmacol* 2012; 13(1):126-34.
- Costanzo LS. *Physiology*. 4. izdanje. Philadelphia: Elsevier; 2010.
- Cottigli F, Loy G, Garau D, Floris C, Caus M, Pompei R. i sar Antimicrobial evaluation of coumarins and flavonoids from the stems of *Daphne gnidium* L. *Phytomedicine* 2001; 8(4):302-5.

- Couladis M, Tzakou O, Verykokidou E, Harvala C. Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother Res* 2003; 17(2):194-5.
- Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(4):564-82.
- Cui H, Zhang X, Zhou H, Zhao C, Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. *Bot Stud* 2015; 56(1):16.
- Cunningham MW. Post-streptococcal autoimmune sequelae: rheumatic fever and beyond. U: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, urednici. *Streptococcus pyogenes: basic biology to clinical manifestations* [Internet]. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016.
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2004; 42(12):5644-9.
- Cushnie TT, Hamilton VE, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res* 2003; 158(4):281-9.
- Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Ag* 2005; 26(5):343-56.
- Day HE, Campeau S, Watson Jr SJ, Akil H. Distribution of  $\alpha_{1a}$ -,  $\alpha_{1b}$ -and  $\alpha_{1d}$ -adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 1997; 13(2):115-39.
- Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules* 2010; 15(10):7313-52.
- de la Maza LM, Pezzlo MT, Shigei JT. Color atlas of medical bacteriology. Washington: American Society for Microbiology Press; 2004.
- Dellavalle PD, Cabrera A, Alem D, Larranaga P, Ferreira F, Dalla Rizza M. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chil J Agr Res* 2011; 71(2):231-9.
- Delamare APL, Moschen-Pistorello IT, Artico L, Atti-Serafini L, Echeverrigaray S. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in South Brazil. *Food Chem* 2007; 100(2):603-8.

- Dent M, Dragović-Uzelac V, Elez Garofulić I, Bosiljkov T, Ježek D, Brnčić M. Comparison of conventional and ultrasound-assisted extraction techniques on mass fraction of phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis* L.). *Chen Biochem Eng Q* 2015; 29(3):475-84.
- Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, Brncic M, Bosiljkov T, Levaj B. The effect of extraction solvents, temperature and time on the composition and mass fraction of polyphenols in Dalmatian wild sage (*Salvia officinalis* L.) extracts. *Food Technol Biotech* 2013; 51(1):84-91.
- Derakhshani Z, Hassani A, Pirzad A, Abdollahi R, Dalkani M. Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity in some medicinal herbs cultivated in Iran. *Botanica Serbica* 2012; 36(2):117-22.
- Deshmukh R, Kaundal M, Bansal V. Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomed Pharmacother* 2016; 81:56-62.
- Dhanani T, Shah S, Gajbhiye NA, Kumar S. Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arab J Chem* 2017; 10(Suppl 1): S1193-S9.
- Diklić N. Rod *Salvia* L. U: Josifović M, urednik. Flora SR Srbije, 6. Beograd: Srpska Akademija Nauka i Umetnosti; 1974. p. 444-5.
- Dion CF, Ashurst JV. Pneumonia, *Streptococcus pneumoniae*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
- Dizaye KF. The pharmacological and antimicrobial studies of *Salvia officinalis* infusion. *Zanco J Med Sci* 2005; 9(2):2005.
- Dobetsberger C, Buchbauer G. Actions of essential oils on the central nervous system: An updated review. *Flavour Frag J* 2011; 26(5):300-16.
- Dogan G, Hayta S, YuceE, Bagci E. Composition of the essential oil of two *Salvia* taxa (*Salvia sclarea* and *Salvia verticillata* subsp. *verticillata*) from Turkey. *Nat Sci Discov* 2015; 1(3):62-7.
- Drossman DA. 2006. The functional gastrointestinal disorders and the Rome III process. *Gastroenterology* 130(5):1377-90.

- Drossman DA. Functional gastrointestinal disorders: history, pathophysiology, clinical features, and Rome IV. *Gastroenterology* 2016; 150(6):1262-79.
- Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *J Agr Food Chem* 2009; 57(5):1768-74.
- Dulger B, Hacıoglu N. Antifungal activity of endemic *Salvia tigrina* in Turkey. *Trop J Pharm Res* 2008; 7(3):1051-4.
- Dumitrescu AL, El-Aleem SA, Morales-Aza B, Donaldson LF. A model of periodontitis in the rat: effect of lipopolysaccharide on bone resorption, osteoclast activity, and local peptidergic innervations. *J Clin Periodontol* 2004; 31(8):596-603.
- Dumitrescu AL. Histological comparison of periodontal inflammatory changes in two models of experimental periodontitis in rats. A pilot study. *Timisoara Medical Journal* 2006; 56(2-3):211-7.
- Đukić M, Ninković M, Jovanović M. Oxidative stress: Clinical diagnostic significance. *J Med Biochem* 2008; 27(4):409-25.
- Džamić A, Soković M, Ristić M, Grujić-Jovanović S, Vukojević J, Marin PD. Chemical composition and antifungal activity of *Salvia sclarea* (Lamiaceae) essential oil. *Arch Biol Sci* 2008; 60(2):233-7.
- Dweck AC. Folklore and cosmetic use of various *Salvia* species. U: Kintzios SE, urednik. Sage: the genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. s. 20-1.
- Dzumayev KK, Tsibulskaya IA, Zenkevich IG, Tkachenko KG, Satzyperova IF. Essential oils of *Salvia sclarea* L. produced from plants grown in southern Uzbekistan. *J Essenti Oil Res* 1995; 7(6):597-604.
- Ebani V, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F. Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. *Molecules* 2018; 23(7):1668.
- Ebrahimabadi AH, Mazoochi A, Kashi FJ, Djafari-Bidgoli Z, Batooli H. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of the aerial parts of *Salvia eremophila* Boiss. from Iran. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(5):1371-6.
- Edwards AM. Chromones. *Chem Immunol Allergy* 2014; 100:317-22.



- Eftekhar N, Moghimi A, Boskabady MH. Prophylactic effect of rosmarinic acid on tracheal responsiveness, white blood cell count and oxidative stress markers in lung lavage of sensitized rats. *Pharmacol Rep* 2018; 70(1):119-25.
- Eglen RM, Hegde SS, Watson N. Muscarinic receptor subtypes and smooth muscle function. *Pharmacol Rev* 1996; 48(4):531-65.
- Eiji S, Salmaki Y. Evolution of trichomes and its systematic significance in *Salvia* (Menthaeae; Nepetoideae; Lamiaceae). *Bot J Linn Soc* 2016; 180(2):241-57.
- Eisenman SW, Zaurov DE, Struve L. Medicinal plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan. Berlin: Springer Science & Business Media; 2012.
- Ejeil AL, Gaultier F, Igondjo-Tchen S, Senni K, Pellat B, Godeau G, i sar. Are cytokines linked to collagen breakdown during periodontal disease progression? *J Periodontol* 2003; 74(2): 196-201.
- Elburki MS, Rossa C, Guimaraes MR, Goodenough M, Lee HM, Curylofo FA, i sar. A novel chemically modified curcumin reduces severity of experimental periodontal disease in rats: initial observations. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:959471.
- Ellis BE, Towers GHN. Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochem J* 1970; 118(2):291-7.
- Engelbertz J., Lechtenberg M, Studt L, Hensel A, Verspohl EJ. Bioassay-guided fractionation of a thymol-deprived hydrophilic thyme extract and its antispasmodic effect. *J Ethnopharmacol* 2012; 141(3):848-53.
- Ehrnhofer-Ressler MM, Fricke K, Pignitter M, Walker JM, Walker J, Rychlik M, i sar. Identification of 1,8-cineole, borneol, camphor and thujone as anti-inflammatory compounds in a *Salvia officinalis* L. infusion using human gingival fibroblasts. *J Agric Food Chem* 2013; 61(14): 3451-9.
- Erdtman G. Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae, and Avicenniaceae. *Svensk Botanisk Tidskrift* 1945; 39:279-85.
- Ertas A, Boga M, Yilmaz MA, Yesil Y, Tel G, Temel H, i sar. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): rosmarinic acid. *Ind Crop Prod* 2015; 67:336-45.

- Esfandabadi AO, Khodagholi F, Sanati MH. Evaluation of the neuroprotective effect of salvigenin between the hippocampus and cortex of *beta*-amyloid-injected rats. *Alzheimers Dement* 2013; 9(4):P308.
- European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 9.0 edition. Strasbourg: European Directorate for the quality of medicines and healthcare. Council of Europe; 2017.
- Fang J, Zhou Q, Liu LZ, Xia C, Hu X, Shi X, i sar. Apigenin inhibits tumor angiogenesis through decreasing HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression. *Carcinogenesis* 2007; 28(4):858-64.
- Fakoorziba MR, Moemenbellah-Fard MD, Azizi K, Shekarpoor H, Alipoor H. Excito-repellency effects of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) extracts on adult house flies, *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *J Health Sci Surveill Syst* 2014; 2(1):2-7.
- Farka P, Holla M, Tekel J, Mellen S, Vaverkova T. Composition of the essential oils from the flowers and leaves of *Salvia sclarea* L. (Lamiaceae) cultivated in Slovak Republic. *J Essenti Oil Res* 2005; 17(2):141-4.
- Farrugia G. Ionic conductances in gastrointestinal smooth muscles and interstitial cells of Cajal. *Annu Rev Physiol* 1999; 61(1):45-84.
- FDA – Food and drug administration. Bad Bug Book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. Second edition. Silver Spring: Center for food safety and applied nutrition (CFSAN) of the Food and drug administration (FDA), U.S. Department of health and human services; 2012.
- Federica C, Cristina N, Anna C, Nunziatina DT, Antonella L, Lucia M. *In vitro* binding studies of methanolic extracts from different *Salvia* species. *Pharmacologyonline* 2006; 1:1-10.
- Feres M, Figueiredo LC, Soares GM, Faveri M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis. *Periodontol* 2015; 67(1):131-86.
- Ferreira LG, Evora PRB, Capellini VK, Albuquerque AA, Carvalho MTM, da Silva Gomes RA, i sar. Effect of rosmarinic acid on the arterial blood pressure in normotensive and hypertensive rats: Role of ACE. *Phytomedicine* 2018; 38:158-65.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen PS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 $\beta$  generation. *Clin Exp Immunol* 2007; 147(2):227-35.

- Ferry DR, Smith A, Malkhandi J, Fyfe DW, de Takats PG, Anderson D, i sar. Phase I clinical trial of the flavonoid quercetin: pharmacokinetics and evidence for *in vivo* tyrosine kinase inhibition. Clin Cancer Res 1996; 2:659-68.
- Ferlay V, Mallet G, Masson A, Ucciani E, Gruber M. Fatty acid composition of seed oils from spontaneous species of the mediterranean south-east area. Oleagineux 1993; 48:91-7.
- Fick RB. *Pseudomonas aeruginosa*, the opportunist: pathogenesis and disease. Boca Raton: CRC Press; 1993.
- Fiore G, Nencini C, Cavallo F, Capasso A, Bader A, Giorgi G, i sar. *In vitro* antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. Phytoter Res 2006; 20(8):701-3.
- Fiorellini JP, Ishikawa SO, Kim DM. Gingival inflammation. U: Carranza FA, urednik. Clinical periodontology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2006.
- Fleer H, Verspohl EJ. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. Phytomedicine 2007; 14(6):409-15.
- Foris LA, Snowden J. *Proteus mirabilis* infections. NCBI. Treasure Island (FL): StatPearls publishing; 2017.
- Formagio ASN, Volobuff CRF, Santiago M, Cardoso CAL, Vieira MC, Pereira ZV. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. Antioxidants 2014; 3:745-57.
- Foster T. *Staphylococcus*. U: Baron S, urednik. Medical Microbiology. 4<sup>th</sup> edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
- Fraternale D, Giamperi L, Bucchini A, Ricci D, Epifano F, Genovese S, i sar. Composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* from Italy. Chem Nat Compd 2005; 41(5):604-6.
- Fuchs J, Milbradt R. Skin anti-inflammatory activity of apigenin-7-glucoside in rats. Arzneimittelforsch 1993; 43(3):370-2.
- Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, apigenin, luteolin and fisetin. Int Immunopharmacol 2011; 11(9):1150-9.

- Furlan CM, Motta LB, dos Santos DYAC. Tannins: what do they represent in plant life. U: Petridis GK, urednik. Tannins: types, foods containing, and nutrition. New York; Nova Science Publishers Inc; 2010.
- Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ. The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. U: Lyte M, Cryan J, urednici. Microbial endocrinology: The microbiota-gut-brain axis in health and disease. 817. volumen. New York: Springer; 2014.
- de Gaetano G, Rotondo HS. The relationship between wine consumption and vascular risk: From epidemiological evidence to biological plausibility. Archives of Hellenic Medicine 2000; 17(SUPPL. A).
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, i sar. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella enteritidis*. FEMS Microb Rev 2009;33(4):718-38.
- Gayet S, Chollet R, Molle G, Pages JM, Chevalier J. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(5):1555-9.
- Giachetti D, Taddei E, Taddei I. Pharmacological Activity of *Mentha piperita*, *Salvia officinalis* and *Rosmarinus officinalis* essences on Oddi's sphincter. Planta Med 1986; 52(6):543-4.
- Giada MD. Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power. U: Morales-Gonzalez, urednik. Oxidative stress and chronic degenerative diseases-a role for antioxidants. London: InTechOpen; 2013.
- Giembycz MA, Newton R. Beyond the dogma: novel  $\beta$ 2-adrenoceptor signalling in the airways. Eur Respir J 2006; 27(6):1286-306.
- Gilani AH, Khan AU, Ghayur MN, Ali SF, Herzig J. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through  $K^+$ -channel activation. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2006; 99(5):365-73.
- Gilani AH, Rehman NU, Khan A, Alkharfy KM. Studies on bronchodilator activity of *Salvia officinalis* (sage): possible involvement of  $K^+$  channel activation and phosphodiesterase inhibition. Phytotherapy Res 2015; 29(9):1323-9.
- Gilmore MS, urednik. The *Enterococci*: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: American Society for Microbiology Press; 2002.

- Gohari AR, Saeidnia S, Shahverdi AR, Yassa N, Malmir M, Mollazade K, i sar. Phytochemistry and antimicrobial compounds of *Hymenocrater calycinus*. Eur Asia J Bio Sci 2009; 3(9):64-8.
- Gomez-Rivera A, Gonzalez-Cortazar M, Gallegos-Garcia AJ, Escobar-Ramos A, Flores-Franco G, Lobato-Garcia CE. Spasmolytic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Salvia gesneriflora* Lindley. Afr J Tradit Complement Altern Med 2018; 15(4):72-82.
- Gorzalczany S, Moscatelli V, Acevedo C, Ferraro G. Spasmolytic activity of *Artemisia copa* aqueous extract and isolated compounds. Nat Prod Res 2013; 27(11):1007-11.
- Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the microcirculation. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences; 2010.
- Grasa L, Rebollar E, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD. The role of Ca<sup>2+</sup> in the contractility of rabbit small intestine *in vitro*. J Physiol Pharmacol 2004; 55(3):639-50.
- Greenwood D, Slack RCB, Peuthere JF. Medical microbiology, a guide to microbial infections: pathogens, immunity, laboratory diagnosis and control. 16. izdanje. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2002.
- Gronbaek M, Becker U, Johansen D, Tonnesen H, Jensen G, Sorensen TIA. Population based cohort study of the association between alcohol intake and cancer of the upper digestive tract. BMJ 1998; 317:844-7.
- Gross M, Neshar E, Tikhonov T, Raz O, Pinhasov A. Chronic food administration of *Salvia sclarea* oil reduces animals' anxious and dominant behavior. J Med Food 2013; 16(3):216-22.
- Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). Fitoterapia. 2005; 76(1):1-25
- Guimaraes MR, de Aquino SG, Coimbra LS, Spolidorio LC, Kirkwood KL, Rossa CJr. Curcumin modulates the immune response associated with LPS-induced periodontal disease in rats. Innate Immun 2012; 18(1):155-63.
- Gulen HT, Yucel YY, Polatoglu K. Comparison of the essential-oil composition of *Salvia sclarea* L. aromatherapy oils from Turkish markets. Facta Universitatis, Series Physics, Chemistry and Technology 2018; 16(1):162.

- Guo D, Du G, Li L, Li R. Inhibitory activities of rosmarinic acid against plant pathogenic fungi. *Wei sheng wu xue tong bao* 2004; 31(4):71-6.
- Gupta S, Ahmad N, Mohan RR, Husain MM, Mukhtar H. Prostate cancer chemoprevention by green tea: *In vitro* and *in vivo* inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer Res* 1999; 59(9):2115-20.
- Guthmiller JM, Novak KF. Periodontal diseases. U: Brogden KA, Guthmiller JM, urednici. Polymicrobial diseases. Washington (DC): ASM Press; 2002.
- Gutiérrez-Venegas G, Kawasaki-Cárdenas P, Arroyo-Cruz SR, Maldonado-Frías S. luteolin inhibits lipopolysaccharide actions on human gingival fibroblasts. *Eur J Pharmacol* 2006; 541(1-2):95-105.
- Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 2006, 217:213-20.
- Gulcin I, Uguz MT, Oktay M, Beydemir S, Kufrevioglu OI. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turk J Agric For* 2004; 28(1):25-33.
- Gundry S. Modifying the gut microbiome with polyphenols and a lectin limited diet improves endothelial function. *Atherosclerosis* 2016; 252:e167.
- Gundry S, Epstein J. Thirteen year followup of managing patients with known coronary artery disease using a leptin-limited, high dose olive oil and polyphenol rich diet. *Atherosclerosis* 2016; 252:e90.
- Hagerman A, Harvey-Mueller I, Makkar HPS. Quantification of tannins in tree foliage - a laboratory manual. Vienna; FAO/IAEA; 2000.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 1999; 86(6):985-90.
- Han SH, Hur MH, Buckle J, Choi J, Lee MS. Effect of aromatherapy on symptoms of dysmenorrhea in college students: A randomized placebo-controlled clinical trial. *J Altern Complem Med* 2006; 12(6):535-41.
- Hanada T, Yoshimura A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(4-5):413-21.

- Hansel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G. Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis: Drogen P-Z Folgeband 2. Berlin: Springer Verlag; 1994.
- Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino PD, Conn BJ, Grayer R, i sar. Labiatae. U: Kubitzki K, Kadereit JW, urednici. The families and genera of vascular plants. Vol. 7. Berlin & Heidelberg: Springer; 2004.
- Harvey J, Keenan KP, Gilmour A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. Food Microbiol 2007; 24(4):380-92.
- Haznedaroglu MZ, Karabay NU, Zeybek U. Antibacterial activity of *Salvia tomentosa* essential oil. Fitoterapia 2001; 72(7):829-31.
- Hegazi AG, Abdel-Rahman EH. Cytokines. U: Khan WA, urednik. Innovative Immunology. New Jersey: Austin Publishing Group; 2015.
- Hertog MG, Kromhout D, Aravanis C, Blackburn H, Buzina R, Fidanza F, i sar. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the seven countries study. Arch Intern Med 1995; 155(4):381-6.
- Hijazi A, Al Masri DS, Farhan H, Nasser M, Rammal H, Annan H. Effect of different ethanol concentrations, using different extraction techniques, on the antioxidant capacity of Lebanese *Eryngium creticum*. J Pharm Chem Biol Sci 2015; 3(2):262-71.
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De BK, Popovic T, i sar. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. J Clin Microbiol 2006; 44(9):3352-60.
- Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Yamazaki K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. Clin Exp Immunol 2006; 144(1):35-40.
- Hopmans EC. Patulin: a mycotoxin in apples. Perishables Handling Quarterly 1997; 91:5-6.
- Horinaka M, Yoshida T, Shiraishi T, Nakata S, Wakada M, Sakai T. The dietary flavonoid apigenin sensitizes malignant tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. Mol Cancer Ther 2006; 5(4):945-51.

- Horvathova K, Chalupa I, Šebova L, Tothova D, Vachalkova A. Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2005; 565(2):105-12.
- Howells GL. Cytokine networks in destructive periodontal disease. *Oral Dis* 1995; 1(4): 266-70.
- Hristova Y, Gochev V, Wanner J, Jirovetz L, Schmidt E, Girova T, i sar. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. *J BioSci Biotechnol* 2013; 2(1):39-44.
- Hsu FL, Chen YC, Cheng JT. Caffeic acid as active principle from the fruit of *xanthiumstrumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. *Planta Med* 2000; 66(03):228-30.
- [https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name\\_id=183819](https://wcsp.science.kew.org/synonymy.do?name_id=183819)
- Huang MT, Smart RC, Wong CQ, Conney AH. Inhibitory effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Res* 1988; 48(21):5941-6.
- Hudaib M, Bellardi MG, Rubies-Autonell C, Fiori J, Cavrini V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-I. *Farmaco* 2001; 56(3):219-27.
- Hudault S, Guignot J, Servin AL. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. *Gut* 2001; 49(1):47-55.
- Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, i sar. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486:207-14.
- Ijuhin N, Miyauchi M, Ito H., Takata T, Ogawa I, Nikai H. Enhanced collagen phagocytosis by rat molar periodontal fibroblasts after topical application of lipopolysaccharide-ultrastructural observations and morphometric analysis. *J Periodontal Res* 1992; 27(3):167-75.
- Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. The pharmacological effects of *Salvia* species on the central nervous system. *Phytother Res* 2006; 20(6):427-37.
- Jalali-Nezhad AA, Farajian-Mashhadi F, Komeili G, Barkhordari-Ahmadi F. The effect of ginger hydroalcoholic extract on rat ileal contraction *in vitro*. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences* 2016; 18(2):e5984.



- Janbaz KH, Hamid I, Qadir MI. Spasmolytic, bronchodilator and vasodilator activities of aqueous-methanolic extract of *Ocimum basilicum*. Int J Agric Biol 2014; 16(2):321-7.
- Janda JM, Abbott SL. The Enterobacteria. Second edition. Washington: ASM press; 2006.
- Jančić R. Botanika farmaceutika. Beograd: Službeni glasnik; 2002.
- Jančić R, Stošić D, Mimica-Dukić N, Lakušić B. Aromatične biljke Srbije. Beograd-Gornji Milanovac: NIP Dečije novine; 1995.
- Jandinski JJ, Stashenko P, Feder LS, Leung CC, Peros WJ, Rynar JE, i sar. Localization of interleukin-1 *beta* in human periodontal tissue. J Periodontol 1991; 62(1):36-43.
- Janicsak G, Mathe I, Miklossy-Vari V, Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. Biochem System Ecol 1999; 27(7):733-8.
- Janković M, Đorđević V. Primenjena ekologija. Beograd; Naučna knjiga: 1981.
- Janssen K, Mensink RP, Cox FJ, Harryvan JL, Hovenier R, Hollman PC, i sar. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an *in vitro* and a dietary supplement study. Am J Clin Nutr 1998; 67(2):255-62.
- Jasicka-Misiak I, Poliwoda A, Petecka M, Buslovych O, Shlyapnikov VA, Wieczorek PP. Antioxidant phenolic compounds in *Salvia officinalis* L. and *Salvia sclarea* L. Ecol Chem Eng S 2018; 25(1):133-42.
- Jeong GS, Lee SH, Jeon, SN, Kim YC, Kim EC. Anti-inflammatory effects of apigenin on nicotine- and lipopolysaccharide-stimulated human periodontal ligament cells via heme oxygenase-1. Int Immunopharmacol 2009; 9(12):1374-80.
- Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. Am J Clin Nutr 2003; 78(4):728-33.
- Jiang H, Xia Q, Wang X, Song J, Bruce IC. Luteolin induces vasorelaxion in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences 2005; 60(6):444-7.
- Johnson JR. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. Clin Microbiol Rev 1991; 4(1):80-128.
- Jovanović M. Praktikum iz farmaceutske tehnologije sa biofarmacijom I deo. Drugo izdanje. Beograd: Nijansa, Zemun; 2004.

- Jugoslovenska farmakopeja (Ph. Jug. V). Prilagođeni prevod Evropske farmakopeje. Peto izdanje. Beograd: Savremena administracija; 2000.
- Jugoslovenska farmakopeja IV SFRJ (Ph. Jug. IV). Pharmacopoea jugoslavica editio quarta. Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu; 1984.
- Jung UJ, Lee MK, Park YB, Jeon SM, Choi MS. Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318(2):476-83.
- Kamarudin NA, Markom M, Latip J. Effects of solvents and extraction methods on herbal plants *Phyllanthus niruri*, *Orthosiphon stamineus* and *Labisia pumila*. *Indian J Sci Technol* 2016; 9(21).
- Kamatou GPP, Makunga NP, Ramogola WPN, Viljoen AM. South African *Salvia* species: a review of biological activities and phytochemistry. *J Ethnopharmacol* 2008; 119(3):664-72.
- Kamatou GPP, Van Vuuren SF, Van Heerden FR, Seaman T, Viljoen, AM. Antibacterial and antimycobacterial activities of South African *Salvia* species and isolated compounds from *S. chamelaeagnea*. *S Afr J Bot* 2007; 73(4):552-7.
- Kamatou GPP, Viljoen AM, Gono-Bwalya AB, Van Zyl RL, Van Vuuren SF, Lourens ACU, i sar. The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(3):382-90.
- Kan Y, Gökbulut A, Kartal M, Konuklugil B, Yılmaz G. Development and validation of a LC method for the analysis of phenolic acids in Turkish *Salvia* species. *Chromatographia* 2007; 66(1):S147-52.
- Kara Y, Kocak A, Citil OB, Tulukcu E. A comparative study of the fatty acid composition and lipid content of *Salvia sclarea*. *Chem Nat Compd* 2010; 46(4):612-4.
- Karakašević B. Mikrobiologija i parazitologija. Beograd–Zagreb: Medicinska knjiga; 1977.
- Karaki H, Weiss G. Calcium release in smooth muscles. *Life Sci* 1988; 42(2):111-22.
- Karaman S, Kocabas YZ. Traditional medicinal plants of K. Maras (Turkey). *The Sciences* 2001; 1(3):125-8.
- Karatas H. Antimicrobial activities of the essential oils of four *Salvia* species from Turkey. *J Med Plants Res* 2010; 4(12):1238-40.

- Kaur T, Bhat HA, Bhat R, Kumar A, Bindu K, Koul S, i sar. Physio-chemical and antioxidant profiling of *Salvia sclarea* L. at different climates in north-western Himalayas. *Acta Physiol Plant* 2015; 37(7):132.
- Kawai M, Hirano T, Higa S, Arimitsu J, Maruta M, Kuwahara Y, et al. Flavonoids and related compounds as anti-allergic substances. *Allergol Int* 2007; 56(2):113-23.
- Kayedi MH, Haghdoost AA, Salehnia A, Khamisabadi K. Evaluation of repellency effect of essential oils of *Satureja khuzestanica* (carvacrol), *Myrtus communis* (myrtle), *Lavandula officinalis* and *Salvia sclarea* using standard WHO repellency tests. *J Arthropod-borne Di* 2014; 8(1):60-8.
- Khan A, Najeeb-ur-Rehman KM, Gilani AH. Antidiarrheal and antispasmodic activities of *Salvia officinalis* are mediated through activation of K<sup>+</sup> channels channels. *Bangladesh J Pharmacol* 2011; 6(2):111-6.
- Khan T, Zahid M, Asim M, Iqbal Z, Choudhary MI, Ahmad VU. Pharmacological activities of crude acetone extract and purified constituents of *Salvia moorcraftiana* Wall. *Phytomedicine* 2002; 9(8):749-52.
- Khanbabaee K, van Ree T. Tannins: classification and definition. *Nat Prod Rep* 2001; 18(6):641-9.
- Khoury M, Stien D, Eparvier V, Ouaini N, El Beyrouthy M. Report on the medicinal use of eleven Lamiaceae species in Lebanon and rationalization of their antimicrobial potential by examination of the chemical composition and antimicrobial activity of their essential oils. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2016:2547169.
- Kim TH, Jung JW, Ha BG, Hong JM, Park EK, Kim HJ, i sar. The effects of luteolin on osteoclast differentiation, function *in vitro* and ovariectomy-induced bone loss. *J Nutr Biochem* 2011a; 22(1):8-15.
- Kim YJ, Lee MS, Yang YS, Hur MH. Self-aromatherapy massage of the abdomen for the reduction of menstrual pain and anxiety during menstruation in nurses: a placebo-controlled clinical trial. *Eur J Integr Med* 2011b; 3(3):e165-8.
- Kinane DF. Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2001; 25(1):8-20.

- King GM. Uptake of carbon monoxide and hydrogen at environmentally relevant concentrations by *Mycobacteria*. *Appl Environ Microb* 2003; 69(12):7266-72.
- Kintzios S. Sage-the genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000.
- Kirmizibekmez H, Atay I, Kaiser M, Yesilada E, Tasdemir D. *In vitro* antiprotozoal activity of extracts of five Turkish Lamiaceae species. *Nat Prod Commun* 2011; 6(11):1697-700.
- Kirschstein T, Rehberg M, Bajorat R, Tokay T, Porath K, Kohling R. High K<sup>+</sup>-induced contraction requires depolarization-induced Ca<sup>2+</sup> release from internal stores in rat gut smooth muscle. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30(8):1123-31.
- Kitić D. Divlji bosiljak - hemijsko i mikrobiološko ispitivanje. Beograd: Zadužbina Andrejević; 2006.
- Kiyochiro Y, Kenji K. Electrophysiological and mechanical characteristics of histamine receptors in smooth muscle cells of the guinea-pig ileum. *E J Pharmacol* 1987; 144(1):29-37.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ* 1996; 312(7029):478-81.
- Ko FN, Huang TF, Teng CM. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1991; 1115(1):69-74.
- Ko WC, Shih CM, Leu IJ, Chen TT, Chang JP. Mechanisms of relaxant action of luteolin in isolated guinea pig trachea. *Planta Med* 2005; 71:406-11.
- Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PL, Park YK, i sar. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *J Antimicrob Chemoth* 2003; 52(5):782-9.
- Koshihara Y, Neichi T, Murota S, Lao A, Fujimoto Y, Tatsuno T. Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim Biophys Acta Lipids Lipid Metab* 1984; 792(1):92-7.
- Kostić M, Zlatković B, Miladinović B, Živanović S, Mihajilov-Krstev T, Pavlović D, i sar. 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* 2015; 39(2):199-208.

- Kotanidou A, Xagorari A, Bagli E, Kitsanta P, Fotsis T, Papapetropoulos A, i sar. Luteolin reduces lipopolysaccharide-induced lethal toxicity and expression of proinflammatory molecules in mice. *Am J Resp Crit Care* 2002; 165(6):818-23.
- Kotiranta A, Lounatmaa K, Haapasalo M. Epidemiology and pathogenesis of *Bacillus cereus* infections. *Microbes Infect* 2000; 2(2):189-98.
- Koutsaviti A, Tzini DI, Tzakou O. Greek *Salvia sclarea* L. essential oils: effect of hydrodistillation time, comparison of the aroma chemicals using hydrodistillation and HS-SPME techniques. *Rec Nat Prod* 2016; 10(6):800-5.
- Koval YS, Tonkovtseva VV, Bekmambetov TR., Yarosh AM. Essential oil of *Salvia sclarea* and its effect on psychophysiological state of elderly people breathing it in low concentration. *Bull of the State Nikit Botan Gard* 2015; 116:69-73.
- Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2002.
- Kovačević P. Respiracioni sistem. U: Veljković S, Radenković M. Medicinska fiziologija, urednici. Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2016.
- Kristich CJ, Rice LB, Arias CA. Enterococcal infection—treatment and antibiotic resistance. U: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, urednici. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014.
- Krstić L, Malenčić D, Anačkov G. Structural investigations of trichomes and essential oil composition of *Salvia verticillata*. *Bot Helv* 2006; 116(2):159-68.
- Kuete V, Ngameni B, Simo CF, Tankeu RK, Ngadjui BT, Meyer JJM, i sar. Antimicrobial activity of the crude extracts and compounds from *Ficus chlamydocarpa* and *Ficus cordata* (Moraceae). *J Ethnopharmacol* 2008; 120(1):17-24.
- Kumar P, Ansari SH, Ali J. Herbal remedies for the treatment of periodontal disease - a patent review. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2009; 3(3):221–8.
- Kuzma L, Bruchajze E, Wysokinska H. Diterpenoid production in hairy root culture of *Salvia sclarea* L. *Z Naturforsch C* 2008; 63(7-8):621-4.
- Kuzma L, Kalemba D, Rozalski M, Rozalska B, Wieckowska-Szakiel M, Krajewska U, i sar. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated *in vitro*. *Molecules* 2009; 14(4):1438-47.

- Kuzma L, Skrzypek Z, Wysokinska H. Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots of *Salvia sclarea*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 2006; 84(2):171-9.
- Kuzma L, Rozalski M, Walencka E, Rozalska B, Wysokinska H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine* 2007; 14(1):31-5.
- Lattoo SK, Dhar RS, Dhar AK, Sharma PR, Agarwal SG. Dynamics of essential oil biosynthesis in relation to inflorescence and glandular ontogeny in *Salvia sclarea*. *Flavour Frag J* 2006; 21(5):817-21.
- Laville R, Castel C, Filippi JJ, Delbecque C, Audran A, Garry PP, i sar. Amphilectane diterpenes from *Salvia sclarea*: biosynthetic considerations. *J Nat Prod* 2012; 75(2):121-6.
- Lawrence BM. Production of clary sage oil and sclareol in North America. 4emes Recontres Internacionales, Nyons. 5-7 Dec 1994. s. 41-58.
- Lederberg J, urednik. *Encyclopedia of Microbiology*. Second Edition. Volume 3. San Diego: Academic Press; 2000.
- Lee KB, Cho E, Kang YS. Changes in 5-hydroxytryptamine and cortisol plasma levels in menopausal women after inhalation of clary sage oil. *Phytotherapy Res* 2014; 28(11):1599-605.
- Lee KA, Moon SH, Kim KT, Mendonca AF, Paik HD. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157: H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Sci Biotechnol* 2010; 19(1):257-61.
- Lemmens-Gruber R, Marchart E, Rawnduzi P, Engel N, Benedek B, Kopp B. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* s.l. on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittelforschung* 2006;56(8):582-8.
- Leonardi T, Vanamala J, Taddeo SS, Davidson LA, Murphy ME, Patil BS, i sar. Apigenin and naringenin suppress colon carcinogenesis through the aberrant crypt stage in azoxymethane-treated rats. *Exp Biol Med* 2010; 235(6):710-7.
- Lepley DM, Li B, Birt DF, Pelling JC. The chemopreventive flavonoid apigenin induces G2/M arrest in keratinocytes. *Carcinogenesis* 1996; 17(11):2367-75.
- Leporatti ML, Pavesi A, Posocco E. Phytotherapy in the Valnerina Marche (Central Italy). *J Ethnopharmacol* 1985; 14(1):53-63.

- Lerner KL, Lerner BW. World of Microbiology and Immunology. Farmington Hills: Thomson, The Gale Group Inc; 2003.
- Levites Y, Amit T, Youdim MB, Mandel S. Involvement of protein kinase C activation and cell survival/cell cycle genes in green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate neuroprotective action. *J Biol Chem* 2002; 277(34):30574-80.
- de Lima Silva L, Heldwein CG, Reetz LGB, Zanella R, Pereira AMS, Heinzmann BM. Influence of extraction method on antibacterial activity of ethanolic extracts of *Ocimum gratissimum* L. *J Med Plants Res* 2015; 9(7):199-206.
- Li R, Zhao D, Qu R, Fu Q, Ma S. The effects of apigenin on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. *Neuroscience Lett* 2015; 594:17-22.
- Lin JK, Chen YC, Huang YT, Lin-Shiau SY. Suppression of protein kinase C and nuclear oncogene expression as possible molecular mechanisms of cancer chemoprevention by apigenin and curcumin. *J Cell Biochem Suppl* 1997; 67(S28–29):39-48.
- Lin Y, Yan Y. Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microb Cell Fact* 2012; 11(1):42.
- Lin SY, Wang YY, Chen WY, Liao SL, Chou ST, Yang CP, i sar. Hepatoprotective activities of rosmarinic acid against extrahepatic cholestasis in rats. *Food Chem Toxicol* 2007; 108:214-23.
- Lis-Balchin M, Hart S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle *in vitro*. *J Ethnopharmacol* 1997; 58(3):183-7.
- Liu R, Gao M, Qiang GF, Zhang TT, Lan X, Ying J, i sar. The anti-amnesic effects of luteolin against amyloid  $\beta_{25-35}$  peptide-induced toxicity in mice involve the protection of neurovascular unit. *Neuroscience* 2009; 162(4):1232-43.
- Liu LZ, Fang J, Zhou Q, Hu X, Shi X, Jiang BH. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. *Mol Pharmacol* 2005; 68(3):635-43.
- Liu S, Hu HZ, Ren J, Gao C, Gao N, Lin Z, i sar. Pre- and postsynaptic inhibition by nociceptin in guinea pig small intestinal myenteric plexus *in vitro*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 281(1):G237-46.

- Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, i sar. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules* 2010; 15(11):7933-45.
- Loizzo MR, Abouali M, Salehi P, Sonboli A, Kanani M, Menichini F, i sar. *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of nine *Salvia* species. *Nat Prod Res* 2014; 28(24):2278-85.
- Long X, Fan M, Bigsby RM, Nephew KP. Apigenin inhibits antiestrogen-resistant breast cancer cell growth through estrogen receptor- $\alpha$ -dependent and estrogen receptor- $\alpha$ -independent mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(7):2096-108.
- Lorber B. Listeriosis. *Clin Infect Dis* 1997; 24:1-11.
- Lorenzo D, Paz D, Davies P, Villamil J, Vila R, Canigual S, i sar. Characterization and enantiomeric distribution of some terpenes in the essential oil of a Uruguayan biotype of *Salvia sclarea* L. *Flavour Frag J* 2004; 19(4):303-7.
- Lu Y, Foo LY. Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry* 2002; 59(2):117-40.
- Lv F, Liang H, Yuan Q, Li C. *In vitro* antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. *Food Res Int* 2011; 44(9):3057-64.
- Madunić J, Madunić IV, Gajski G, Popić J, Garaj-Vrhovac V. Apigenin: A dietary flavonoid with diverse anticancer properties. *Cancer Lett* 2018; 413:11-22.
- Mak P, Leung YK, Tang WY, Harwood C, Ho SM. Apigenin suppresses cancer cell growth through ER $\beta$ . *Neoplasia* 2006; 8(11):896-904.
- Makino T, Ono T, Liu N, Nakamura T, Muso E, Honda G. Suppressive effects of rosmarinic acid on mesangioproliferative glomerulonephritis in rats. *Nephron* 2002; 92(4):898-904.
- Mallik SB, Mudgal J, Nampoothiri M, Hall S, Anoopkumar-Dukie S, Grant G, i sar Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. *Neurosci Lett* 2016; 632, 218-23.
- Manju V, Balasubramaniyan V, Nalini N. Rat colonic lipid peroxidation and antioxidant status: the effects of dietary luteolin on 1, 2-dimethylhydrazine challenge. *Cell Mol Biol Lett* 2005; 10(3):535-51.
- Manju V, Nalini N. Protective role of luteolin in 1,2-dimethylhydrazine induced experimental colon carcinogenesis. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(2):189-94.



- Mansourabadi AH, Sadeghi M, Razavi N, Rezvani E. Anti-inflammatory and analgesic properties of salvigenin, *Salvia officinalis* flavonoid extracted. *Advanced Herbal Medicine* 2015; 1(3):31-41.
- Mamadalieva NZ, Akramov DK, Ovidi E, Tiezzi A, Nahar L, Azimova SS, i sar. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities. *Medicines* 2017; 4(1):8.
- Mapel DW. Functional disorders of the gastrointestinal tract: Cost effectiveness review. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2013; 27(6):913-31.
- Matsumoto T, Horiuchi M, Kamata K, Seyama Y. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* SCHERFF treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea pig ileum and on histamine release from mast cells. *J Smooth Muscle Res* 2009; 45(2-3):75-86.
- Matsuoka Y, Hasegawa H, Okuda S, Muraki T, Uruno T, Kubota K. Ameliorative effects of tea catechins on active oxygenrelated nerve cell injuries. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274(2):602-8.
- Marin P, Duletić S, Petković B. Nutlet ornamentation in selected *Salvia* L. species (Lamiaceae). *Flora Mediterranea* 1996; 6:203-11.
- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolics and total flavonoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the Uuniversity of Chemical Technology and Metallurgy* 2005; 40(3):255-60.
- Martins N, Ferreira ICFR, Barros L, Silva S, Henriques M. Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment. *Mycopathologia* 2014; 177(5-6):223-40.
- Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Azuma T, Ekuni D, i sar. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. *Arch Oral Biol* 2011; 56(1):48-53.
- Maurer B, Hauser A. New sesquiterpenoids from clary sage oil (*Salvia sclarea* L.). *Helv Chim Acta* 1983; 66(7):2223-35.
- Mauricio R, Rauscher MD. Experimental manipulation of putative selective agents provides evidence for the role of natural enemies in the evolution of plant defense. *Evolution* 1997; 51(5):1435-44.

- Merino S, Camprubi S, Alberti S, Benedi VJ, Tomas JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun* 1992; 60(6):2529-35.
- Medeiros A, Bianchi S, Calvete JJ, Balter H, Bay S, Robles A, i sar. Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. *Eur J Biochem* 2000; 267(5):1434-40.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KD, Barnes S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer* 1994; 21(2):113-31.
- Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of dicotyledons. 2. izdanje. 1. volumen. Oxford: Clarendon Press; 1950.
- Metz N, Lobstein A, Schneider Y, Gosse F, Schleiffer R, Anton R, i sar. Suppression of azoxymethane-induced preneoplastic lesions and inhibition of cyclooxygenase-2 activity in the colonic mucosa of rats drinking a crude green tea extract. *Nutr Cancer* 2000; 38(1):60-4.
- Miao-feng MA, Jili F, Jianyou L, Wenjun W. Study on the fungicidal activity of *Salvia sclarea*. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica* 2005; 14(6):137-40.
- Miao-feng MA, Wen-jun WU, Zhi-fang Z, Hong-jin BAI. Study on the fungicidal activity of *Salvia sclarea* extracted from its flowers. *Chinese Journal of Pesticide Science* 2003; 2:012.
- Mihajilov-Krstev T. Hemijski sastav i antimikrobna aktivnost etarskih ulja biljnih vrsta roda *Satureja* L. Doktorska disertacija. Novi Sad: Prirodno-matematički fakultet. Univerzitet u Novom Sadu; 2009.
- Miladinović B, Branković S, Kostić M, Milutinović M, Kitić N, Šavikin K, i sar. Antispasmodic effect of blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) juice and its potential use as functional food in gastrointestinal disorders. *Med Prin Pract* 2018; 27(2):179-85.
- Milić B, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, Sakač M. Biljni polifenoli. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2000.
- Miyauchi M, Takata T, Ito H, Ogawa I, Kudo, Y, Takekoshi T, i sar. Distribution of macrophage lineage cells in rat gingival tissue after topical application of lipopolysaccharide: an immunohistochemical study using monoclonal antibodies: OX6, ED1 and ED2. *J Periodontal Res* 1998; 33(6):345-51.

- Miles EA, Zoubouli P, Calder PC. Differential anti-inflammatory effects of phenolic compounds from extra virgin olive oil identified in human whole blood cultures. *Nutrition* 2005; 21(3):389-94.
- Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004; 85(2):231-7.
- Milić B, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, Sakač M. Biljni polifenoli. Novi Sad: Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet; 2000.
- Miski M, Ulubelen A, Johansson C, Mabry TJ. Antibacterial activity studies of flavonoids from *Salvia palaestina*. *J Nat Prod* 1983; 46(6):874-5.
- Mith H, Dure R, Delcenserie V, Zhiri A, Daube G, Clinquart A. Antimicrobial activities of commercial essential oils and their components against food-borne pathogens and food spoilage bacteria. *Food Sci Nutr* 2014; 2(4):403-16.
- Moon HK, Vinckier S, Walker JB, Smets E, Huysmans S. A search for phylogenetically informative pollen characters in the subtribe Salviinae (Mentheae: Lamiaceae). *Int J Plant Sci* 2008; 169(3):455-71.
- Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007; 14(4):289-300.
- Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J Sci Technol* 2004; 26(2):211-9.
- Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res* 2006; 40(2):223-31.
- Moretti MD, Peana AT, Satta M. A study on anti-inflammatory and peripheral analgesic action of *Salvia sclarea* oil and its main components. *J Essent Oil Res* 1997; 9(2):199-204.
- Mori MX, Itsuki K, Hase H, Sawamura S, Kurokawa T, Mori Y, et al. Dynamics of receptor-operated  $Ca^{2+}$  currents through TRPC channels controlled via the PI(4,5)P<sub>2</sub>- PLC signaling pathway. *Front Pharmacol* 2015; 6:22.
- Motamedi H, Darabpour E, Gholipour M, Seyyed Nejad SM. *In vitro* assay for the anti-*Brucella* activity of medicinal plants against tetracycline-resistant *Brucella melitensis*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2010; 11(7):506-11.

- Mousavi-Jazi M, Aslroosta H, Moayer AR, Baeri M, Abdollahi M. Effects of Angipars on oxidative inflammatory indices in a murine model of periodontitis. *DARU* 2010; 18(4):260-4.
- Moussaoui F, Zellagui A, Segueni N, Touil A, Rhouati S. Flavonoid constituents from Algerian *Launaea resedifolia* (OK) and their antimicrobial activity. *Rec Nat Prod* 2010; 4(1):91-5.
- Murray BE. Diversity among the multidrug-resistant *Enterococci*. *Emerg Infect Dis* 1998; 4(1):37-47.
- Naghbi F, Mosaddgeh M, Motamed SM, Ghorbani A. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iran J Pharm Res* 2005; 2: 63-79.
- Nakamura H, Ukai T, Yoshimura A, Kozuka Y, Yoshioka H, Yoshinaga Y, i sar. Green tea catechin inhibits lipopolysaccharide-induced bone resorption *in vivo*. *J Periodontal Res* 2010; 45(1):23-30.
- Nakazawa T, Yasuda T, Ueda J, Ohsawa K. Antidepressant-like effects of apigenin and 2, 4, 5-trimethoxycinnamic acid from *Perilla frutescens* in the forced swimming test. *Biol Pharm Bull* 2003; 26(4):474-80.
- Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpaa J, Garsin DA, Hook M, Erlandsen SL, i sar. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J Clin Invest* 2006; 116(10):2799-807.
- Nardini M, D'Aquino M, Tomassi G, Gentili V, Di Felice M, Scaccini C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Bio Med* 1995; 19(5):541-52.
- Nasermoadeli S, Rowshan V. Comparison of *Salvia sclarea* L. essential oil components in wild and field population. *Int J Agri Crop Sci* 2013; 5(8):828-31.
- Nativ D, Yaniv-Bacharach Z, Putievsky E, Saady D, Schafferman D, Chaimovitsh D. Composition containing as the active ingredient components from *Salvia sclarea* seed. U.S. Patent Application No. 10/570,810; 2006.
- Nayaka HB, Londonkar RL, Umesh MK, Tukappa A. Antibacterial attributes of apigenin, isolated from *Portulaca oleracea* L. *Int J Bacteriol* 2014; 2014:175851.
- Nešić M. Nervni sistem. Vegetativni nervni sistem. U: Veljković S, Radenković M, urednici. Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2016.

- Nkengla A. Investigation of the *in vitro* bioavailability of luteolin from modified preparations of *Artemisia afra*. Magister thesis. Bellville, South Africa: University of the Western Cape; 2014.
- Noad RL, Rooney C, McCall D, Young IS, McCance D, McKinley MC, i sar. Beneficial effect of a polyphenol-rich diet on cardiovascular risk: a randomised control trial. *Heart* 2016; 102(17):1371-9.
- Noori S, Hassan ZM, Yaghmaei B, Dolatkah M. Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice. *Cell Immunol* 2013; 286(1-2):16-21.
- Ogiwara T, Satoh K, Negoro T, Okayasu H, Sakagami H, Fujisawa S. Inhibition of NO production by activated macrophages by phenolcarboxylic acid monomers and polymers with radical scavenging activity. *Anticancer Res* 2003; 23(2B):1317-23.
- Ogutcu H, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M, Serkedjieva J, Daferera D, i sar. Bioactivities of the various extracts and essential oils of *Salvia limbata* CA Mey. and *Salvia sclarea* L. *Turk J Biol* 2008; 32(3):181-92.
- Orhan G, Orhan I, Sener B. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Lett Drug Des Disc* 2006; 3(4):268-74.
- Orhan I, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yilmaz G, Kan Y, i sar. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem* 2007; 103(4):1247-54.
- Orhan I, Kartal M, Kan Y, Sener B. Activity of essential oils and individual components against acetylcholinesterase. *Z Naturforsch C* 2008; 63(7-8):547-53.
- Osakabe N, Takano H, Sanbongi C, Yasuda A, Yanagisawa R, Inoue K, i sar. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. *Biofactors* 2004a; 21(1-4):127-31.
- Osakabe N, Yasuda A, Natsume M, Yoshikawa T. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model. *Carcinogenesis* 2004b; 25(4):549-57.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54:49-79.
- Ozcelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol* 2011; 49(4):396-402.

- Ozdemir C, Senel G. The morphological, anatomical and karyological properties of *Salvia sclarea* L. Turk J Bot 1999; 23:7-18.
- Ozturk, N, Tuncel M, Uysal UD, Oncu-Kaya EM, Koyuncu O. Determination of rosmarinic acid by high-performance liquid chromatography and its application to certain *Salvia* species and rosemary. Food Anal Method 2011; 4(3):300-6.
- Page RC, Schroeder HE. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. Lab Invest 1976; 34(3):235-49.
- Paknejadi M, Foroohi F, Yousefzadi M. Antimicrobial activities of the essential oils of five *Salvia* species from Tehran province, Iran. J Paramed Sci 2012; 3(2):12-8.
- Palhares RM, Drummond MG, Brasil BDSAF, Cosenza GP, Brandão MDGL, Oliveira G. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. PLoS One 2015; 10(5):e0127866.
- Palombo EA. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potential application in the prevention and treatment of oral diseases. Evid Based Compl Alt 2011; 2011:680354.
- Panizzi L, Catalano S, Miarelli C, Cioni PL, Campeol E. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Geum rivale*. Phytother Res 2000; 14(7):561-3.
- Panda S, Kar A. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone) regulates hyperglycaemia, thyroid dysfunction and lipid peroxidation in alloxan-induced diabetic mice. J Pharm Pharmacol 2007; 59(11):1543-8.
- Pappas PG, Rex JH, Sobel JD, Filler SG, Dismukes WE, Walsh TJ, et al. Guidelines for treatment of candidiasis. Clin Infect Dis 2004; 38(2):161-89.
- Pavela R. Insecticidal activity of some essential oils against larvae of *Spodoptera littoralis*. Fitoterapia 2005; 76(7-8):691-6.
- Pavela R. Insecticidal properties of several essential oils on the house fly (*Musca domestica* L.). Phytotherapy Res 2008; 22(2):274-8.
- Paravati S, Warrington SJ. Physiology, Catecholamines. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.

- Parsaei P, Bahmani M, Naghdi N, Asadi-Samani M, Rafieian-Kopaei M, Tajeddini P, i sar. Identification of medicinal plants effective on common cold: An ethnobotanical study of Shiraz, South Iran. *Pharm Lett* 2016; 8(2):90-7.
- Patel MR, Bhalodia YS, Pathak NL, Patel MS, Suthar K, Patel N, i sar. Study on the mechanism of the bronchodilatory effects of *Cynodon dactylon* (Linn.) and identification of the active ingredient. *J Ethnopharmacol* 2013; 150(3):946-52.
- Patil SP, Jain PD, Sancheti JS, Ghumatkar PJ, Tambe R, Sathaye S. Neuroprotective and neurotrophic effects of apigenin and luteolin in MPTP induced parkinsonism in mice. *Neuropharmacology* 2014; 86:192-202.
- Paulsen IT, Banerjee J, Myers GSA, Nelson KE, Seshadri R, Read TD, i sar. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 2003; 299(5615):2071-4.
- Paur I, Carlsen MH, Halvorsen BL, Blomhoff R. Antioxidants in herbs and spices. U: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, urednici. *Herbal medicine: biomolecular and clinical aspects. Drugo izdanje*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2011.
- Peana AT, Moretti M. Pharmacological activities and applications of *Salvia sclarea* L. and *Salvia desoleana* essential oils. U: Atta-ur-Rahman, urednik. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 26. Amsterdam: Elsevier; 2002.
- Peana AT, Moretti MD, Juliano C. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *S. sclarea*. *Planta Med* 1999; 65(08):752-4.
- Peana A, Satta M. A preliminary research on essential oils of *Salvia sclarea* L. and *Salvia desoleana* A. et P. *Pharmacol Res* 1993; 27(Suppl 1):25-6.
- Peana A, Satta M. Effects of the essential oil from *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea* on the CNS. *Ars Pharmaceutica* 1992; 33:(1-4):458-61.
- Perunović N. Nivoi IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , PGE2 u gingivalnoj tečnosti i u krvi prevremeno porođenih žena sa parodontitisom. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Stomatološki fakultet; 2015.
- Petersen M. Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochem Rev* 2013; 12(1):207-27.
- Petersen M, Simmonds MJ. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003; 62(2):121-5.

- Pešić PŽ, Banković VM. Investigation on the essential oil of cultivated *Salvia sclarea* L. Flavour Frag J 2003; 18(3):228-30.
- Pereira P, Tysca D, Oliveira P, da Silva Brum LF, Picada JN, Ardenghi P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. Pharmacol Res 2005; 52(3):199-203.
- Perez-Bonila M, Salido Sanchez A, vann Beek T, Altarejos J. Effect of extraction conditions on the antioxidant activity of olive wood extracts. Int J Food Sci 2013; 2013:719593.
- Pierozan MK, Pauletti GF, Rota L, Santos AC, Lerin LA, Di Luccio M, i sar. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *Salvia* L. species. Cienc Tec Alimentar 2009; 29(4):764-70.
- Pilija V, Radenkovic M, Djurendic Brenesel M, Popovic M, Ivetic V, Trivic S. Inhibitory effect of *Ginkgo biloba* extract on the tonus of the small intestine and the colon of rabbits. Molecules 2010; 15:2079-86.
- Piller V, Piller F, Cartron JP. Comparison of the carbohydrate-binding specificities of seven N-acetyl-D-galactosamine-recognizing lectins. Eur J Biochem 1990; 191(2):461-6.
- Piller V, Piller F, Cartron JP. Isolation and characterization of an N-acetylgalactosamine specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. J Biol Chem 1986; 261(30):14069-75.
- Pitt JI, Hocking AD. Fungi and Food Spoilage. Drugo izdanje. Berlin: Springer Science & Business; 1997.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr J Biotechnol 2006; 5(11):1142-5.
- Prescott E, Gronbaek M, Becker U, Sorensen TI. Alcohol intake and the risk of lung cancer: Influence of type of alcoholic beverage. Am J Epidemiol 1999; 149(5):463-70.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, i sar. Neuroscience. Drugo izdanje. Sunderland (LA): Sinauer Associates; 2001.
- Puškarova A, Bučková M, Krakova L, Pangallo D, Kozics K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. Sci Rep 2017; 7(1):8211.
- Qian LB, Wang HP, Chen Y, Chen FX, Ma YY, Bruc, IC, i sar. Luteolin reduces high glucose-mediated impairment of endothelium-dependent relaxation in rat aorta by reducing oxidative stress. Pharmacological Res 2010; 61(4):281-7.



- Qiusheng Z, Xiling S, Gang L, Meng S, Changhai W. Protective effects of luteolin-7-glucoside against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004; 59(4):286-8.
- Raafat K, Habib J. Phytochemical compositions and antidiabetic potentials of *Salvia sclarea* L. essential oils. *J Oleo Sci* 2018; 67(8):1015-25.
- Radenković M. Fiziologija mišića. U: Veljković S, Radenković M, urednici. Medicinska fiziologija. Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2016.
- Radenković M, Ivetić V, Popović M, Mimica-Dukić N, Veljković S. Neurophysiological effects of mistletoe (*Viscum album* L.) on isolated rat intestines. *Phytother Res* 2006; 20(5):374-7.
- Radić SB. Opšta patofiziologija. Niš: Galaksijanis; 2012.
- Rafatian G, Khodagholi F, Farimani MM, Abraki SB, Gardaneh M. Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Mol Cell Biochem* 2012; 371(1-2):9-22.
- Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mirnajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H. Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: An evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Phytomedicine* 2018; 40:59-67.
- Rajabi Z, Ebrahimi M, Farajpour M, Mirza M, Ramshini H. Compositions and yield variation of essential oils among and within nine *Salvia* species from various areas of Iran. *Ind Crop Prod* 2014; 61:233-9.
- Rajendra-Prasad N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem* 2011; 349(1-2):11-9.
- Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, i sar. Listeria-review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect* 2007; 40(1):4-13.
- Randelović V. Botanika. Peto delimično izmenjeno izdanje. Niš: Biološko društvo „Dr Sava Petrović“; 2008.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Farmakologija. 5 izdanje. Beograd: Data status; 2005.

- Ranković G, Veličković D. Fiziologija digestivnog sistema. U: Veličković D, urednik. Fiziologija. Niš: Medicinski fakultet; 2013.
- Rashed K, Ćirić A, Glamočlija J, Soković M. Antibacterial and antifungal activities of methanol extract and phenolic compounds from *Diospyros virginiana* L. Ind Crop Prod 2014; 59:210-5.
- Rauha JP, Remes S, Heinonen M, Hopia A, Kähkönen M, Kujala T, i sar. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. Int J Food Microbiol 2000; 56(1):3-12.
- Razboršek MI, Vončina DB, Doleček V, Vončina E. Determination of oleanolic, betulinic and ursolic acid in Lamiaceae and mass spectral fragmentation of their trimethylsilylated derivatives. Chromatographia 2008; 67(5-6):433-40.
- Republički hidrometeorološki zavod (RHMZ) Srbije. Meteorološki godišnjak. Klimatološki podaci 2011. Dostupno na: [http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteo\\_godisnjaci/Meteoroloski%20godisnjak%201%20-%20klimatoloski%20podaci%20-%202011.pdf](http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteo_godisnjaci/Meteoroloski%20godisnjak%201%20-%20klimatoloski%20podaci%20-%202011.pdf)
- Republički hidrometeorološki zavod (RHMZ) Srbije. Klimatološka analiza 2012. godine na teritoriji republike Srbije. Dostupno na: <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/latin/2012.pdf>
- Republički hidrometeorološki zavod (RHMZ) Srbije. Godišnji bilten za Srbiju 2013. godina. Dostupno na: <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/latin/2013.pdf>
- Republički hidrometeorološki zavod (RHMZ) Srbije. Godišnji bilten za Srbiju 2014. godina. Dostupno na: <http://www.hidmet.gov.rs/podaci/meteorologija/latin/2014.pdf>.
- Robinson MM, Zhang X. The world medicines situation 2011, traditional medicines: Global situation, issues and challenges. Geneva: World Health Organization; 2011.
- Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chem 2005; 92(2):235-54.
- Rolim A, Maciel CP, Kaneko TM, Consiglieri VO, Salgado-Santos I, Velasco MVR. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Benth (Olacaceae) commercial extract. J AOAC Int 2005; 88(4):1015-9.

- Ronald AM, Bartha R. Microbial ecology: fundamentals and applications. 4th edition. Menlo Park: Bemjammin/Cummings Publishing Company, Inc.; 1998.
- Rouquette C, Berche P. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. Microbiologia 1996; 12(2):245-58.
- Rozalski M, Kuzma L, Wysokinska H, Krajewska U. Cytotoxic and proapoptotic activity of diterpenoids from *in vitro* cultivated *Salvia sclarea* roots. Studies on the leukemia cell lines. Z Naturforsch C 2006; 61(7-8):483-8.
- Rozalski M, Walencka E, Rozalska B, Wysokinska H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. Phytomedicine 2007; 14(1):31-5.
- Rota C, Carraminana JJ, Burillo J, Herrera A. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. J Food Protect 2004; 67(6):1252-6.
- Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. Am J Pathol 1977; 86(1):183-276.
- Rutishauser U, Sachs L. Cell-to-cell binding induced by different lectins. J Cell Biol 1975; 65(2):247-57.
- Sadraei H, Ghanadian M, Asghari G, Sekhavati N. Antispasmodic activity of apigenin and luteolin, two components of *Dracocephalum kotschyi* extract, on rat ileum contractions. J HerbMed Pharmacol 2018; 7(2):100-5.
- Saharkhiz MJ, Ghani A, Hassanzadeh KM. Changes in essential oil content and composition of Clary Sage (*Salvia sclarea*) aerial parts during different phenological stages. Med Aromat Plant Sci Biotechnol 2009; 3(1):90-3.
- Saini R, Marawar PP, Shete S, Saini S. Periodontitis, a true infection. J Glob Infect Dis 2009; 1(2):149-50.
- Salah KBH, Mahjoub MA, Ammar S, Michel L, Millet-Clerc J, Chaumont JP, i sar. Antimicrobial and antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. Nat Prod Res 2006; 20(12):1110-20.
- Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R. Rosmarinic acid inhibits lung injury induced by diesel exhaust particles. Free Radical Bio Med 2003; 34(8):1060-9.

- Sandor Z, Mottaghipisheh J, Veres K, Hohmann J, Bencsik T, Horvath A, i sar. Evidence supports tradition: the *in vitro* effects of Roman Chamomile on smooth muscles. *Front Pharmacol* 2018; 9:323.
- Sanjarani F, Esmaeilidehaj M, Zareh-Mehrjardi F, Eghbali T, Rezvani ME. The effect of salvigenin on learning, memory and mRNA expression rate of Brain-derived neurotrophic growth factor (BDNF) in male Alzheimer disease model rat hippocampus. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences* 2018; 25(12):994-1002.
- Sarić M. Lekovite biljke Srbije. Beograd: Srpska Akademija Nauka i Umetnosti; 1989.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004; 35(4):275-80.
- Sartori MR, Pretto JB, Cruz AB, Bresciani LF, Yunes RA, Sortino M. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Pharmazie* 2003; 58(8):567-9.
- Sarvestani NN, Sepehri H, Delphi L, Farimani MM. Eupatorin and salvigenin potentiate doxorubicin-induced apoptosis and cell cycle arrest in ht-29 and sw948 human colon cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19(1):131-9.
- Sato Y, Suzaki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 2000; 72(3):483-8.
- Savić L. Metode ekstrakcije biljnih materijala: Upporedna analiza cirkulatorne ekstrakcije i ekstrakcije primenom superkritičnog ugljen-dioksida. *Lek Sirov* 2014; 34:93-103.
- Scalbert A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 1991; 30(12):3875-83.
- Scalbert A, Manach C, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2005; 45(4):287-306.
- Scalbert A, Morand C, Manach C, Remesy C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomed Pharmacother* 2002; 56(6):276-82.
- Scarpati ML, Oriente G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*). *Ric Sci* 1958; 28:2329-33.

- Schmiderer C, Grassi P, Novak J, Weber M, Franz C. Diversity of essential oil glands of clary sage (*Salvia sclarea* L., Lamiaceae). *Plant Biology* 2008; 10(4):433-40.
- Schinor EC, Salvador MJ, Ito IY, Dias DA. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents from *Chresta scapigera*. *Braz J Microbiol* 2007; 38(1):145-9.
- Schulz V, Hansel R, Blumenthal M, Tyler VE. Rational phytotherapy: A reference guide for physicians and pharmacists. Berlin: Springer Science & Business Media; 2004.
- Schwartz A, Duttke C, Hild J, Müller HJ. *In vitro* activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections. *Int J Aromather* 2006; 16(3):169-74.
- Sedighi M, Rafieian-Kopaei M, Noori-Ahmadabadi M, Godarzi I, Baradaran A. *In vitro* impact of hydro-alcoholic extract of *Rosa damascena* Mill. on rat ileum contractions and the mechanisms involved. *Int J Prev Med* 2014; 5(6):767-75.
- Seol GH, Lee YH, Kang P, You JH, Park M, Min SS. Randomized controlled trial for *Salvia sclarea* or *Lavandula angustifolia*: differential effects on blood pressure in female patients with urinary incontinence undergoing urodynamic examination. *J Altern Complem Med* 2013; 19(7):664-70.
- Seol GH, Shim HS, Kim PJ, Moon HK, Lee KH, Shim I, i sar. Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *J Ethnopharmacol* 2010; 130(1):187-90.
- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med* 2008a; 74(14):1667-77.
- Seelinger G, Merfort I, Wölfl U, Schempp C. Anti-carcinogenic effects of the flavonoid luteolin. *Molecules* 2008b; 13(10):2628-51.
- Setzer WN. Essential oils and anxiolytic aromatherapy. *Nat Prod Commun* 2009; 4(9):1305-16.
- Sharon N, Lis H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14(11):53R–62R.
- Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 1972; 177(4053):949-59.
- Sharopov FS, Setzer WN. The essential oil of *Salvia sclarea* L. from Tajikistan. *Rec Nat Prod* 2012; 6(1):75-9.

- Sharopov F, Valiev A, Sobeh M, Arnold E, Winka M. Bioactivity of three *Salvia* species in relation to their total phenolic and flavonoid contents. *Pharm Chem J* 2018; 52(7):596-600.
- Sharopov F, Zhang H, Wink M, Setzer W. Aromatic medicinal plants from Tajikistan (Central Asia). *Medicines* 2015; 2(1):28-46.
- Shukla S, Gupta S. Molecular targets for apigenin-induced cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell xenograft. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(4):843-52.
- Singh G, Kumar P, Joshi SC. Treatment of dermatophytosis by a new antifungal agent 'apigenin'. *Mycoses* 2014; 57(8):497-506.
- Singh UP, Pandey VB, Singh KN, Singh, RDN. Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. *Can J Bot* 1988; 66(9):1901-3.
- Singh JPV, Selvendiran K, Banu SM, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Protective role of apigenin on the status of lipid peroxidation and antioxidant defense against hepatocarcinogenesis in Wistar albino rats. *Phytomedicine* 2004; 11(4):309-4.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 1999; 299:152-78.
- Smiljković M, Stanisavljević D, Stojković D, Petrović I, Marjanović Vićentić J, Popović J, i sar. Apigenin-7-*O*-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. *EXCLI J* 2017; 16:795-807.
- Smolinska S, Jutel M, Cramer R, O'mahony L. Histamine and gut mucosal immune regulation. *Allergy* 2014; 69(3):273-81.
- Sonboli A, Babakhani B, Mehrabian AR. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Z Naturforsch C* 2006; 61(3-4):160-4.
- Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. *Mutat Res-Fund Mol M* 2005; 579(1):200-13.
- Sruthi DR, Indira G. A comparative evaluation of maceration, soxhlation and ultra sound assisted extraction for the phytochemical screening of the leaves of *Nephelium lappaceum*. L. (Sapindaceae). *J Pharmacogn Phytochem* 2016; 5(5):386-9.

- Stagos D, Portesis N, Spanou C, Mossialos D, Aligiannis N, Chaita E, i sar. Correlation of total polyphenolic content with antioxidant and antibacterial activity of 24 extracts from Greek domestic Lamiaceae species. *Food Cheml Toxicol* 2012; 50(11):4115-24.
- Stanković S. Uperedna anatomija kičmenjaka. Beogra: Narodna knjiga; 1950.
- Stansbury J. Rosmarinic acid as a novel agent in the treatment of allergies and asthma. *Journal of Restorative Medicine* 2014; 3(1):121-6.
- Stefanović N, Vlajković S, Daković Bjelaković M, Ugrenović S, Jovanović I. Anatomija čoveka - grudni koš. Niš: Medicinski fakultet u Nišu; 2008.
- Stojičić D, Tošić S, Slavkovska V, Zlatković B, Budimir S, Janošević, D, i sar. Glandular trichomes and essential oil characteristics of *in vitro* propagated *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth.(Lamiaceae). *Planta* 2016; 244(2):393-404.
- Stojković D, Petrović J, Soković M, Glamočlija J, Kukić-Marković J, Petrović S. *In situ* antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, *p*-coumaric acid and rutin, using food systems. *J Sci Food Agr* 2013; 93(13):3205-8.
- Sulaiman ISC, Basri M, Masoumi HRF, Chee WJ, Ashari SE, Ismail M. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology. *Chem Cent J* 2017; 11(1):54.
- Svobodova A, Psotova J, Walterova D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003; 147(2):137-45.
- Sun D, Huang J, Zhang Z, Gao H, Li J, Shen M, i sar. Luteolin limits infarct size and improves cardiac function after myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats. *PloS one* 2012; 7(3):e33491.
- Sweetman SC, urednik. Martindale: the complete drug reference. 35. izdanje. London: Pharmaceutical Press; 2007.
- Szentmihalyi K, Hethelyi E, Virag V, Then M. Mineral elements in muscat sage plant (*Salvia sclarea* L.) and essential oil. *Acta Biol Szeged* 2009; 53(Suppl.1):35-8.

- SZO. Estimating the burden of respiratory diseases. U: Practical approach to lung health: manual on initiating PAL implementation. Geneva: World Health Organization; 2008.
- SZO. Diarrhoeal disease. 2017 maj "citirano 15. dec. 2018" Dostupno na: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- Taarit MB, Msaada K, Hosni K, Marzouk B. Fatty acids, phenolic changes and antioxidant activity of clary sage (*Salvia sclarea* L.) rosette leaves grown under saline conditions. Ind Crop Prod 2012; 38:58-63.
- Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. Eur J Pharmacol 2002a; 449(3):261-7.
- Takeda H, Tsuji M, Miyamoto J, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. Psychopharmacology 2002b; 164(2):233-5.
- Tan MC, Tan CP, Ho CW. Effects of extraction solvent system, time and temperature on total phenolic content of henna (*Lawsonia inermis*) stems. Int Food Res J 2013; 20(6):3117-23.
- Tan N, Satana D, Sen B, Tan E, Altan HB, Demirci B, i sar. Antimycobacterial and antifungal activities of selected four *Salvia* species. Rec Nat Prod 2016; 10(5):593-603.
- Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Sullivan DR, Fenech M, Patch CS, i sar. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. Med J Aust 2006; 185(4 Suppl):S4-24.
- Tatić B, Blečić V. Sistematika i filogenija viših biljaka. Beograd: Univerziteti udžbenik, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva; 1984.
- Taylor TA, Unakal CG. *Staphylococcus aureus*. NCBI. StatPearls publishing; 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). Food Chem 2005; 90(3):333-40.
- Tepe B, Eminagaoglu O, Akpulat HA, Aydin E. Antioxidant potentials and rosmarinic acid level of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *Salvia*



- verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm) Bornm. Food Chem 2007; 100(3):985-9.
- Tepe B, Sokmen M, Akpulat HA, Sokmen A. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. Food Chem 2006; 95(2):200-4.
- Thorne RF. Classification and geography of the flowering plants. Bot Rev 1992; 58(3):225-348.
- Todorov S, Philianos S, Petkov V, Harvala C, Zamfirova R, Olimpiou H. Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. Acta Physiol Pharmacol Bulg 1984; 10(2):13-20.
- Tomičić RM, Čabarkapa IS, Varga AO, Tomičić ZM. Antimicrobial activity of essential oils against *Listeria monocytogenes*. Food Feed Res 2018; 45(1):37-44.
- Torres ME, Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ, Pinilla MG. Volatile constituents of two *Salvia* species grown wild in Spain. J Essent Oil Res 1997; 9(1):27-33.
- Tortoriello J, Meckes-Fischer M, Villarreal ML, Berlin B, Berlin E. Spasmolytic activity of medicinal plants used to treat gastrointestinal and respiratory diseases in the Highland of Chiapas. Phytomedicine 1995; 2(1):57-66.
- Toutouchi NS, Afroozian A, Rameshrad M, Rezabakhsh A, Vaez H, Hamedeyazdan S, i sar. Cardioprotective effects of rosmarinic acid on isoproterenol-induced myocardial infarction in rats. Pharmaceutical Sciences 2017; 23:103-111.
- Track NS. The gastrointestinal endocrine system. Can Med Assoc J 1980; 122(3):287-92.
- Tsai CC, Huang SC, Liu JK, Wang HC, Tsai TR., Tsai PJ, i sar. *Salvia miltiorrhiza* causes tonic contraction in rat ileum through  $Ca^{2+}$ -calmodulin pathway. J Ethnopharmacol 2012; 142(3):694-9.
- Tulukcu E, Sagdic O, Albayrak S, Ekici L, Yetim H. Effect of collection time on biological activity of clary sage (*Salvia sclarea*). J Appl Bot Food Qual 2009; 83(1):44-9.
- Ujiki MB, Ding XZ, Salabat MR, Bentrem DJ, Golkar L, Milam B, i sar. Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. Molecular Cancer 2006; 5:76.
- Ulubelen A, Sonmez U, Topcu G. Diterpenoids from the roots of *Salvia sclarea*. Phytochemistry 1997; 44(7):1297-9.

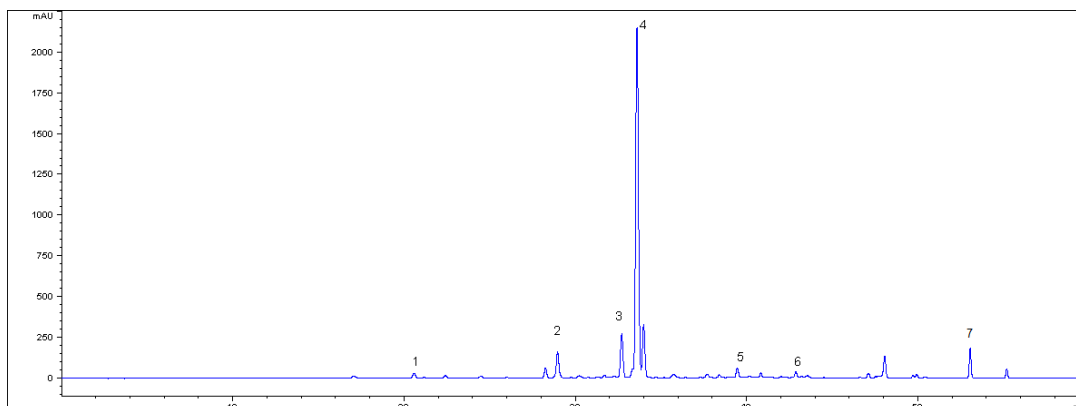
- Ulubelen A, Topcu G, Eri C, Sonmez U, Kartal M, Kurucu S, i sar. Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 1994; 36(4):971-4.
- Unno T, Matsuyama H, Sakamoto T, Uchiyama M, Izumi Y, Okamoto H, i sar. M(2) and M(3) muscarinic receptor-mediated contractions in longitudinal smooth muscle of the ileum studied with receptor knockout mice. *Br J Pharmacol* 2005; 146(1):98-108.
- Vaquero MR, Alberto MR, De Nadra MM. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 2007; 18(2):93-101.
- Vahabi S, Sattari M, Taheraslani M, Bagheban AA. Correlation between interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  and clinical parameters in chronic and aggressive periodontal disease. *J Periodontol Implant Dent* 2011; 3(2):51-6.
- Valgimiglib L, Gabbaninic S, Cavrinia V. Determination of *trans*-anethole in *Salvia sclarea* essential oil by liquid chromatography and GC-MS. *J Sep Sci* 2002; 25(10-11):703-9.
- van Delden C. Virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. U: Ramos JL, urednik. Virulence and gene regulation. Boston: Springer; 2004.
- van de Waal M, Niclass Y, Snowden RL, Bernardinelli G, Escher S. 1-Methoxyhexane-3-thiol, a powerful odorant of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Helv Chim Acta* 2002; 85(5):1246-60.
- Venkateshappa SM, Sreenath KP. Potential medicinal plants of Lamiaceae. *Am Int J Res Form Appl Nat Sci* 2013; 3(1):82-7.
- Verma RS. Chemical investigation of decanted and hydrophilic fractions of *Salvia sclarea* essential oil. *Asian J Tradit Med* 2010; 5(3):102-8.
- Verma RS, Chauhan A, ur Rahman L, Verma RK, Singh A. Aroma profile of clary sage (*Salvia sclarea* L.): influence of harvesting stage and postharvest storage in Uttarakhand hills. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol* 2011; 5(2):139-42.
- Vermerris W, Nicholson R. Families of phenolic compounds and means of classification. U: Phenolic compound biochemistry. Dordrecht: Springer; 2008.
- Vokou D, Katradi K, Kokkini S. Ethnobotanical survey of Zagori (Epirus, Greece), a renowned centre of folk medicine in the past. *J Ethnopharmacol* 1993; 39(3):187-96.
- Walker JB, Sytsma KJ, Treutlein J, Wink M. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *Am J Bot* 2004; 91(7):1115-25.

- Wang GG, Lu XH, Li W, Zhao X, Zhang C. Protective effects of luteolin on diabetic nephropathy in STZ-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2007; 25(2):189-94.
- Wang GF, Shi LP, Ren YD, Liu QF, Liu HF, Zhang RJ, i sar. Anti-hepatitis B virus activity of chlorogenic acid, quinic acid and caffeic acid *in vivo* and *in vitro*. *Antivir Res* 2009; 83(2):186-90.
- Wang J, Liu YT, Xiao L, Zhu L, Wang Q, Yan T. Anti-inflammatory effects of apigenin in lipopolysaccharide-induced inflammatory in acute lung injury by suppressing COX-2 and NF-kB pathway. *Inflammation* 2014; 37(6):2085-90.
- Wang XG, Wei XY, Tian YQ, Shen LT, Xu HH. Antifungal flavonoids from *Ficus sarmentosa* var. *henryi* (King) Corner. *Agr Sci China* 2010; 9(5):690-4.
- Wasey A, Salen P. *Escherichia coli* (*E. coli* 0157 H7). Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
- Webster RP, Gawde MD, Bhattacharya RK. Protective effect of rutin, a flavonol glycoside, on the carcinogen-induced DNA damage and repair enzymes in rats. *Cancer Lett* 1996; 109(1-2):185-91.
- Wen A, Delaquis P, Stanich K, Toivonen P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. *Food Microbiol* 2003; 20(3):305-11.
- Werker E. Trichome diversity and development. *Adv Bot Res* 2000; 31:1-35.
- Wijnands LM, Dufrenne JB, Zwietering MH, van Leusden FM. Spores from mesophilic *Bacillus cereus* strains germinate better and grow faster in simulated gastro-intestinal conditions than spores from psychrotrophic strains. *Int J Food Microbiol* 2006; 112(2):120-8.
- Willershausen B, Gruber I, Hamm G. The influence of herbal ingredients on the plaque index and bleeding tendency of the gingiva. *J Clin Dent* 1991; 2(3):75-8.
- Wood JD. Enteric nervous system: neuropathic gastrointestinal motility. *Dig Dis Sci* 2016; 61(7):1803-16.
- Woodward M, Tunstall-Pedoe H. Coffee and tea consumption in the Scottish Heart Health Study follow up: conflicting relations with coronary risk factors, coronary disease, and all cause mortality. *J Epidemiol Community Health* 1999; 53:481-7.
- Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, i sar. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev* 2012; 112(11):5967-6026.

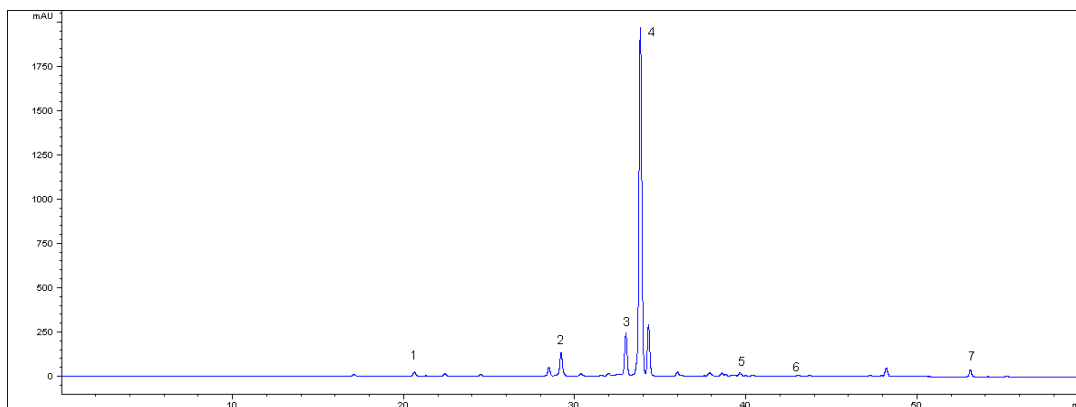
- Yadav A, Chanotiya CS, Singh AK. Terpenoid compositions and enantio-differentiation of linalool and sclareol in *Salvia sclarea* L. from three different climatic regions in India. J Essent Oil Res 2010; 22(6):589-92.
- Yalcin H, Ozturk I, Tulukcu E, Sagdic O. Effect of  $\gamma$ -irradiation on bioactivity, fatty acid compositions and volatile compounds of clary sage seed (*Salvia sclarea* L.). J Food Sci 2011; 76(7):C1056-61.
- Yan JJ, Cho JY, Kim HS, Kim KL, Jung JS, Huh SO, i sar. Protection against  $\beta$ -amyloid peptide toxicity *in vivo* with long-term administration of ferulic acid. Brit J Pharmacol 2001; 133(1):89-96.
- Yan GF, Li XG, Yuan LJ. Research on biological activity of nature luteolin. Cereals and Oils 2006; 3:27-9.
- Yang HJ, Kim KY, Kang P, Lee HS, Seol, GH. Effects of *Salvia sclarea* on chronic immobilization stress induced endothelial dysfunction in rats. BMC Complem Altern Med 2014; 14(1):396.
- Yi LT, Li JM, Li YC, Pan Y, Xu Q, Kong LD. Antidepressant-like behavioral and neurochemical effects of the citrus-associated chemical apigenin. Life Sci 2008; 82(13-14):741-51.
- Yılar M, Bayan Y. Antifungal effect of *Salvia sclarea* L. essential oil on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker and *Verticillium dahliae* (Kleb.). VIII International Scientific Agriculture Symposium, "Agrosym 2017"; 2017 Oktobar Jahorina, Bosna i Hercegovina; Poljoprivredni fakultet, Univerzitet Istočno Sarajevo; s. 1409-13.
- Yuce E, Yildirim N, Yildirim NC, Paksoy MY, Bagci E. Essential oil composition, antioxidant and antifungal activities of *Salvia sclarea* L. from Munzur Valley in Tunceli, Turkey. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 2014; 60(2):1-5.
- Zabka M, Pavela R, Slezakova L. Antifungal effect of *Pimenta dioica* essential oil against dangerous pathogenic and toxinogenic fungi. Ind Crop Prod 2009; 30(2):250-3.
- Zdarilova A, Svobodová A, Simánek V, Ulrichová J. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid suppress lipopolysaccharide-induced alteration in human gingival fibroblasts. Toxicol In Vitro 2009; 23(4):386-92.

- Zhang YH, Park YS, Kim TJ, Fang LH, Ahn HY, Hong J, i sar. Endothelium-dependent vasorelaxant and antiproliferative effects of apigenin. *Genl Pharmacol* 2000; 35(6):341-7.
- Zhao S, Liu JY, Chen SY, Shi LL, Liu YJ, Ma C. Antioxidant potential of polyphenols and tannins from burs of *Castanea mollissima* Blume. *Molecules* 2011; 16(10):8590-600.
- Zheng PW, Chiang LC, Lin CC. Apigenin induced apoptosis through p53-dependent pathway in human cervical carcinoma cells. *Life Sci* 2005; 76(12):1367-79.
- Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agr Food Chem* 2001; 49(11):5165-70.
- Zengin G, Senkardes I, Mollica A, Picot-Allain CMN, Bulut G, Dogan A, i sar. New insights into the *in vitro* biological effects, *in silico* docking and chemical profile of clary sage—*Salvia sclarea* L. *Comp Biol Chem* 2018; 75:111-9.
- Zlatković B, Ranđelović V, Jušković M, Marković M. New floristic records in Serbia and northern Macedonia. 8. Simpozijum flore Jugoistočne Srbije i susednih područja; 2005 Jun 20-24; Niš, Srbija, Niš; Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet; s. 1-4.
- Živković J, Ristić M, Kschonsek J, Westphal A, Mihailović M, Filipović V, i sar. Comparison of chemical profile and antioxidant capacity of seeds and oils from *Salvia sclarea* and *Salvia officinalis*. *Chem Biodivers* 2017; 14(12):e1700344.

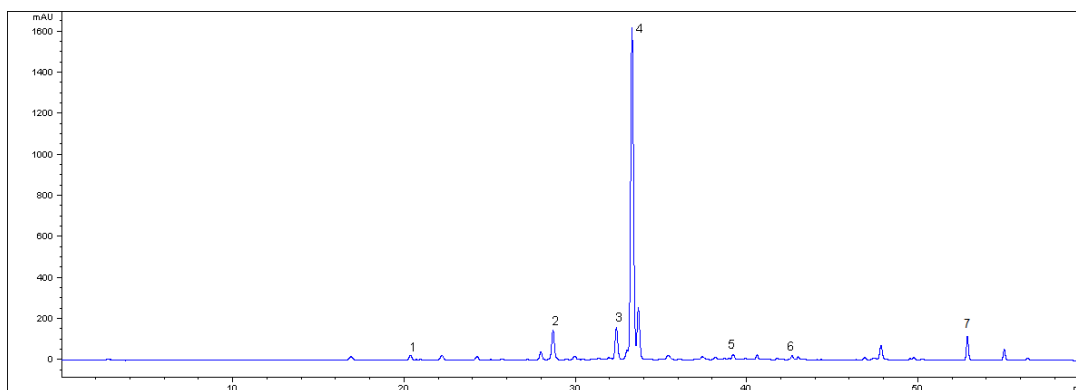
## 8. PRILOG



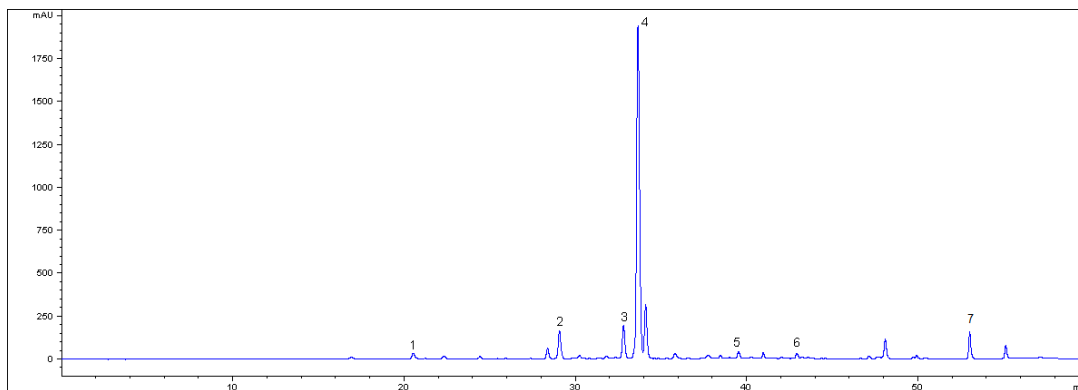
**Slika 8.1.** HPLC hromatogram ekstrakta E80U 2011 rastvoren u metanolu (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



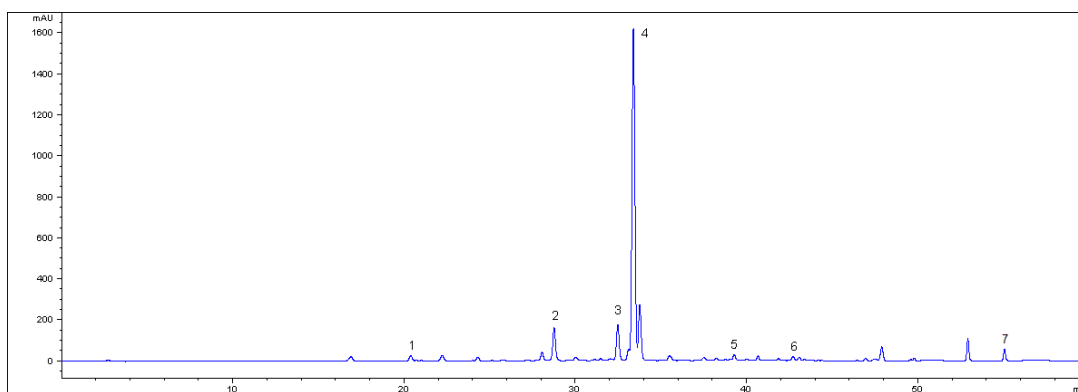
**Slika 8.2.** HPLC hromatogram ekstrakta E80U 2011 rastvoren u vodi (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



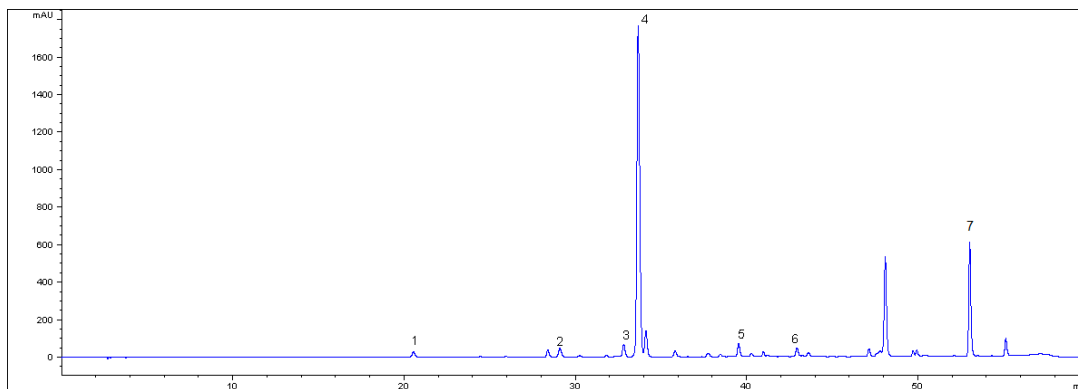
**Slika 8.3.** HPLC hromatogram ekstrakta E60U 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



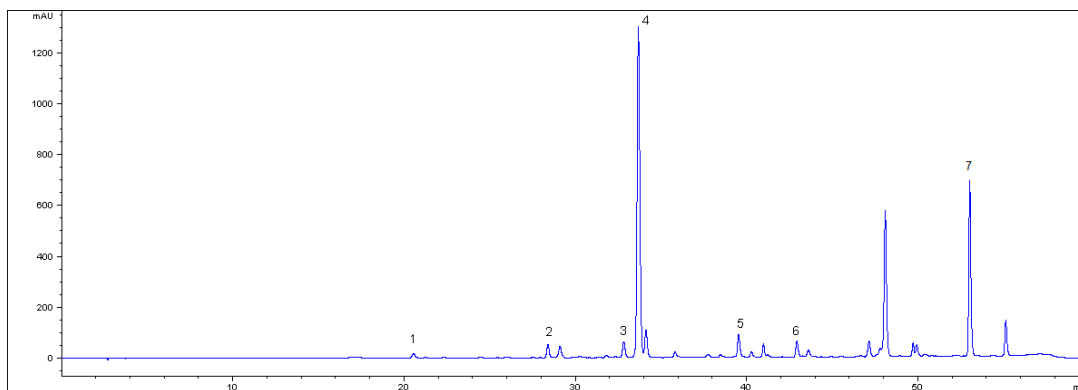
**Slika 8.4.** HPLC hromatogram ekstrakta E80T 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



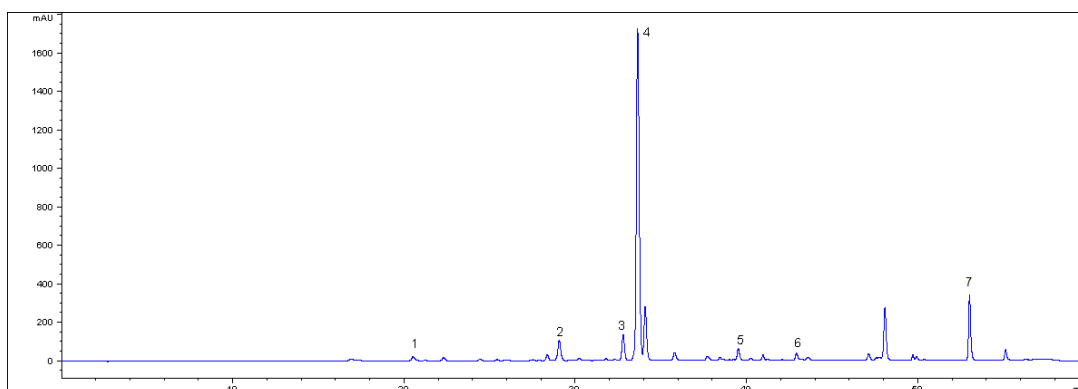
**Slika 8.5.** HPLC hromatogram ekstrakta E60T 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



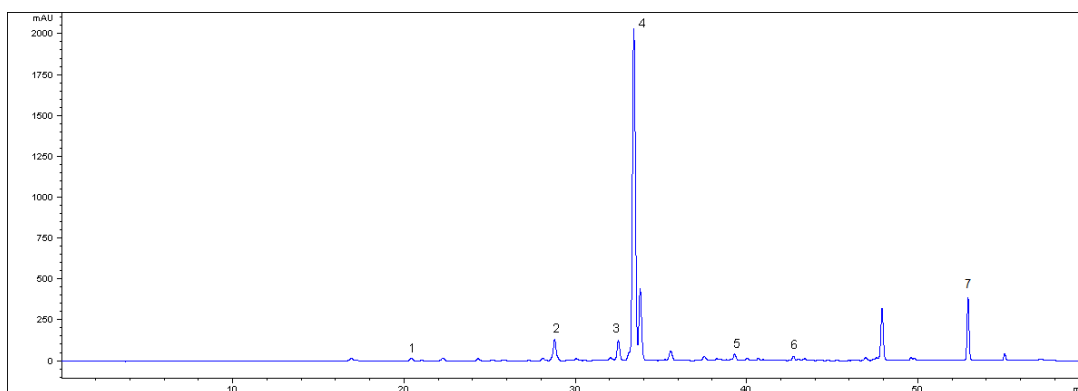
**Slika 8.6.** HPLC hromatogram ekstrakta EM 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



**Slika 8.7.** HPLC hromatogram ekstrakta EU 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

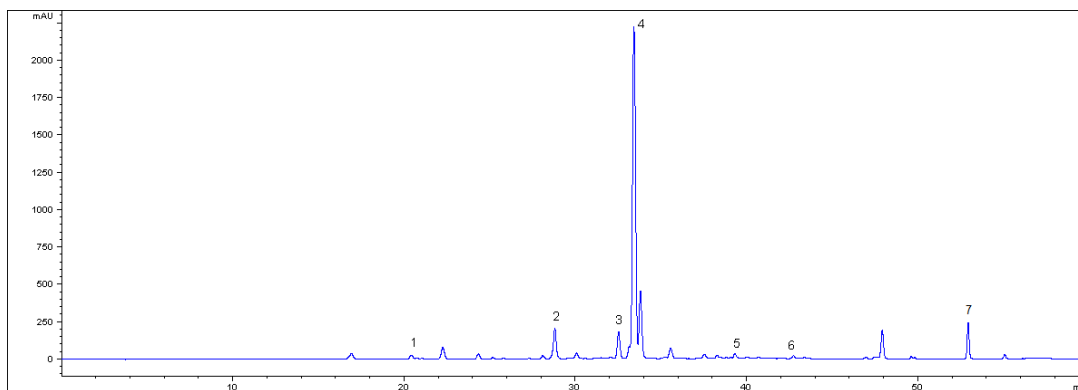


**Slika 8.8.** HPLC hromatogram ekstrakta MM 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

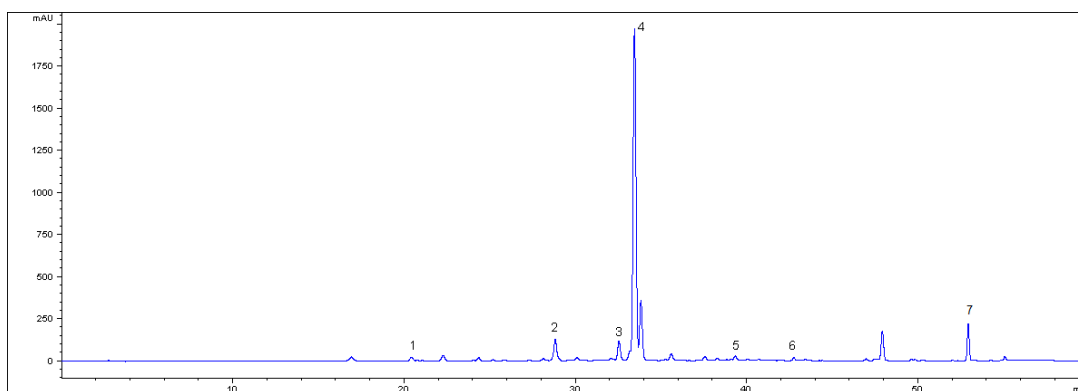


**Slika 8.9.** HPLC hromatogram ekstrakta MU 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

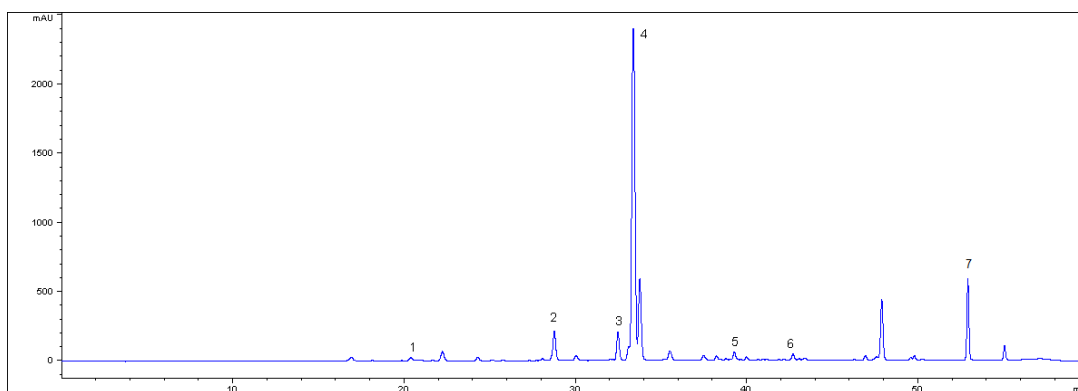




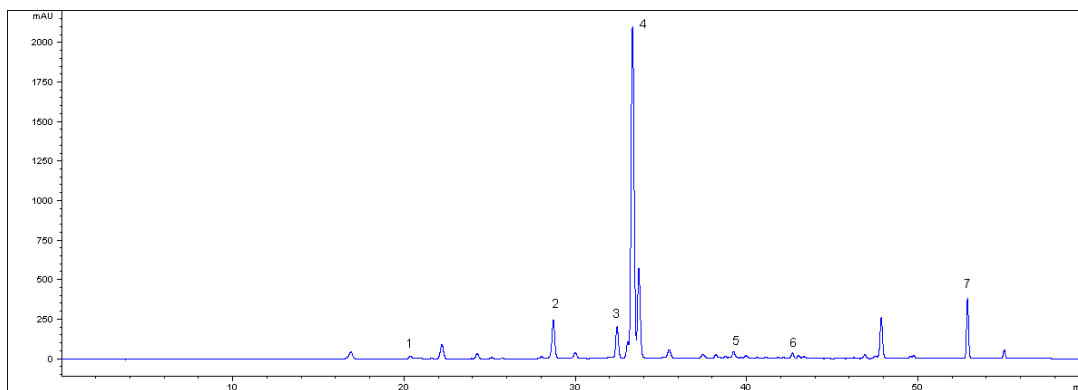
**Slika 8.10.** HPLC hromatogram ekstrakta M80M 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



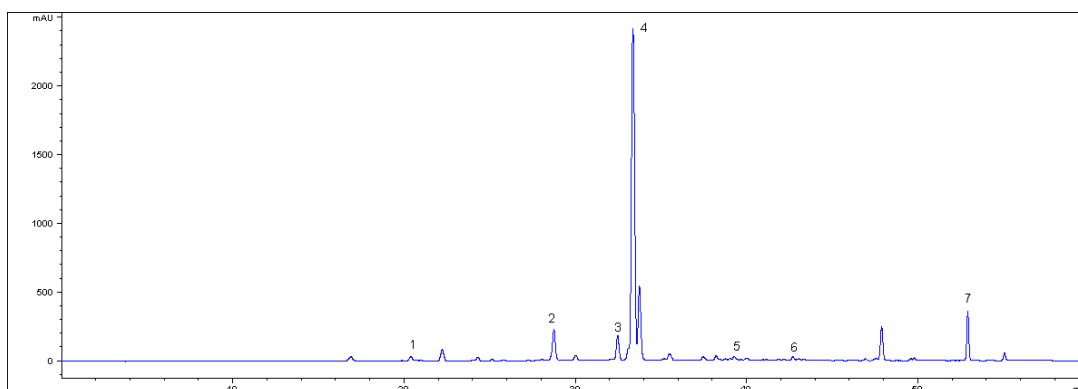
**Slika 8.11.** HPLC hromatogram ekstrakta M80U 2011 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



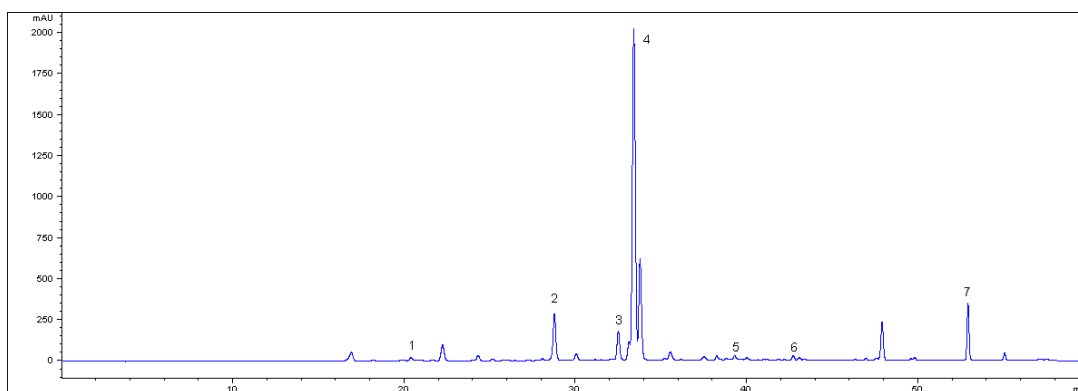
**Slika 8.12.** HPLC hromatogram ekstrakta E80U 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



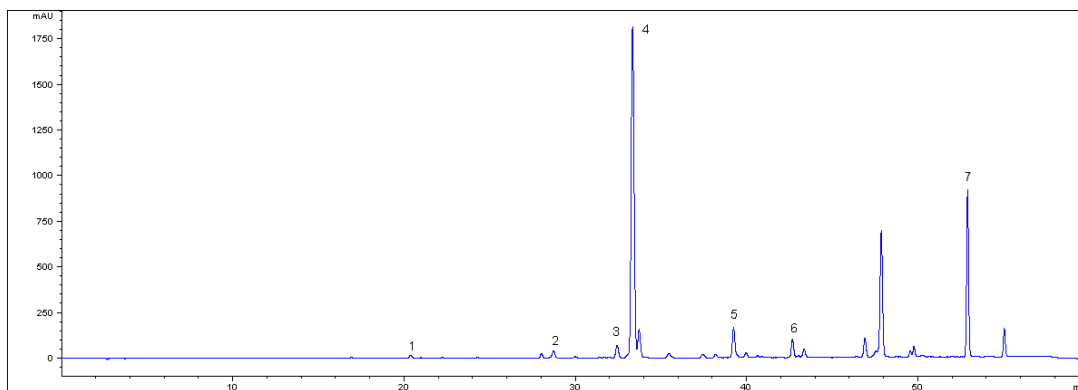
**Slika 8.13.** HPLC hromatogram ekstrakta E60U 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



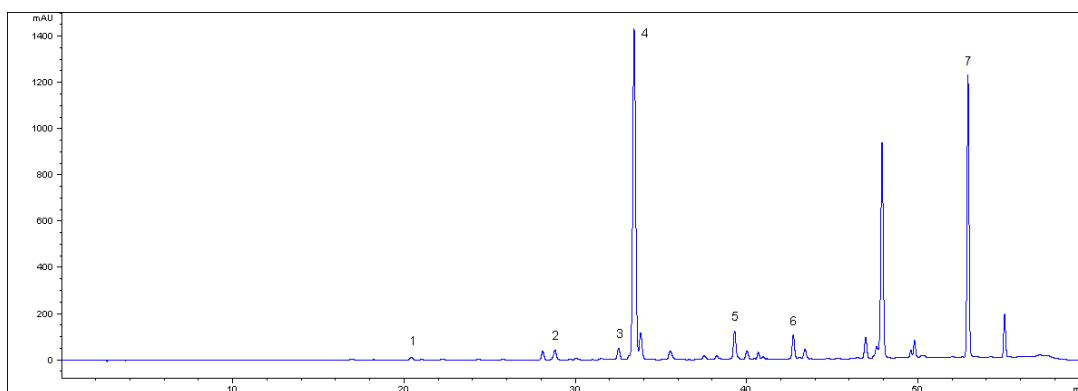
**Slika 8.14.** HPLC hromatogram ekstrakta E80T 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



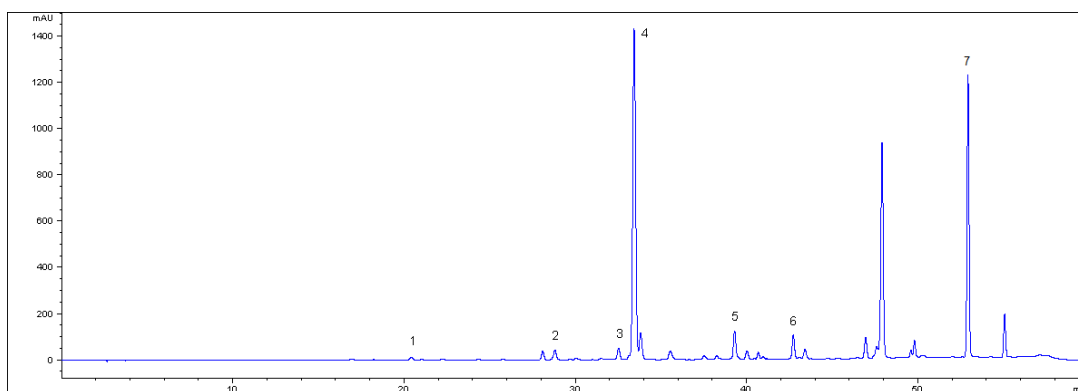
**Slika 8.15.** HPLC hromatogram ekstrakta E60T 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



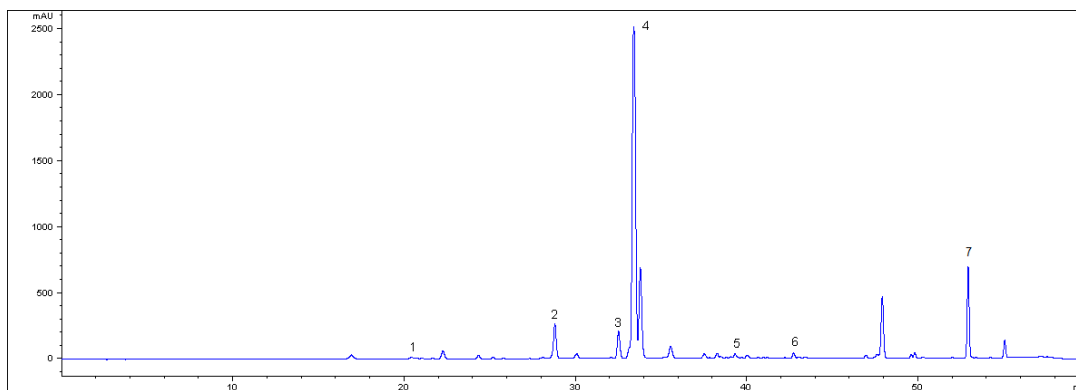
**Slika 8.16.** HPLC hromatogram ekstrakta EM 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



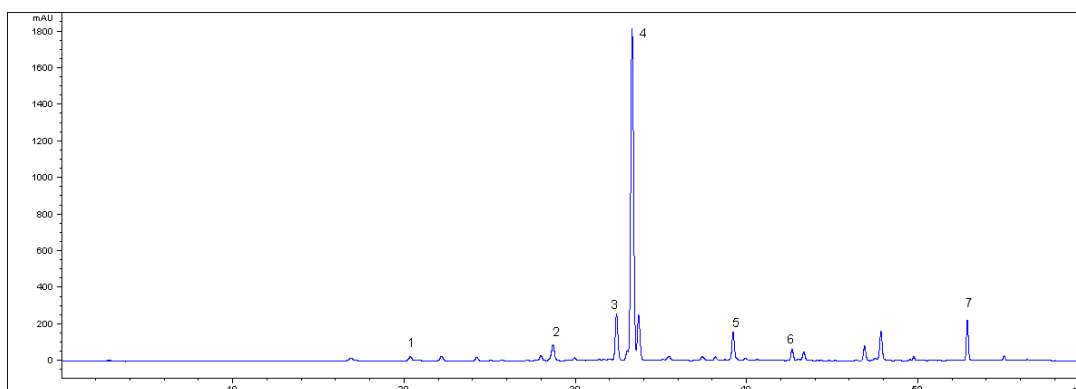
**Slika 8.17.** HPLC hromatogram ekstrakta EU 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



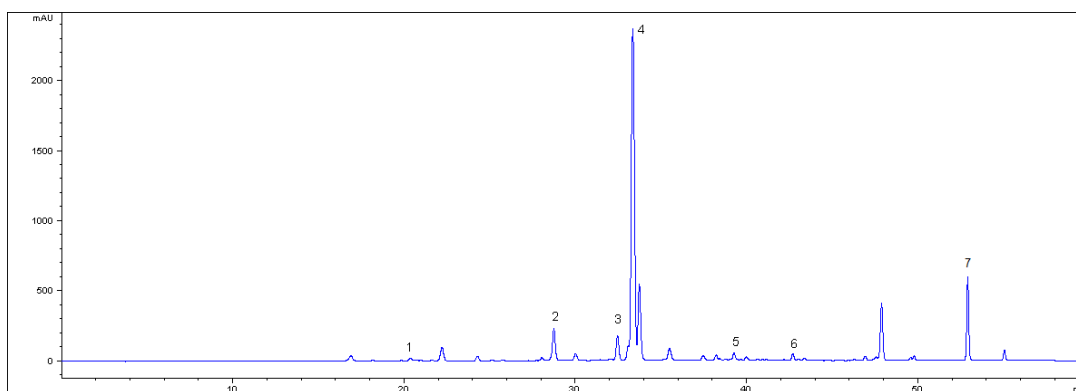
**Slika 8.18.** HPLC hromatogram ekstrakta MM 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



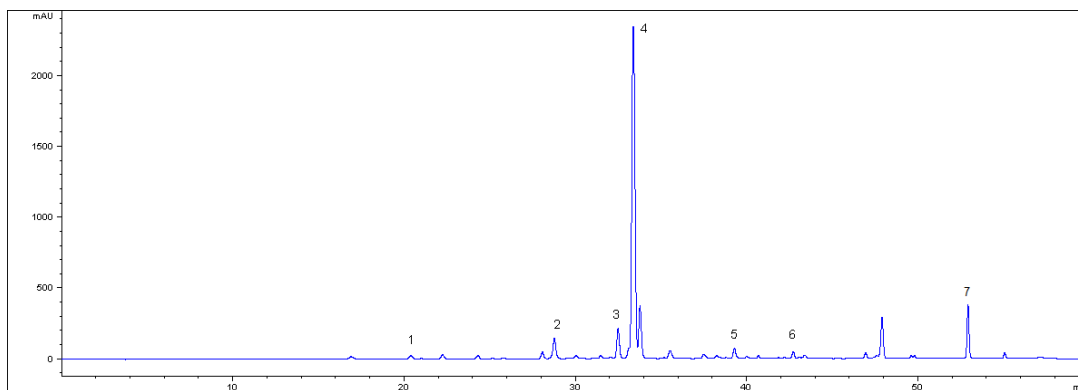
**Slika 8.19.** HPLC hromatogram ekstrakta MU 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



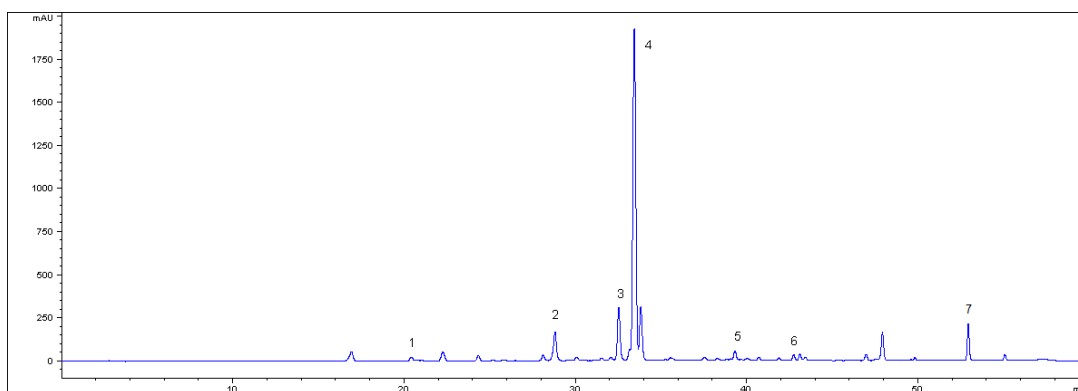
**Slika 8.20.** HPLC hromatogram ekstrakta M80M 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



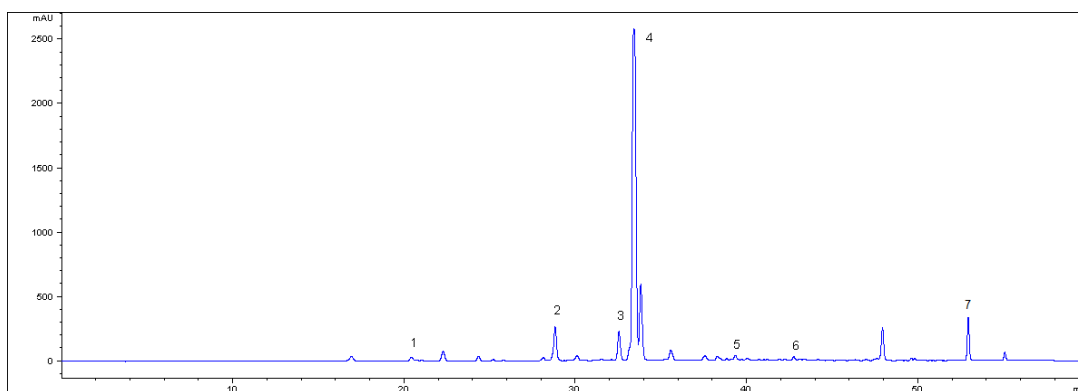
**Slika 8.21.** HPLC hromatogram ekstrakta M80U 2012 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



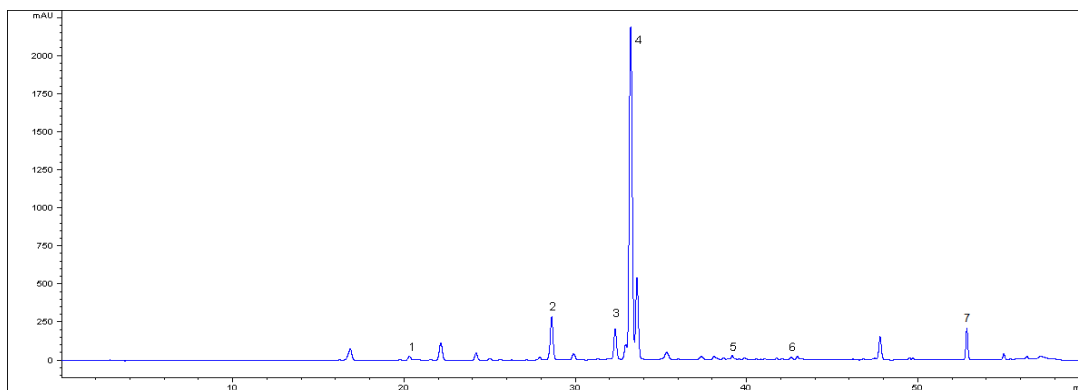
**Slika 8.22.** HPLC hromatogram ekstrakta E80U 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



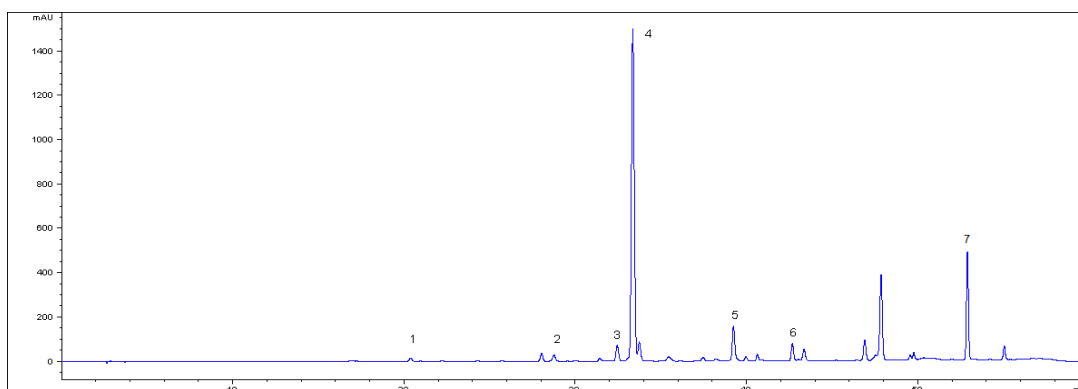
**Slika 8.23.** HPLC hromatogram ekstrakta E60U 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



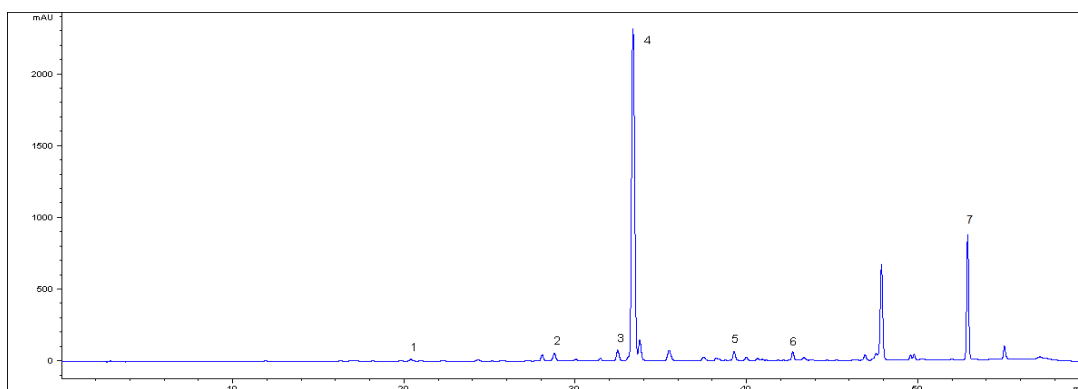
**Slika 8.24.** HPLC hromatogram ekstrakta E80T 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



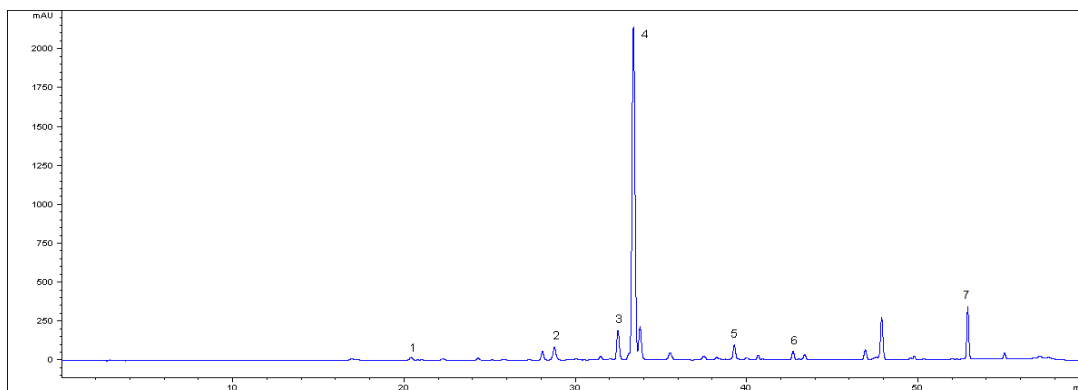
**Slika 8.25.** HPLC hromatogram ekstrakta E60T 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



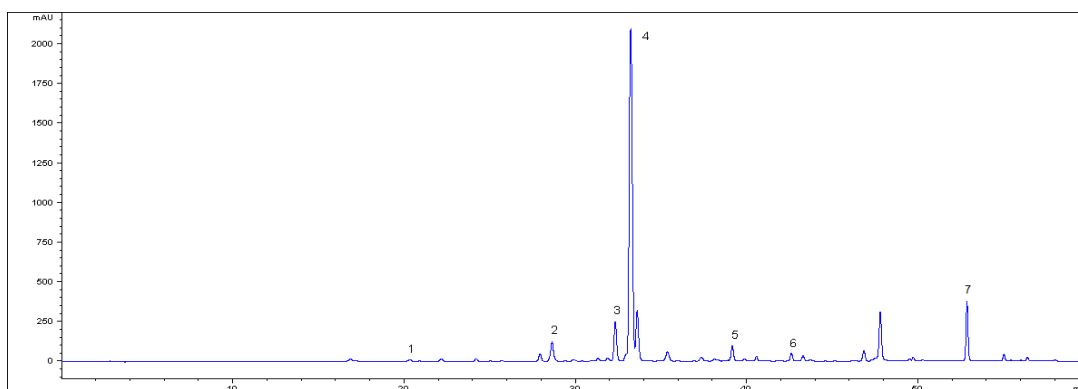
**Slika 8.26.** HPLC hromatogram ekstrakta EM 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



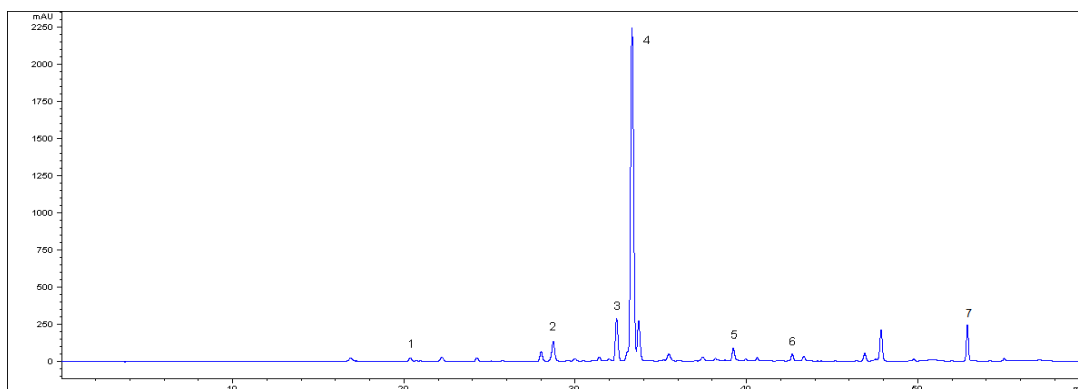
**Slika 8.27.** HPLC hromatogram ekstrakta EU 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



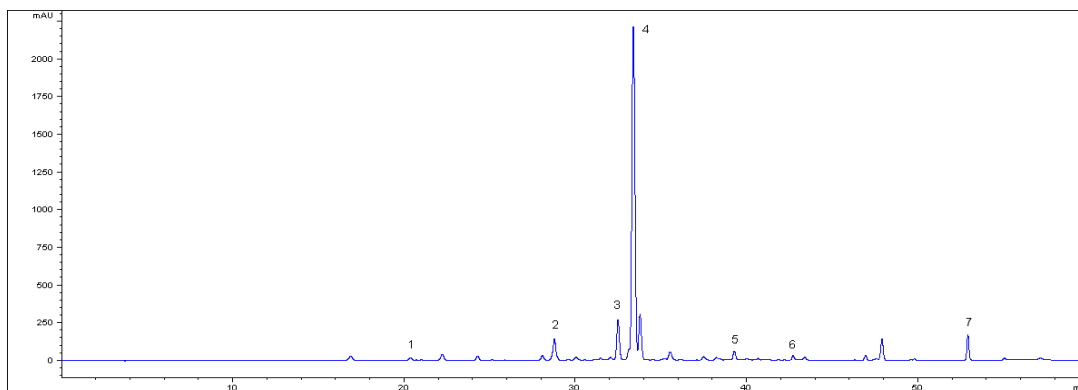
**Slika 8.28.** HPLC hromatogram ekstrakta MM 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



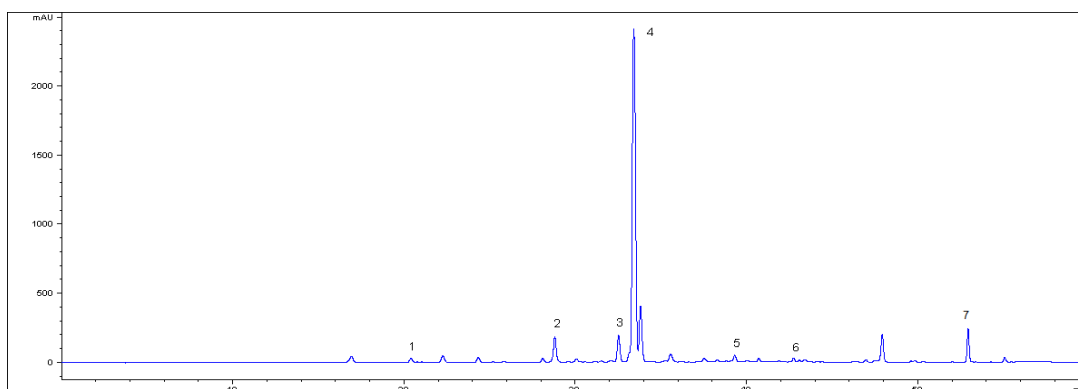
**Slika 8.29.** HPLC hromatogram ekstrakta MU 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



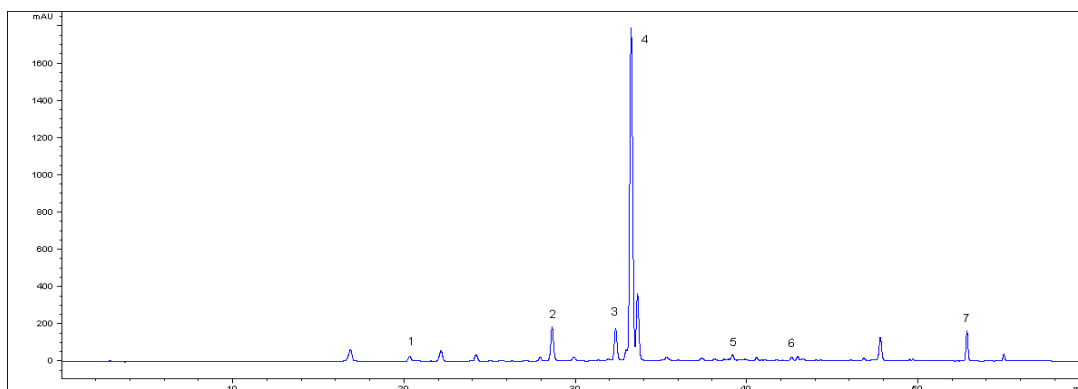
**Slika 8.30.** HPLC hromatogram ekstrakta M80M 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



**Slika 8.31.** HPLC hromatogram ekstrakta M80U 2013 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

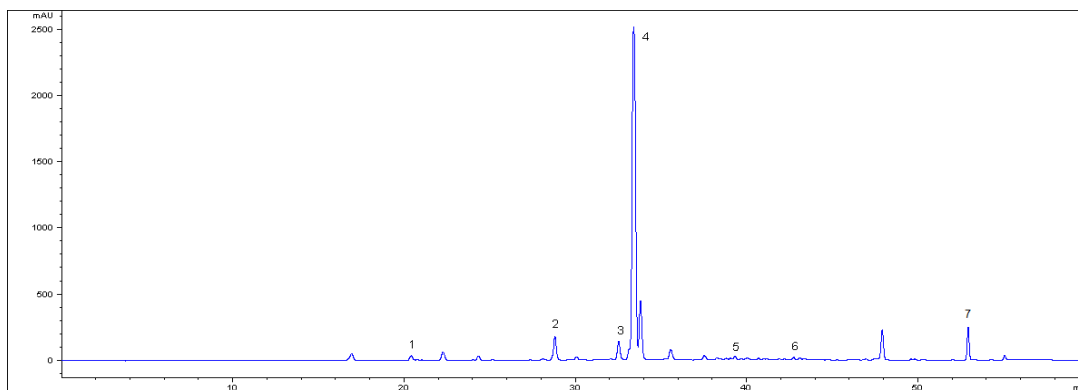


**Slika 8.32.** HPLC hromatogram ekstrakta E80U 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

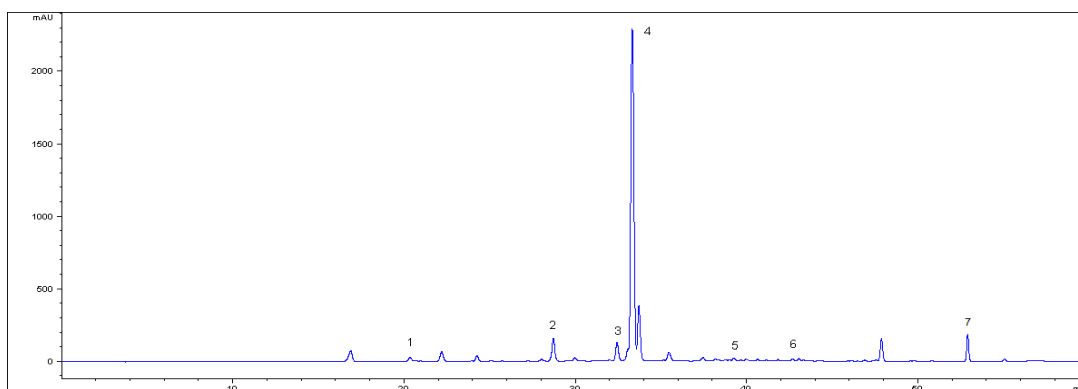


**Slika 8.33.** HPLC hromatogram ekstrakta E60U 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

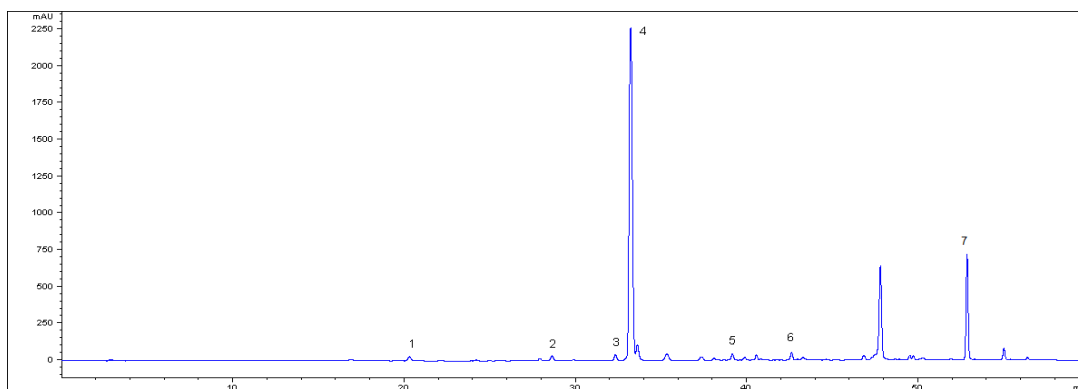




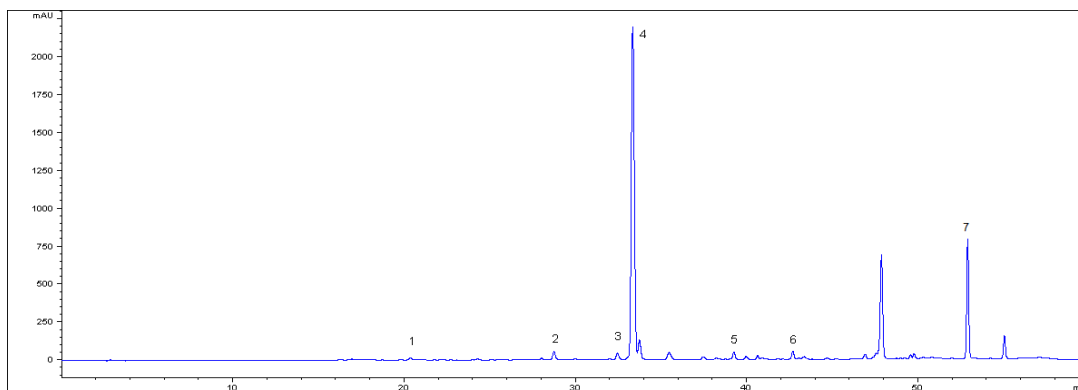
**Slika 8.34.** HPLC hromatogram ekstrakta E80T 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



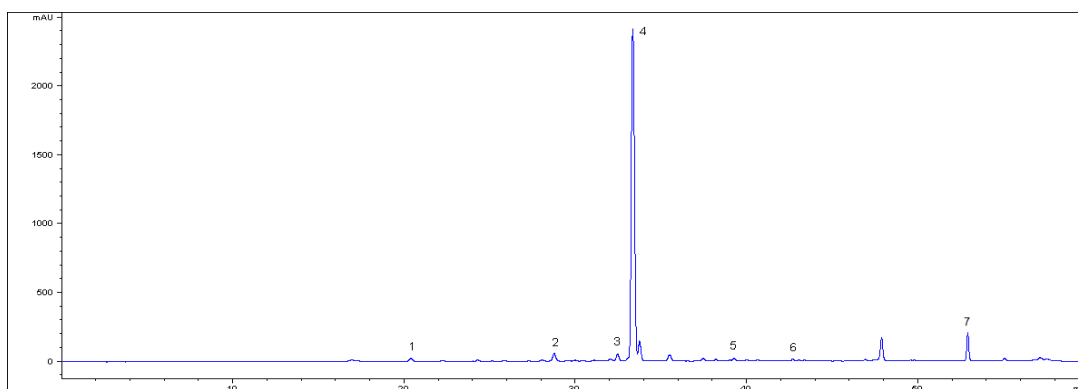
**Slika 8.35.** HPLC hromatogram ekstrakta E60T 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



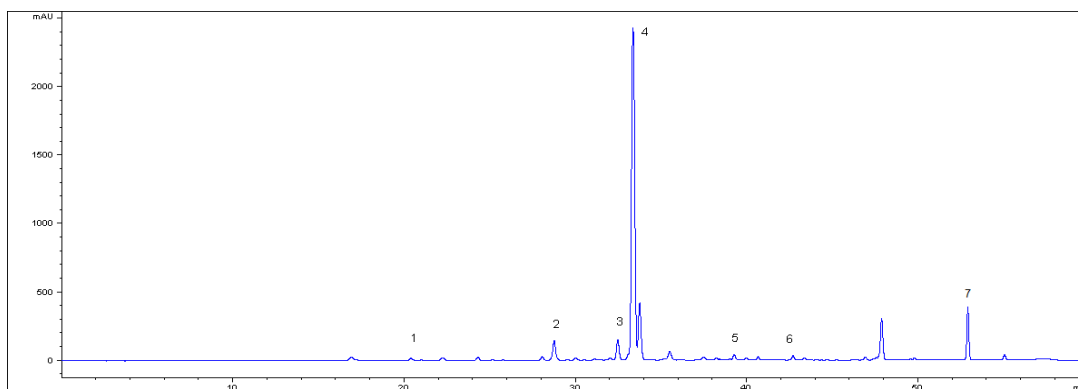
**Slika 8.36.** HPLC hromatogram ekstrakta EM 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



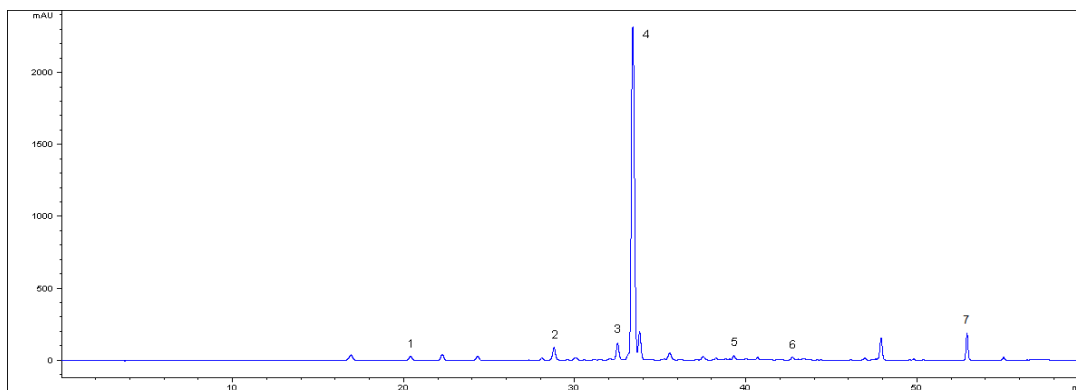
**Slika 8.37.** HPLC hromatogram ekstrakta EU 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



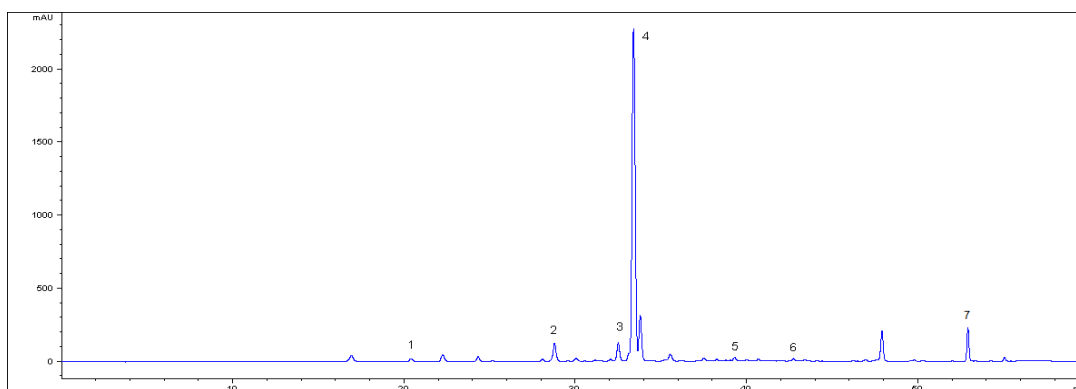
**Slika 8.38.** HPLC hromatogram ekstrakta MM 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



**Slika 8.39.** HPLC hromatogram ekstrakta MU 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ružmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



**Slika 8.40.** HPLC hromatogram ekstrakta M80M 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin



**Slika 8.41.** HPLC hromatogram ekstrakta M80U 2014 (330 nm). 1. kafena kiselina, 2. luteolin-7-*O*-glukozid, 3. apigenin-7-*O*-glukozid, 4. ruzmarinska kiselina, 5. luteolin, 6. apigenin, 7. salvigenin

## BIOGRAFIJA AUTORA

Milica Kostić je rođena 21. 5. 1984. godine u Nišu. Osnovnu školu i srednju medicinsku školu „Dr Milenko Hadžić”, smer farmaceutski tehničar, završila je u Nišu. Školske 2003/2004. godine je upisala Medicinski fakultet u Nišu – studijska grupa farmacije. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,36 i ocenom 10 na završnom ispitu iz predmeta Farmakognozija. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije i stipendista Fonda za talente grada Niša. Učestvovala je na kongresima studenata biomedicinskih nauka sa internacionalnim učešćem kao autor i koautor više radova, a takođe i kao član organizacionih odbora. Akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu u Nišu je upisala školske 2009/2010. godine, smer Toksikologija. Zbog užeg usavršavanja iz oblasti farmakognozije i fitoterapije, školske 2013/2014. godine se prebacuje na novoakreditovani program doktorskih studija – farmaceutske nauke.

Profesionalnu karijeru je započela u Zdravstvenoj ustanovi „Neven”, a od 2010. godine je u radnom odnosu na Medicinskom fakultetu u Nišu. Kao asistent angažovana je u izvođenju nastave na predmetima Farmakognozija I, Farmakognozija II i Fitoterapija. Istraživač je na projektu III41018 „Preventivni, terapijski i etički pristup prekliničkim i kliničkim istraživanjima gena i modulatora redoks ćelijske signalizacije u imunskom, inflamatornom i proliferativnom odgovoru ćelije” i Internom projektu Medicinskog fakulteta MF-INT-25 „Hemijska karakterizacija, biološka aktivnost i nutritivna *Ribes nigrum* L., *Salvia sclarea* L. i *Foeniculum vulgare* Miller”.

Učestvovala je na brojnim skupovima sa nacionalnim i međunarodnim značajem na kojima je prezentovala rezultate projektnih istraživanja. Autor je i koautor većeg broja naučnih radova publikovanih u časopisima nacionalnog i međunarodnog značaja.

Učestvovala je u realizaciji više studentskih radionica, kao predavač i moderator i bila je mentor brojnih studentskih radova koji su prezentovani na kongresima studenata biomedicinskih nauka sa internacionalnim učešćem.

## IZJAVA O AUTORSTVU

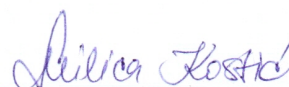
Izjavljujem da je doktorska disertacija, pod naslovom **HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKI PROFIL EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.** koja je odbranjena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu:

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada;
- da ovu disertaciju, ni u celini, niti u delovima, nisam prijavljivala na drugim fakultetima, niti univerzitetima;
- da nisam povredila autorska prava, niti zloupotrebila intelektualnu svojinu drugih lica.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci, koji su u vezi sa autorstvom i dobijanjem akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada, i to u katalogu Biblioteke, Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Nišu, kao i u publikacijama Univerziteta u Nišu.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



---

**Milica Kostić**



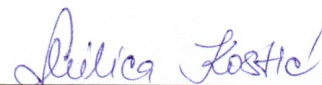
**IZJAVA O ISTOVETNOSTI ELEKTRONSKOG I ŠTAMPANOG OBLIKA  
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Naslov disertacije: **HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKI PROFIL EKSTRAKATA  
*Salvia sclarea* L.**

Izjavljujem da je elektronski oblik moje doktorske disertacije, koju sam predala za unošenje u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, istovetan štampanom obliku.

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



---

**Milica Kostić**

## IZJAVA O KORIŠĆENJU

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku "Nikola Tesla" da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu unese moju doktorsku disertaciju, pod naslovom: **HEMIJSKI SASTAV I FARMAKOLOŠKI PROFIL EKSTRAKATA *Salvia sclarea* L.**

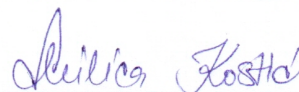
Disertaciju sa svim prilogima predao/la sam u elektronskom obliku, pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju, unetu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Nišu, mogu koristiti svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons), za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo (CC BY)
2. Autorstvo – nekomercijalno (CC BY-NC)
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade (CC BY-NC-ND)
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima (CC BY-NC-SA)
5. Autorstvo – bez prerade (CC BY-ND)
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima (CC BY-SA)

U Nišu,

Potpis autora disertacije:



---

**Milica Kostić**