

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena M. Kukić-Marković

**Hemijska i farmakološka karakterizacija
Stachys anisochila, *S. beckeana*, *S. plumosa* i
S. alpina subsp. *dinarica* (Lamiaceae)**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET



Jelena M. Kukić-Marković

**Hemijska i farmakološka karakterizacija
Stachys anisochila, *S. beckeana*, *S. plumosa* i
S. alpina subsp. *dinarica* (Lamiaceae)**

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY



Jelena M. Kukić-Marković

**Chemical and Pharmacological
Characterisation of
Stachys anisochila, *S. beckeana*, *S. plumosa*
and *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)**

Doktoral Dissertation

Belgrade, 2013

Mentor

Prof. dr Silvana Petrović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Prof. dr Petar Marin, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Prof. dr Silva Dobrić, redovni profesor
Univerzitet odbrane – Medicinski fakultet Vojnomedicinske akademije

Prof. dr Miroslav Savić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Marina Milenković, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Datum odbrane _____

Hemijska i farmakološka karakterizacija *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)

Rezime

U okviru doktorske disertacije izvršeno je hemijsko i farmakološko ispitivanje četiri taksona roda *Stachys* L.: *S. anisochila* Vis. et Pančić, *S. beckeana* Dörfler & Hayek, *S. plumosa* Griseb. i *S. alpina* subsp. *dinarica* Murb., endemičnih za Balkansko poluostrvo. Odabrane vrste roda *Stachys* bile su do sada samo delimično hemijski i farmakološki ispitivane, dok podvrsta *S. alpina* subsp. *dinarica* do sada nije bila predmet farmakognostijskih proučavanja.

Preliminarnim hemijskim ispitivanjima u nadzemnim delovima biljaka u cvetu utvrđeno je prisustvo tanina, flavonoida, antocijana, fenolkarboksilnih kiselina i alkaloida i određen njihov sadržaj.

Iz osušenih herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* destilacijom vodenom parom izolovana su etarska ulja. Prinos etarskih ulja bio je nizak: 0,15% (V/m) i 0,03% (m/m), redom. Analiza etarskog ulja *S. plumosa* pokazala je da su njegovi glavni sastojci diterpeni (74,3%), dok su monoterpeni i seskviterpeni prisutni u znatno manjoj količini (8,7 i 3,2%, redom). Glavna komponenta ovog etarskog ulja je diterpen dehidroabietan ($\equiv ar$ -abietatrien) (61,2%). U etarskom ulju *S. alpina* subsp. *dinarica* najzastupljeniji su seskviterpeni (60,5%) i to pretežno ugljovodonici (41,0%). Glavne komponente ovog etarskog ulja su (*E*)-kariofilen i germakren D (13,4 i 12,3%, redom). Ispitivano etarsko ulje karakteriše i visok sadržaj alifatičnih jedinjenja (19,4%).

Iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, tehnikama hromatografije na koloni i tankom sloju silikagela, izolovana su tri flavonska heterozida: 4'-*O*-metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje 1), 3'-hidroksi-4'-*O*-metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje 2) i izoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje 3). Strukture ovih jedinjenja utvrđene su na osnovu analize njihovih UV, MS, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektralnih podataka. Prisustvo ovih jedinjenja ranije je utvrđeno u nekim drugim vrstama roda *Stachys*, ali su ona u okviru ove doktorske disertacije po prvi put identifikovana u *S. alpina* subsp. *dinarica*.

HPLC-UV i HPLC-MS analizom metanolnih ekstrakata herbi dobijena su dodatna saznanja o kvalitativnom sastavu herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. plumosa*, dok je za *S. alpina* subsp. *dinarica* ova analiza sprovedena po prvi put. Takođe je za ekstrakte herbi sva četiri odabrana taksona metodom HPLC-UV prvi put izvršena i njihova kvantitativna analiza. U svim ekstraktima dominiraju flavonoidni heterozidi, a pored njih zastupljeni su i feniletanski heterozidi i fenolkarboksilne kiseline.

Flavonoidni kompleks ekstrakata herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* u kvalitativnom smislu je veoma sličan: najzastupljeniji su heterozidi 8-hidroksiflavona, tj. 7-*O*-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata. Dodatno, u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* prisutna su još i dva 7-*O*-diheksozida luteolina. U ekstraktu herbe *S. plumosa* zastupljeni su isključivo 7-*O*-biozidi hrizoeriola i monozidi apigenina, dok heterozidi 8-hidroksiflavona izostaju. Distribucija flavonoidnih heterozida u ispitivanim taksonima u skladu je sa njihovom taksonomskom pripadnošću. Naime, najveća sličnost u pogledu kompozicije flavonoidnih heterozida uočena je između ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana*, koje pripadaju istoj sekciji (*S. sect. Olisia*) i istoj grupi *S. recta*. Ove vrste

su u pogledu kompozicije flavonoidnih heterozida sličnije *S. alpina* (*S. sect. Eriostomum*), nego *S. plumosa* (*S. sect. Swainsoniana*).

Od fenolkarboksilnih kiselina, prisustvo hlorogenske utvrđeno je u svim ispitivanim ekstraktima (zastupljena je u opsegu koncentracija od 3,17% u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* do 12,57% u ekstraktu herbe *S. anisochila*). Dikafeoilhina kiselina je detektovana samo u ekstraktu herbe *S. anisochila*. U ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, osim hlorogenske kiseline, detektovan je i jedan derivat ferula kiseline. Od feniletanskih heterozida u svim ispitivanim ekstraktima prisutni su akteozid i lavandulifoliozid. U ekstraktima herbi *S. beckeana*, *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* identifikovana su, pored ova dva, još četiri jedinjenja iz ove grupe: martinozid u sva tri ekstrakta; izoakteozid u ekstraktima herbi *S. beckeana* i *S. plumosa*, a betoniozid E i leukoskeptoizid A u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*. Akteozid je najzastupljeniji feniletanski heterozid u svim ekstraktima (prisutan je u opsegu koncentracija od 1,09% u ekstraktu herbe *S. anisochila* do 9,07% u ekstraktu herbe *S. beckeana*).

U suvim metanolnim ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Stachys* spektrofotometrijskim postupkom, uz korišćenje Folin-Ciocalteu reagensa, utvrđen je sadržaj ukupnih polifenola (iznosio je od 65,63 µg katehin/mg suvog ekstrakta herbe *S. plumosa* do 192,16 µg katehin/mg suvog ekstrakta herbe *S. anisochila*).

Antioksidantni potencijal suvih metanolnih ekstrakata herbi svih odabranih taksona procenjivan je pomoću različitih *in vitro* testova: FRAP test (ukupna antioksidantna aktivnost), DPPH i TLC-DPPH test (neutralizacija DPPH radikala), 2-dezoksiriboza test (neutralizacija OH radikala) i TBA test (inhibicija indukovane lipidne peroksidacije). Rezultati antioksidantnih testova bili su u značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, flavonoida i feniletanskih heterozida. Ukupna antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata bila je oko pet puta manja od aktivnosti vitamina C. Svi ekstrakti koncentraciono zavisno su neutralisali DPPH radikal, pri čemu ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* ispoljavaju visoku anti-DPPH aktivnost ($SC_{50} < 50$ µg/ml). TLC-DPPH testom je dokazano da su glavni nosioci ove aktivnosti flavonoidni heterozidi i fenolkarboksilne kiseline. U 2-dezoksiriboza testu svi ekstrakti su koncentraciono zavisno neutralisali OH radikal, a u opsegu koncentracija 6,25-50 µg/ml inhibicija razgradnje 2-dezoksiriboze iznosila je preko 40%. Inhibicija lipidne peroksidacije takođe je bila koncentraciono zavisna, a najveću aktivnost ispoljili su ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* ($IC_{50} = 25,07$ i $49,00$ µg/ml, redom).

Na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova ispitano je antiinflamatorno delovanje suvih metanolnih ekstrakata herbi svih odabranih taksona roda *Stachys*. Svi ekstrakti su ispoljili dozno zavisnu aktivnost, a maksimalni efekti postignuti su primenom najveće testirane doze (200 mg/kg). Najbolji efekat uporediv sa efektom referentnog leka indometacina u dozi od 2 mg/kg, pokazali su ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. anisochila*: edem je umanjen za 54,04, donosno 53,30%. Ekstrakt herbe *S. plumosa* je ispoljio nešto nižu aktivnost (46,52%), dok je najslabiji efekat ispoljio ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* (37,17%).

Za ispitivanje hepatoprotektivnog delovanja korišćen je model ugljen-tetrahloridom indukovano oštećenja jetre pacova. Ekstrakti su primenjivani nakon ugljen-tetrahlorida, čime je omogućena procena njihovog reparativnog (terapijskog) efekta. Na osnovu promene nivoa enzima jetre (AST, ALT i AP) u serumu, kao i na osnovu patohistoloških promena u tkivu jetre, utvrđeno je da je najbolji i dozno zavistan efekat

ispoljio ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*: u dozi od 200 mg/kg oštećenje jetre smanjeno je za oko 50%. Hepatoprotektivni efekat ostalih ekstrakata je takođe bio evidentan, pri čemu između primenjenih doza (200 i 100 mg/kg) nije bilo statistički značajnih razlika. Efekti ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana* međusobno su bili slični i bolji u odnosu na efekte ekstrakta herbe *S. plumosa*.

Može se zaključiti da je ispoljeno antiinflamatorno i hepatoprotektivno delovanje ispitivanih ekstrakata delom i posledica njihove antioksidantne i antiradikalske aktivnosti.

Delovanje suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* na aktivnost mikrozomalne MAO praćeno je *in vitro* preko stepena razgrađivanja ¹⁴C-serotonina (supstrat za MAO-A) i ¹⁴C-fenil-etil-amina (supstrat za MAO-B). Rezultati ukazuju na odsustvo MAO-inhibitorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata.

Bihevioralna karakterizacija metanolnih ekstrakata sprovedena je korišćenjem standardnih testova: ponašanje u uzdignutom plus lavirintu (EPM), test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA) i test jačine stiska. Rezultati ispitivanja pokazuju izostanak jasnog anksiolitičkog ili miorelaksantnog delovanja. Ipak, utvrđeno je da ekstrakt herbe *S. beckeana* u dozi od 400 mg/kg ispoljava izvestan anksiogeni efekat u EPM testu, dok parametri vezani za aktivnost u istom testu ukazuju na sedativno delovanje ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*. Test lokomotorne aktivnosti (SLA), potvrdio je sedativni potencijal *S. alpina* subsp. *dinarica*. Dobijeni rezultati ukazuju da ispoljena bihevioralna aktivnost ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* ne uključuje predominantno populaciju GABA_A receptora sa α_1 -podjedinicom, a indirektno da su za ispoljene bihevioralne efekte odgovorni i određeni mehanizmi koji ne uključuju GABA-ergičku neurotransmisiju.

Antimikrobna aktivnost etarskih ulja herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, kao i metanolnih ekstrakata herbi sva četiri odabrana taksona roda *Stachys* ispitana je agar difuzionim testom. Korišćeni su standardni ATCC sojevi četiri Gram-(+) i tri Gram(-) bakterije i jedan soj gljivice *Candida albicans*. Etarsko ulje herbe *S. plumosa* pokazalo je aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima. Ono je bilo najaktivnije prema *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*, dostižući aktivnost veću od aktivnosti referentnih antibiotika (ampicilina, odnosno amikacina). Nasuprot tome, etarsko ulje herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* nije dovelo do inhibicije rasta nijednog od ispitivanih mikroorganizama. Suvi metanolni ekstrakti herbi svih odabranih taksona inhibirali su rast većine testiranih mikroorganizmima, osim ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* koji nije uticao na rast *Enterococcus faecalis* i *C. albicans*. U slučaju *Klebsiella pneumoniae* aktivnost ekstrakata bila je najveća i uporediva sa aktivnošću ampicilina.

Ključne reči: *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa*, *S. alpina* subsp. *dinarica*, hemijska karakterizacija, farmakološka karakterizacija.

Naučna oblast: Farmacija.

Uža naučna oblast: Farmakognozija.

UDK broj: 581.182:582.949.27(043.3)
615.322(043.3)

Chemical and Pharmacological Characterisation of *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* and *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)

Abstract

Chemical and pharmacological characterisation of four taxa from genus *Stachys* L.: *S. anisochila* Vis. et Pančić, *S. beckeana* Dörfler & Hayek, *S. plumosa* Griseb. and *S. alpina* subsp. *dinarica* Murb., endemic for Balkan peninsula, was performed. Selected species of genus *Stachys* were just partly chemically and pharmacologically investigated so far, while subspecies *S. alpina* subsp. *dinarica* has never been subjected to any pharmacognostic investigation.

Preliminary chemical analysis showed presence of tannins, flavonoids, anthocyanins, phenolic acids and alkaloids in aerial parts of investigated plants in full blossom. The content of these secondary metabolites was also determined.

From dried aerial parts of *S. plumosa* and *S. alpina* subsp. *dinarica*, by means of hydrodistillation, essential oils were isolated. Yield of both essential oils was low: 0.15% (V/m) and 0.03% (m/m), respectively. In essential oil of *S. plumosa* main constituents were diterpens (74.3%), while monoterpens and sesquiterpens were present in much lower amount (8.7 and 3.2%, respectively). The main component of this oil was diterpen dehydroabietane ($\equiv ar$ -abietatriene) (61.2%). In *S. alpina* subsp. *dinarica* essential oil sesquiterpens were the most abundant (60.5%), mainly hydrocarbons (41.0%). Main components of this essential oil were (*E*)-caryophyllene and germacrene D (13.4 and 12.3%, respectively). This oil was also characterised by high amount of aliphatic compounds (19.4%).

From methanol extract of *S. alpina* subsp. *dinarica*, by means of column and thin layer chromatography on silica gel, three flavone glycosides were isolated: 4'-*O*-methylisoscuteallarein-7-*O*-[6'''-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (compound **1**), 3'-hydroxy-4'-*O*-methylisoscuteallareine-7-*O*-[6'''-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (compound **2**) and isoscuteallareine-7-*O*-[6'''-acetyl- β -D-allopyranosyl-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranoside (compound **3**). Structure of these compounds was determined according analysis of their UV, MS, ^1H NMR and ^{13}C NMR spectral data. Presence of these compounds was previously determined in some other *Stachys* species, but in this doctoral dissertation they were identified for the first time in *S. alpina* subsp. *dinarica*.

HPLC-UV and HPLC-MS analysis of methanol herb extracts of selected *Stachys* taxa provided further information on qualitative composition of *S. anisochila*, *S. beckeana* and *S. plumosa*. For *S. alpina* subsp. *dinarica* this analysis was performed for the first time. Also, for the first time all four selected taxa were subjected to quantitative analysis. In all investigated extracts flavonoids, phenolic acids and phenylethanoid glycosides were detected, with flavonoids being predominant.

Flavonoid composition of *S. anisochila*, *S. beckeana* and *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extracts qualitatively was very similar: the most abundant were 8-hydroxyflavone glycosides, namely 7-*O*-biosides of isoscuteallareine and hypolaetine and their 4'-methyl derivatives. Further, in herb extract of *S. alpina* subsp. *dinarica* were also present two luteolin-7-*O*-dihexosides. In *S. plumosa* herb extract were present only 7-*O*-biosides of chrysoeriol and apigenin monosides, while 8-hydroxyflavone glycosides were absent. Distribution of flavonoid glycosides in selected taxa was in accordance with their taxonomy. According to flavonoid composition, the most similar were *S. anisochila* and

S. beckeana, which belong to the same section (*S. sect. Olisia*) and the same group *S. recta*. These two species are more similar with *S. alpina* (*S. sect. Eriostomum*) than with *S. plumosa* (*S. sect. Swainsoniana*).

Presence of chlorogenic acid was characteristic for all investigated extracts (from 3.17% in *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extract up to 12.57% in *S. anisochila* herb extract). Dicaffeoylchonic acid was detected in *S. anisochila* herb extract only. In *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extract, except chlorogenic acid, one ferulic acid derivative was detected. Among phenylethanoid glycosides in all investigated extracts acteoside and lavandulifolioside were present. In *S. beckeana*, *S. alpina* subsp. *dinarica* and *S. plumosa* herb extracts, beside these two, further four compounds were identified: martinosiol in all three extracts; isoacteoside in *S. beckeana* and *S. plumosa* herb extracts, and betonioside E and leucosceptoside A in *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extract. Acteoside was main phenylethanoid glycoside in all investigated extracts (from 1.09% in *S. anisochila* herb extract up to 9.07% in *S. beckeana* herb extract).

In dry methanol herb extracts of all selected *Stachys* taxa spectrophotometrically with Folin-Ciocalteu reagent, was determined total phenolics content (from 65.63 µg catechin/mg dry extract in *S. plumosa* herb extract up to 192.16 µg catechin/mg dry extract in *S. anisochila* herb extract).

Antioxidant potential of dry herb methanol extracts of selected *Stachys* taxa was estimated using several different *in vitro* tests: FRAP test (total antioxidant activity), DPPH and TLC-DPPH test (neutralisation of DPPH radical), 2-deoxyribose test (neutralisation of OH radical) and TBA test (inhibition of induced lipid peroxidation). Results of these antioxidant tests were in significant correlation with total phenolics content, flavonoids and phenylethanoid glycosides. Total antioxidant activity of methanol extracts was *ca.* five times lower compared to L-ascorbic acid. All extracts neutralised DPPH radical in concentration dependent manner, with *S. anisochila*, *S. beckeana* and *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extracts expressing very high activity ($SC_{50} < 50$ µg/ml). TLC-DPPH test showed that main compounds responsible for expressed activity were flavonoid glycosides and phenolic acids. In 2-deoxyribose test neutralisation of OH radical was concentration dependent, with inhibition over 40% in concentrations 6.25-50 µg/ml. Inhibition of lipid peroxidation was in correlation with applied extract concentrations, with *S. beckeana* and *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extracts being the most active ones ($IC_{50} = 25.07$ and 49.00 µg/ml, respectively).

Anti-inflammatory activity of dry methanol herb extracts of selected *Stachys* taxa was investigated in carrageenan-induced paw edema in rats, an experimental model of acute inflammation. All extracts exhibited dose-dependent activity, with maximal effect achieved with the highest dose applied (200 mg/kg). The best effect, comparable with the effect of reference drug indomethacin at dose of 2 mg/kg, showed *S. beckeana* and *S. anisochila* herb extracts: edema was decreased for 54.04 and 53.30%, respectively. *S. plumosa* herb extract has shown less-pronounced anti-inflammatory activity (46.52%), while *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extract had the lowest efficiency (37.17%).

The influence of methanol extracts of selected four *Stachys* taxa on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats was investigated. Extract were applied after the carbon tetrachloride, thus their reparative (therapeutic) effect was estimated. Based on alteration of biochemical parameters (liver enzymes AST, ALT and AP in the serum), as well as through histopathological changes in the liver (liver damage score, LDS), it was concluded that the best dose-dependant effect achieved by *S. alpina* subsp. *dinarica* herb extract: at 200 mg/kg liver damage was suppressed by 50%.

Hepatoprotective effect of other investigated *Stachys* extracts was also evident, though differences between applied doses (200 and 100 mg/kg) were not statistically significant. Effects of *S. anisochila* and *S. beckeana* herb extracts were similar with each other, and better than that of *S. plumosa* herb extract.

It could be concluded that showed anti-inflammatory and hepatoprotective activity of investigated extracts is partly due to their antioxidant and antiradical activity.

Effects of dry herb extracts of selected *Stachys* taxa on activity of microsomal MAO was investigated *in vitro* through degradation of ¹⁴C-serotonine (MAO-A substrate) i ¹⁴C-phenyl-ethyl-amine (MAO-B substrate). Results showed no MAO-inhibitory activity of investigated extracts.

Behavioural characterisation of herb extracts was conducted in the elevated plus maze (EPM), spontaneous locomotor activity (SLA), and grip strength tests, mainly predictive of anxiolytic, sedative and myorelaxant actions, respectively. Results showed that all investigated *Stachys* extracts lacked clear anxiolytic or myorelaxant activities. However, these extracts were not devoid of behavioral activity: *S. beckeana* at 400 mg/kg exerted an anxiogenic-like effect in the EPM, while the activity-related parameters from the same test suggested a sedative activity of *S. alpina* subsp. *dinarica* and *S. plumosa* herb extracts. The locomotor activity test confirmed the sedative potential of *S. alpina* subsp. *dinarica*. Obtained results suggest that the observed behavioral activity of *S. alpina* subsp. *dinarica* and *S. plumosa* herb extracts does not predominantly involve the α 1-containing population of GABA_A receptors responsible for sedation induced by benzodiazepine-like agents, but indirectly suggest the involvement of some other, non-GABA mechanisms in mediating the behavioral effects of the examined extracts.

Antimicrobial activity of *S. plumosa* and *S. alpina* subsp. *dinarica* herb essential oils, as well as of dry methanol herb extracts of all four selected *Stachys* taxa, was investigated using agar diffusion test, against standard ATCC strains of four Gram-positive and three Gram-negative bacteria and one strain of *Candida albicans*. *S. plumosa* herb essential oil expressed activity against all tested microorganisms, showing the best growth inhibitory activity against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*, reaching activity better than reference antibiotics (ampicillin and amikacin, respectively). On contrary, *S. alpina* subsp. *dinarica* herb essential oil did not inhibit growth of any tested microorganism. Investigated extracts inhibited growth of most tested strains, except *S. alpina* subsp. *dinarica* extract which didn't inhibit growth of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. As for *Klebsiella pneumoniae*, inhibitory activity of all investigated extracts was the most prominent and comparable with the activity of ampicillin.

Keywords: *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa*, *S. alpina* subsp. *dinarica*, chemical characterisation, pharmacological characterisation.

Academic expertise: Pharmacy.

Major in: Pharmacognosy.

UDC N°: 581.182:582.949.27(043.3)
615.322(043.3)

Mentoru, prof. dr. Silvani Petrović, izražavam veliku zahvalnost na ukazanom poverenju, strpljenju i podršci tokom izrade ovog rada.

Prof. dr. Petru Marinu, zahvaljujem na korisnim savetima i sugestijama u toku pisanja ovog rada.

Prof. dr. Silvi Dobrić, zahvaljujem na dragocenoj pomoći pri izvođenju eksperimenata za procenu antiinflamatorne i hepatoprotektivne aktivnosti i savetima pri pisanju ovog rada.

Prof. dr. Marini Milenković dugujem zahvalnost za pomoć oko ispitivanja antimikrobne aktivnosti i za savete i sugestije tokom pisanja rada.

Prof. dr. Miroslavu Saviću izražavam zahvalnost za svestranu pomoć u izvođenju bihevioralnih eksperimenata i savetima u pisanju ovog rada.

Dr. sc. Vesni Jačević (Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd) zahvaljujem na pomoći oko eksperimenata za procenu hepatoprotektivne aktivnosti.

Prof. dr. Aleksandri Topić (Katedra za medicinsku biobemiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) zahvaljujem na pomoći oko eksperimenata za procenu hepatoprotektivne aktivnosti i tumačenju rezultata.

Dr. sc. Anastasia Karioti i prof. dr. Anna Rita Billia (Institut za farmaceutske nauke, Univerzitet u Firenci) zahvaljujem na neprocenjivoj pomoći prilikom izvođenja HPLC analize ekstrakata i strukturne analize izolovanih jedinjenja.

Dr. sc. Marjannu Niketiću, kustosu Prirodnjačkog muzeja u Beogradu, dugujem veliku zahvalnost za pomoć prilikom prikupljanja i identifikacije biljnog materijala i savete i sugestije u pisanju ovog rada.

Dr. sc. Mibajlu Ristiću (Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr. Josif Pančić", Beograd), prof. dr. Maria Couladis i prof. dr. Olga Tzakou (Institut za farmakognoziju i hemiju prirodnih proizvoda, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Atini) i doc. dr. Milici Pavlović-Drobac (Katedra za farmakognoziju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) zahvaljujem na pomoći oko analize etarskih ulja.

Dr. sc. Mirku Tomiću, višem naučnom saradniku, i dr. sc. Gordani Tovilović (Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu) zahvaljujem na pomoći oko eksperimenta prilikom određivanja uticaja na aktivnost enzima MAO.

Kolegicama dipl. pharm. Mariji Milinković, dipl. pharm. Jovani Divljaković (Katedra za farmakologiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) i mr. sc. Dragani Vučićević (Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) zahvaljujem na pomoći u eksperimentalnom radu.

Kolektivu Katedre za farmakognoziju zahvaljujem na podršci, saradnji i pomoći tokom svih ovih godina.

Hvala dragim prijateljima, za uzor, podršku i sve ono neprocenjivo.

Hvala mojim najdražima, naročito M.

UVOD.....	1
1. Rod <i>Stachys</i> L.....	2
2. Sekundarni metaboliti vrsta roda <i>Stachys</i>	8
2.1. Flavonoidni aglikoni	8
2.2. Flavonoidni heterozidi	10
2.3. Feniletanski heterozidi.....	15
2.4. Fenolkarboksilne kiseline	18
2.5. Iridoidi	20
2.6. Diterpeni	23
2.7. Etarska ulja	26
2.8. Alkaloidi	29
3. Upotreba vrsta roda <i>Stachys</i>	31
4. Farmakološka aktivnost vrsta roda <i>Stachys</i>	38
5. Odabrane vrste roda <i>Stachys</i>	45
5.1. <i>Stachys anisochila</i> Vis. & Pančić	45
5.2. <i>Stachys beckeana</i> Dörfler & Hayek.....	46
5.3. <i>Stachys plumosa</i> Griseb.....	47
5.4. <i>Stachys alpina</i> L.....	48
5.4.1. <i>Stachys alpina</i> subsp. <i>dinarica</i> Murb.	49
5.5. Dosadašnja ispitivanja	50
CILJ	53
MATERIJAL I METODE	54
1. Biljni materijal i ekstrakcija	55
2. Aparatura	56
3. Osnovna hemijska ispitivanja.....	58
4. Kvalitativna hemijska analiza.....	58
4.1. Dokazivanje tanina.....	58
4.2. Dokazivanje flavonoida	59
4.3. Dokazivanje alkaloida.....	59
5. Kvantitativna hemijska analiza.....	60
5.1. Određivanje ukupnih polifenola	60
5.2. Određivanje tanina	60
5.3. Određivanje flavonoida.....	61
5.4. Određivanje antocijana	62
5.5. Određivanje derivata hidroksicimetne kiseline.....	63
5.6. Određivanje alkaloida	64
6. TLC analiza	66
6.1. TLC analiza fenolnih jedinjenja	66
6.2. TLC analiza monosaharida nakon kisele hidrolize.....	67
7. Ekstrakcija herbe <i>Stachys alpina</i> subsp. <i>dinarica</i> i izolovanje flavonoida	68

8. HPLC-UV i HPLC-MS analiza	69
9. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja.....	72
9.1. Etarsko ulje herbe <i>Stachys plumosa</i>	72
9.2. Etarsko ulje herbe <i>Stachys alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	73
10. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	75
10.1. Ukupna antioksidativna aktivnost (FRAP test).....	76
10.2. Neutralizacija DPPH radikala (DPPH test).....	77
10.3. TLC-DPPH test.....	77
10.4. Neutralizacija OH radikala (2-dezoksiriboza test).....	78
10.5. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test).....	79
11. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti	81
12. Ispitivanje hepatoprotektivne aktivnosti.....	83
13. Ispitivanje inhibicije enzima MAO	89
14. Bihevioralna karakterizacija.....	91
14.1. Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu (EPM test).....	93
14.2. Merenje spontane lokomotorne aktivnosti (SLA test)	93
14.3. Test jačine stiska	94
15. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti	95
15.1 Agar difuzioni test.....	97
REZULTATI I DISKUSIJA.....	98
1. Osnovna hemijska ispitivanja.....	99
2. Kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza.....	99
2.1. Tanini i ukupni polifenoli	99
2.2. Flavonoidi i antocijani	100
2.3. Derivati hidroksicimetne kiseline	101
2.4. Alkaloidi	102
3. TLC analiza	103
3.1. TLC analiza fenolnih jedinjenja.....	103
3.2. TLC analiza monosaharida nakon kisele hidrolize	106
4. Identifikacija flavonoida izolovanih iz metanolnog ekstrakta herbe <i>Stachys alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	107
4.1. Identifikacija jedinjenja 1 (4'- <i>O</i> -metilizoskutelarein 7- <i>O</i> -[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid)	107
4.2. Identifikacija jedinjenja 2 (3'-hidroksi-4'- <i>O</i> -metilizoskutelarein 7- <i>O</i> -[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid)	108
4.3. Identifikacija jedinjenja 3 (izoskutelarein 7- <i>O</i> -[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid)	110
5. HPLC-UV i HPLC-MS analiza	115
5.1. Metanolni ekstrakt herbe <i>S. anisochila</i>	115
5.2. Metanolni ekstrakt herbe <i>S. beckeana</i>	115
5.3. Metanolni ekstrakt herbe <i>S. plumosa</i>	116

5.4. Metanolni ekstrakt herbe <i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	117
6. Etarska ulja	137
6.1. Etarsko ulje herbe <i>Stachys plumosa</i>	137
6.2. Etarsko ulje herbe <i>Stachys alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	138
7. Antioksidantna aktivnost	143
7.1. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test).....	143
7.2. Neutralizacija DPPH radikala (DPPH test).....	144
7.3. TLC-DPPH test.....	146
7.4. Neutralizacija OH radikala (2-dezoksiriboza test).....	147
7.5. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test).....	149
8. Antiinflamatorna aktivnost.....	155
9. Hepatoprotektivna aktivnost.....	163
11. Inhibicija enzima MAO	173
10. Bihevioralna karakterizacija.....	175
12. Antimikrobna aktivnost	186
ZAKLJUČCI	193
LITERATURA	200
PRILOG.....	224

UVOD

1. Rod *Stachys* L.

Subkosmopolitski rod *Stachys* L. obuhvata oko 300 veoma varijabilnih vrsta, što ga čini najvećim rodом podfamilije *Lamioideae* i jednim od najvećih rodova familije *Lamiaceae* (Salmaki i sar., 2011).

Rod obuhvata višegodišnje ili jednogodišnje zeljaste biljke, sa nerazgranatom ili razgranatom stabljikom. Izdanak je go, do gusto pokriven svilastim ili vunastim dlakama. Listovi su sedeći ili sa lisnom drškom, većinom pravilno nazubljeni, ređe nenazubljeni. Cvetovi sedeći ili sa vrlo kratkom drškom, po 2 ili više složeni većinom u guste prividne pršljenove u pazuhu listova stabla ili priperaka, svi zajedno grade većinom guste prividne klasove. Čašica cevasta ili zvonasta, sa 5 ili 10 nerava, većinom pravilno nazubljena, sa 5 zubaca, ređe su 3 gornja zupca meki ili neznatno trnoliko produženi i srasli u gornju usnu. Krunica dvousnata, ± crvena, bleožuta ili bela, krunična cev prava ili neznatno savijena, u vršnom delu iste širine ili malo proširena, dugačka kao čašica ili znatno duža od iste; gornja usna celog oboda ili dvorežnjevita, malo ispupčena ili ravna, prava ili naviše savijena, spolja ± pokrivena dlakama, donja proširena ili naniže oborena, trorežnjevita, sa većim, celim ili dvorežnjevitim srednjim režnjem. Prašnika 4, prednji većinom duži od unutrašnjih, uzdižu se paralelo sa gornjom usnom krunice, većinom napolje savijeni. Poluantere odvojene, paralelne ili češće stoje pod većim ili manjim uglom. Diskus pravilan. Stubić na vrhu sa žigom deljenim u 2 kratka režnja. Plodići obrnuto jajasti ili izduženi, trouglasti, spreda zaobljeni, suvi (Diklić, 1974).

Najveći broj vrsta raste na krečnjačkim kamenjarima. Srodne vrste roda *Stachys* obično žive na sličnim, ali geografski izolovanim staništima (Bhattacharjee, 1980).

Biljke ovog roda rasprostranjene su u toplim klimatskim delovima Mediterana i jugozapadne Azije, u Severnoj i Južnoj Americi i u severnoj Africi. Ne naseljavaju Australiju i Novi Zeland.

Glavni centri diverziteta su:

- jugozapadna Azija (južna i istočna Anadolija, Kavkaz, severozapadni delovi Irana i severni delovi Iraka) i
- Balkansko poluostrvo.

Azijski centar obuhvata dva regiona: mediteranski i irano-turanski, i u njemu raste najveći broj vrsta (oko 95); evropski centar sačinjavaju mediteranski i evro-sibirski (Bhattacharjee, 1980).

Rod *Stachys* je bio predmet većeg broja taksonomskih i morfoloških studija u cilju odgovarajućeg pozicioniranja, kako samog roda, tako i velikog broja taksona koje obuhvata. Počevši od 1827. godine, kada Dumortier deli rod na tri sekcije (1827), pa do danas, predloženo je nekoliko klasifikacija. Kao neki od kriterijuma korišćeni su: broj cvetova, veličina brakteola, boja i veličina krunice, oblik čašice, jednogodišnje ili višegodišnje biljke, anatomija lista i dr. (Salmaki i sar., 2011).

U Flori Evrope (Ball, 1972) se u okviru roda *Stachys* navodi 58 vrsta, svrstanih u četiri sekcije: *S. sect. Stachys*, *S. sect. Olisia* Dumort., *S. sect. Eriostomum* (Hoffmanns. et Link) Dumort. i *S. sect. Betonica* (L.) Bentham (Tabela 1).

Međutim, mnogobrojna anatomsko-morfološka, mikromorfološka i hemijska ispitivanja vrsta ovog roda idu u prilog mišljenju da taksone *Stachys* i *Betonica* L. treba posmatrati kao dva odvojena podroda ili roda (Bankova i sar., 1999; Bhattacharjee, 1980; Grujić-Jovanović, 2009). Prema klasifikaciji koju je dao Bhattacharjee (1980) ceo rod *Stachys* je podeljen na dva podroda: *S. subgen. Stachys*, koji obuhvata 19 sekcija, i *S. subgen. Betonica* (L.) R. Bhattacharjee, sa dve sekcije (Tabela 2).

U daljem tekstu biće primenjen taksonomski koncept Bhattacharjee (1980), sa izuzetkom *S. anisochila* Vis. et Pančić koju autor pogrešno uključuje u *S. sect. Swainsoniana* R. Bhattacharjee. U skladu sa ovom klasifikacijom ova vrsta bi zapravo pripadala *S. sect. Olisia* subsect. *Rectae* R. Bhattacharjee. Na to ukazuju i mnoge klasifikacije i taksonomske studije pre Bhattacharjee (1980), kao i Lenherr (1983), Lenherr i saradnici (1984a), Baltisberger i Lenherr (1984), Greuter i saradnici (1986) i Chrtek (1992), koji *S. anisochila* uključuju u grupu (agregat) vrste *S. recta* L. koja je i tipska vrsta pomenute podsekcije *S. subsect. Rectae*. Prema Lehnerr-u (1983) grupa *S. recta* obuhvata 10 vrsta: *S. recta*, *S. atherocalyx* K. Koch, *S. subcrenata* Vis., *S. baldaccii* (K. Malý) Hand.-Mazz., *S. anisochila*, *S. labiosa* Bertol., *S. leucoglossa* Griseb., *S. beckeana* Dörfler & Hayek, *S. parolinii* Vis. i *S. tetragona* Boiss. & Kotschy.

Većina njih su balkanski endemiti, osim *S. recta*, *S. atherocalyx* i *S. labiosa*.

Tabela 1. Sekcije i vrste roda *Stachys* prema Flori Evrope (Ball, 1972)

Sekcija *Stachys*

S. decumbens Pers.
S. canescens Bory & Chaub.
S. anisochila Vis. & Pančić
S. menthifoila Vis.
S. plumosa Griseb.
S. sylvatica L.
S. palustris L.
S. recta L.
S. beckeana Dörfler & Hayek
S. parolinii Vis.
S. atherocalyx K. Koch
S. iberica Bieb.
S. virgata Bory & Chaub.
S. angustifolia Bieb.
S. tetragona Boiss. & Heldr.
S. leucoglossa Griseb.
S. mucronata Sieber ex Sprengel
S. spruneri Boiss.
S. swansonii Bentham.
S. ionica Halácsy
S. euboica Rech. fil.
S. circinata L'Hér.
S. glutinosa L.
S. spinosa L.
S. iva Griseb.
S. chrysantha Boiss. & Heldr.
S. candida Bory & Chaub.
S. spreitzenhoferi Heldr.
S. maritima Gouan.
S. pubescens Ten.
S. arenaria Vahl.

Sekcija *Eriostomum*

S. balansae Boiss. & Kotschy
S. alpina L.
S. germanica L.
S. tymphaea Hausskn.
S. tournefortii Poiret
S. sericophylla Halácsy
S. thirkei C. Koch
S. cassia (Boiss.) Boiss.
S. cretica L.
S. byzantina K. Koch
S. heraclea All.
S. acutifolia Bory & Chaub.
S. obliqua Waldst. & Kit.

Sekcija *Olisia*

S. corsica Pers.
S. ocymastrum (L.) Briq.
S. marrubifolia Viv.
S. annua (L.) L., Sp.
S. spinulosa Sibth. & Sm.
S. milanii Petrović
S. arvensis (L.) L.
S. brachyclada De Noë ex Cosson
S. serbica Pančić

Sekcija *Betonica*

S. alopecuros (L.) Bentham
S. monieri (Gouan) P. W. Ball.
S. officinalis (L.) Trevis.
S. balcanica P. W. Ball
S. scardica (Griseb.) Hayek

Tabela 2. Klasifikacija roda *Stachys* koju je dao Bhattacharjee (1980)

Podrod <i>Stachys</i>			
1. Sect. <i>Eriostomum</i> (Hoffmanns.& Link) Dum.	Subsect. <i>Spectabiles</i> R. Bhattacharjee	<i>S. durandiana</i> Coss.	9. Sect. <i>Fragilicaulis</i> R. Bhattacharjee
Subsect. <i>Germanicae</i> R. Bhattacharjee	<i>S. bayburtensis</i> Bhattacharjee & Hub.-Mor.	<i>S. guyoniana</i> Noë	Subsect. <i>Multibracteolatae</i> R. Bhattacharjee
<i>S. acutifolia</i> Link	<i>S. huetii</i> Boiss.	<i>S. mialhesii</i> Noë	<i>S. asterocalyx</i> Rech. fil.
<i>S. alpina</i> L.	<i>S. longispicata</i> Boiss.	7. Sect. <i>Candida</i> R. Bhattacharjee	<i>S. ballotiformis</i> Vatke
<i>S. balansae</i> Boiss.	<i>S. spectabilis</i> Choisy	<i>S. candida</i> Bory & Chaub	<i>S. benthamiana</i> Boiss.
<i>S. germanica</i> L.	<i>S. viticina</i> Boiss.	<i>S. chrysantha</i> Boiss.	<i>S. brantii</i> Bentham
<i>S. ehrenbergii</i> Boiss.	2. Sect. <i>Mucronata</i> R. Bhattacharjee	<i>S. iva</i> Griseb.	<i>S. fragillima</i> Bornm.
<i>S. floccosa</i> Bentham	<i>S. mucronata</i> Sieber.	<i>S. maweana</i> Bal.	<i>S. graveolens</i> Náb.
<i>S. heraclea</i> All.	3. Sect. <i>Infrarosularis</i> R. Bhattacharjee	<i>S. saxicola</i> Coss. & Bal.	<i>S. kurdica</i> Boiss.
<i>S. hissarica</i> Regel	<i>S. amanica</i> P. H. Davis	<i>S. spreitzenhoferi</i> Heldr.	<i>S. laetivirens</i> [Kotschy ex] Rech. fil.
<i>S. huber-monarthii</i> Bhattacharjee	<i>S. cataonica</i> Bhattacharjee & Hub.-Mor.	8. Sect. <i>Swainsoniana</i> R. Bhattacharjee	<i>S. lanigera</i> Rech. fil.
<i>S. ischatkalensis</i> Knorr.	<i>S. citrina</i> Boiss.	Subsect. <i>Swainsonianae</i> R. Bhattacharjee	<i>S. mardinensis</i> (Post) R. Mill
<i>S. libanotica</i> Boiss.	<i>S. petrococos</i> Rech. fil.	<i>S. euboica</i> Rech. fil.	<i>S. megalodonta</i> Hausskn. & Bornm. ex P. H. Davis
<i>S. obliqua</i> Waldst. & Kit.	<i>S. pumila</i> Banks & Sol.	<i>S. ionica</i> Hal.	<i>S. subnuda</i> [Montbret & Aucher ex] Bentham
<i>S. persica</i> Gmel.	<i>S. rupestris</i> Montbret & Aucher.	<i>S. spruneri</i> [Boiss. ex] Bentham	<i>S. viscosa</i> [Montbret & Aucher ex] Bentham
<i>S. pinetorum</i> Boiss.	4. Sect. <i>Roseostachys</i> R. Bhattacharjee	<i>S. swainsonii</i> Bentham	Subsect. <i>Fragiles</i> [Boiss. ex] Rech. fil.
<i>S. rizeensis</i> Bhattacharjee	<i>S. rosea</i> Desf.	Subsect. <i>Decumbentes</i> R. Bhattacharjee	<i>S. butleri</i> R. Mill
<i>S. sericantha</i> Davis	5. Sect. <i>Setifolia</i> R. Bhattacharjee	<i>S. anisochila</i> Vis. ^a	<i>S. euadenia</i> P. H. Davis
<i>S. sericophylla</i> Hal.	<i>S. iraqensis</i> Bhattacharjee	<i>S. canescens</i> Bory & Chaub	<i>S. longiflora</i> Boiss.
<i>S. sibirica</i> Link	<i>S. menthoides</i> Kotschy & Boiss.	<i>S. decumbens</i> Pers.	<i>S. pinardii</i> Boiss.
<i>S. tournerifortii</i> Poiret	<i>S. setifera</i> C. A. Meyer	<i>S. menthifolia</i> Vis.	<i>S. pseudopinardii</i> Bhattacharjee & Hub.-Mor.
Subsect. <i>Creticae</i> R. Bhattacharjee	6. Sect. <i>Stachys</i>	<i>S. panagea</i> Phitos	
<i>S. byzantina</i> K. Koch.	Subsect. <i>Sylvaticae</i> (Knorr. ex Omel'chuk-M'yakushko) R. Bhattacharjee	<i>S. plumosa</i> Griseb.	
<i>S. cretica</i> L.	<i>S. hydrophila</i> Boiss.		
<i>S. macrotricha</i> Rech. fil.	<i>S. palustris</i> L.		
<i>S. thirkei</i> K. Koch.	<i>S. sylvatica</i> L.		
<i>S. tmolea</i> Boiss.	Subsect. <i>Circinatae</i> R. Bhattacharjee		
	<i>S. circinata</i> L'Hérit		

^a Prema taksonomskom konceptu koji je primenjen u ovoj doktorskoj disertaciji, vrsta *S. anisochila* ne pripada sekciji *S. sect. Swainsoniana*, već sekciji *S. sect. Olisia*.

<p>10. Sect. <i>Olisia</i> Dum. Subsect. <i>Rectae</i> R. Bhattacharjee <i>S. albanica</i> Markgraf <i>S. angustifolia</i> Bieb. <i>S. arenaria</i> Vahl. <i>S. atherocalyx</i> K. Koch. <i>S. beckeana</i> Dörfler & Hayek <i>S. fontqueri</i> Pau. <i>S. iberica</i> Bieb. <i>S. leucoglossa</i> Griseb. <i>S. recta</i> L. <i>S. sparsipilosa</i> Bhattacharjee & Hub.-Mor. <i>S. tetragona</i> Boiss. <i>S. virgata</i> Bory & Chaub. Subsect. <i>Distantes</i> R. Bhattacharjee <i>S. aleurites</i> Boiss. <i>S. bombycina</i> Boiss. <i>S. distans</i> Benth Subsect. <i>Annuae</i> R. Bhattacharjee <i>S. annua</i> L. <i>S. maritima</i> Gouan <i>S. mouretii</i> Batt. & Pit. <i>S. parolinii</i> Vis. <i>S. talyschensis</i> Kapeller Subsect. <i>Rosulatae</i> R. Bhattacharjee <i>S. diversifolia</i> Boiss. <i>S. inanis</i> Hausskn. & Bornm. <i>S. munzurdagensis</i> Bhattacharjee Subsect. <i>Spinosae</i> R. Bhattacharjee <i>S. spinosa</i> L.</p>	<p>11. Sect. <i>Campaniastrum</i> (Habl.) Reichb. Subsect. <i>Ocymastrum</i> R. Bhattacharjee <i>S. brachyclada</i> Noë <i>S. duriaei</i> Noë <i>S. ocymastrum</i> (L.) Briq. Subsect. <i>Arvenses</i> R. Bhattacharjee <i>S. arabica</i> Hornem. <i>S. arvensis</i> (L.) L. <i>S. marrubifolia</i> Viv. <i>S. milanii</i> Petr. <i>S. spinulosa</i> Sm. 12. Sect. <i>Corsica</i> R. Bhattacharjee <i>S. corsica</i> Pers. 13. Sect. <i>Sideritopsis</i> R. Bhattacharjee <i>S. obscura</i> Boiss. <i>S. pseudosideritis</i> Bhattacharjee & Hub.-Mor. <i>S. zoharyana</i> Eig. 14. Sect. <i>Neurocalyx</i> R. Bhattacharjee <i>S. neurocalycina</i> Boiss. 15. Sect. <i>Satureoides</i> R. Bhattacharjee <i>S. burgsdorffoides</i> (Benth) Boiss. <i>S. melampyroides</i> Hand.-Mazz. <i>S. ramosissima</i> Montbret & Aucher <i>S. saturoides</i> Montbret & Aucher</p>	<p>16. Sect. <i>Thamnostachys</i> Kapeller Subsect. <i>Fruticulosae</i> R. Bhattacharjee <i>S. araxina</i> Kapeller <i>S. fruticulosa</i> Bieb. <i>S. grosshemii</i> Kapeller <i>S. sosnowskyi</i> Kapeller Subsect. <i>Paulinae</i> R. Bhattacharjee <i>S. paulii</i> Grossh. 17. Sect. <i>Aucheriana</i> R. Bhattacharjee <i>S. acerosa</i> Boiss. <i>S. aucheri</i> Benth <i>S. glutinosa</i> L. <i>S. ixoides</i> Boiss. <i>S. multicaulis</i> Benth <i>S. pilifera</i> Benth 18. Sect. <i>Zietenia</i> (Gled.) Benth <i>S. lavandulifolia</i> Vahl. 19. Sect. <i>Ambleia</i> Benth <i>S. aegyptiaca</i> Pers. <i>S. demawendica</i> Bornm. <i>S. inflata</i> Benth <i>S. kotschyi</i> Boiss. <i>S. laxa</i> Boiss. <i>S. nivea</i> Labill. <i>S. obtusirena</i> Boiss. <i>S. palaestina</i> L. <i>S. tomentosa</i> Benth <i>S. trinervis</i> Aiton <i>S. turcomanica</i> Trautv.</p>	<p>Podrod <i>Betonica</i> (L.) Bhattacharjee 20. Sect. <i>Betonica</i> <i>S. alopecuros</i> (L.) Benth <i>S. macrantha</i> (W. Koch) Stearn <i>S. monieri</i> (Gouan) P. W. Ball <i>S. officinalis</i> (L.) Trev. <i>S. serbica</i> Pančić 21. Sect. <i>Macrostachya</i> R. Bhattacharjee <i>S. betonicifolia</i> Rupr. <i>S. discolor</i> Benth <i>S. macrostachya</i> (Wend.) Briq. <i>S. scardica</i> (Griseb.) Hayek</p>
--	---	---	---

Prema Flori Srbije, na teritoriji Srbije raste 17 vrsta roda *Stachys* (Diklić, 1974): *S. alopecuros* (L.) Benth., *S. alpina* L., *S. anisochila* Vis. et Pančić,^a *S. annua* L., *S. atherocalyx* K. Koch, *S. cassia* (Boiss.) Boiss., *S. germanica* L., *S. leucoglossa* Griseb., *S. milanii* Petrović,^b *S. officinalis* (L.) Trevis, *S. palustris* L., *S. plumosa* Griseb.,^a *S. recta* L., *S. reinertii* Heldr., *S. scardica* Griseb.,^a *S. serbica* Pančić,^a i *S. sylvatica* L.

Treba napomenuti da se dve prethodno navedene vrste iz grupe *S. recta*: *S. subcrenata* i *S. baldaccii* (Lenherr, 1983) u Flori Srbije vode kao podvrste *S. recta*: *S. r. subsp. subcrenata* (Vis.) Briq. i *S. r. subsp. baldaccii* (K. Malý) Hayek (Diklić, 1974).

^a Endemit Balkanskog poluostrva

^b Endemit istočnog dela Balkanskog poluostrva

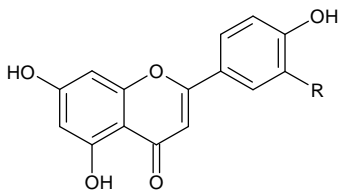
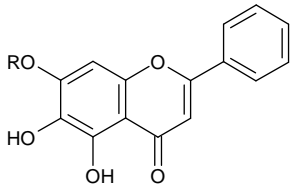
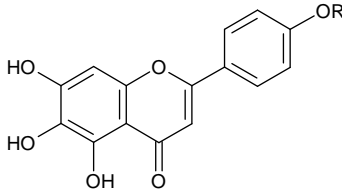
2. Sekundarni metaboliti vrsta roda *Stachys*

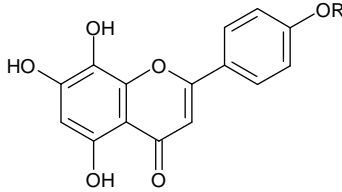
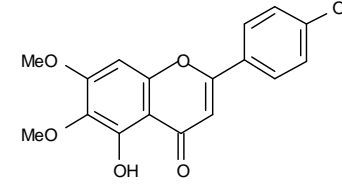
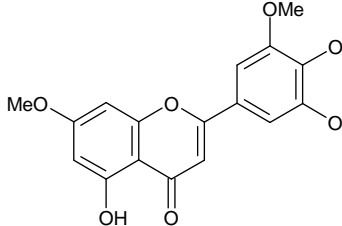
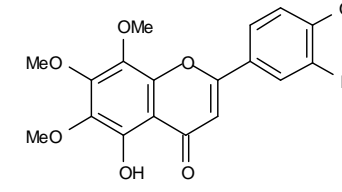
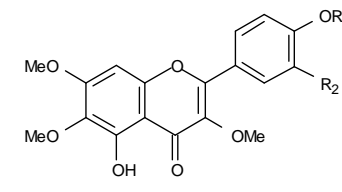
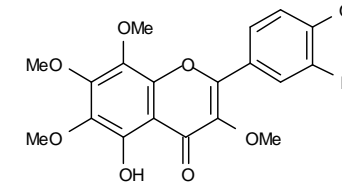
Vrste roda *Stachys* su intenzivno proučavane u poslednjih 20 godina. Velika morfološka raznovrsnost, različiti ekološki faktori, hibridizacija, poliploidija i dr., usloveli su i veliku strukturnu raznovrsnost sekundarnih metabolita ovog roda. Najčešće su proučavani: flavonoidi, feniletanski heterozidi, iridoidi, terpenoidi, etarska ulja i fenolkarboksline kiseline (Buchwald i Czapska, 1995; Bankova i sar., 1999; Meremeti i sar., 2004; Piozzi i Bruno, 2009, 2011). Pojava sofisticiranih tehnika izolacije i analize biljnih sastojaka dovela je i do mogućnosti identifikacije velikog broja struktura, što je doprinelo i njihovoj upotrebi kao hemotaksonomskih markera na subfamilijarnom, inter- i intraspecijskom nivou.

2.1. Flavonoidni aglikoni

Aglikoni flavonoida se nalaze na površini listova i drugih nadzemnih organa, ili u obliku eksudata ili rastvoreni u lipofilnom matriksu (Tomas-Barberan i Gil, 1992). Slobodni aglikoni izolovani iz vrsta roda *Stachys* uglavnom su flavonski, uz značajan broj metilovanih derivata flavonola (Tabela 3).

Tabela 3. Flavonoidni aglikoni vrsta roda *Stachys*

	Aglikon	Vrsta
	Apigenin (R=H)	<i>S. aegyptiaca</i> , ¹ <i>S. officinalis</i> ² <i>S. neglecta</i> , ³ <i>S. ionica</i> ⁴ <i>S. byzantina</i> , ⁵ <i>S. ocymastrum</i> ⁶
	Luteolin (R=OH)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹ <i>S. neglecta</i> ³ <i>S. ocymastrum</i> ⁶
	Hrizoeriol (R=OMe)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹ <i>S. candida</i> , <i>S. chrysantha</i> ⁷
	Bajkalein (R=H)	<i>S. annua</i> ⁸
	Negletein (R=Me)	<i>S. neglecta</i> ³
	Skutelarein (R=H)	<i>S. inflata</i> ⁹
	4'-O-Metilskutelarein (R=Me)	<i>S. annua</i> ⁸

	Izoskutelarein (R=H)	<i>S. inflata</i> ⁹
	4'-O-Metilizoskutelarein (R=Me)	<i>S. inflata</i> ⁹
	Cirzimaritin (R=H)	<i>S. schtschegleevii</i> ^{10, a}
	Salvigenin (R=Me)	<i>S. ionica</i> ⁴
	7-O-Metiltricin	<i>S. officinalis</i> ²
	Ksantomikrol (R ₁ =R ₂ =H)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹ <i>S. candida</i> , <i>S. chrysantha</i> ⁷ <i>S. ionica</i> , ⁴ <i>S. schtschegleevii</i> ¹⁰
	Sideritiflavon (R ₁ =H, R ₂ =OH)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹
	4',5-dihidroksi, 3',6,7,8-tetrametoksi flavon (R ₁ =H, R ₂ =OMe)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹
	5-hidroksi, 3',4',6,7,8-pentametoksi flavon (R ₁ =Me, R ₂ =OMe)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹
	5- hidroksi, 4',3,6,7-tetrametoksi flavon (R ₁ =R ₂ =H)	<i>S. ionica</i> ⁴
	Hrizosplenetin (R ₁ =H, R ₂ =OMe)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹ <i>S. ionica</i> ⁴
	Kasticin (R ₁ =Me, R ₂ =OH)	<i>S. ionica</i> ⁴
	Kalikopterin (R ₁ =R ₂ =H)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹ <i>S. candida</i> , <i>S. chrysantha</i> ⁷
	5- hidroksi, 4',3,6,7,8-pentametoksi flavon (R ₁ =Me, R ₂ =H)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹
	3',4',5-tri hidroksi, 3,6,7,8-tetrametoksi flavon (R ₁ =H, R ₂ =OH)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹
	4',5-di hidroksi, 3',3,6,7,8-pentametoksi flavon (R ₁ =H, R ₂ =OMe)	<i>S. aegyptiaca</i> ¹

¹ El-Ansari i sar., 1991; ² Kobzar i Nikonov 1986; ³ Zinchenko, 1969; ⁴ Meremeti i sar., 2004; ⁵ Asnaashari i sar., 2010; ⁶ Lakhali i sar., 2011; ⁷ Skaltsa i sar., 2000; ⁸ Sheremet i Komissarenko, 1972; ⁹ Komissarenko i sar., 1979; ¹⁰ Nazemiyeh i sar., 2006.

^a sinonim za *S. inflata* var. *caucasica*

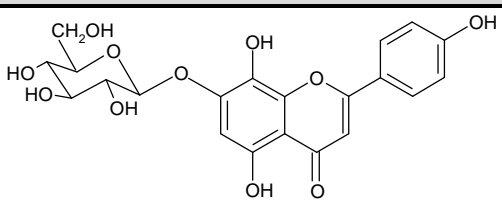
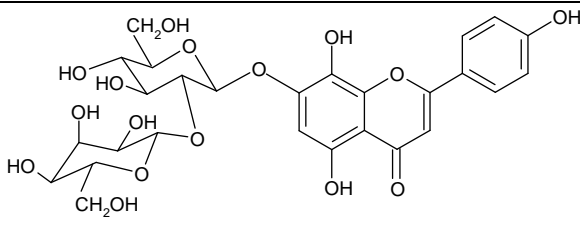
2.2. Flavonoidni heterozidi

Flavonski heterozidi su najzastupljeniji tip flavonoida u vrstama roda *Stachys*. Najčešće se radi o heterozidima apigenina, luteolina i hrizoeriola, odnosno njihovih derivata. Pored monozida veoma su česti i biozidi. Najzastupljeniji monosaharidi su glukoza i aloza, a takođe su prisutni manozna i glukuronska kiselina. Glukoza je gotovo uvek direktno vezana za aglikon, najčešće za fenolnu grupu u položaju C-7 aglikona, dok se ostali šećeri vezuju za glukozu (1→2) acetalnom vezom.

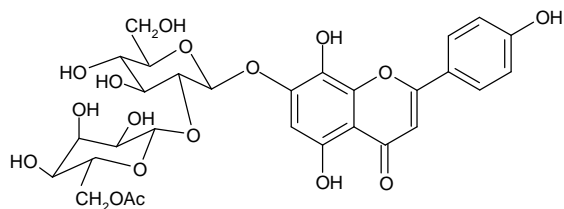
Bitna karakteristika vrsta roda *Stachys* je prisustvo alozilglukozida 8-hidroksiflavona. Ova jedinjenja se javljaju u formi diacetilovanih, monoacetilovanih i neacetilovanih heterozida. Ovaj tip heterozida se takođe javlja i kod biljaka rodova *Sideritis* L., *Galeopsis* L. (Tomas-Barberan i Gil, 1992), *Veronica* L. i *Teucrium* L. (Petreska i sar., 2011).

Struktura nekih flavonoidnih heterozida izolovanih iz nadzemnih delova vrsta roda *Stachys* data je u Tabeli 4.

Tabela 4. Flavonoidni heterozidi vrsta roda *Stachys*

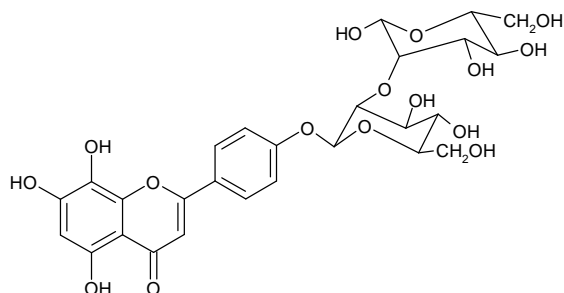
Jedinjenje	Vrsta
 <p>Izoskutelarein 7-O-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. alopecuroides</i> ¹
 <p>Izoskutelarein 7-O-[[β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. aegyptiaca</i> ² <i>S. ionica</i> ³ <i>S. byzantina</i> ^{4, a} <i>S. ocymastrum</i> ⁵

^a sinonim *S. lanata*



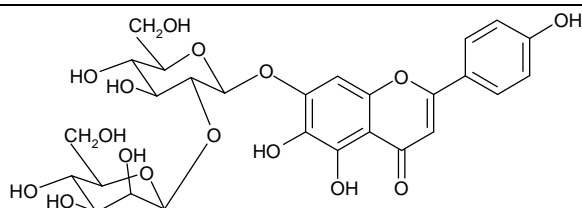
Izoskutelarein 7-O-[6'''-acetyl- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

*S. aegyptiaca*², *S. anisochila*^{1,6,7}
S. atherocalyx, *S. beckeana*,
S. baldaccii, *S. labiosa*, *S. subcrenata*,
S. leucoglossa, *S. parolinii*, *S. tetragona*,
S. mentifolia, *S. annua*, *S. angustifolia*⁶
*S. sieboldii*⁸
*S. corsica*⁹
*S. ionica*³
S. mialhesi (koren)¹⁰
*S. plumosa*¹
S. recta^{6,11}



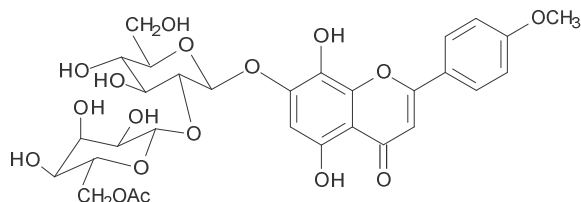
Izoskutelarein 4'-O-[β -D-manopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (izostahiflazid)

*S. inflata*¹²
*S. spectabilis*¹³



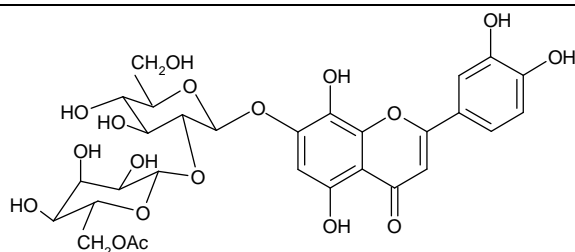
Skutelarein 7-O-[β -D-manopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (stahiflazid)

*S. annua*¹⁴
*S. inflata*¹⁵
S. atherocalyx^{15,16}
*S. spectabilis*¹³



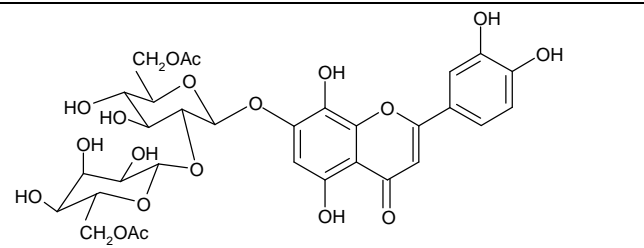
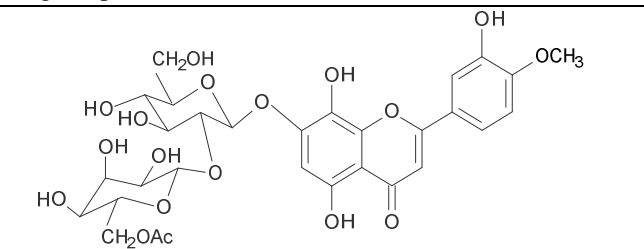
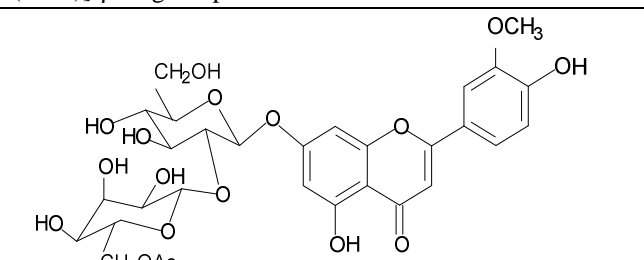
4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetyl- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

S. anisochila^{1,6}
S. atherocalyx, *S. baldaccii*, *S. labiosa*,
S. subcrenata, *S. leucoglossa*,
S. mentifolia, *S. annua*, *S. angustifolia*⁶
S. recta^{1,6}
S. plumosa, *S. germanica*, *S. sylvatica*,
*S. thracica*¹⁷
*S. ionica*³
*S. byzantina*⁴
*S. corsica*⁹



Hipolaetin 7-O-[6'''-acetyl- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

*S. anisochila*⁷

 <p>Hipolaetin 7-O-[6'', 6'''-diacetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid</p>	<p><i>S. anisochila</i>⁷</p>
 <p>4'-O-Metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid</p>	<p><i>S. anisochila</i>^{6,7} <i>S. byzantina</i>⁴ <i>S. annua</i>, <i>S. atherocalyx</i>, <i>S. subcrenata</i>, <i>S. labiosa</i>, <i>S. beckeana</i>, <i>S. baldaccii</i>, <i>S. parolinii</i>, <i>S. leucoglossa</i>⁶ <i>S. recta</i>^{6,11}</p>
 <p>Hrizeriol 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid (stahispinozid)</p>	<p><i>S. bombycina</i>¹⁸ <i>S. spinosa</i>¹⁹ <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>melangavica</i>²⁰ <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>scyronica</i>²⁰ <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i>²⁰</p>

¹ Marin i sar., 2004; ² El-Ansari i sar., 1991; ³ Meremeti i sar., 2004; ⁴ Murata i sar., 2008; ⁵ Lakhal i sar., 2011; ⁶ Lenherr i sar., 1984a; ⁷ Lenherr i Mabry, 1987; ⁸ Takeda i sar., 1985; ⁹ Serrilli i sar., 2005; ¹⁰ Laggoune i sar., 2011a; ¹¹ Lenherr i sar., 1984b; ¹² Komissarenko i sar., 1979; ¹³ Derkach i sar., 1980; ¹⁴ Sheremet i Komissarenko, 1971a; ¹⁵ Komissarenko i sar., 1976; ¹⁶ Kostyuchenko i sar., 1982; ¹⁷ Bankova i sar., 1999; ¹⁸ Delazar i sar., 2005a; ¹⁹ Kotsos i sar., 2001; ²⁰ Skaltsa i sar., 2007.

Izostahiflazid i stahiflazid su retki flavonoidi u čijoj strukturi je umesto aloze prisutna manoza (Tabela 4). Neki autori smatraju da manoza identifikovana u strukturi stahiflazida i izostahiflazida zapravo nastaje transformacijom aloze prilikom kisele hidrolize, tj. da je artefakt nastao prilikom određivanja strukture flavonoida (Wollenweber i Jay, 1988).

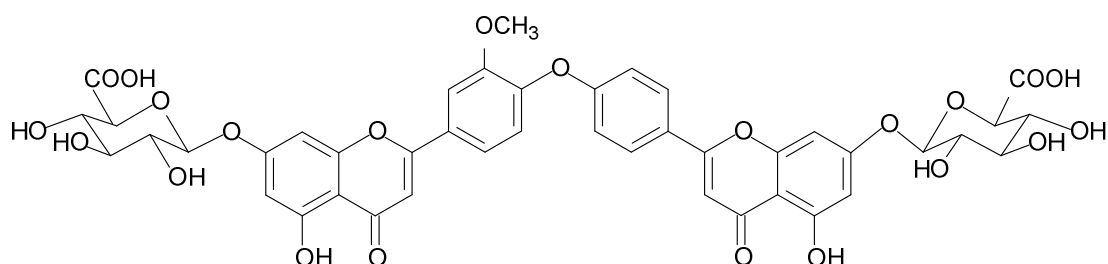
Takođe, neki autori smatraju da u vrstama ovog roda nisu prisutni heterozidi 4'-metilskutelareina, već heterozidi njegovog izomera 4'-metilizoskutelareina. Naime, pretpostavlja se da tokom kisele hidrolize koja se sprovodi u cilju određivanja strukture

jedinjenja dolazi do Wessely-Moser premeštanja^b i nastaje aglikon 4'-metilskutelarein (Tomás-Barberán i sar., 1988).

Ostali tipovi flavonoidnih heterozida u vrstama ovog roda su retki. Flavonolni heterozidi su sporadično zastupljeni - u vrstama: *S. officinalis*, *S. sylvatica*, *S. glutinosa* (Tomás-Barberán i sar., 1988), *S. palustris* (Grujić-Jovanović, 2009), kao i C-heterozidi – u vrstama: *S. officinalis*, (Tomás-Barberán i sar., 1988; Grujić-Jovanović, 2009), *S. scardica* i *S. palustris* (Grujić-Jovanović, 2009). Interesantno je da u ovim vrstama nije zabeleženo prisustvo karakterističnih 7-O-alozilglukozida 8-hidroksiflavona.

Flavonoidi poput izostahiflazida (*S. inflata*, Komissarenko i sar., 1979; *S. spectabilis*, Derkach i sar., 1980), kod kojih se glikozidna veza ostvaruje preko OH grupe u položaju C-4', veoma su retki.

Iz nadzemnog dela vrste *S. ehrenbergii* izolovan je biflavonoid hrizoeriol 7-O-β-D-glukuronopiranozid-(4'-O-4''')-hrizin-7''-O-β-D-glukuronopiranozid (Slika 1) (Cincinelli i sar., 2011).



Slika 1. Hrizoeriol 7-O-β-D-glukuronopiranozid-(4'-O-4''')-hrizin-7''-O-β-D-glukuronopiranozid

Estri flavonoida sa *p*-kumarnom kiselinom su takođe sporadično zastupljeni u vrstama ovog roda. *p*-Kumarna kiselina estarsku vezu uglavnom ostvaruje sa C-6 hidroksilnom grupom odgovarajućeg šećera, najčešće glukoze (Tabela 5).

^b Kod flavona i flavanona sa nezaštićenom C₅-OH grupom dolazi do otvaranja heterociklusa i njegovog ponovnog zatvaranja, pri čemu nastaje izomerno jedinjenje:

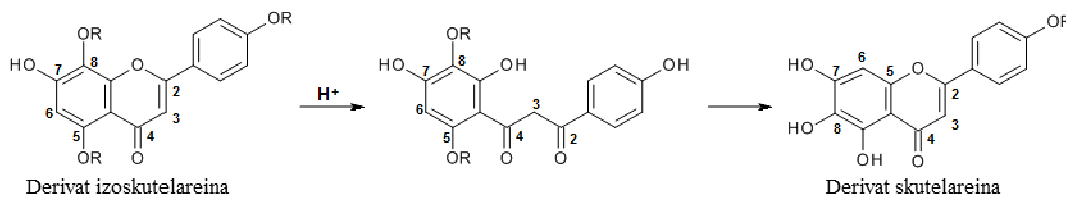
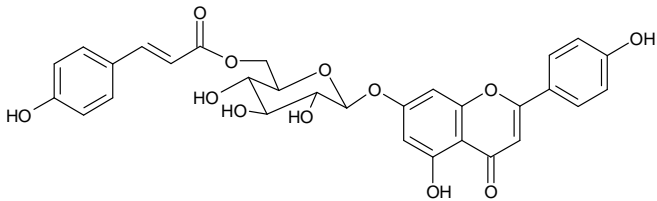
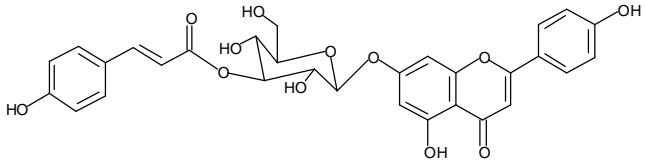
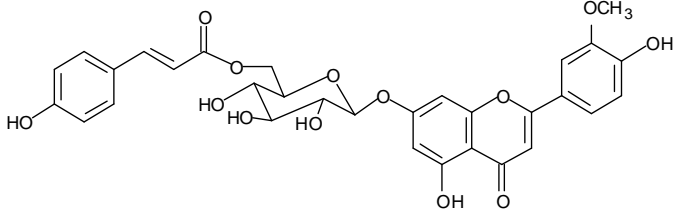
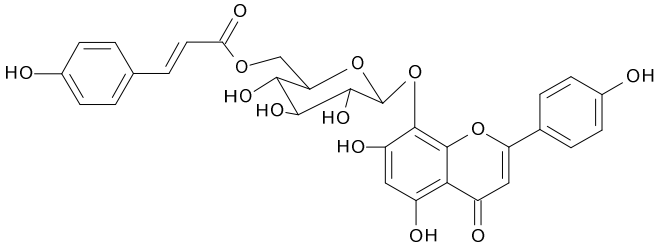
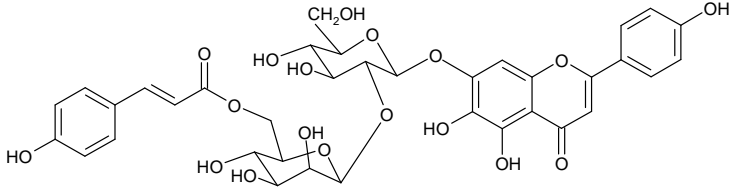
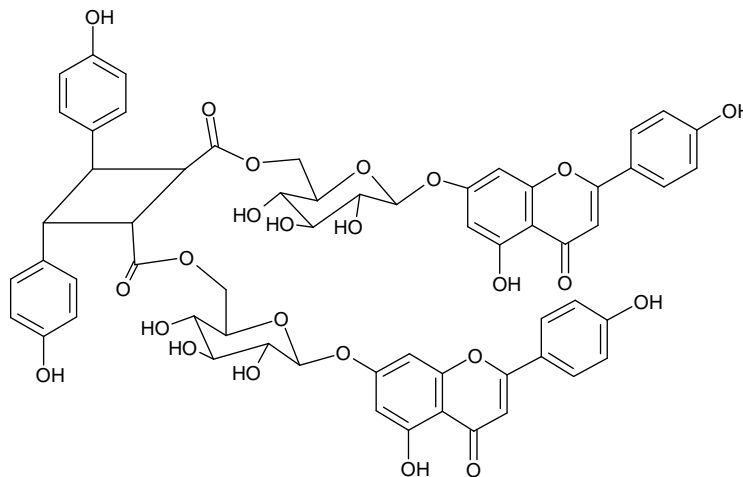


Tabela 5. Najzastupljeniji *p*-kumaroil derivati flavonoida vrsta roda *Stachys*

Jedinjenje	Vrsta
 <p>Apigenin 7-O-(6''-<i>p</i>-kumaroil)-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. officinalis</i> , <i>S. alopecuros</i> , <i>S. scardica</i> , <i>S. anisochila</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. sylvatica</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. plumosa</i> ¹ <i>S. bombycina</i> ² , <i>S. ionica</i> ³ <i>S. schtschegleevii</i> ⁴ , <i>S. byzantina</i> ⁵ , <i>S. ocymastrum</i> ⁶ , <i>S. mialhesi</i> ⁷ , <i>S. recta</i> ⁸
 <p>Apigenin 7-O-(3''-<i>p</i>-kumaroil)-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. byzantina</i> ⁵ <i>S. recta</i> ⁸
 <p>Hrizoeriol 7-O-(6''-<i>p</i>-kumaroil)-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. schtschegleevii</i> ⁴ <i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i> ⁹ <i>S. chrysantha</i> , <i>S. candida</i> ¹⁰
 <p>Izoskutelarein 8-O-(6''-<i>p</i>-kumaroil)-β-D-glukopiranozid</p>	<i>S. aegyptiaca</i> ¹¹
 <p>Stahanoacid</p>	<i>S. annua</i> ¹²

¹ Marin i sar., 2004; ² Delazar i sar., 2005a; ³ Meremeti i sar., 2004; ⁴ Nazemiyeh i sar., 2006; ⁵ Murata i sar., 2008;
⁶ Lakhal i sar., 2011; ⁷ Laggoune i sar., 2011a; ⁸ Karioti i sar., 2010; ⁹ Skaltsa i sar., 2007; ¹⁰ Skaltsa i sar., 2000;
¹¹ Sharaf, 1998; ¹² Sheremet i Komissarenko, 1971b.

Iz nadzemnih delova *S. aegyptiaca* (El-Ansari i sar., 1995) i *S. byzantina*^c (Murata i sar., 2008) izolovan je stahizetin, koji je strukturno diestar dikarboksilne *p,p'*-dihidroksitruksilne kiseline i apigenin 7-glukozida (Slika 2).



Slika 2. Stahizetin (diapigenin 7-glukozid-*p,p'*-dihidroksitruksilna kiselina)

2.3. Feniletanski heterozidi

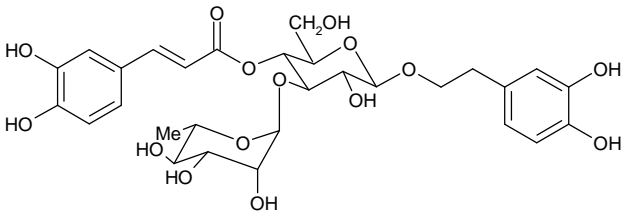
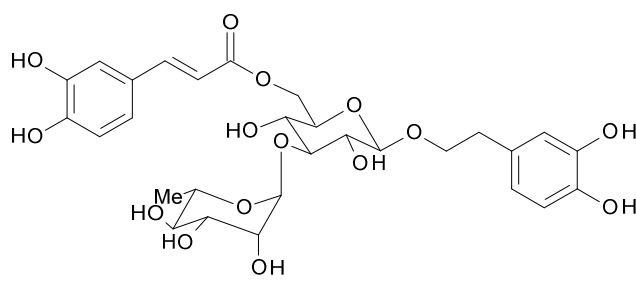
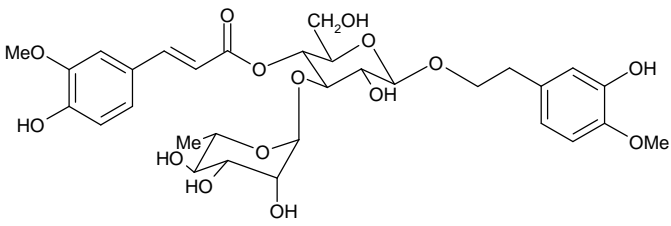
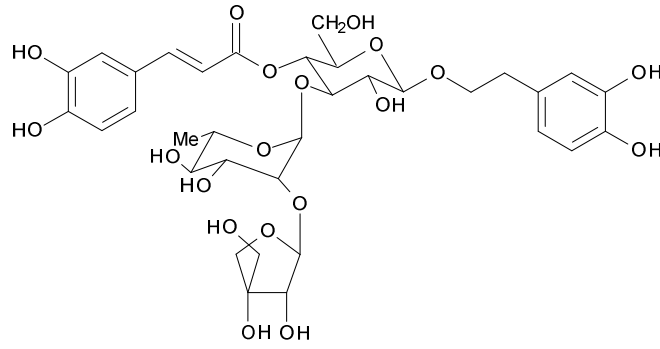
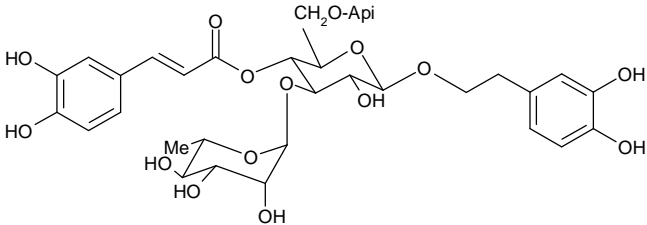
Feniletanski heterozidi su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Izolovani su iz različitih biljnih organa (npr. iz korena, kore, listova), kao i iz ćelijskih kultura nekih biljaka (kalus, suspenzija). Najveći broj je izolovan iz biljaka familija *Scrophulariaceae*, *Oleaceae*, *Plantaginaceae*, *Lamiaceae* i *Orobanchaceae*. Feniletanski heterozidi ispoljavaju raznovrsne biološke aktivnosti: neuroprotektivnu, antioksidantnu i antiradikalnu, imunomodulatornu, antitumorsku, antivirusnu, antibakterijsku, deluju kao hepatoprotektivni i antiinflamatorni agensi (Fu i sar., 2008). Utvrđeno je da su u okviru familije *Lamiaceae* jedinjenja ovog tipa ograničena na podfamilije sa heksakolpatnim^d polenovim zrnima (*Lamioideae s.l.*) (Pedersen, 2000).

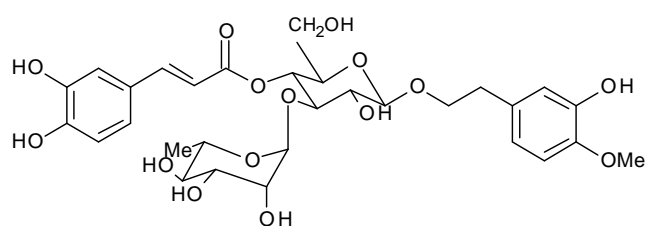
Produkcija feniletanskih heterozida je karakteristična za vrste roda *Stachys* i iz njih je izolovan veliki broj jedinjenja ove klase. Neka od ovih jedinjenja su veoma rasprostranjena u biljnom carstvu (akteozid, forzitozid B, martinozid), dok su neka za sada identifikovana samo u vrstama ovog roda (Tabela 6).

^c Sinonim *S. lanata*.

^d Polenovo zrno na čijoj se površini nalazi šest nabora (colpa).

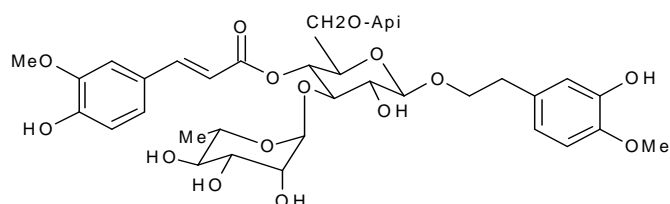
Tabela 6. Feniletanski heterozidi vrsta roda *Stachys*

Jedinjenje	Vrsta
 <p>Akteozid</p>	<p><i>S. sieboldii</i>^{1, 2, 3, 4} <i>S. lavandulifolia</i>^{5, 6} <i>S. macrantha</i>⁷, <i>S. riederi</i>⁸ <i>S. officinalis</i>^{9, 10} <i>S. ["Betonica"] bulgarica</i>¹⁰ <i>S. ["Betonica"] scardica</i>¹⁰ <i>S. germanica</i>, <i>S. sylvatica</i>, <i>S. plumosa</i>, <i>S. thracica</i>¹⁰ <i>S. byzantina</i>^{11, 12} <i>S. iberica</i>¹³, <i>S. schtschegleevii</i>¹⁴</p>
 <p>Izoakteozid</p>	<p><i>S. byzantina</i>¹¹ <i>S. iberica</i>¹³</p>
 <p>Martinozid</p>	<p><i>S. sieboldii</i>^{1, 2, 4} <i>S. macrantha</i>⁷ <i>S. ["Betonica"] bulgarica</i>¹⁰ <i>S. ["Betonica"] scardica</i>¹⁰ <i>S. officinalis</i>, <i>S. germanica</i>, <i>S. sylvatica</i>, <i>S. plumosa</i>, <i>S. thracica</i>¹⁰ <i>S. byzantina</i>¹¹</p>
 <p>Betoniozid F</p>	<p><i>S. officinalis</i>⁹ <i>S. schtschegleevii</i>¹⁴</p>
 <p>Forzitozid B</p>	<p><i>S. officinalis</i>⁹ <i>S. ["Betonica"] bulgarica</i>¹⁰ <i>S. ["Betonica"] scardica</i>¹⁰ <i>S. sylvatica</i>, <i>S. officinalis</i>, <i>S. plumosa</i>, <i>S. thracica</i>¹⁰</p>



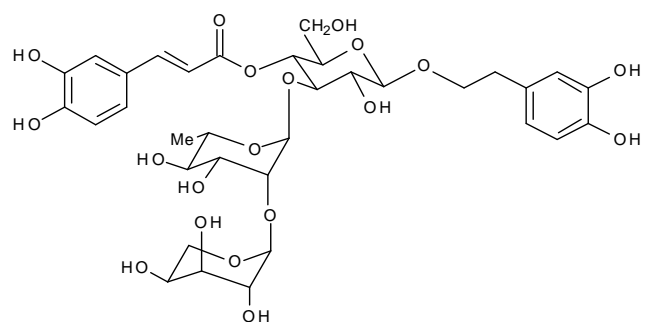
S. sieboldii^{2, 3, 4}
*S. macrantha*⁷
*S. lavandulifolia*⁶

Leukoskeptozid A



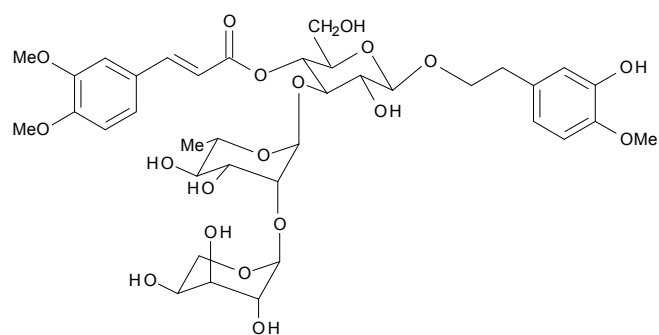
*S. officinalis*⁹

Leukoskeptozid B



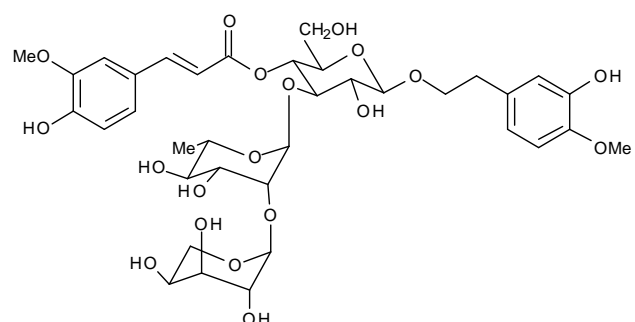
S. lavandulifolia^{5, 6}
S. sieboldii^{2, 3, 4}
*S. macrantha*⁷
*S. riederi*⁸

Lavandulifolozid



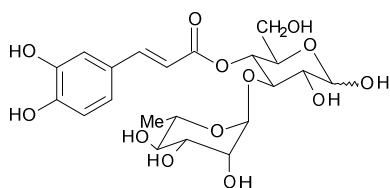
*S. lavandulifolia*⁶

Lavandulifolozid B



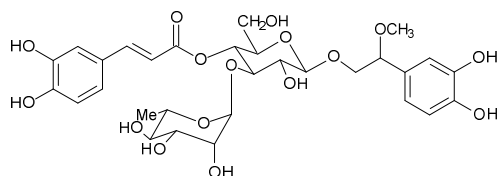
*S. sieboldii*¹³

Stahisozid D



*S. byzantina*¹¹

Cistanosid F



*S. byzantina*¹¹

Kampneozid I

¹ Takeda i sar., 1985; ² Yamahara i sar., 1990; ³ Miyase i sar., 1990; ⁴ Nishimura i sar., 1991; ⁵ Basaran i sar., 1988; ⁶ Delazar i sar., 2011; ⁷ Calis i sar., 1992; ⁸ Ikeda i sar., 1994; ⁹ Miyase i sar., 1996a; ¹⁰ Bankova i sar., 1999; ¹¹ Murata i sar., 2008; ¹² Asnaashari i sar., 2010; ¹³ Tepe i sar., 2011; ¹⁴ Nazemiyeh i sar., 2006.

2.4. Fenolkarboksilne kiseline

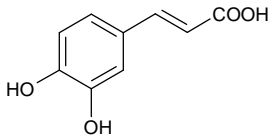
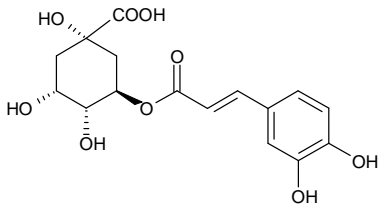
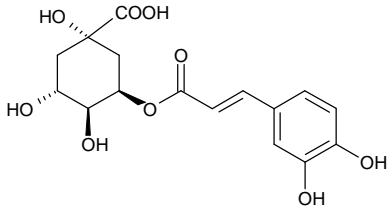
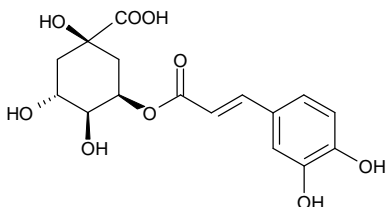
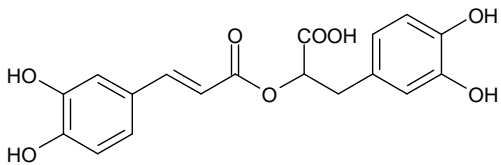
Fenolkarboksilne kiseline su veoma rasprostranjeni sekundarni biljni metaboliti. Predstavljaju derivate hidroksicimetne i hidroksibenzojeve kiseline. Mogu biti slobodne ili (češće) u obliku estara (sa šećerima ili drugim kiselinama), amida ili heterozida. Fenolkarboksilne kiseline ispoljavaju različite farmakološke efekte (Ghasemzadeh i Ghasemzadeh, 2011).

Kafena kiselina i njeni konjugati smatraju se hemotaksonomski značajnim markerima familije *Lamiaceae* (Grayer i de Kok, 1998; Janicsak i sar., 1999; Grayer i sar., 2003). Kafena kiselina je prisutna u većem broju vrsta roda *Stachys*, a neki njeni depsidi, naročito hlorogenska kiselina, su još zastupljeniji (Tabela 7).

Rozmarinska kiselina je identifikovana u više vrsta roda *Stachys* (Tabela 7), ali u vrlo niskoj koncentraciji.

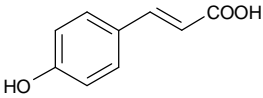
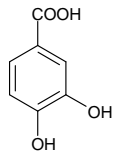
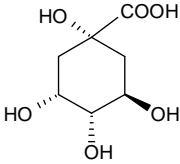
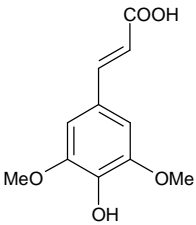
p-Kumarna kiselina je kao slobodna retko zastupljena u vrstama ovog roda, dok su *p*-kumaroil derivati flavonoida znatno češći (Tabela 5). Druge fenolkarboksilne kiseline su znatno manje zastupljene (Tabela 8).

Tabela 7. Kafena kiselina i njeni depsidi zastupljeni u vrstama roda *Stachys*

Jedinjenje	Vrsta
 <p>Kafena kiselina</p>	<i>S. foliosa</i> , ¹ <i>S. betonicaeflora</i> ^{1,2} <i>S. officinalis</i> , ^{3,4,5} <i>S. palustris</i> , ^{5,6} <i>S. atherocalyx</i> ⁷ <i>S. alpina</i> , <i>S. annua</i> , <i>S. arvensis</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. sylvatica</i> ^{5,6}
 <p>Hlorogenska kiselina (3-kafeoilhina kiselina)</p>	<i>S. foliosa</i> ¹ <i>S. betonicaeflora</i> ^{1,2} <i>S. officinalis</i> , ^{3,4,5,8} <i>S. atherocalyx</i> , ⁷ <i>S. palustris</i> ^{5,6,8} <i>S. alpina</i> , <i>S. sylvatica</i> ^{5,8} <i>S. annua</i> , <i>S. arvensis</i> , <i>S. germanica</i> , <i>S. recta</i> ⁵ <i>S. recta</i> subsp. <i>subcretica</i> , <i>S. salviifolia</i> ⁸ <i>S. iberica</i> ⁹
 <p>Izohlorogenska kiselina</p>	<i>S. officinalis</i> ⁴
 <p>Neohlorogenska kiselina (5-kafeoilhina kiselina)</p>	<i>S. foliosa</i> ¹ <i>S. betonicaeflora</i> ^{1,2} <i>S. palustris</i> ⁶ <i>S. atherocalyx</i> ⁷ <i>S. officinalis</i> ⁴
 <p>Rozmarinska kiselina</p>	<i>S. alpina</i> , <i>S. arvensis</i> , ⁵ <i>S. annua</i> , <i>S. byzantina</i> , <i>S. grandiflora</i> , <i>S. macrantha</i> ¹⁰ <i>S. germanica</i> , <i>S. officinalis</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. recta</i> , <i>S. sylvatica</i> ^{5,10}

¹ Litvinenko i Aronova, 1968; ² Aronova i Litvinenko, 1970; ³ Gstirner i Schiemenz, 1969; ⁴ Kobzar, 1986; ⁵ Buchwald i Czapska, 1995; ⁶ Ross i Zinchenko, 1975; ⁷ Kostyuchenko 1975; ⁸ Bilušić Vundać i sar., 2005; ⁹ Tepe i sar., 2011; ¹⁰ Czigle i sar., 2007.

Tabela 8. Ostale fenolkarboksilne kiseline vrsta roda *Stachys*

Jedinjenje	Vrsta
	<i>S. atherocalyx</i> ¹ <i>S. officinalis</i> ² <i>S. recta, S. sylvatica</i> ³
<i>p</i> -Kumarna kiselina (<i>p</i> -hidroksicimetna kiselina)	
	<i>S. alpina, S. annua, S. arvensis, S. germanica, S. officinalis, S. palustris, S. recta, S. sylvatica</i> ³
Protokatehinska kiselina	
	<i>S. atherocalyx</i> ¹
Hina kiselina	
	<i>S. alpina, S. annua, S. arvensis, S. germanica, S. officinalis, S. palustris, S. recta, S. sylvatica</i> ³
Sinapinska kiselina	

¹ Kostyuchenko, 1975; ² Kobzar, 1986; ³ Buchwald i Czapska, 1995.

2.5. Iridoidi

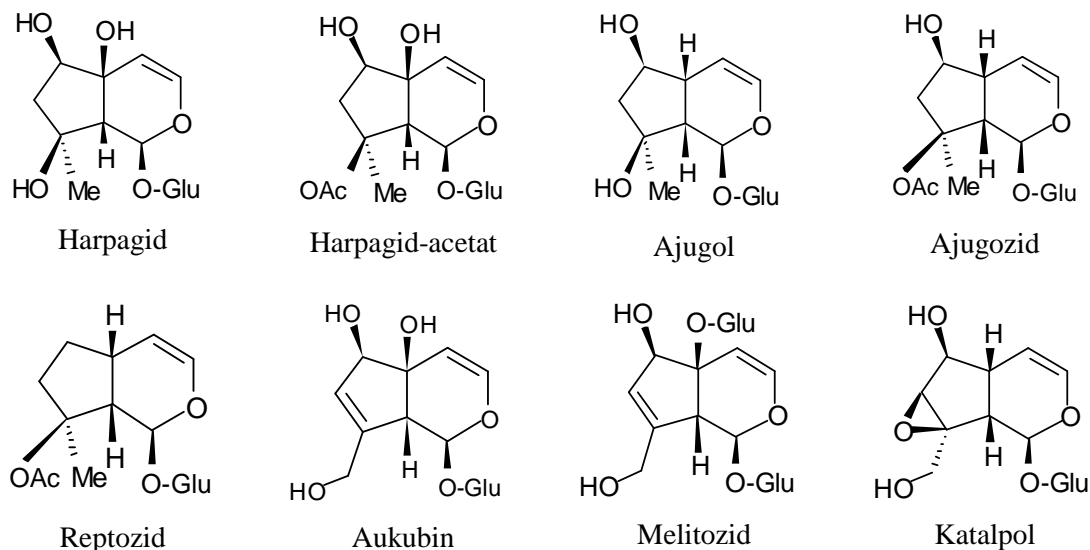
Iridoidi su biciklična, monoterpenska jedinjenja. U vrstama roda *Stachys* identifikovan je veći broj ovih jedinjenja i njihovih heterozida. Iridoidi nastaju „izoprenskim biosintetskim putem“, iz geranilpirofosfata. Pri tome nastaje iridodial, koji se ciklizuje u loganin, a iz njega daljim metabolizmom ostali iridoidi.

Iridoidi su zastupljeni u „izvedenijim“ redovima i familijama simpetalnih grupa biljaka i mogu se uspešno koristiti kao hemotaksonomski markeri. U okviru familije *Lamiaceae* biljke sa trikolpatnim^e dvojedarnim polenovim zrnima (*Lamioideae s.l.*) uvek sadrže iridoide, dok ih biljke sa heksakolpatnim trojedarnim polenovim zrnima (*Nepetoideae s.l.*) ne sadrže (Marin, 2003).

^e Polenovo zrno na čijoj se površini nalaze tri nabora (colpa).

Smatra se da u biljkama iridoidi imaju funkciju fitoaleksina. Izrazito su gorkog ukusa, a deluju antimikrobno, antiinflamatorno, antipiretično i spazmolitično (Kovačević, 2000). Biljke koje sadrže iridoide obično su otporne na gljivicu *Puccinia menthae* (Marin, 2003).

Harpagid i acetilharpagid su najzastupljeniji iridoidni heterozidi u vrstama roda *Stachys*, a česti su i ajugol, ajugozid, reptozid, aukubin, melitozid i katalpol (Slika 3).

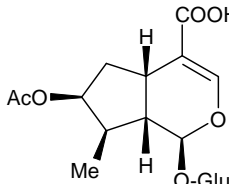
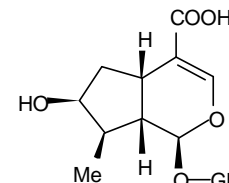
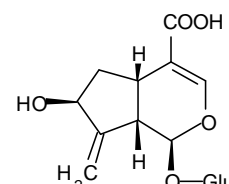
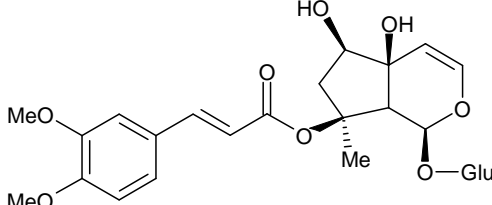
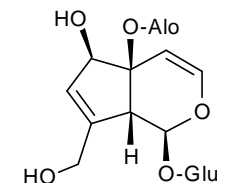
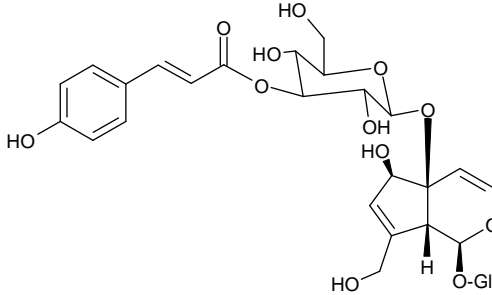


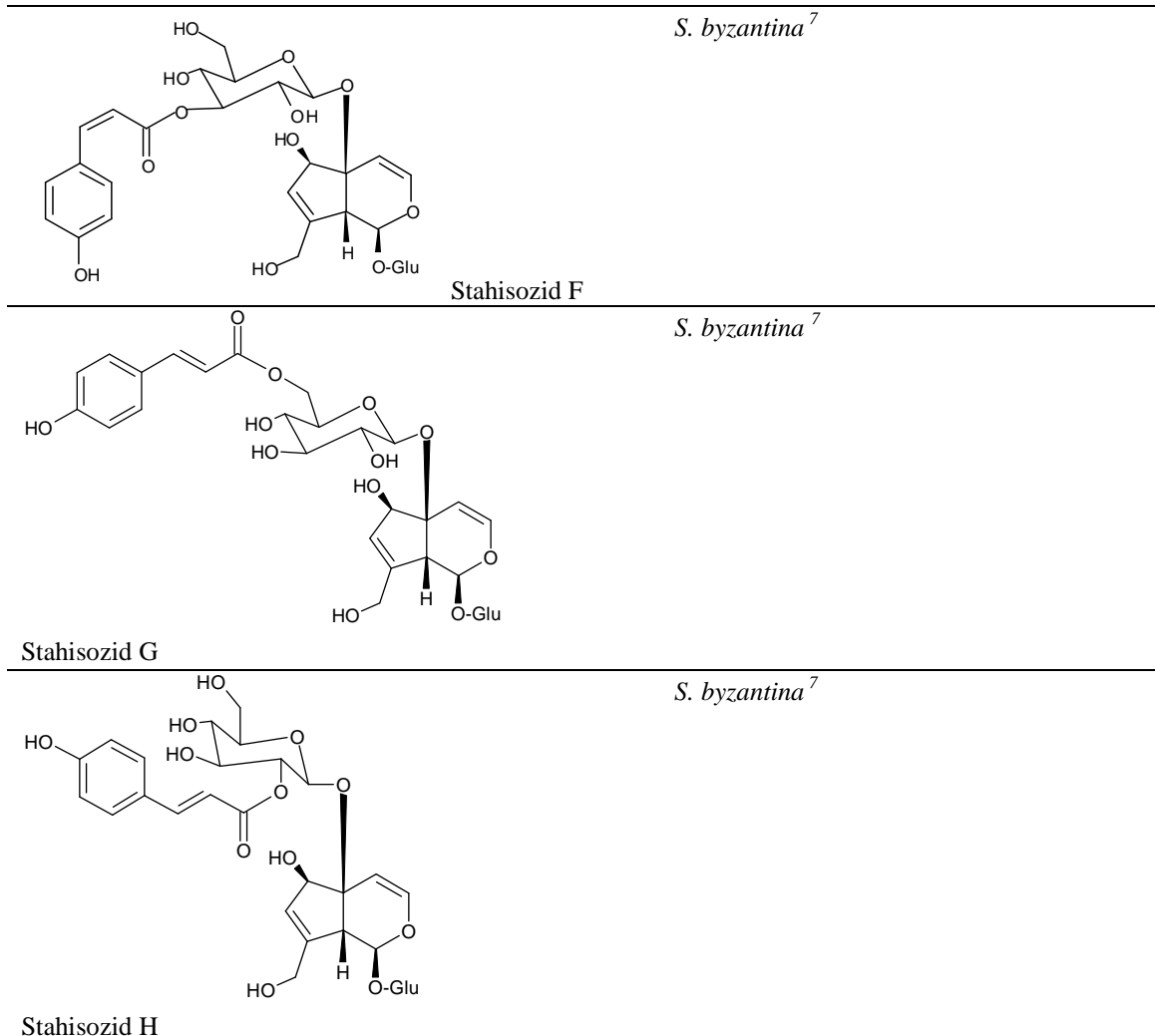
Slika 3. Iridoidni heterozidi identifikovani u mnogim vrstama roda *Stachys*

U pojedinim vrstama ovog roda identifikovani su iridoidni heterozidi specifične strukture (Tabela 9):

Tabela 9. Iridoidni heterozidi specifične strukture identifikovani u pojedinima vrstama roda *Stachys*

Jedinjenje	Vrsta
<p style="text-align: center;">Acetilmiporozid</p>	<i>S. officinalis</i> ¹ <i>S. glutinosa</i> ²
<p style="text-align: center;">Alobetonikozid</p>	<i>S. officinalis</i> ¹ <i>S. glutinosa</i> ²

 <p>7-O-Acetyl-epi-loganinska kiselina</p>	<p><i>S. spinosa</i>³</p>
 <p>Loganinska kiselina</p>	<p><i>S. ionica</i>⁴</p>
 <p>Gardoziol</p>	<p><i>S. ionica</i>⁴</p>
 <p>Markantol</p>	<p><i>S. macrantha</i>⁵</p>
 <p>5-O-β-Alopiranoziloksaikubin (5-O-β-alopiranozilmonomelitozid)</p>	<p><i>S. glutinosa</i>² <i>S. lavandulifolia</i>⁶</p>
 <p>Stahisozid E</p>	<p><i>S. byzantina</i>⁷</p>



¹ Jeker i sar., 1989; ² Serrilli i sar., 2006; ³ Kotsos i sar., 2001; ⁴ Meremeti i sar., 2004; ⁵ Calis i sar., 1992; ⁶ Delazar i sar., 2011; ⁷ Murata i sar., 2008.

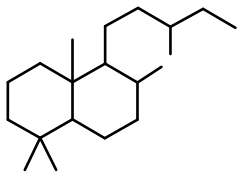
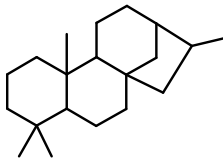
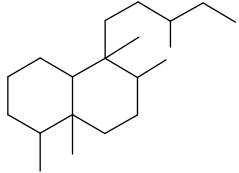
2.6. Diterpeni

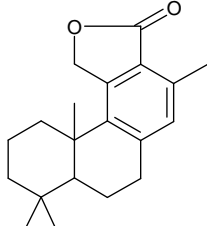
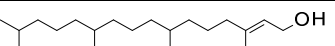
Diterpeni nastaju „izoprenskim biosintetskim putem“ iz geranilgeranilpirofosfata. Njihov molekul izgrađuje 20 C atoma, a broj različitih mogućih struktura iznosi preko 90. Diterpeni su važni hemotaksonomski markeri, a za biljke familije *Lamiaceae* oni su tipični sekundarni metaboliti (Vestri Alvarenga i sar., 2001).

Diterpeni su uglavnom izolovani iz podzemnih organa, ređe iz nadzemnih delova vrsta roda *Stachys*. To su najčešće diterpeni tipa *neo*-klerodana (Vestri Alvarenga i sar., 2001; Harley i sar., 2004). Takođe su česti i diterpeni labdanskog tipa (Piozzi i sar., 2002; Paternostro i sar., 2000), kao i derivati *ent*-kaurana (Piozzi i Bruno, 2011). Iz

vrsta ovog roda do sada je izolovano oko 30 diterpena, od čega je 25 predstavljalo nova jedinjenja (Piozzi i Bruno, 2011). Najčešće zastupljeni su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Neki diterpeni zastupljeni u vrstama roda *Stachys* (Piozzi i Bruno, 2011)

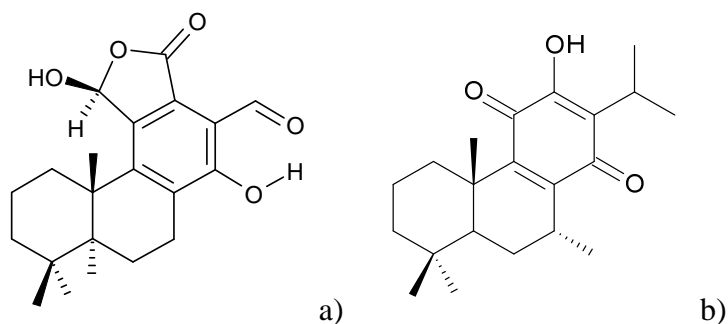
	Diterpen	Vrsta
Labdan tip 	(+)-Dezoksiandaluzol	<i>S. plumosa</i> ¹
		<i>S. ionica</i> , <i>S. distans</i> ²
	(+)-Epijabugodiol	<i>S. plumosa</i> ¹
	(+)-Plumosol	<i>S. plumosa</i> ¹
	Ribenol	<i>S. mucronata</i> ³
	Ribenon	<i>S. mucronata</i> ³
Kauran tip 	Stahizinska kiselina	<i>S. sylvatica</i> ⁴
	6-Hidroksikaur-16-en	<i>S. sylvatica</i> ⁴
	6,8-Dihidroksikaur-16-en	<i>S. sylvatica</i> ⁴
	3-Acetoksi-19-kaur-16-enska kiselina	<i>S. byzantina</i> ⁵
	3-hidroksi-19-kaur-16-enska kiselina	<i>S. byzantina</i> ⁵
	3, 19-dihidroksikaur-16-en	<i>S. byzantina</i> ⁵
Klerodan tip 	Stahizolon	<i>S. annua</i> ⁶
		<i>S. aegyptiaca</i> ⁷
	Stahizolon-13-acetat	<i>S. annua</i> ⁶
		<i>S. aegyptiaca</i> ⁷
		<i>S. recta</i> ⁸
	Stahizolon-7-acetat	<i>S. annua</i> ⁶
		<i>S. recta</i> ⁸
	Stahizolon-7,13-diacetat	<i>S. annua</i> ⁶
		<i>S. recta</i> ⁸
	Anuanon	<i>S. annua</i> ⁹
		<i>S. atherocalyx</i> , <i>S. balansae</i> , <i>S. iberica</i> , <i>S. inflata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. sylvatica</i> ¹⁰
	Stahilon	<i>S. annua</i> ⁹
		<i>S. atherocalyx</i> , <i>S. balansae</i> , <i>S. iberica</i> , <i>S. inflata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. sylvatica</i> ¹⁰
	Stahon	<i>S. annua</i> ⁹
		<i>S. atherocalyx</i> , <i>S. balansae</i> , <i>S. iberica</i> , <i>S. inflata</i> , <i>S. palustris</i> , <i>S. sylvatica</i> ¹⁰
	Roseostahenon	<i>S. rosea</i> ¹¹
	Roseostahon	<i>S. rosea</i> ¹¹
	13- <i>epi</i> -Sklareol	<i>S. rosea</i> ¹²
Roseostahenol	<i>S. rosea</i> ¹²	
Roseotetrol	<i>S. rosea</i> ¹²	

	Betolid	<i>S. officinalis</i> ¹³
		<i>S. ["Betonica"] scardica</i> ¹³
		<i>S. ["Betonica"] bulgarica</i> ¹³
	Betonikolid	<i>S. officinalis</i> ¹⁴
	Betonikozid A-D	<i>S. officinalis</i> ¹³
	Fitol nonadekanoat	<i>S. byzanthina</i> ¹⁰

¹ Paternostro i sar., 2000; ² Piozzi i sar., 2002; ³ Fazio i sar., 1994a; ⁴ Popa i Pasechnik, 1974; ⁵ Piozzi i sar., 1980; ⁶ Orgiyan i Popa, 1969; ⁷ Melek i sar., 2002; ⁸ Adinolfi i sar., 1984; ⁹ Orgiyan, 1970; ¹⁰ Piozzi i Bruno, 2011; ¹¹ Fazio i sar., 1992; ¹² Fazio i sar., 1994b; ¹³ Bankova i sar., 1999; ¹⁴ Miyase i sar., 1996b.

Diterpenski lakton betolid (Slika 4a) prvi put je izolovan iz korena *S. officinalis* (Tkachev i sar., 1987). Zatim je identifikovan i u ekstraktima korena vrsta *S. ["Betonica"] bulgarica* i *S. ["Betonica"] scardica*, ali ne i u drugim ispitivanim vrstama roda *Stachys*, što ukazuje na njegov hemotaksonomski značaj na nivou podroda (Bankova i sar., 1999).

Citotoksični diterpenski hinon horminon (Slika 4b) izolovan je iz nadzemnog dela alžirske endemične vrste *S. mialhesi* de Noé (Lagoune i sar., 2011b).



Slika 4. Betolid (a), Horminon (b)

Neki isparljivi diterpeni u okviru vrsta roda *Stachys* su identifikovani kao komponente njihovih etarskih ulja. Do sada je u etarskim uljima više od 30 vrsta roda *Stachys* identifikovano oko 45 diterpena, uglavnom derivata labdana, abietana, kaurana i pimarana (Tabela 13) (Piozzi i Bruno, 2009).

2.7. Etarska ulja

Vrste roda *Stachys* su siromašne etarskim uljem (0,01-0,5%) (Radulović i sar., 2007; Goren i sar., 2011), što je karakteristično i za ostale rodove podfamilije *Lamioideae s.l.* Na osnovu pregleda literaturnih podataka može se uočiti velika varijabilnost etarskih ulja vrsta ovog roda, kako u kvantitativnom, tako i u kvalitativnom smislu. Ove razlike su česte i među uljima istih vrsta ovog roda. One su najverovatnije posledica različitih ekoloških uslova, staništa, zatim načina izolovanja etarskih ulja i metodologije identifikacije i određivanja sadržaja komponenti.

Najveći broj etarskih ulja vrsta roda *Stachys* je bogat seskviterpenima (Tabela 11). Glavnu frakciju čine ugljovodonici, dok su oksidovani seskviterpeni dominantne komponente manjeg broja etarskih ulja. Najzastupljeniji seskviterpeni su: (E)-kariofilen, germakren D i kariofilen-oksid (Goren i sar., 2011).

U manjem broju etarskih ulja vrsta roda *Stachys* dominiraju monoterpeni. Oksidovani monoterpeni su zastupljeniji u odnosu na monoterpenske ugljovodonike (Tabela 12). Najzastupljeniji monoterpeni su pineni (α i β), linalol i linalilacetat (Goren i sar., 2011).

U etarskim uljima više od 30 vrsta roda *Stachys* identifikovano je oko 45 diterpena, uglavnom derivata labdana, abietana, kaurana i pimarana. Diterpenska jedinjenja su u ovim etarskim uljima najčešće zastupljena u malim količinama ili u tragovima. Neki od izuzetaka su navedeni u Tabeli 13 (prema Piozzi i Bruno, 2009).

U etarskim uljima nekih vrsta roda *Stachys* u značajnom procentu su zastupljena alifatična i aromatična jedinjenja (Tabela 14).

Tabela 11. Vrste roda *Stachys* u čijim etarskim uljima dominiraju seskviterpeni

Vrsta	Sadržaj (%)	Seskviterpenski ugljovodoni	Oksidovani seskviterpeni
<i>S. alopecuros</i> ¹	81,1	47,6	33,5
<i>S. alpina</i> ²	45,6	41,9	3,7
<i>S. alpina</i> ³	38,7	10,7	28,0
<i>S. antalyensis</i> ⁴	82,0	55,8	26,2
<i>S. aucheri</i> ⁵	65,1	1,9	63,2
<i>S. balansae</i> subsp. <i>balansae</i> ⁶	85,9	67,2	16,7
<i>S. bayburtensis</i> ⁶	81,5	58,8	22,7
<i>S. benthamiana</i> ⁷	60,1	45,6	14,5
<i>S. byzantina</i> ⁸	81,2	55,0	26,2
<i>S. candida</i> ⁹	65,4	46,6	18,8
<i>S. chrysantha</i> ⁹	65,5	18,2	47,3
<i>S. cretica</i> ^{6, 10, 11, 12, 13, 14}	30,0-96,3	21,3-92,3	2,9-44,1
<i>S. euboica</i> ¹⁰	63,7	50,4	13,3
<i>S. germanica</i> ^{15, 16}	42,6-59,1	20,6-37,8	4,8-24,9
<i>S. germanica</i> subsp. <i>bithynica</i> ⁶	82,4	58,9	23,5
<i>S. germanica</i> subsp. <i>heldreichii</i> ⁶	82,7	53	29,7
<i>S. germanica</i> subsp. <i>heldreichii</i> ¹⁰	67,6-81,6	55,6-67,7	12,0-23,5
<i>S. germanica</i> subsp. <i>heldreichii</i> ¹⁷	75,6	35,4	40,2
<i>S. huber-morathii</i> ⁶	78,7	57,1	21,6
<i>S. huetii</i> ⁶	83,4	63,6	19,8
<i>S. ionica</i> ¹	55,4-69,5	15,9-21,5	55,4-69,5
<i>S. laxa</i> ¹⁸	60,0	46,1	13,9
<i>S. laxa</i> ¹⁹	78,6	67,3	11,3
<i>S. longispicata</i> ⁶	71,2	51,4	19,8
<i>S. menthifolia</i> ²⁰	52,6-60,3	1,4-6,4	48,4-58,9
<i>S. obliqua</i> ⁶	76,3	72,2	4,1
<i>S. officinalis</i> ^{2, 3, 14, 21}	65,7-89,1	51,0-71,1	7,7-18,7
<i>S. pinardii</i> ¹¹	59,6	24,6	59,6
<i>S. pinetorum</i> ⁶	76,0	53,7	22,3
<i>S. recta</i> subsp. <i>recta</i> ²²	51,8-82,7	43,3-78,3	4,4-8,5
<i>S. recta</i> subsp. <i>serpentini</i> ²²	79,5-80,7	51,0-52,6	28,1-28,5
<i>S. recta</i> subsp. <i>subcrenata</i> ³	70,9	46,5	24,4
<i>S. salviifolia</i> ³	73,3	58,4	14,9
<i>S. scardica</i> ^{10, 15, 17}	74,6-92,6	55,8-69,3	5,3-23,3
<i>S. schtschegleevii</i> ²³	56,7	47,2	9,5
<i>S. sericea</i> ²⁴	87,8	79,1	8,7
<i>S. spectabilis</i> ⁶	74,1	60,8	13,3
<i>S. sylvatica</i> ¹⁵	82,3	70,8	11,5
<i>S. thirkei</i> ⁶	75,9	57,2	18,7
<i>S. tmolea</i> ⁶	80,3	58,4	21,9
<i>S. viticina</i> ⁶	72,3	65,4	6,9

¹ Skaltsa i sar., 2001; ² Haznagy-Radnai i sar., 2007; ³ Bilušić Vundać i sar., 2006; ³ Fakir i sar., 2010; ⁴ Javidnia i sar., 2008; ⁵ Goren i sar., 2011; ⁶ Rustaiyan i sar., 2006; ⁷ Khanavi i sar., 2004; ⁸ Skaltsa i sar., 1999; ⁹ Skaltsa i sar., 2003; ¹⁰ Ozkan i sar., 2006; ¹¹ Öztürk i sar., 2009; ¹² Conforti i sar., 2009; ¹³ Serbetci i sar., 2010; ¹⁴ Grujić-Jovanović i sar., 2004; ¹⁵ Grujić-Jovanović i sar., 2008; ¹⁶ Radulović i sar., 2007; ¹⁷ Morteza-Semnani i sar., 2006; ¹⁸ Sajjadi, Mehregan, 2003; ¹⁹ Čavar i sar., 2010; ²¹ Chalchat i sar., 2001; ²² Giulina i sar., 2008; ²³ Rezazadeh i sar., 2006; ²⁴ Bisht i sar., 2008.

Tabela 12. Vrste roda *Stachys* u čijim etarskim uljima dominiraju monoterpeni

Vrsta	Sadržaj (%)	Monotrepenski ugljovodoni	Oksidovani monoterpeni
<i>S. acerosa</i> ¹	79,3	1,4	77,9
<i>S. acerosa</i> ²	85,7	22,4	63,3
<i>S. atherocalyx</i> ³	50,7	16,5	34,2
<i>S. balansae</i> ⁴	64,1	51,2	12,9
<i>S. glutinosa</i> ⁵	48,9-61,1	7,9-15,6	41,0-45,5
<i>S. glutinosa</i> ⁶	70,6	42,8	27,8
<i>S. iberica</i> subsp. <i>stenostachya</i> ⁷	87,1	2,0	85,1
<i>S. inflata</i> ⁸	77,5	9,1	68,4
<i>S. inflata</i> ⁹	60,1	2,0	58,1
<i>S. inflata</i> ¹⁰	79,9	73,1	6,8
<i>S. ixoides</i> ¹¹	65,2	8,6	56,6
<i>S. lavandulifolia</i> ^{12, 13, 14}	51,8-81,1	47,2-80,4	0,2-4,6
<i>S. milanii</i> ¹⁵	88,1	-	88,1
<i>S. obliqua</i> ¹⁶	63,5	14,8	48,7
<i>S. pilifera</i> ¹⁷	56,7	5,6	50,1
<i>S. pilifera</i> ¹⁸	78,2	30,9	47,3
<i>S. recta</i> ¹⁹	43,5	1,6	41,9
<i>S. schtschegleevii</i> ²⁰	62,6	55,2	7,4
<i>S. schtschegleevii</i> ²¹	72,4	67,7	2,7
<i>S. setifera</i> subsp. <i>iranica</i> ²²	84,6	3,3	81,3
<i>S. yemenensis</i> ²³	54,1	53,7	0,4

¹Masoudi i sar., 2003; ²Salehi i sar., 2007; ³Rezazadeh i sar., 2009a; ⁴Cakir i sar., 1997; ⁵Pintore i sar., 2006; ⁶Mariotti i sar., 1997; ⁷Kaya i sar., 2001; ⁸Omidbaigi i sar., 2006; ⁹Ebrahimabadi i sar., 2010; ¹⁰Norouzi-Arasi i sar., 2006; ¹¹Sefidkon i sar., 2003; ¹²Feizbakhsh i sar., 2003; ¹³Javidnia i sar., 2004; ¹⁴Meshkatsalsadat i sar., 2007b; ¹⁵Palić i sar., 2006; ¹⁶Harmandar i sar., 1997; ¹⁷Sefidkon, Shaabani, 2004; ¹⁸Masoudi i sar., 2003; ¹⁹Skaltsa i sar., 2003; ²⁰Sonboli i sar., 2005; ²¹Norouzi-Arasi i sar., 2004; ²²Javidnia i sar., 2003; ²³Ali i sar., 2010.

Tabela 13. Najzastupljeniji diterpeni u etarskim uljima vrsta roda *Stachys*

Diterpen	Vrsta	Sadržaj (%)
Abietatrien	<i>S. plumosa</i> ¹	45,5
	<i>S. plumosa</i> ²	11,9
	<i>S. menthifolia</i> ³	13,7
	<i>S. menthifolia</i> ⁴	11,8-21,1
	<i>S. spruneri</i> ⁵	6,9-7,6
13- <i>epi</i> -manool	<i>S. macrantha</i> ⁶	25,8
Fitol	<i>S. laetivirens</i> ⁷	17,9
Izofilokladen	<i>S. germanica</i> subsp. <i>heldreichii</i> ³	14,2
Kaur-16-en	<i>S. menthifolia</i> ³	9,0
Kleroda-2,4(18),14-trien-13-ol	<i>S. glutinosa</i> ⁸	12,3
Manoiloksid	<i>S. candida</i> ⁹	12,1
	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i> ⁵	7,7
	<i>S. menthifolia</i> ³	7,5
Pimaradien	<i>S. cretica</i> ³	18,6

¹Radulović i sar., 2007; ²Grujić-Jovanović i sar., 2001; ³Skaltsa i sar., 2003; ⁴Čavar i sar., 2010; ⁵Skaltsa i sar., 2001; ⁶Haznagay-Radnai i sar., 2007; ⁷Duman i sar., 2005; ⁸Mariotti i sar., 1997; ⁹Skaltsa i sar., 1999.

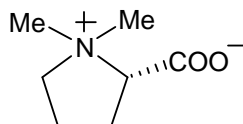
Tabela 14. Vrste roda *Stachys* u čijim etarskim uljima značajnu frakciju čine alifatična i aromatična jedinjenja

Vrsta	Sadržaj (%)	Vrsta	Sadržaj (%)
<i>S. bombycina</i> ¹	67,1%	<i>S. alpina</i> ^{3, 5}	10,5-47,8
<i>S. persica</i> ²	44,2-58,6	<i>S. inflata</i> ⁷	26,2
<i>S. palustris</i> ³	24,9	<i>S. macrantha</i> ³	26,1
<i>S. palustris</i> ⁴	40,1	<i>S. germanica</i> ⁹	25,5
<i>S. palustris</i> ⁵	50,9	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>argolica</i> ¹⁰	21,5
<i>S. laetivirens</i> ⁶	38,2	<i>S. athorecalyx</i> ¹¹	21,0
<i>S. lavandulifolia</i> ⁷	32,9	<i>S. balansae</i> ¹¹	19,5
<i>S. byzantina</i> ⁷	31,4	<i>S. recta</i> ^{3, 5, 12, 13, 14}	15,7-40,2
<i>S. annua</i> ³	31,0	<i>S. spinulosa</i> ¹⁵	19,9
<i>S. cretica</i> subsp. <i>vacillans</i> ⁸	30,2	<i>S. swainsonii</i> subsp. <i>swainsonii</i> ¹⁰	10,5-17,3

¹ Kucukbay i sar., 2011; ² Khanavi i sar., 2004; ³ Haznagy-Radnai i sar., 2007; ⁴ Senatore i sar., 2007; ⁵ Bilušić Vundać i sar., 2006; ⁶ Duman i sar., 2005; ⁷ Morteza-Semnani i sar., 2006; ⁸ Conforti i sar., 2009; ⁹ Grujić-Jovanović i sar., 2004; ¹⁰ Skaltsa i sar., 2001; ¹¹ Rezazadeh i sar., 2009a; ¹² Cakir i sar., 1997; ¹³ Chalchat i sar., 2001; ¹⁴ Giuliani i sar., 2008; ¹⁵ Skaltsa i sar., 2003.

2.8. Alkaloidi

Ispitivanja alkaloida u vrstama roda *Stachys* uglavnom su vršena 70-ih godina prošlog veka. Prema ovim literarnim podacima alkaloidi su sporadično zastupljeni, npr. u vrstama: *S. atherocalyx* K. Koch. (Kostyuchenko, 1972), *S. betonicaeflora* (Aronova, 1969; Pulatova, 1969), *S. hissarica* Regel (Pulatova, 1969), *S. sylvatica* L. (Hegnauer, 1966), *S. turcomanica* Trautv. (Allayarov i sar., 1965), i to u vrlo malim količinama (0,03-0,74%). Uglavnom se radi o jedinjenjima pirolidinske strukture, a najčešće je zastupljen stahidrin (Slika 5).

**Slika 5.** Stahidrin (1,1-dimetilpirolidinium-2-karboksilat)

Stahidrin-hlorid daje pozitivne taložne reakcije sa:

- fosforvolframovom kiselinom (beo talog)
- fosformolibdenskom kiselinom (žut talog)

- BiJ₃/KJ (crveni talog)
- KJ₃ (mrk talog, ne formira se u alkalnoj sredini).

Sa taninskom kiselinom se ne taloži; sa pikrinskom kiselinom se taloži samo iz veoma koncentrovanog rastvora, a iz razblaženog se tek nakon dužeg stajanja izdvajaju igličasti kristali (Schulze i Trier, 1911).

Stahidrin, kao i betonicin (3-hidroksistahidrin, levogiri enantiomer) i turicin (desnogiri enantiomer 3-hidroksistahidrina; nije genuini sastojak, već nastaje prilikom izolovanja), neki autori smatraju hemotaksonomskim markerima ne samo roda *Stachys*, već i biljaka tribusa *Stachyae* (Hegnauer, 1966).

3. Upotreba vrsta roda *Stachys*

Vrste roda *Stachys* se veoma često primenjuju u narodnoj medicini. Kosmopolitske vrste, poput *S. officinalis*, *S. palustris* i *S. recta*, koriste se u različitim kulturama na veoma sličan način, dok se neke druge primenjuju samo u podnebljima za koja su specifične (npr. *S. lavandulifolia* u Turskoj i Iranu).

Možda najpoznatija i najviše korišćena vrsta ovog roda je **ranilist**, **ranjenik**, **betonika**,^a **bukvica**^b - *Stachys officinalis* (L.) Trevis. (sinonim: *Betonica officinalis* L.^c).

Ova biljka je kao lekovita poznata još od antičkih vremena. Antonius Musa, glavni lekar rimskog imperatora Avgusta, koristio ju je za lečenje čak 47 bolesti. U Srednjem veku su joj pripisivane mnogobrojne lekovite i magične moći, pa je služila za zaštitu od vradžbina i zlih duhova, a mnogi su je nosili oko vrata poput amajlije. Gajena je i kao lekovita biljka, uglavnom u manastirima. Lekar Robert Turner (XIX vek) navodi 30 indikacija za upotrebu ranilista (Grieve, 1971).

Ranilist je nekada smatrana neprikosnovenim lekom za sve bolesti glave. Prema "*Medicina Britannica*" (1666) dekokt se smatra korisnim u stanjima histerije, glavobolje čiji je uzrok visok krvni pritisak, kod neuralgija i u svim neurotičnim stanjima povezanim sa anksioznošću i napetošću. Takođe se koristi kao aromatik i adstringens, u kombinaciji sa drugim biljkama kao tonik kod dispepsije i kao alternativna terapija kod reumatizma i za "čišćenje krvi". Osušeni nadzemni deo biljke se ranije koristio zajedno sa herbom vidca^a (*Euphrasia officinalis* L., Scrophulariaceae) i podbela^a (*Tussilago farfara* L., Asteraceae) za lečenje glavobolje, u obliku cigara za pušenje (Grieve, 1971).

Ova biljka se pod nazivom *potprsnica* ili *betonika* spominje i u „Hilandarskom medicinskom kodeksu“ (XII-XV vek) (fototipsko izdanje i prevod, 1989). Navodi se da je ona „vruća, suva i spada u treći stepen. Njeno se lišće se koristi za pripremanje lekova, ali samo kada je zeleno i suvo“. Koristi se kod glavobolje, bolova u stomaku i da je korisna kod žene „koja ima obolelu matericu, pa ne može izneti trudnoću“.

Čajkanović (1994) u „Rečniku srpskih narodnih verovanja o biljkama“ pominje „*ranilist*, *ranjak*, *betuniku*“, koji je u narodnoj medicini „dosta popularan melem za rane, takođe i za rane od zmijskog ujeda, kojom se prilikom treba da pije i sok ranilista.

^a Simonović, 1959 – Botanički rečnik.

^b Od odrvenjenog rizoma su nekad u ruskim štamparijama pravili laka svetla slova nazvana „litera“. Otuda potiče i ruski naziv biljke - „буквица“.

^c Diklić, 1974 – Rod *Stachys* L., Flora SR Srbije.

Tej od ranilista je lek od grudne bolesti, groznicu (tada se koristi za vreme mene meseca), glavobolju, grčeve i kao lek od padavice“.

Nadzemni deo biljke *S. officinalis* u cvetu upotrebljavao se kao adstringens i antidijaroik, zbog visokog sadržaja tanina (Hoppe, 1958). U velikim dozama deluje kao purgativ i emetik. Osušeni i sprášeni listovi su sredstvo za kijanje. U homeopatiji se koristi kod astme i stanja opšte slabosti, a tinktura od svežih listova kao antidijaroik; dekokt se primenjuje spolja za lečenje inficiranih rana i rana kod proširenih vena (Hoppe, 1958; Schauenberg i Paris, 1969). Herba ove biljke oficinalna je u nekim homeopatskim farmakopejama (Nemačka – HAB 2003, SAD – The Homeopathic Pharmacopoeia of the United States).

„Jednako tako preporučuje se bukvica ženama kod menstrualnih smetnji, krvarenja materice, a i kod drugih ženskih bolesti“ (Willfort, 1978).

Ulazi u sastav *Švajcarskog čaja (Species vulnerariae)*, koji se koristi lečenje rana, posekotina, uboja, opekotina, upaljene sluznice i slično (Tucakov, 1971). Navodi se da ova mešavina „jača, pospešuje probavu, suzbija proliv, preveliku kiselost u želucu, tegobe žučnog mjehura, disajnih organa, leči od astme, bronhitisa, kašlja i upale usne šupljine“ (Gursky, 1978).

U tradicionalnoj medicini ranilist se osim kao antidijaroik, koristi i kao karminativ i sredstvo protiv upala (Gruenwald, 2004).

U Bugarskoj se koristi ceo nadzemni deo biljke (*ranilist*) i u obliku infuza upotrebljava kao antiseptik kod inficiranih rana, a u Italiji se infuz lista upotrebljava kao diuretik, holagog i hepatoprotektiv (Leporati i Ivancheva, 2003).

U Bosni i Hercegovini ova biljka je poznata pod nazivom *čistac*, a od nadzemnog dela biljke se priprema čaj koji se koristi „za čišćenje krvi“ (Šarić-Kundalić i sar., 2010).

U oblasti Golak na Kosovu sveži listovi ranilista (*sarushë*) nanose se spolja kod infekcija kože, sok sveže biljke (2-3 kapi) se upotrebljava kod bolova u uhu, a infuz spolja kod rana, a interno kod menstrualnih bolova i za zaustavljanje krvarenja (Mustafa i sar., 2011).

Stachys palustris L. (čistac barski crveni, blatni čistac, vodeni teterljan)^d je ranije bio veoma cenjen zbog svojih lekovitih svojstava, naročito za lečenje rana. Ispoljava

^d Simonović, 1959 – Botanički rečnik.

antiseptično i spazmolitično delovanje, ublažava bolove kod gihta, grčeve, bolove u zglobovima i vrtoglavicu. Upotrebljava se još i za lečenje rana, bolova u stomaku, groznice i menstrualnih tegoba (Grieve, 1971; Gruenwald, 2004). Zgnječeni listovi sveže biljke spolja se koriste za brzo zaustavljanje krvarenja; interno se takođe koriste za zaustavljanje krvarenja i kod dizenterije (Grieve, 1971). Biljka je poznata pod naziv *woundwort*, iako se to ime odnosi još i na nadzemne delove vrsta *S. sylvatica* L., *Prunella vulgaris* L. (Lamiaceae) i *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) (Gruenwald, 2004). Ova biljka se naročito mnogo upotrebljavala u Velikoj Britaniji, gde se još nazivana i *allheal*. U Severnoj Americi su je upotrebljavali pripadnici plemena Delavare za lečenje veneričnih bolesti (Luczaj i sar., 2011).

Stachys recta L. (čistac)^e se u narodnoj medicini koristi za lečenje rana, nazofaringealnog katara, groznice i bunila i kao adstringens. Osušeni nadzemni deo ove biljke (poznat kao *Herba sideritis*) korišćen je u narodnoj medicini u većem delu Evrope protiv epilepsije i histerije (Garnier i sar., 1961; Thoms, 1931). U Ukrajini se obloge od *S. recta* kuvane u mleku koriste kod reumatizma (Abdel-Mogib i Al-Zahrani, 2005). U Italiji (Ligurija) se koriste nadzemni i vršni delovi biljke u cvetu *S. recta* subsp. *recta* (*erba da pòia*). Kao obloge se nanose na bolna mesta na telu i kod zubobolje. Dekokt ima magijsko-ritualnu primenu kao kupka ili oblog kod nervoze, bolova i zubobolje (Cornara i sar., 2009).

U Tabeli 15. navedena je primena i nekih drugih vrsta ovog roda u narodnoj medicini.

Neke vrste roda *Stachys* se koriste u i za lečenje životinja. U slučaju *S. officinalis* primjenjuje se „u vinu ili jakoj rakiji namočena biljka bukvice u cvatu kao sredstvo za čišćenje, za liječenje čireva i lišaja kod domaćih životinja" (Willfort, 1978). U Toskani (Italija) se sveži, sažvakani listovi ove biljke, poznate pod nazivom *betonica*, nanose na rane kod goveda, konja, pasa i mačaka, čak i ako su inficirane i zagnojene (Uncini Manganelli i sar., 2001). Takođe u Italiji za lečenje bradavica kod domaćih životinja koristi se *S. germanica* L. (Viegi i sar., 2003).

^e Simonović, 1959 – Botanički rečnik.

Neke biljke ovog roda se takođe koriste i u ishrani. Vrsta *S. palustris* je u Italiji poznata pod imenom *erba strega o scabbiosa* (veštičija ili šugava trava). Iako je cela biljka neprijatnog mirisa, u ishrani se mogu koristiti koren, list i seme (Senatore, 2007). Koren ove biljke je krtolast, i može se jesti sirov, kuvan ili pečen. Iz osušenog korena se nakon mlevenja dobija brašno koje se može upotrebiti za mešenje hleba (Luczaj i sar., 2011). Mladi izdanci, iako neprijatnog ukusa, mogu se koristiti i pripremati kao asparagus (Grieve, 1971; Senatore, 2007; Luczaj i sar., 2011). U Kini i Japanu se vekovima gaji i u ishrani koristi *S. sieboldii* Miq. (sin. *S. affinis* Bunge). Biljka je poreklom iz sevenih delova Kine i poznata je kao kineska ili japanska artičoka (Luczaj i sar., 2011). U Kini je poznata pod imenom *Tsanyungtzu*, dok je u Japanu zovu *Chorogi* (Grieve, 1971). Gomoljasti koren ove sadrži 15-18% ugljenih hidrata, i to uglavnom stahioze, retkog, ali lako svarljivog tetrasaharida. Biljka se gaji i u Evropi, naročito u Francuskoj i Nemačkoj (Luczaj i sar., 2011; Grlić, 1980). Listovi i cvetovi *S. officinalis* su zbog prijatnog aromatičnog mirisa i ukusa pogodni za pripremu jela od mesa (Grieve, 1971).

U severnim delovima Albanije nadzemne delove *S. alpina* L. (*sierush*) koriste kao hranu za stoku (Pieroni i sar., 2005).

Nadzemni delovi *S. palustris* su u Škotskoj upotrebljavani za dobijanje žute i plave tekstilne boje. U kombinaciji sa srčenjakom^f (*Potentilla erecta* (L.) Rauschel, Rosaceae) dobijana je crvena, a sa srčenjakom i kampeševinom^f (*Haematoxylon campechianum* L., Cesalpiniaceae) žuta boja „hundie“ (Luczaj i sar., 2011).

^f Simonović, 1959 – Botanički rečnik.

Tabela 15. Primena nekih vrsta roda *Stachys* u narodnoj medicini

Vrsta	Zemlja	Narodno ime	Deo biljke	Oblik primene	Primena
<i>S. aethiopica</i> L.	Lesoto	-	Herba	Inhalacija dima zapaljene herbe	Kod delirijuma uzrokovanog groznicom ¹
<i>S. albicans</i> Lindl.	Čile	-	-	-	Za poboljšanje varenja, lečenje apcesa i za „čišćenje“ krvi ²
<i>S. annua</i> (L.) L.	-	-	Cvet	-	Kod nesаницe ³
<i>S. annua</i> subsp. <i>annua</i> var. <i>lycaonica</i> R. Bhattacharjee	Turska	<i>Dağ çayı</i> ,	Herba	Dekokt	Kod nazeba, kao antipiretik ⁴
<i>S. asperata</i> Epl.	Peru	-	-	-	Za lečenje rana i čireva i kod stomaćnih problema ²
<i>S. athorecalyx</i> K. Koch.	Iran	<i>sonboleh</i>	Herba	Infuz	Kod infekcija, artritisa i respiratornih oboljenja ⁵
<i>S. balanasae</i> subsp. <i>balansae</i>	Turska	-	Cvet	Infuz	Kao napitak za uživanje ⁶
<i>S. bogotensis</i> Kunth.	Južna Amerika	-	List	-	Za otklanjanje neprijatnog zadaha iz usta ²
		-	List, list i herba	-	Kod menstrualnog krvavljenja ²
	Peru	-	-	-	Za lečenje inficiranih rana i kod pleuritisa ²
<i>S. byzantina</i> K. Koch.	Katalonija	<i>orella de gat</i>	List	-	Direktno spolja na bolna mesta ⁷
	Iran	<i>bezalagh</i>	List	Dekokt, demulcent	Oblog za inficirane rane i posekotine ⁸
<i>S. chonotica</i> Hook.	Južna Amerika	-	-	-	Lek protiv groznice ²
<i>S. cretica</i> L.	Turska	<i>Dağ çayı</i>	Herba	Infuz	Kod bolova u stomaku ⁹
<i>S. cretica</i> subsp. <i>anatolica</i> Rech. fil.	Turska	<i>Çaya çe, Dağ çayı</i>	Herba	Infuz, dekokt	Kod nazeba i stomaćnih problema ^{4, 10}
<i>S. cretica</i> subsp. <i>mersinaea</i> (Boiss.) Rech.f.	Turska	<i>Çaya çe, Dağ çayı</i>	Herba	Infuz, dekokt	Kod nazeba i stomaćnih problema ^{4, 10}
<i>S. germanica</i> L.	Iran	<i>tuklijeh</i>	List	Infuz	Kod bola u želucu i bolne menstruacije ⁸
<i>S. glutinosa</i> L.	Sardinija	<i>locasu bruscadinu</i>	List	Dekokt	Kod nazeba ¹¹
<i>S. iberica</i> Bieb. subsp. <i>georgica</i> Rech.	Turska	<i>Dağ çayı</i> ,	Herba	Dekokt	Kod nazeba, kao antipiretik ⁴
<i>S. iberica</i> subsp. <i>stenostachya</i> (Boiss.) Rech. fil.	Turska	<i>Dağ çayı</i> ,	Herba	Dekokt	Kod nazeba, kao antipiretik, kod bolova u stomaku ⁴

Uvod

Vrsta	Zemlja	Narodno ime	Deo biljke	Oblik primene	Primena
<i>S. inflata</i> Benth.	Iran	<i>Poulk,</i> <i>Ghol-e-Argavan,</i> <i>Sonbeleh Arghavani</i>	Herba (pre cvetanja)	Ekstrakt	Kod infektivnih, astmatičnih, reumatskih i drugih inflamatornih oboljenja ^{8, 12, 13}
<i>S. japonica</i> Miq.	Južna Koreja	<i>seokjampul</i>	Koren	Dekokt	Kod kašlja ¹⁴
<i>S. byzantina</i> K. Koch.	Brazil	-	List	-	Kod infekcija, rana i upala ¹⁵
<i>S. lavandulifolia</i> Vahl.	Iran	<i>Marzanjush, tuklijeh,</i> <i>Chai alafi</i>	List	Infuz, dekokt	Kod groznice, grčeva, gastrodinije, dispepsije i nadutosti, kao sedativ ⁸
		<i>chaie koochi</i>	Herba	Infuz	Kod stomačnih oboljenja i dijareje kao spazmolitik i karminativ, diuretik, tonik i stiptik, kao anksiolitik, sedativ i antidepressiv ¹⁶
		<i>chai alati</i>	Herba	-	Anksiolitik, kod dijareje ¹⁷
	Iran	<i>Chaye- e-Kohi,</i> <i>lolopashamak,</i> <i>Cahie koochi</i>	Cvet	Dekokt	Kod infekcija kože, menoragije, kao antibakterijsko sredstvo ¹⁸
		<i>Kaklikoti</i>	Herba	Dekokt	Kao antipiretik, spazmolitik, sedativ, antiinflamatorno sredstvo ¹⁹
		<i>Kaklikoti</i>	Cvet	Infuz, u obliku praška	Kod glavobolje i kamena u bubregu ²⁰
<i>S. lavandulifolia</i> var. <i>lavandulifolia</i>	Jordan	-	-	-	Kod poremećaja varenja ²¹
	Turska	<i>Dağ çayı,</i>	Herba	Infuz	Kao antipiretik i kod kašlja ⁴
<i>S. lavandulifolia</i> var. <i>lavandulifolia</i>	Turska	-	Herba	Infuz	Kod astme ⁶
<i>S. leucoglossa</i> Griseb.	Bugarska	<i>ranilist</i>	Herba	Infuz	Kod raka dojke i materice ²²
<i>S. micheliana</i> Briq.	Amazonija	-	-	-	Za lečenje dizenterije ²
<i>S. obliqua</i> Waldst. & Kit.	Turska	<i>Dağ çayı</i>	Herba	Infuz	Kod nazeza i gripa ¹⁹
<i>S. pusilla</i> (Wedd.) Briq.	Bolivija	<i>verbena</i>	Herba	Infuz	Kod bolova u stomaku, kamena u žučnoj kesi i drugih bolesti žuči ²³
<i>S. sylvatica</i> L.	V. Britanija	<i>hedge woundwort</i>	Herba	Sirćetni oblog	Kod proširenih vena i otoka ²⁴
			Cvet	Etarsko ulje	Kod upale pljuvačnih žlezda ²⁴ Poboljšava raspoloženje ²⁴

Uvod

Vrsta	Zemlja	Narodno ime	Deo biljke	Oblik primene	Primena
		<i>woundwort</i>	Herba	-	Kao dezinficijens, spazmolitik i lek za rane ²⁵
<i>S. schtschegleevii</i> Sosn. ex Grossh.	Iran	<i>poulk,</i> <i>Sonbeleh Arasbarani,</i> <i>Sonbeleh Badkonaki</i>	-	-	Kod bakterijskih infekcija, reumatske groznice, respiratornih i drugih inflamatornih oboljenja ^{9, 13, 26, 27}
<i>S. thirkei</i> K. Koch	Turska	<i>kestere</i>	Herba	Dekokt	Kod gastrointestinalnih tegoba ²⁸
<i>S. thunbergii</i> Benth.	Južna Afrika	--	-	-	Lečenje histerije i nesаницe u kombinaciji sa <i>Valeriana capensis</i> ¹
<i>S. tibetica</i> Vatke	Indija (oblast Ladah)	<i>yakjak</i>	Herba	Dekokt	Kod groznice, mentalnih poremećaja i fobija ^{29,30}
<i>S. turcomanica</i> Trautv.	Iran	<i>sim-kesh</i>	Herba		Za lečenje upala, zubobolje, bronhitisa i gripa u obliku infuza ili za inhalaciju ^{9, 31}

¹ Stafford i sar., 2008; ² Heinrich, 1992; ³ Hoppe, 1958; ⁴ Altundag i Ozturk, 2011; ⁵ Rezazadeh i sar., 2009b; ⁶ Özüdoğru i sar., 2011; ⁷ Bonet i sar., 1999; ⁸ Naghibi i sar., 2005; ⁹ Polat i Satil, 2012; ¹⁰ Yesil i Akalin, 2009; ¹¹ Loi i sar., 2004; ¹² Maleki i sar., 2001; ¹³ Nazemiyeh i sar., 2007; ¹⁴ Kim i Song, 2011; ¹⁵ de Souza i sar., 2004; ¹⁶ Ghannadi i Alemdoost, 1996; ¹⁷ Naseri i sar., 2011; ¹⁸ Pirbalouti i Koohpyeh, 2011; ¹⁹ Nabavizadeh i sar., 2011; ²⁰ Ahvazi i sar., 2012; ²¹ Abdel-Mogib i Al-Zahrani, 2005; ²² Kultur i Sami, 2009; ²³ Macia i sar., 2005; ²⁴ Grieve, 1971; ²⁵ Gruenwald, 2004; ²⁶ Maleki-Dizaji i sar., 2008; ²⁷ Abichandani i sar., 2010; ²⁸ Ünsal i sar., 2010; ²⁹ Ballabh i Chaurasia, 2007; ³⁰ Kumar i sar., 2012; ³¹ Ghorbani, 2005.

4. Farmakološka aktivnost vrsta roda *Stachys*

Savremeni trend ispitivanja tradicionalno korišćenih biljaka obuhvatio je i značajan broj vrsta roda *Stachys*, rezultirajući velikim brojem različitih hemijskih, kao i *in vitro* i *in vivo* farmakoloških ispitivanja.

Pregled nekih farmakoloških efekata vrsta roda *Stachys* dat je u Tabeli 16.

Tabela 16. Farmakološka aktivnost nekih vrsta roda *Stachys*

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model	
Antioksidantna	<i>S. alpina</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =5,2 g/ml	DPPH test	
		EtOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =46,6 µg/ml		
	<i>S. byzantina</i> ²	<i>n</i> -heksanski ekstrakt herbe	SC ₅₀ =1,66 mg/ml		
		MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =15 µg/ml		
	<i>S. schtschegleevii</i> ³	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =29,4 µg/ml		
	<i>S. officinalis</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =10,6 µg/ml		
	<i>S. palustris</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =2,67 µg/ml		
	<i>S. recta</i> subsp. <i>recta</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =1,96 µg/ml		
	<i>S. recta</i> subsp. <i>subcrenata</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =5,97 µg/ml		
	<i>S. salviifolia</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =10,7 µg/ml		
	<i>S. sylvatica</i> ¹	MeOH ekstrakt herbe	SC ₅₀ =16,1 µg/ml		
	<i>S. mialhesi</i> ⁴	<i>n</i> -BuOH frakcija 70% MeOH ekstrakta herbe	SC ₅₀ =47,0 µg/ml		DPPH-ESR test
	<i>S. ocymastrum</i> ⁵	<i>n</i> -BuOH frakcija MeOH ekstrakta herbe	SC ₅₀ =6,77 µg/ml		-
	<i>S. lavandulifolia</i> ⁶	Vodeni ekstrakt herbe	15,4 mg VCE/g sd ^a		ABTS
	<i>S. alpina</i> ⁷	MeOH ekstrakt herbe	IC ₅₀ =219,4 µg/ml		Inhibicija LP
<i>S. annua</i> ⁷	IC ₅₀ =88,8 µg/ml				
<i>S. macrantha</i> ⁷	IC ₅₀ =93,0 µg/ml				
<i>S. officinalis</i> ⁷	IC ₅₀ =80,6 µg/ml				
<i>S. recta</i> ⁷	IC ₅₀ =73,6 µg/ml				
<i>S. sylvatica</i> ⁷	IC ₅₀ =39,8 µg/ml				
<i>S. byzantina</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	9,3 ^b	FRAP test		

^a mg vitamin C ekvivalenti/g suve droge^b mmol Fe²⁺/100 g suve droge

Uvod

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model
	<i>S. fruticulosa</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	62,1	
	<i>S. inflata</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	31,1	
	<i>S. laxa</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	35,1	
	<i>S. persica</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	61,4	
	<i>S. setifera</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	11,4	
	<i>S. subaphylla</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	17,1	
	<i>S. trinervis</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	9,1	
	<i>S. turcomanica</i> ⁸	MeOH ekstrakt herbe	22,6	
Antimikrobna	<i>S. alpoecuros</i> ⁹	Vodenometanolni ekstrakt herbe	MIC ^c =0.625-2.5 mg/ml	<i>Helicobacter pylori</i>
	<i>S. schtschegleevii</i> ³	<i>n</i> -Heksanski, CH ₂ Cl ₂ i MeOH ekstrakti herbe	-	ARS ^d <i>E. coli</i> (NCTC 10418) i <i>S. aureus</i> (NCTC 1803)
	<i>S. sylvatica</i> ¹⁰	Petroletarska frakcija 70% EtOH ekstrakta herbe	MIC=50 µg/ml	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Ra
		Vodena frakcija 70% EtOH ekstrakta herbe	MIC=200 µg/ml	
	<i>S. aleurites</i> ¹¹	Vodenometanolni ekstrakt herbe	PZI ^e =8-18,8 mm	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>B. cereus</i>
	<i>S. pinardii</i> ¹²		PZI=8-18,8 mm	
	<i>S. pseudopinardii</i> ¹²	Etanolni ekstrakt herbe	MIC=16 µg/ml	<i>B. cereus</i>
			MIC=32 µg/ml	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	<i>S. nivea</i> ¹³	CH ₂ Cl ₂ ekstrakt herbe	ICAM ₅₀ =15,7 µg/ml	Intracelularni amastigoti <i>Leishmania</i> sp.
	<i>S. palaestina</i> ¹³	Ekstrakt herbe	ICAM ₅₀ =8,6 µg/ml	
	<i>S. byzantina</i> ¹⁴	Etarsko ulje herbe	MIC=0,25 mg/ml	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
Antiedematozna	<i>S. athorecalyx</i> ¹⁵	MeOH ekstrakt herbe	100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	CFA ^f test

^c Minimalna inhibitorna koncentracija

^d Ampicilin rezistentni sojevi

^e Prečnik zone inhibicije

^f Kombinovani Frojdov adjuvans

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model
	<i>S. alpina</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. annua</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. balansae</i> ¹⁷	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. byzantina</i> ¹⁸	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
		Acetonski ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. byzantina</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. germanica</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. grandiflora</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. inflata</i> ¹⁹	70% MeOH ekstrakt	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. mialhesi</i> ⁴	<i>n</i> -BuOH frakcija 70% MeOH ekstrakta herbe	5 g/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. macrantha</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	Karageninski test
	<i>S. officinalis</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. palustris</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. persica</i> ²⁰	MeOH ekstrakt herbe	100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. recta</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	
	<i>S. setifera</i> ²⁰	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. schtschegleevii</i> ¹⁷	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. schtschegleevii</i> ²¹	EtOAc frakcija meoh ekstrakta [§]	100, 200, 400 mg/kg <i>i.p.</i>	
		Vodenoalkoholni ekstrakt herbe [§]	100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. schtschegleevii</i> ²²	Vodenoalkoholni ekstrakt herbe [§]	50, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
		CH ₂ Cl ₂ frakcija ekstrakta herbe [§]	100 mg/kg <i>i.p.</i>	
		EtOAc frakcija ekstrakta herbe	100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. sylvatica</i> ¹⁶	Vodeni ekstrakt herbe	5 mg/kg <i>p.o.</i>	

[§] Biljka pre cvetanja

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model
Antinociptivna	<i>S. balansae</i> ¹⁷	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	Formalinski test
	<i>S. byzanthina</i> ¹⁸	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg	
		Acetonski ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg	
	<i>S. inflata</i> ¹⁹	70% MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg	
	<i>S. persica</i> ²⁰	MeOH ekstrakt herbe	50, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. setifera</i> ²⁰	MeOH ekstrakt herbe	50, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. schtschegleevii</i> ¹⁷	MeOH ekstrakt herbe	50, 100, 200 mg/kg <i>i.p.</i>	
	<i>S. mialhesi</i> ⁴	<i>n</i> -BuOH frakcija 70% MeOH ekstrakta herbe	5-10 g/kg <i>p.o.</i>	Test sa sirčetnom kiselinom
Gastroprotektivna	<i>S. mialhesi</i> ⁴	<i>n</i> -BuOH frakcija 70% MeOH ekstrakta herbe	5 g/kg <i>p.o.</i>	Indometacinom indukovani ulkus
	<i>S. lavandulifolia</i> ²³	Vodeni ekstrakt herbe	100 mg/kg/dan	EtOH indukovani gastritis
Hepatoprotektivna	<i>S. floridana</i> ²⁴	Polisaharidi rizoma	200, 400 mg/kg <i>p.o.</i>	CCl ₄ indukovano oštećenje jetre
Antianoksično	<i>S. sieboldii</i> ²⁵	Metanolni ekstrakt krtole	-	KCN-indukovana anoksija
Imunomodulatorna /antiproliferativna	<i>S. nivea</i> ¹³	Vodeni, MeOH, CH ₂ Cl ₂ ekstrakt herbe	ICAM ₅₀ =50-100 µg/ml	Humani monociti THP1 Inhibicija odloženog tipa reakcije preosetljivosti, supresija sinteze antitela, inhibicija proliferacije humanih limfocita, inhibicija stvaranje IL-2, indukcija apoptoze u aktiviranim limfocitima
	<i>S. palaestina</i> ¹³	Vodeni, MeOH, CH ₂ Cl ₂ ekstrakt herbe	ICAM ₅₀ =50-100 µg/ml	
	<i>S. obtusirena</i> ²⁶	MeOH ekstrakt herbe	1-100 µg/ml	
Citotoksična	<i>S. recta</i> ²⁷	Vodemetanolni ekstrakt stabljike	10 µg/ml	A431 ^h , HeLa ⁱ , MCF-7 ^j ćelijske linije
	<i>S. palustris</i> ²⁷	Vodemetanolni ekstrakt stabljike	10 µg/ml	HeLa, MCF-7 ćelijske linije

^h Skin epidermoid carcinoma – epidermoidni karcinom kože

ⁱ Cervix adenocarcinoma – adenokarcinom grlića materice

^j Breast adenocarcinoma – adenokarcinom dojke

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model
	<i>S. germanica</i> ²⁸	Etarsko ulje herbe	LD ₅₀ =74,5 µg/ml	ACHN ^k ćelijska linija
	<i>S. germanica</i> ²⁸	Etarsko ulje herbe	LD ₅₀ =75 µg/ml	C32 ^l ćelijska linija
	<i>S. laxa</i> ²⁹	EtOAc frakcija vodenometanolnog ekstrakta herbe	IC ₅₀ =18,1 µg/ml	T47D ^m ćelijska linija
	<i>S. subaphylla</i> ²⁹		IC ₅₀ =43,4 µg/ml	
	<i>S. turcomanica</i> ²⁹		IC ₅₀ =30,1 µg/ml	
Antimutagena	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁰	Vodeni ekstrakt herbe, iridoidna frakcija, feniletanska frakcija, akteozid	2 mg/ml	Ames-ov test, COMET test
	<i>S. annula</i> ³¹	Vodeni ekstrakt herbe	4-10 mg	Ames-ov test
	<i>S. petrokosmos</i> ³²	MeOH ekstrakt lista	1,5-6 µg/ml	CA ⁿ , SCE ^o testovi
Antialergijska	<i>Stachys riederi</i> var. <i>japonica</i> ³³	Vodeni ekstrakt herbe	0,1, 1 mg/ml	48/80 indukovana alergijska reakcija, PCA test, inhibicija oslobađanja histamina, inhibicija sekrecije TNF-α i IL-6
Insekticidna	<i>S. byzantina</i> ²	Frakcije MeOH ekstrakta herbe	5-10 mg/ml	<i>Oryzaephilus surinamensis</i>
Anksiolitična	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁴	Vodenoetanolni ekstrakt herbe	100 mg/kg <i>i.p.</i>	EPM ^p test
	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁵	Vodenoetanolni ekstrakt herbe	50 mg/kg <i>i.p.</i>	
		Petroletarski ekstrakt (PE herbe)	25 mg/kg <i>i.p.</i>	
		EtOAc frakcija PE herbe	25 mg/kg <i>i.p.</i>	
		Vodena frakcija PE herbe	25 mg/kg <i>i.p.</i>	
<i>S. tibetica</i> ³⁶	Etarsko ulje herbe	25, 50 mg/kg <i>p.o.</i>		
Sedativna	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁴	Vodenoetanolni ekstrakt herbe	100 mg/kg <i>i.p.</i>	SLA test ^q

^k Amelanotic melanoma – amelanotični melanom

^l Renal cell adenocarcinoma – adenokarcinom renalnih ćelija

^m Breast carcinoma – karcinom dojke

ⁿ Chromosomal aberration

^o Sister chromatid exchanges

^p Elevated plus maze – uzdignuti plus lavirint

Uvod

Aktivnost	Vrsta	Preparat	Efektivna koncentracija/doza	Test/eksperimentalni model
	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁵	<i>n</i> -BuOH frakcija petroletarskog ekstrakta herbe	50 mg/kg <i>i.p.</i>	
		Vodena frakcija petroletarskog ekstrakta herbe	50 mg/kg <i>i.p.</i>	SLA test
Kardioprotektivna	<i>S. inflata</i> ³⁷	Vodometanolni ekstrakt (stabljika pre cvetanja) standardizovan na 4,5% derivata kafene kiseline	1,35-2,70 µg/kg/min	Okluzija/reperfuzija
Spazmolitična	<i>S. lavandulifolia</i> ³⁸	CHCl ₃ frakcija MeOH (90%) ekstrakta herbe	IC ₅₀ =0,126±0,018 mg/ml	Izolovan ileus pacova

¹ Bilušić Vundać i sar., 2007.; ² Asnaashari i sar., 2010.; ³ Abichandani i sar., 2010.; ⁴ Laggoune i sar., 2011b; ⁵ Lakhal i sar., 2011; ⁶ Bouayed i sar., 2007a; ⁷ Haznagy-Radnai i sar., 2006a; ⁸ Khanavi i sar., 2009.; ⁹ Stamatis i sar., 2003; ¹⁰ Tosun i sar., 2004; ¹¹ Dulger i sar., 2005; ¹² Dulger i Aki, 2009; ¹³ di Gorgio i sar., 2008.; ¹⁴ Duarte i sar., 2005.; ¹⁵ Rezazadeh i sar., 2009b; ¹⁶ Haznagy-Radnai i sar., 2011; ¹⁷ Rezazadeh i sar., 2005.; ¹⁸ Khanavi i sar., 2005; ¹⁹ Maleki i sar., 2001; ²⁰ Sharifzadeh i sar., 2005.; ²¹ Nazemiyeh i sar., 2007.; ²² Maleki-Dizaji i sar., 2008; ²³ Nabavizadeh i sar., 2011; ²⁴ Ma i sar., 2011; ²⁵ Yamahara i sar., 1990; ²⁶ Amirghofran, 2010; ²⁷ Haznagy-Radnai i sar., 2008.; ²⁸ Conforti i sar., 2009; ²⁹ Khanavi i sar., 2012; ³⁰ Basaran i sar., 1996; ³¹ Karakaya i Kavas, 1999; ³² Rencuzogullari i sar., 2011.; ³³ Shin, 2004.; ³⁴ Rabanni i sar., 2003; ³⁵ Rabanni i sar., 2005; ³⁶ Kumar i sar., 2012; ³⁷ Garjani i sar., 2004; ³⁸ Naseri i sar., 2011.

^q Test spontane lokomotorne aktivnosti

5. Odabrane vrste roda *Stachys*

U okviru doktorske disertacije ispitane su četiri vrste roda *Stachys*, endemične za Balkansko poluostrvo.

5.1. *Stachys anisochila* Vis. & Pančić

(*S. anisochila* Vis. & Pančić 1870. u Mem. Imp. Reale Ist. Veneto Sci. 15: 13.)

Višegodišnja zeljasta biljka. Stabljika razgranata još od osnove, grane ustajuće do uspravne, gusto pokrivene kovrdžavim dlakama ili \pm gole. Listovi jajasti, eliptični ili izduženi, sa kratkom lisnom drškom, na vrhu zatupasti donji pri osnovi \pm srcasto usečeni ili odsečeni do zaokrugljeni, gornji klinasto suženi u dršku, duž oboda krupno tupo nazubljeni, zeleni, i na licu i na naličju pokrivene kovrdžavim dlakama. Brakteje izdužene, vršne linearne, na oba kraja sužene, nenazubljene, \pm dugačke kao cvetovi. Po 6 cvetova složeno u prividne pršljenove, koji su grupisani na vrhu stabljike i grana, na početku u kratke i zbijene, kasnije u izdužene i proređene cvasti. Čašica dugačka 10-11 mm, duboko dvousnata, pokrivena gustim do proređenim dlakama; gornja usna izdužena, samo na vrhu sa 2-3 zupca, donja deljena u $2 \pm$ nejednaka, linearna, na vrhu ušiljena režnja; čašični zupci su na vrhu šiljati. Krunica bleđožuta, sa crvenkastim flekama; u kruničnoj cevi se nalazi dlakavi prsten; gornja usna krunice izdužena, na vrhu tupa, usečena, donja duplo duža, dugačka 8-10 mm, trorežnjevita, srednji režanj najveći, obrnuto srcast, na vrhu usečen. Cvetovi VI-VII.

Raste na krečnjačkim kamenjarima. Endemit je Balkanskog poluostrva.

U Srbiji je rasprostranjena u zapadnoj Srbiji (Medvednik (*locus classicus*), Koslane, Ovčinske stene (Podrinje), Mokra gora, Krilje, Derventa (Perućac, Povlen) (Diklić 1974).

U literaturi se navodi da je vrsta rasprostranjena i u istočnoj Srbiji (Stara planina – Midžor, Tupanar, Zarkova čuka) i na Kosovu (Žljeb – Veprina), ali su ti podaci sporni.



Slika 6. *Stachys anisochila* (klisura Belog Rzava, zapadna Srbija)

5.2. *Stachys beckeana* Dörfler & Hayek

(*S. beckeana* Dörfler & Hayek 1918. u Denkschr. Akad. Wiss. Math.-Nat. Kl. (Wien) 94: 186.)

Višegodišnja zeljasta biljka. Stabljika 10-30(40) cm, ustajuća do polegla, pokrivena rutavim do vunastim dlakama. Listovi jajasti, objajasti ili izduženo eliptični, pri osnovi zaobljeni ili srcasti, duž oboda nareckani, na vrhu tupi do zatupasti; donji sa lisnom drškom, gornji sedeći; pokriveni rutavim do vunastim dlakama. Po 6-16 cvetova složeno u guste prividne pršljenove, koji su jedan iznad drugog grupisani pri vrhu stabljike i grana u izdužene prividne klasove. Čašica duga 7-8 mm, gusto rutava do vunasta, često i sa žlezdastim dlakama; čašični zupci lancetasti, šiljati, kraći od čašične cevi. Krunica duga 15-20 mm, bledožuta; donja usna duga 8-10 mm (Hayek, 1917).

Vrsta pripada *Stachys recta* L. kompleksu.

Raste na siparima i kamenjarima u subalpijskoj zoni, najčešće na krečnjaku, ređe na silikatnoj podlozi.

Endemična balkanska vrsta koja se sporadično javlja na planinama Dinarida (južna Bosna, Crna Gora, severna Albanija), zapadne Makedonije i zapadne Bugarske (Ball, 1972).



Slika 7. *Stachys beckeana* (Ražana glava, Durmitor, Crna Gora)

5.3. *Stachys plumosa* Griseb.

(*S. plumosa* Griseb. 1844 u Spic. Fl. Rumel. 2: 139.)

Višegodišnja zeljasta biljka. Stabljika uspravna, nerazgranata ili razgranata, pokrivena kratkim žlezdastim maljama i proređeno vunastim stršećim dlakama. Listovi relativno nežni, izduženo jajasti ili lancetasti, na vrhu šiljati, pri osnovi kratko suženi ili zaokrugljeni, donji sa lisnom drškom, gornji sedeći, duž oboda testerasto nazubljeni, pokriveni kratkim žlezdastim maljama i \pm dugačkim dlakama. Po 6-12 cvetova složeno u guste prividne pršljenove, koji su jedan iznad drugog grupisani pri vrhu stabljike i grana u izdužene prividne klasove. Čašica je pokrivena kratkim žlezdastim i gušće dugačkim dlakama; čašični zupci lancetasti, na vrhu bodljasto šiljati, dugački \pm kao čašična cev. Cvetovi bledo do prljavo žuti ili crvenkasti. Cveti VI-VII.

Raste na sušnim površinama, zatravljenim mestima, na krečnjačkoj i silikatnoj geološkoj podlozi. Rasprostranjena je u jugoistočnim delovima Balkanskog poluostrva.

U Srbiji je rasprostranjena u istočnoj i jugoistočnoj Srbiji (okolina Vranja (Diklić, 1974), okolina Bosilegrada, Stara planina (Niketić pers. comm.).

Navodi se i za floru okoline Niša (Diklić, 1974), ali dosadašnja istraživanja nisu potvrdila njeno prisustvo.



Slika 8. *Stachys plumosa*

5.4. *Stachys alpina* L.

(*S. alpina* L. 1753. u Sp. Pl.: 581.)

Stachys alpina je pretežno šumska vrsta koja nastanjuje brdske i planinske predele (Diklić, 1974; Koeva, 1989). Pripada polimorfnom kompleksu vrsta *S. germanica* L. (Ball, 1972; Greuter i sar., 1986; Koeva, 1989; Lovašen-Eberhardt, 2000). U okviru nje do sada su opisane tri podvrste (Greuter i sar., 1986):

- tipska podvrsta nastanjuje centralni i jugoistočni deo Evrope (uključujući Apeninsko i Balkansko poluostrvo) (Ball, 1972; Diklić, 1974; Greuter i sar., 1986; Koeva, 1989),

- podvrsta *macrophylla* (Albov) Bhattacharjee raste na Kavkazu (Greuter i sar., 1986),

- podvrsta *dinarica* Murb. endemit Balkanskog poluostrva (Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Kosovo i Metohija i jugozapadna Bugarska) (Bjelčić, 1974; Diklić, 1974; Greuter i sar., 1986; Koeva, 1989; Lovašen-Eberhardt, 2000; Rohlena, 1942).

5.4.1. *Stachys alpina* subsp. *dinarica* Murb.

Stachys alpina subsp. *dinarica* Murb. (u Acta Univ. Lund. 27(5): 61. 1891.) je višegodišnja zeljasta, aromatična biljka, bez bazalnih rozeta, visine 40-50 cm. Stabljika u donjem delu skoro vunasto, u gornjem štrčeće i proređeno žlezdasto dlakava. Listovi su na naličju meko pustenasto svilasto do vunasto dlakavi, na licu proređeno dlakavi, jajasti ili izduženo jajasti, pri osnovi srčasti. Cvetovi raspoređeni na vrhu stabljike u nekoliko gustih (12-20 cvetnih) prividnih pršljenova. Brakteole linearne, slične dužine kao i čašica, vunaste. Čašica duga 7-9 mm, obično crvenkasta, sa zupcima dužine 2-3 mm. Krunica duga 11-14 mm, ljubičasto-crvenkasta; gornja usna duga 4-6 mm, donja 7-10 mm, obe dugo belo dlakave (Diklić, 1974; Koeva, 1989).

Za razliku od tipske podvrste, podvrsta *dinarica* najčešće raste na većim nadmorskim visinama, na planinskim pašnjacima i rudinama. Javlja se u visinskom dijapazonu od 1200-2000 m, najčešće u subalpijskom pojasu, na krečnjačkoj geološkoj podlozi i na relativno dubokom zemljištu (Diklić, 1974; Koeva, 1989).

Ovaj takson je po morfološkim svojstvima, dosta sličan i apeninsko-balkanskoj vrsti *S. tymphaea* Hausskn. (Diklić, 1974; Koeva, 1989).



Slika 9. *Stachys alpina* subsp. *dinarica* (Jahorina, Bosna i Hercegovina)

5.5. Dosadašnja ispitivanja

Odabrane vrste roda *Stachys* su do sada samo delimično hemijski i farmakološki ispitivane, dok podvrsta *S. alpina* subsp. *dinarica* do sada nije bila proučavana.

U listu *S. anisochila* od flavonoida identifikovani su: 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozidi izoskutelareina, hipolaetina i 4'-O-metilhipolaetina, njihovi diacetil analozi (7-O-[6'', 6'''-O-diacetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozidi), 4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozid (Lenherr i sar., 1984a, b; Lenher i Mabry, 1987), kao i apigenin 7-O-*p*-kumaroilglukozid (Marin i sar., 2004). Od iridoida detektovani su melitozid i i acetilharpagid (Lenherr i sar., 1984a).

U listu *S. beckeana* od flavonoida identifikovani su takođe 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozidi izoskutelareina, hipolaetina i 4'-O-metilhipolaetina, a od iridoida pored melitozida i acetilaharpagida, dodatno i harpagid, ajugol i ajugozid (Lenherr i sar., 1984a).

U herbi i korenu *S. plumosa* identifikovani su flavonski heterozid 4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozid i feniletanski heterozidi: akteozid (verbaskozid), martinozid i forzitozid B (Bankova i sar., 1999). U herbi je utvrđeno i prisustvo 7-O-acetilalozilglukozida hrizoeriola i izoskutelareina i

apigenin 7-O-*p*-kumaroilglukozida (Marin i sar., 2004), kao i tri labdanska diterpena: 13-epijabugodiol i dva enantiomera 6-dezoksiandaluzola (Paternostro i sar., 2000).

Herba *S. alpina* [subsp. *alpina*] okarakterisana je u pogledu sadržaja tanina, flavonoida i derivata hidroksicimetne kiseline (Haznagy-Radnai i sar., 2006a; Bilušić Vundać i sar., 2007). U herbi su do sada od flavonoida detektovani 7-O-acetilalozilglukozidi hipolaetina, izoskutelareina i 4'-metilhipolaetina (Marin i sar., 2004), od fenolkarboksilnih kiselina su identifikovane kafena, sinapinska, protokatehinska (Ross i Zinchenko, 1975), hlorogenska (Ross i Zinchenko, 1975; Buchwald i Czapska, 1995; Bilušić Vundać i sar., 2005) i rozmarinska (Ross i Zinchenko, 1975; Czigle i sar., 2007), a od iridoidnih heterozida je identifikovan harpagid (Haznagy-Radnai i sar., 2006b).

Za razliku od *S. alpina* [subsp. *alpina*], podvrsta *S. alpina* subsp. *dinarica*, predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije, do sada nije bila hemijski i farmakološki ispitivana.

Do sada je ispitivan hemijski sastav etarskih ulja izolovanih iz herbi *S. alpina* [subsp. *alpina*] (Bilušić Vundać i sar., 2006; Haznagy-Radnai i sar., 2007) i *S. plumosa* (Grujić-Jovanović i sar., 2001, 2004; Radulović i sar., 2007) sa različitih lokaliteta, kao i hemijski sastav etarskog ulja izolovanog iz herbe *S. anisochila* (Grujić-Jovanović i sar., 2011). Samo je za uzorke etarskog ulja *S. plumosa* (Grujić-Jovanović i sar., 2004; Ristić i sar., 2008) do sada publikovana antimikrobna aktivnost.

Za ekstrakte herbe *S. alpina* [subsp. *alpina*] ispitivana je antioksidantna aktivnost. Utvrđeno je da metanolni ekstrakt u izvesnoj meri inhibira lipidnu peroksidaciju u homogenizatu mozga govečeta ($IC_{50}=219,4 \mu\text{g/ml}$) (Haznagy-Radnai i sar., 2006a). Takođe, Bilušić Vundać i saradnici (2007) su utvrdili da metanolni i etanolni ekstrakti u značajnoj meri neutrališu DPPH radikal ($IC_{50}=5,2$ i $46,6 \mu\text{g/ml}$, redom), dok je aktivnost hloroformskog ekstrakta bila znatno slabija ($IC_{50}=112 \mu\text{g/ml}$).

Za vodeni ekstrakt herbe *S. alpina* [subsp. *alpina*] ispitivano je antiinflamatorno delovanje na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova. Ekstrakt i diklofenak-natrijum primenjeni oralno (*p.o.*) u od 5 mg/kg ispoljili su sličan antiinflamatorni efekat. Nakon intraperitonealne (*i.p.*) primene istih doza ekstrakt je bio

znatno efikasniji od referentnog leka: ekstrakt je suprimirao edem oko 80%, a diklofenak-natrijuma za oko 40% (Hahnagy-Radnai i sar., 2011).

Za vrste *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. plumosa* nema podataka o upotrebi u narodnoj medicini. Za *S. alpina* subsp. *dinarica* je u okviru naših terenskih istraživanja na Jahorini (Bosna i Hercegovina) zabeležena njena tradicionalna upotreba „slično kao nana“ i „kod upale mokraćne bešike, za smirenje i kod nesаницe“.

CILJ

Cilj doktorske disertacije je hemijska i farmakološka karakterizacija četiri odabrana taksona roda *Stachys* L.:

- *S. anisochila* Vis. et Pančić,
- *S. beckeana* Dörfler & Hayek,
- *S. plumosa* Griseb.
- *S. alpina* subsp. *dinarica* Murb.

Vrste *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* [subsp. *alpina*] su do sada bile samo delimično hemijski ispitivane, dok za *S. alpina* [subsp. *alpina*] i *S. plumosa* postoji ograničen broj podataka o njihovoj farmakološkoj aktivnosti.

Podvrsta *Stachys alpina* subsp. *dinarica*, jedina za koju je u okviru terenskih istraživanja ustanovljena tradicionalna upotreba (kod upale mokraćne bešike, za smirenje i kod nesаницe), do sada nije bila predmet farmakognostijskih proučavanja.

Hemijska karakterizacija podrazumeva da se u herbama svih odabranih taksona roda *Stachys* i njihovim suvim metanolnim ekstraktima odredi sadržaj sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju, da se izoluju najzastupljeniji flavonoidi iz herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* i izvrši njihova identifikacija, da se sprovede uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza metanolnih ekstrakata herbi sva četiri taksona, kao i kvalitativna i kvantitativna analiza izolovanih etarskih ulja.

Farmakološka karakterizacija podrazumeva ispitivanje antioksidantne, antiinflamatorne, hepatoprotektivne i antimikrobne aktivnosti, sposobnosti inhibicije enzima MAO, kao i psihotropnog delovanja suvih metanolnih ekstrakata herbi svih odabranih taksona, kao i ispitivanje antimikrobne aktivnosti izolovanih etarskih ulja.

MATERIJAL I METODE

1. Biljni materijal i ekstrakcija

Biljni materijal je sakupljen sa karakterističnih lokaliteta u Srbiji, Crnoj Gori i Bosni i Hercegovini (Tabela 17).

Tabela 17. Lokaliteti i vreme sakupljanja biljnog materijala

Vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja	Kolektorski broj
<i>S. anisochila</i>	Klisura Belog Rzava (zapadna Srbija), jun 2003. godine	BEO - ko620041/4
<i>S. beckeana</i>	Durmitor (Crna Gora), avgust 2003. godine	BEO - ko820033/6
<i>S. plumosa</i>	Jelašnička klisura (jugoistočna Srbija), jun 2002. godine	BEO - ko320025/6
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	Jahorina (Bosna i Hercegovina), jul 2004. godine	BEO - ko720049/83

Nadzemni delovi biljaka sakupljeni su u periodu punog cvetanja i osušeni na sobnoj temperaturi. Osušen biljni materijal je samleven, potom preleven hloroformom (1:7) i macerovan 72 h uz povremeno mućkanje. Hloroformski ekstrakt je profiltriran, a ekstrakcija ponovljena istom količinom hloroforma tokom naredna dva dana. Nakon filtriranja, biljni materijal je osušen, a postupak bimaceracije ponovljen na isti način metanolom. Rastvarači su uklonjeni uparavanjem pod sniženim pritiskom.

Dobijeni suvi metanolni ekstrakti su do analize čuvani u vakuum eksikatoru. Njihov prinos dat je u Tabeli 18.

Tabela 18. Prinos suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys*

Herba	Prinos ekstrakta (%)
<i>S. anisochila</i>	14,88
<i>S. beckeana</i>	11,66
<i>S. plumosa</i>	12,57
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	13,94

2. Aparatura

Spektrofotometrijsko određivanje ukupnih polifenola, tanina, flavonoida, antocijana i derivata hidroksicimetne kiseline urađeno je na spektrofotometru SPECOL 11 (Carl Zeiss, Jena).

GC-FID i GC-MS analiza etarskih ulja

GC-FID analiza etarskog ulja *S. plumosa*^a je urađena na aparatu HP 5890 II Gas chromatograph, opremljenim HP-5 kapilarnom kolonom (25 m × 0,32 mm; debljina filma 0,52 μm) i plameno-jonizujućim detektorom (Flame Ionization Detector – FID). GC-MS analiza je urađena na aparatu HP G 1800 C GCD Series II (GC-EID), opremljenim HP-5MS kapilarnom kolonom (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm) i MS detektorom (EI režim, 70 eV, opseg m/z 40-450). Noseći gas bio je helijum.

GC-FID analiza etarskog ulja *S. alpina* subsp. *dinarica*^b je urađena na aparatu SRI 8610C GC, opremljenim sa DB-5 kapilarnom kolonom (30 m × 0,32 mm; debljina filma 0,25 μm) i FID detektorom. GC-MS analiza je urađena na aparatu HP 6890-5973 GC-MS sa kapilarnom kolonom HP-5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm) i MS detektorom (EI režim, 70 eV). Noseći gas bio je helijum.

Hromatografija na tankom sloju (TLC)

Za analitičku hromatografiju na tankom sloju korišćene su ploče sa silikagelom na aluminijumskoj foliji (DC-Alufolien, Kieselgel 60F₂₅₄, Merck, Darmstat, Germany; 0,1 mm).

Za preparativnu hromatografiju na tankom sloju korišćene su ploče sa silikagelom na aluminijumskoj foliji (Fluka, Switzerland).

Hromatografija na koloni (CC)

Za izvođenje hromatografiju na koloni korišćen je silikagel (Kieselgel 60 (0,063-0,200 mm), Merck, Darmstat, Germany).

Prečišćavanje izolovanih jedinjenja vršeno je na koloni sefadeksa (Sefadex LH 20, Sigma).

^a Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

^b Institut za farmakognoziju i hemiju prirodnih proizvoda, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Atini

HPLC-UV i HPLC-MS analiza^c

HPLC-UV analiza metanolnih ekstrakata je urađena na aparatu HPLC 1100 L opremljen sa HP 9000 data stanicom (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), uz korišćenje kolone Phenomenex Luna C-18 (150 × 3 mm, 5 μm) i DAD detektora.

HPLC-MS analiza je izvedena korišćenjem opisanog sistema za HPLC koji je povezan sa uređajem HP 1100 MSD API-electrospray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) sa kvadrupol masenim detektorom.

NMR analiza^c

NMR spektri (¹H NMR, ¹³C NMR, COSY, HSQC, HMBC, ROESY) izolovanih jedinjenja snimani su na aparatu Bruker DRX-400 (295 K). Uzorci su rastvarani u deuterisanom metanolu (CD₃OD).

Bihevioralni eksperimenti^d

Bihevioralni eksperimenti su izvedeni korišćenjem standardne opreme:

- uzdignuti plus lavirint (eng. elevated plus maze) – aparatura se sastoji iz po dva otvorena (50 × 10 cm, ivica uzdignuta 0,3 cm) i dva zatvorena kraka (50 × 10 × 40 cm), povezana centralnom kvadratnom površinom (10 × 10 cm),

- spontana lokomotorna aktivnost – svaka pojedinačna životinja je smeštena u providni kavez od pleksiglasa (40 × 25 × 35 cm) i njeno ponašanje praćeno pod difuznim crvenim osvetljenjem (20 lux).

Ponašanje životinja je snimano kamerom postavljenom na plafon, a analizirano pomoću softvera "ANY-maze Video Tracking System software" (Stoelting Co Wood Dale, IL, USA).

Jačina stiska je merena pomoću komercijalnog uređaja (Ugo Basile, Milan, Italy, model 47105).

^c Institut za farmaceutske nauke, Univerzitet u Firenci

^d Katedra za farmakologiju, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

3. Osnovna hemijska ispitivanja

Osnovna hemijska ispitivanja izvršena su prema odgovarajućim postupcima koje propisuje Ph. Jug. IV (1984), a obuhvatila su:

- određivanje vlage
- određivanje pepela
- određivanje u kiselini nerastvorljivog pepela
- određivanje ekstrakta.

4. Kvalitativna hemijska analiza

4.1. Dokazivanje tanina

Priprema ekstrakta

0,5 g droge u prašku (sito 710) prelije se u tikvici sa 100 ml destilovane vode i greje 30 minuta na 90 °C. Dokazne reakcije se izvode sa profiltriranim i ohlađenim dekoktom (Petrović i sar., 2009).

Opšte taložne i bojene reakcije

U 2-3 ml dekokta dodaje se nekoliko kapi vodenog rastvora želatina, gvožđe(III)-hlorida, strihnin-sulfata ili baznog olovo-acetata. Sa želatinom, strihnin-sulfatom i baznim olovo-acetatom taloge daju i galni i katehinski tanini. Sa gvožđe(III)-hloridom galni tanini daju plavo, a katehinski zeleno obojenje (Petrović i sar., 2009).

Formaldehidna (tanofomska) proba

50 ml dekokta se zagreva 30 minuta u tikvici sa ravnim dnom uz povratni hladnjak sa 5 ml koncentrovane HCl i 10 ml formaldehida (40%). Talog tanoforma nastaje kao kondenzacioni proizvod katehinskih tanina i formaldehida, dok galni ne reaguju.

Kada se talog tanoforma odvoji filtriranjem, u filtrat se bez mešanja doda 1 g kristalnog natrijum-acetata, a zatim 1 ml rastvora gvožđe(III)-amonijum sulfata. Na dodirnoj površini se u slučaju prisustva galne kiseline, odnosno galnih tanina javlja plavoljubičasti prsten (Petrović i sar., 2009).

4.2. Dokazivanje flavonoida

Priprema ekstrakta

0,2 g droge (sito 0,75) prelije se sa 5 ml 70% (V/V) metanola i zagreva 10 minuta uz povratni hladnjak na vodenom kupatilu. Filtrat se podeli na dva dela i koristi za izvođenje dokaznih reakcija.

Shinoda (cijanidinska) reakcija

1 ml rastvora za ispitivanje se upari do suva i ostatak rastvori u 1 ml etanola. U etanolni rastvor se doda na vrh kašike opiljaka magnezijuma i nekoliko kapi HCl (36%). Flavoni, flavonoli i flavanonoli se u prisustvu nascentnog vodonika redukuju se do crvenih antocijanidina, a flavanoni daju ljubičasti polimetinski katjon (Petrović i sar., 2009).

Wilson-Taubök-ova reakcija

1 ml rastvora za ispitivanje se upari na vodenom kupatilu do suva. Ostatak se pomeša sa po 5 mg borne i oksalne kiseline i 3 ml acetona i ponovo upari do suva. Žuti ostatak se rastvori u 3 ml etra i posmatra na dnevnoj i pod UV svetlošću (254 nm, 365 nm). Flavonoli grade helatne komplekse koji već na dnevnoj svetlosti pokazuju intenzivnu žutozelenu ili plavu fluorescenciju (Petrović i sar., 2009).

4.3. Dokazivanje alkaloida

Priprema ekstrakta

0,5 g sprašene droge (sito 0,75) mučka se 3 minuta sa smešom 2,5 ml razblažene HCl (10%) i 2,5 ml vode, ekstrakt profiltrira i filtrat koristi za izvođenje dokaznih reakcija pomoću reagenasa navedenih u Tabeli 19 (Petrović i sar., 2009).

Tabela 19. Opšti taložni reagensi za dokazivanje alkaloida

Reagens	Hemijski sastav	Talog
Dragendorfov reagens	K[BiI ₄]	Narandžast
Majerov reagens	K ₂ [HgI ₄]	Žučkasto beo
Rastvor tanina	<i>Acidum tannicum</i>	Bledosmeđ
Hagerov reagens	Pikrinska kiselina	Žut, kristalan
Vagnerov reagens	KJ ₃	Crvenosmeđ
Bertrandov reagens	Silikovolframova kiselina	Beličast, amorfan

5. Kvantitativna hemijska analiza

5.1. Određivanje ukupnih polifenola

Ukupni polifenoli su određivani u metanolnim ekstraktima korišćenjem Folin-Ciocalteu (FC) reagensa. Metoda se zasniva na reakciji između FC reagensa (fosformolibdovolframova kiselina) i polifenolnih jedinjenja u baznoj sredini, pri čemu polifenoli redukuju W^{6+} -jon do W^{4+} -jona i Mo^{6+} -jon do Mo^{4+} -jona (volfram-molibdensko plavo), a sami se oksidišu do *o*-hinona (Petrović i sar., 2009).

Postupak

Ispitivani metanolni ekstrakti rastvoreni su u metanolu (1 mg/ml). 100 μ l uzorka je pomešano sa 750 μ l FC reagensa (prethodno 10 puta razblaženog vodom) i posle 5 minuta svakom uzorku je dodato po 750 μ l rastvora Na_2CO_3 (60 g/l). Posle 90 minuta merena je apsorbanacija uzoraka na 725 nm. Rezultati su izraženi kao ekvivalenti katehina, odnosno μ g katehina/mg suvog ekstrakta (Velioglu i sar., 1998).

5.2. Određivanje tanina

Tanini u nadzemnim delovima biljaka cvetu su određivani spektrofotometrijskim postupkom sa fosforvolframovom kiselinom u baznoj sredini prema propisu Ph. Jug. V (2000) za list hamamelisa, *Hamamelidis folium*. Sadržaj tanina je izračunat kao razlika u sadržaju ukupnih polifenola i polifenola koji nisu adsorbovani kožnim prahom.

Postupak

0,75 g sprašene droge se u tikvici prelije sa 150 ml hladne vode, zagreje do ključanja i ostavi 30 minuta na vodenom kupatilu. Smeša se ohladi, prenese u odmernu tikvicu od 250 ml i dopuni vodom do 250 ml. Kada se slegne, rastvor se filtrira i prvih 50 ml filtrata baci.

Ukupni polifenoli

5 ml filtrata se u odmernoj tikvici dopuni do 25 ml vodom. 5 ml ovog rastvora se pomeša sa 2 ml fosforvolframove kiseline i dopuni rastvorom Na₂CO₃ (106 g/l) do 50 ml. Posle tačno 3 minuta se meri apsorbancija plavo obojenog rastvora na talasnoj dužini od 715 nm, uz vodu kao slepu probu (A₁).

Polifenoli koji nisu adsorbovani kožnim prahom

20 ml filtrata se pomeša sa 0,2 g kožnog praha i snažno mućka 60 minuta. Filtrira se i 5 ml ovog filtrata pomeša sa 2 ml fosforvolframove kiseline i dopuni rastvorom Na₂CO₃ (106 g/l) do 50 ml. Posle tačno 3 minuta se meri apsorbancija plavo obojenog rastvora na talasnoj dužini od 715 nm, uz vodu kao slepu probu (A₂).

Standard pirogalola

50 mg pirogalola se rastvori u vodi i dopuni vodom do 100 ml. Odmeri se 5 ml ovog rastvora se odmeri i dopuni vodom do 100 ml. 5 ml ovog rastvora se pomeša sa 2 ml fosforvolframove kiseline i dopuni rastvorom Na₂CO₃ (106 g/l) do 50 ml. Posle tačno 3 minuta se meri apsorbancija plavo obojenog rastvora na talasnoj dužini od 715 nm, uz vodu kao slepu probu (A₃).

Sadržaj tanina se izračunava prema formuli:

$$\% \text{ tanina} = \frac{13,12 \times (A_1 - A_2)}{A_3 \times m},$$

A_1 = apsorbancija ukupnih polifenola
 A_2 = apsorbancija neadsorbovanih polifenola
 A_3 = apsorbancija rastvora pirogalola
 m = masa uzorka (g)

5.3. Određivanje flavonoida

Spektrofotometrijsko određivanje flavonoida se zasniva na građenju žuto obojenih kompleksa sa aluminijumom. Heterozidi se ekstrahuju acetonom i podvrgavaju kiseloj hidrolizi (zagrevanjem sa HCl u prisustvu urotropina). Oslobođeni aglikoni se preuzimaju etilacetatom i izlažu dejstvu aluminijum-hlorida, a zatim se meri apsorbancija žutih helata. Urotropin sprečava oksidaciju eventualno prisutnih

proantocijanidina u antocijanidine, koji sa aluminijumom grade plave helate, pa bi se ispitivani rastvor bojio zeleno (Petrović i sar., 2009).

Sadržaj flavonoida u ispitivanim uzorcima određen je spektrofotometrijskim postupkom prema propisu Ph. Eur. 6.0 (2007) za list breze, *Betulae folium*.

Postupak

0,6 g sprašene droge prelije se sa 20 ml acetona u balonu ravnog dna od 100 ml, doda se 1 ml 0,5% rastvora urotropina i 2 ml 25% HCl i zagreva do ključanja 30 minuta uz povratni hladnjak. Posle hlađenja smeša se procedi preko malo vate u odmernu tikvicu do 100 ml. Ostatak droge i vata se zagrevaju još dva puta po 10 minuta sa po 20 ml acetona uz povratni hladnjak. Ohlađeni acetonski ekstrakti se preko malo vate procede u istu odmernu tikvicu i dopune acetonom do 100 ml.

20 ml ovog rastvora se u levku za odvajanje pomeša sa 20 ml vode i izmućka jednom sa 15 ml i tri puta sa po 10 ml etilacetata. Spojeni etil-acetatni ekstrakti se u levku za odvajanje isperu dva puta sa po 50 ml vode, prebace u odmernu tikvicu od 50 ml i sadržaj dopuni etilacetatom do 50 ml.

10 ml ovog rastvora prebaci se u odmernu tikvicu od 25 ml, doda se 1 ml aluminijum-hlorid reagensa i dopuni do oznake 5% rastvorom sirćetne kiseline u metanolu (*rastvor za analizu*).

Istovremeno se 10 ml ovog rastvora razblaži 5% rastvorom sirćetne kiseline u metanolu (*slepa proba*).

Apsorbancija ispitivanog rastvora se meri posle 30 minuta na 425 nm u odnosu na slepu probu. Sadržaj flavonoida se izračunava u odnosu na specifični apsorpcioni koeficijent hiperozida ($A_{1\%/1\text{cm}}=500$), prema formuli:

$$\% \text{ flavonoida} = \frac{A \times 1,25}{m}, \quad \begin{array}{l} A = \text{apsorbancija analize} \\ m = \text{masa uzorka (g)} \end{array}$$

5.4. Određivanje antocijana

Antocijani su biljni polifenoli heterozidne strukture od kojih potiče plava, ljubičasta, crvena i ružičasta boja cvetova i drugih biljnih organa.

U ispitivanim uzorcima antocijani su određeni direktnim spektrofotometrijskim postupkom prema propisu Ph. Eur. 6.0 (2007) za svež plod borovnice, *Myrtilli fructus recens*.

Postupak

50 g droge se zdrobi. Na 5 g droge doda se 95 ml metanola i mehanički meša 30 minuta. Filtrira se u odmernu tikvicu od 100 ml. Filter papir se ispere i odmernu tikvicu dopuni metanolom do 100 ml. Ovaj rastvor se 50 puta razblaži 0,1% rastvorom HCl u metanolu. Apsorbancija analiziranog rastvora meri se na 528 nm u odnosu na slepu probu (0,1% rastvor HCl u metanolu), a količina antocijana, izraženo kao cijanidin 3-glukozid hlorid, izračunava prema formuli:

$$\% \text{ antocijana} = \frac{A \times 5000}{718 \times m},$$

A = apsorbancija analize
 718 = specifična apsorbancija cijanidin 3-glukozid hlorida na 528 nm
 m = masa uzorka (g)

5.5. Određivanje derivata hidroksicimetne kiseline

Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u drogama određuje se spektrofotometrijski, na bazi Arnou-reakcije: kada se u zakiseljeni rastvor *o*-difenola dodaju natrijum-nitrat i natrijum-molibdat, razvija se žuta boja, koja po dodatku baze prelazi u crvenu. Derivati *o*-dihidroksi cimetne kiseline ekstrahuju se iz droge etanolom (Petrović i sar., 2009).

Postupak

Odmeriti 0,3 g^a, odnosno 1 g^b sprasene droge, dodati 95 ml etanola (50%, V/V) i ekstrahovati na vodenom kupatilu uz povratni kondenzator tokom 30 minuta. Ohladiti i profiltrirati u odmernu tikvicu od 100 ml i dopuniti etanolom do crte (rastvor A).

^a Postupak određivanja derivata hidroksicimetne kiseline izraženo kao hlorogenska, prema monografiji Ph. Eur. 6.0 (2007) za list jasena, *Fraxini folium*

^b Postupak određivanja derivata hidroksicimetne kiseline izraženo kao akteozid, prema monografiji Ph. Eur. 6.0 (2007) za list muške bokvice, *Plantaginis lanceolatae folium*

Ispitivani rastvor: 1 ml rastvora A preneti u odmernu tikvicu od 10 ml, dodati 2 ml HCl 0,5 M, 2 ml natrijum-nitrit/natrijum-molibdat reagensa i 2 ml NaOH 8,5%. Dopuniti vodom do 10 ml.

Rastvor za kompenzaciju: 1 ml rastvora A preneti u odmernu tikvicu od 10 ml, dodati 2 ml HCl 0,5 M i 2 ml NaOH 8,5%. Dopuniti vodom do 10 ml.

Apsorbancija ispitivanog rastvora se meri u odnosu na rastvor za kompenzaciju na 525 nm. Sadržaj derivata hidroksicimentne kiseline, izražen kao hlorogenska kiselina, izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ hlorogenske kiseline} = \frac{A \times 5,3}{m}, \quad \begin{array}{l} A = \text{apsorbancija ispitivanog rastvora} \\ m = \text{masa uzorka (g)} \end{array}$$

Sadržaj derivata hidroksicimentne kiseline, izražen kao akteozid, izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ akteozida} = \frac{A \times 1000}{185 \times m}, \quad \begin{array}{l} A = \text{apsorbancija ispitivanog rastvora} \\ m = \text{masa uzorka (g)} \end{array}$$

5.6. Određivanje alkaloida

U ispitivanim uzorcima je zbog nepoznate strukture i molekulske mase alkaloida, njihovo određivanje izvršeno gravimetrijskim postupkom prema propisu Ph. Jug. II (1951) za drogu *Veratri radix*.

Postupak

10 g sprasene droge (sito 0,30) je preliveno u tikvici od 150 ml sa 60 ml etra i 2,5 ml rastvora amonijaka (10%). Smeša se snažno mučka 30 minuta i ostavi da se talog slegne. Dobijeni ekstrakt tačno odmerene mase (oko 40 g), procedi se kroz malo pamuka u tariranu tikvicu. Ekstrakt se prelije u levak za odvajanje, a tikvica ispere sa malo etra i taj etar spoji sa ekstraktom. Etarski ekstrakt se u levku za odvajanje snažno

mućka sa 15 ml, a zatim još tri puta sa po 10 ml smeše razblažene HCl (9,5-10,5%) i vode u odnosu 1:9.

Sjedinjenim vodenim ekstraktima u drugom levku za odvajanje se doda rastvor amonijaka do alkalne reakcije i smeša izmućkava sa 20 ml, a zatim još tri puta sa po 15 ml etra. Etarski ekstrakt se svaki put kroz malo pamuka procedi u tariranu tikvicu. Etar se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, tikvica suši jedan sat i posle hlađenja meri.

6. TLC analiza

Metodom hromatografije na tankom sloju (TLC) ispitivano je prisustvo fenolnih sastojaka (flavonoidi, fenolkarboksilne kiseline) u suvim metanolnim ekstraktima herbi odabranih *Stachys* vrsta. Posle hidrolize ekstrakata u kiseloj sredini, takođe su analizirane aglikonske i šećerne komponente heterozida prisutnih u ispitivanim ekstraktima.

Svi ispitivani ekstrakti rastvoreni su u metanolu (5 mg/ml). Na tanak sloj silikagela naneto je po 20 µl odgovarajućeg rastvora u vidu linije.

Hidroliza metanolnih ekstrakata

250 mg metanolnog ekstrakta je rastvoreno u 15 ml 60% metanola i 5 ml 6 M HCl. Smeša je zagrevana 3 h na vodenom kupatilu na 95 °C uz povratni kondenzator. Posle hlađenja, hidrolizat je profiltriran u odmernu tikvicu i dopunjen 60% metanolom do 50 ml (Wang i Halliwell, 2001).

Slobodni aglikoni iz hidrolizata preuzeti su etilacetatom i ova frakcija je uparena do suva. Suve etilacetatne frakcije su rastvorene u odgovarajućem rastvaraču (5 mg/ml) i nanete na tanak sloj silikagela. Vodena frakcija hidrolizata, zaostala nakon preuzimanja aglikona etilacetatom, neutralisana je natrijum-hidroksidom. U njoj su analizirani monosaharidi.

6.1. TLC analiza fenolnih jedinjenja

Flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline su analizirani pod sledećim uslovima:

- mobilna faza: etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda = 100:11:11:26 (V/V/V/V)
- front rastvarača: 10 cm
- detekcija: NP/PEG reagens, VIS i UV.

NP/PEG reagens (Wagner i Bladt, 1996):

- rastvor A: 1% rastvor difenilboriloksietilamina u MeOH
- rastvor B: 5% rastvor polietilenglikola 400 u etanolu.

Posle sušenja ploče se prskaju rastvorom A, potom rastvorom B.

Posmatraju se žuto do narandžasto obojene zone flavonoida, koje gase UV fluorescenciju ili im se boja intenzivira, naročito posle prskanja NP/PEG reagensom. Fenolkarboksilne kiseline fluoresciraju plavičasto, a fluorescencija se nakon derivatizacije NP/PEG reagensom pojačava.

Etilacetatne frakcije metanolnih ekstrakata nakon hidrolize (aglikoni) su analizirane pod sledećim uslovima:

- mobilna faza: toluen-etilacetat-mravlja kiselina =5:4:1 (V/V/V)
- front rastvarača: 10 cm
- detekcija: NP/PEG reagens, VIS i UV.

6.2. TLC analiza monosaharida nakon kisele hidrolize

Monosaharidi su analizirani u vodenoj frakciji hidrolizata metanolnih ekstrakata pod sledećim uslovima:

- mobilna faza: etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-metanol-voda=60:15:15:10 (V/V/V/V)
- front rastvarača: 20 cm
- detekcija: ploče se suše na vazduhu 20 minuta, pa 15 minuta na 80 °C, potom se prskaju timol-sumpornom kiselinom^a i zagrevaju 15 minuta na 120 °C i posmatraju na dnevnoj svetlosti (Petrović, 1999).

Zone monosaharida se pod navedenim uslovima boje ružičasto, ljubičasto ili smeđenarandžasto.

^a 0,5 g timola se rastvori u 95 ml koncentrovanog etanola i 5 ml koncentrovane H₂SO₄.

7. Ekstrakcija herbe *Stachys alpina* subsp. *dinarica* i izolovanje flavonoida

Ekstrahovano je 800 g usitnjene herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* sa 2,75 l hloroforma postupkom bimaceracije, a potom je na isti način ekstrakcija ponovljena sa 2,75 l metanola. Dobijeni metanolni ekstrakt je uparen do suva i liofilizovan. Dobijeno je 115 g suvog metanolnog ekstrakta.

6,3 g metanolnog ekstrakta razdvajano je na koloni silikagela (Kieselgel 60, Merck; $2,5 \times 89$ cm). Eluiranje je započeto dihlormetanom uz postepeno povećavanje polarnosti dodatkom metanola (CH_2Cl_2 -MeOH=100:0 do 0:100).

Frakcije su testirane na tankom sloju silikagela u sistemima rastvarača: toluen-etilacetat-mravlja kiselina=5:4:1 (V/V/V) i etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda=100:11:11:26 (V/V/V/V). Detekcija zona je vršena na osnovu izgleda hromatograma na dnevnoj i u UV svetlosti, pre i nakon derivatizacije NP/PEG reagensom.

Nakon spajanja frakcija sličnog sastava, dobijene su 23 frakcije.

Frakcije F155-245 i F343-360 su spojene (450 mg) i dalje razdvajane na koloni silikagela (Kieselgel 60, Merck; $3,3 \times 21$ cm). Eluiranje je započeto smešom dihlormetana i metanola uz postepeno povećavanje polarnosti dodatkom metanola (CH_2Cl_2 -MeOH=99:1 do 0:100).

Frakcije su testirane na tankom sloju silikagela u sistemima rastvarača: dihlormetan-metanol=9:1 (V/V), dihlormetan-metanol=4:1 (V/V), etilacetat-sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda=100:11:11:26 (V/V/V/V). Detekcija zona je vršena na osnovu izgleda hromatograma na dnevnoj i u UV svetlosti, pre i nakon derivatizacije NP/PEG reagensom.

Nakon spajanja frakcija sličnog sastava, dobijena je 21 frakcija.

Preparativnom hromatografijom na tankom sloju silikagela u sistemu rastvarača dihlormetan-metanol-voda=40:10:1 (V/V/V) iz frakcije F205-218 (160 mg) izolovano je jedinjenje **1** (6,4 mg).

Na isti način iz frakcije F222-235 (235 mg) izolovana su jedinjenja **2** (1,8 mg) i **3** (2,0 mg).

8. HPLC-UV i HPLC-MS analiza^a

HPLC-UV i HPLC-MS analiza metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Stachys* sprovedene su u cilju identifikacije i kvantifikacije jedinjenja čije su zone detektovane na tankom sloju silikagela.

Postupak

Ispitivani metanolni ekstrakti su rastvoreni u metanolu, a potom profiltrirani kroz membranski filter (0,45 µm).

Aparatura i uslovi analize

HPLC analiza je izvršena na aparatu aparat HPLC 1100 L (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opremljom sa HP 9000 radnom (data) stanicom pod sledećim uslovima:

- kolona: Phenomenex Luna C-18 RT (150 × 3 mm, 5 µm),
- detektor: DAD
- mobilna faza: A) H₂O/HCOOH, pH=3,2; B) acetonitril
- gradijentni protok: 10-15% B (15 min), 15-22% B (7 min), 22% B (8 min), 22-25% B (2 min), 25-66% B (13 min), 66-10% B (5 min), 10% B (5 min)
- brzina protoka: 0,4 ml/min
- temperatura: 27 °C
- vreme analize: 50 minuta
- zapremina uzorka: 20 µl
- talasna dužina: 254, 280, 330 i 350 nm.

Za HPLC-MS analizu je korišćen aparat HPLC 1100 L povezan sa uređajem HP 1100 MSD API-electrospray (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) kvadrupol masenim detektorom. Uslovi HPLC analize (kolona, vreme analize, protok mobilne faze) bili su identični, a MS analiza je sprovedena pod sledećim uslovima:

- jonizacija: pozitivna i negativna
- *m/z*: 100-800
- temperatura: 350 °C

^a Institut za farmaceutске nauke, Univerzitet u Firenci

- noseći gas: azot
- protok: 10 l/min
- pritisak raspršivača: 30 psi
- temperatura kvadrupola: 30 °C
- napon: 3500 V
- energija jonizacije: 80-180 V.

Standardi

Za kvantitativnu analizu su korišćeni sledeći standardi:

- verbaskozid (čistoće 98% HPLC i NMR)^b
- hlorogenska kiselina (Fluka Chemie AG, Švajcarska);
- izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetil-β-D-alopiranozil (1→2)]-β-D-glukopiranozid (čistoća >95% HPLC i NMR)^c
- hrizoeriol 7-O-[6'''-O-acetil-β-D-alopiranozil(1→2)]-β-D-glukopiranozida (čistoće 88% HPLC)^b

Identifikacija

Identifikacija komponenata ispitivanih ekstrakata izvršena je poređenjem retencionih vremena, UV i MS spektara sa odgovarajućim standardima, a u nekim slučajevima poređenjem sa literaturnim podacima.

Kvantitativna analiza

Primenjen je metod spoljašnjeg standarda. Za svaku komponentu je korišćena kalibraciona kriva, a svaka koncentracija je rađena u triplikatu. Određivanja kafeoilhina kiselina, feniletanskih heterozida i derivata hrizoeriola su vršena na 330 nm, a izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetil-β-D-alopiranozil(1→2)]-β-D-glukopiranozida i njegovih derivata na 280 nm. Sadržaj kafeoilhina kiselina je izražen kao sadržaj hlorogenske kiseline, a feniletanskih heterozida kao sadržaj verbaskozida. Sadržaj 8-hidroksiflavona (derivati izoskutelareina i hipolaetina) je izražen kao sadržaj izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetil-β-D-alopiranozil(1→2)]-β-D-glukopiranozida, a

^b Izolovan na IRB (Istituto di Ricerche Biotechnologiche) Altavilla Vicentina, Univerzitet u Firenci.

^c Izolovan iz etanolnog ekstrakta lista *S. recta* (Karioti i sar., 2010)

derivata luteolina i hrizoeriola kao sadržaj hrizoeriol 7-O-[6'''-O-acetil-β-D-alopiranozil(1→2)]-β-D-glukopiranozida.

9. Izolovanje, određivanje sadržaja i analiza sastava etarskih ulja

Nadzemni delovi u cvetu *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* imaju blag aromatičan miris, koji se pojačava kada se biljni materijal protrlja među prstima, što ukazuje na prisustvo etarskog ulja.

Izolovanje etarskih ulja iz osušenih nadzemnih delova biljaka u cvetu izvršeno je destilacijom vodenom parom, u aparaturi prema Clevenger-u, prema odgovarajućim postupcima koje propisuje Ph. Jug. IV (1984).

Analiza i identifikacija komponenti ispitivanih ulja je izvršena metodama gasne hromatografije (GC-FID) i gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS). Identifikacija jedinjenja je izvršena poređenjem njihovih retencionih vremena (RT), retencionih (Kovat's) indeksa (RI) i masenih spektara sa odgovarajućim podacima dobijenim korišćenjem autentičnih uzoraka i/ili poređenjem sa podacima iz kompjuterske datoteke (NIST/NBS, Wiley libraries) i literature (Adams, 2001). Reticioni indeksi (RI) su određeni u poređenju sa homologim nizom *n*-alkana (C₉-C₂₃) pod istim operativnim uslovima.

Procentualni sadržaj komponenata je određen metodom normalizacije integrisanih površina pikova.

9.1. Etarsko ulje herbe *Stachys plumosa*

Etarsko ulje iz osušenih nadzemnih delova u cvetu *S. plumosa* izolovano je postupkom I koji propisuje Ph. Jug. IV (1984) za etarska ulja čija je relativna gustina manja od vode.

Propisana količina droge (sito 6) pomeša se u balonu za destilaciju sa određenom količinom vode, sadržaj u balonu zagreje do ključanja i destiluje 2 h. Posle završene destilacije na skali graduisane cevi se očita zapremina etarskog ulja.

Sadržaj etarskog ulja se izračunava prema formuli:

$$\% (\text{Vol}) \text{ etarskog ulja} = \frac{b}{a} \times 100, \quad \begin{array}{l} a = \text{masa uzorka (g)} \\ b = \text{zapremina etarskog ulja (ml)} \end{array}$$

Analiza etarskog ulja^a izvršena je metodama GC-FID i GC-MS pod sledećim uslovima:

GC-FID analiza: - aparat HP 5890 II Gas chromatograph

- HP-5 kapilarna kolona (25 m × 0,32 mm; debljina filma 0,52 μm)
- FID detektor (280 °C)
- temperatura injektora 250 °C
- noseći gas H₂ (1 ml/min)
- temperaturni program: 40-280 °C, linearan porast temperature 4 °C/min

GC-MS analiza: - aparat HP G 1800 C GCD Series II (GC-EID)

- HP-5MS kapilarna kolona (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm)
- temperaturni program: 40-260 °C, linearan porast temperature 4 °C/min
- temperatura injektora 250 °C, temperatura detektora 260 °C
- noseći gas He (1 ml/min)
- tehnika jonizacije: EI, 70 eV.

9.2. Etarsko ulje herbe *Stachys alpina* subsp. *dinarica*

Etarsko ulje iz osušenih nadzemnih delova u cvetu *S. alpina* subsp. *dinarica* izolovano je postupkom III koji propisuje Ph. Jug. IV (1984) za etarska ulja koja sadrže stearoptene i azulene.

Propisana količina droge (sito 6) pomeša se u balonu za destilaciju sa određenom količinom vode. Kroz bočnu cev se na sloj vode u graduisanoj cevi ulije 1 ml petroletra, sadržaj u balonu zagreje do ključanja i destiluje 2 h. Posle završene destilacije vodeni sloj se ispusti iz graduisane cevi i baci, a rastvor etarskog ulja u petroletru ispusti u odgovarajuću tikvicu. Graduisana cev i hladnjak se isperu 3 puta sa po 3 ml etra i spoje sa petroletarskim rastvorom. U tikvicu se zatim doda 2 g bezvodnog natrijum-sulfata, dobro promućka i sadržaj preko sloja pamuka procedi u tariranu čašu. Tikvica i pamučna vata se isperu 4 puta sa po 3 ml etra. Organski rastvarači se upare do suva, ostatak se suši 2 h u eksikatoru iznad sloja silikagela i potom meri.

^a Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

Sadržaj etarskog ulja se izračunava prema formuli:

$$\% (g) \text{ etarskog ulja} = \frac{b}{a} \times 100, \quad \begin{array}{l} a = \text{masa uzorka (g)} \\ b = \text{masa ostatka posle sušenja (g)} \end{array}$$

Analiza etarskog ulja^b izvršena je metodama GC-FID i GC-MS pod sledećim uslovima:

GC-FID analiza: - aparat SRI 8610C GC

- DB-5 kapilarna kolona (30 m × 0,32 mm; debljina filma 0,25 μm)
- FID detektor (280 °C)
- temperatura injektora 280 °C
- noseći gas He (1,2 ml/min)
- temperaturni program: 60-280 °C, linearni porast temperature 3 °C/min

GC-MS analiza: - aparat HP 6890-5973 GC-MS

- kapilarna kolona HP-5MS (30 m × 0,25 mm; debljina filma 0,25 μm)
- temperaturni program: 60-280 °C, linearan porast temperature 3 °C/min
- split-splitless injektor (200 °C), split ratio 1:10
- temperatura transfer linije: 250 °C
- noseći gas He (1 ml/min)
- tehnika jonizacije: EI, 70 eV
- zapremina injektovanog uzorka: 1 μl.

^b Institut za farmakognoziju i hemiju prirodnih proizvoda, Farmaceutski fakultet, Univerzitet u Atini.

10. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Termin *reaktivne vrste* (eng. reactive species, RS) obuhvata sve klase jedinjenja elektrofilnog karaktera visoke reaktivnosti, tj. oksidacione agense koji posreduju u oksidativnom/nitrozativnom oštećenju biomolekula i time nastanku oksidativnog/nitrozativnog stresa.

Najznačajniju klasu reaktivnih vrsta predstavljaju slobodni radikali (SR), a to su atomi, molekuli ili joni koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona u poslednjoj molekulskoj, odnosno atomskoj orbitali, što ih čini vrlo reaktivnom. Nezavisno od njihove stabilnosti, slobodni radikali stupaju u reakcije supstitucije, adicije, eliminacije, izomerizacije, rekombinacije i disproprijacije (slobodnoradikalske reakcije). Osim toga, učestvuju i u reakcijama koje nisu radikalske (Đukić, 2008).

Slobodni radikali se neprestano stvaraju u ljudskom organizmu, ali ih zaštitni sistemi poput enzima (glutation peroksidaza, katalaza, superoksid dismutaza), transportnih proteina i proteina koji vezuju Fe i Cu (transferin, feritin, laktoferin i ceruloplazmin) i ostalih, efikasno neutrališu i održavaju neophodnu homeostazu (Pieta, 2000).

U malim koncentracijama slobodni radikali ispoljavaju fiziološku funkciju (uključeni su u metabolizam prostaglandina, regulaciju ćelijske signalizacije, aktivaciju ćelijskih receptora, eritropoezu, fagocitozu mikroorganizama, apoptozu). Fiziološki najznačajnije RS su reaktivne vrste kiseonika i azota (ROS i RNS) (Đukić, 2008).

Preterano stvaranje slobodnih radikala, naročito ROS, dovodi do stanja tzv. "oksidativnog stresa". Tada endogeni mehanizmi nisu u stanju da efikasno neutrališu nastali višak slobodnih radikala. Jednom pokrenut lanac reakcija SR ima osobinu prostornog i vremenskog širenja uz pojačavanje efekta. Propagacija podrazumeva nastanak sekundarnih SR koji nastavljaju širenje kaskade lančanih reakcija. Slobodni radikali lako reaguju sa svim klasama biomolekula, što za posledicu ima poremećaj ćelijske morfologije, funkcije, jonske homeostaze enzimske aktivnosti (Đukić, 2008). Smatra se da je oksidativni stres značajan, ako ne i najznačajniji za nastanak i razvoj mnogih patologija (*diabetes mellitus*, HIV infekcija, autoimunih, neurodegenerativnih, koronarnih, malignih, plućnih, inflamatornih i drugih bolesti) i da su slobodni radikali deo kompleksnog patofiziološkog mehanizma oštećenja, a u pojedinim bolestima

njihovo učešće je potencirano. Takođe, smatra se da je i starenje, iako normalan fiziološki proces, posledica stvaranja i delovanja slobodnih radikala (Arouma, 1998).

S obzirom na učešće oksidativnog stresa u patogenezi mnogih poremećaja i bolesti, smatra se da egzogeno uneti antioksidansi mogu imati velikog uticaja na održavanje zdravlja ljudi, kao i samo lečenje bolesti. Osim klasičnih antioksidanasa (vitamin C, tokoferoli, karotenoidi, koenzim Q10, butilhidroksianizol - BHA, butilhidroksitoluen - BHT), velika pažnja je posvećena ispitivanju proizvoda prirodnog porekla, prvenstveno lekovitim biljkama, kao i namirnicama koje se koriste u svakodnevnoj ishrani (npr. zeleni čaj, med, žitarice, crno vino, neki začini). U cilju ispitivanja i procene njihovog antioksidantnog potencijala, kao i identifikacije sekundarnih metabolita koji su odgovorni za takvo delovanje, osmišljeni su brojni *in vitro* i *in vivo* testovi.

U okviru ove disertacije antioksidantna aktivnost suvim metanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* ispitana je kroz pet *in vitro* testova: FRAP, DPPH, TLC-DPPH, 2-dezoksiriboza i TBA test.

10.1. Ukupna antioksidativna aktivnost (FRAP test)

Ukupna antioksidantna aktivnost (UAA) je ispitana korišćenjem FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) testa, koji se zasniva na redukciji Fe^{3+} -TPTZ (Fe^{3+} -2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) kompleksa, do plavo obojenog Fe^{2+} -TPTZ oblika, čiji se intenzitet boje meri na 593 nm (Luximon-Ramma i sar., 2002).

Postupak

150 μl uzorka rastvorenog u metanolu (1 mg/ml) doda se u 4,5 ml FRAP reagensa, dobro promeša i apsorbancija meri posle 5 minuta na 593 nm, uz FRAP reagens kao slepu probu.

FRAP reagens:

- 25 ml acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6),
- 2,5 ml TPTZ rastvora (10 mM TPTZ u 40 mM HCl)
- 2,5 ml FeCl_3 (20 mM u vodi)

Rezultati se izračunavaju korišćenjem kalibracione krive dobijene pomoću rastvora FeSO₄ (100-1000 µM). Dobijene vrednosti (u nmol Fe²⁺) se preračunavaju i izražavaju kao µmol Fe²⁺/mg suvog ekstrakta (FRAP vrednost). Relativna aktivnost uzoraka se poredi sa aktivnošću L-askorbinske kiseline ili BHT.

10.2. Neutralizacija DPPH radikala (DPPH test)

U reakciji sa molekulima koji mogu da otpuste vodonikov atom, stabilni, ljubičasto obojeni DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal redukuje se u žuto obojeni DPPH-H. Smanjenje intenziteta boje se meri spektrofotometrijski na 517 nm (Cuendet i sar., 1997).

Postupak

Suvi ekstrakti su rastvoreni u metanolu (5 mg/ml). Različite zapremine metanolnih rastvora se dopune metanolom do 4 ml i tom rastvoru doda 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH. Smeše se snažno promućkaju i inkubiraju 30 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se meri na 517 nm uz metanol kao slepu probu. Kao kontrola korišćen je 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH razblažen sa 4 ml metanola.

Inhibicija DPPH radikala se izračunava prema formuli:

$$I(\%) = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100, \quad \begin{array}{l} A_k - \text{apsorbancija kontrole,} \\ A_a - \text{apsorbancija analize} \end{array}$$

Rezultati se izražavaju kao neutralizacija DPPH radikala (%) i kao SC₅₀ vrednost (µg/ml), odnosno ona koncentracija ekstrakta koja dovodi do 50% neutralizacije DPPH radikala.

10.3. TLC-DPPH test

Hromatogrami su razvijani u mobilnim fazama za razdvajanje flavonoidnih heterozida (etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda=100:11:11:26, V/V/V/V) i za razdvajanje flavonoidnih aglikona (toluen-etilacetat-mravlja kiselina=5:4:1, V/V/V), a nakon toga prskani 0,2% rastvorom DPPH u metanolu.

Hromatogrami su posmatrani odmah, nakon 15 minuta i nakon 2 sata. Pojava žutih zona ukazuje na prisustvo jedinjenja koja su nosioci „scavenging“ aktivnosti (Cuendet i sar., 1997).

10.4. Neutralizacija OH radikala (2-dezoksiriboza test)

OH radikal je jedan od najreaktivnijih slobodnih radikala, koji se normalno stvara u ljudskom organizmu. 2-Dezoksiriboza test se zasniva na razgradnji 2-dezoksiriboze podstredstvom OH radikala nastalog iz vodonik-peroksida u askorbat/Fe²⁺ indukovanoj Fentonovoj reakciji:



Nastali razgradni produkti reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) gradeći purpuno obojene komplekse sa apsorpcionim maksimumom na 532 nm (Lee i Lim, 2000).

Postupak

Svaki uzorak sadrži reagensu u količinama navedenim u Tabeli 20. Ispitivani metanolni ekstrakti su rastvoreni u metanolu i dodati u reakcionu smešu tako da njihove konačne koncentracije iznose 6,25-200 µg/ml.

Tabela 20. Reagensi u 2-dezoksiriboza testu

Reagens	Analiza	Kontrola	Slepa proba
FeCl ₃ (0,004 M)	100 µl	100 µl	-
EDTA (0,004 M)	100 µl	100 µl	-
2-dezoksiriboza (0,05 M)	200 µl	200 µl	200 µl
ekstrakt	10 µl	-	-
metanol	-	10 µl	10 µl
L-askorbinska kiselina (0,004 M)	100 µl	100 µl	-
H ₂ O ₂ (1,5%)	20 µl	20 µl	-
fosfatni pufer (pH=7,4; I=0,1)	do 4 ml	do 4 ml	do 4 ml

Uzorci se inkubiraju 1 h na 37 °C. Zatim se u svaki doda po 1 ml 2,8% TCA i po 1 ml 1% rastvora TBA u 0,05 M NaOH i smeše zagrevaju 15 minuta na 100 °C, a potom ohlade. Apsorbancija rastvora se meri na 532 nm, u odnosu na odgovarajuću slepu probu.

Neutralizacija OH radikala se izračunava prema formuli:

$$I(\%) = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100, \quad \begin{array}{l} A_k - \text{apsorbancija kontrole,} \\ A_a - \text{apsorbancija analize} \end{array}$$

Rezultati se izražavaju kao neutralizacija OH radikala (%) i kao SC₅₀ vrednost (µg/ml), odnosno ona koncentracija ekstrakta koja dovodi do 50% neutralizacije OH radikala.

10.5. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test)

U TBA testu, u prisustvu velikih koncentracija Fe²⁺ jona i vitamina C, dolazi do indukcije lipidne peroksidacije (LP) u lipozomima i propagacije reakcije, pri čemu kao krajnji produkti nastaju različiti aldehidi i ketoni. Oni sa tiobarbiturnom kiselinom (TBA) grade obojene komplekse, koji se određuju spektrofotometrijski (Afanas'ev i sar., 1989).

Priprema preparata liposoma

Liposomi su pripremljeni korišćenjem preparata "Lipotech 10" (10% lecitina). Liposomi su razblaženi destilovanom vodom i sonifikovani na ultrazvučnom kupatilu 30 minuta, tako da je konačna koncentracija lecitina 0,03 g/ml.

Postupak

Svaki uzorak sadrži reagense navedene u Tabeli 21. Suvi metanoli ekstrakti su rastvoreni u metanolu tako da njihova finalna koncentracija iznosi 12,5-250 µg/ml.

Tabela 21. Reagensi za TBA test

Reagens	Analiza	Kontrola	Slepa proba
fosfatni pufer (pH=7,4; I=0,1)	3,9 ml	3,9 ml	3,9 ml
liposomi (0,03 g/ml)	50 µl	50 µl	50 µl
FeSO ₄ (0,075 M)	20 µl	20 µl	-
ekstrakt (0,5-10%)	10 µl	-	-
metanol	-	10 µl	10 µl
L-askorbinska kiselina (0,1 M)	20 µl	20 µl	

Uzorci se inkubiraju 1 h na 37 °C. Zatim se u svaki uzorak doda po 0,2 ml 0,1 M EDTA i 1,5 ml TBA reagensa,^a a zatim se zagrevaju 15 minuta na 100 °C. Uzorci se potom ohlade i centrifugiraju 10 minuta pri 3000 ob/min. Apsorbancija supernatanta se meri na 532 nm, u odnosu na odgovarajuću slepu probu.

Inhibicija lipidne peroksidacije (LP) se izračunava prema formuli:

$$I(\%) = \frac{A_k - A_a}{A_k} \times 100, \quad \begin{array}{l} A_k - \text{apsorbancija kontrole,} \\ A_a - \text{apsorbancija analize} \end{array}$$

Rezultati se izražavaju kao inhibicija LP (%) i kao IC₅₀ vrednost (μg/ml).

^a TBA reagens: 3,75g tiobarbiturine kiseline (TBA), 150 g trihlorsirćetne kiseline (TCA) i 15,6 ml HClO₄ rastvoreno u 1000 ml destilovane vode.

11. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti^a

Antiinflamatorna aktivnost određivana je pomoću karageninskog testa inflamirane šapice pacova, jednog od najčešće korišćenih eksperimentalnih modela akutne inflamacije (Oyanagui i Sato, 1991). Subplantarna injekcija rastvora karagenina u šapicu pacova dovodi do pojave lokalne, akutne zapaljenske reakcije (stvaranje edema) koja se odvija se u tri faze (di Rosa i sar., 1971; di Rosa i Willoughby, 1971):

1. rana faza – unutar prvog sata od injiciranja karagenina
2. druga faza – tokom 60-150 minuta od injiciranja karagenina
3. treća, kasna faza – nakon 3-5 sati od injiciranja karagenina kada se postiže maksimalan inflamatorni odgovor.

Nastanak lokalnog edema posledica je delovanja različitih medijatora zapaljenja koji se oslobađaju pod dejstvom karagenina i koji povećavaju vaskularnu propustljivost i/ili krvni protok. U prvih sat vremena od injekcije karagenina dolazi do oslobađanja histamina i serotonina, a zatim i kinina; u kasnoj fazi dolazi do oslobađanja prostaglandina. Odložen nastanak edema vezan je za infiltraciju neutrofila s posledičnim oslobađanjem medijatora iz neutrofila i produkcijom slobodnih radikala (di Rosa i sar., 1971; di Rosa i Willoughby, 1971).

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni odrasli Wistar pacovi muškog pola, telesne mase od 200 do 250 g, odgajani na Farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima (sobna temperatura, dnevno-noćni ritam osvetljenja, konstantna vlažnost vazduha), smeštene u plastičnim kavezima, u grupama od 5 do 10 životinja. Pacovi su dobijali briketiranu hranu za pacove (Veterinarski zavod, Zemun) i pijaću vodovodnu vodu preko plastičnih pojilica. Pre izvođenja eksperimenta životinje su hranu i vodu imale stalno na raspolaganju. U eksperimentu su korišćene životinje koje su prethodno gladovale 18 do 20 sati, uz slobodan pristup vodi. Eksperiment je sproveden u skladu sa „Smernicama za eksperimente sa životinjama № 282-12/2002“ (Etički komitet Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Republika Srbija).

^a Odeljenje za eksperimentalnu toksikologiju i farmakologiju Instituta za toksikologiju i farmakologiju, Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

Standardna supstanca

Kao poredbena supstanca korišćen je indometacin (1, 2, 4 i 8 mg/kg), nesteroidni antiinflamatorni lek (NSAIL) koji ispoljava snažno antiinflamatorno, analgetsko i antipiretičko delovanje. Indometacin je rastvaran u dimetilsulfoksidu (DMSO) i primenjivan oralno (*p.o.*) pomoću gastrične sonde.

Postupak

Ekstrakti (50, 100 i 200 mg/kg) ili indometacin (1-8 mg/kg), rastvoreni u DMSO, primenjivani su *p.o.* pomoću gastrične sonde (tretirane životinje). Životinjama u kontrolnoj (netretiranoj) grupi primenjen je rastvarač DMSO u dozi od 1 ml/kg *p.o.* Svaka eksperimentalna grupa sastojala se od 5 do 10 životinja.

Šezdeset minuta posle primene ekstrakta, odnosno indometacina ili DMSO, u zadnju desnu šapicu pacova je ubrizgan 0,1 ml 0,5% vodenog rastvora karagenina, a u zadnju levu šapici 0,1 ml fiziološkog rastvora. Tri sata nakon injekcije karagenina, životinje su žrtvovane, šapce su im amputirane (svaki put na anatomski tačno određenom delu) i izmerene na analitičkoj vagi. Razlika u masi između desne i leve šapice tretiranih, naspram netretiranih pacova služila je kao mera postignutog antiinflamatornog efekta.

Procenat inhibicije edema šapice izračunavan je prema formuli:

$$\text{antiinflamatorna aktivnost (\%)} = \frac{\Delta k - \Delta e}{\Delta k} \times 100,$$

gde je Δk razlika u masi šapica u kontrolnoj (netretiranoj) grupi, a Δe razlika u masi šapica u eksperimentalnoj grupi. Maksimalni antiinflamatorni efekat iznosio je 100%.

Srednja efektivna antiinflamatorna doza (ED_{50}) ekstrakata i indometacina računata je po metodi Litchfielda i Wilcoxon (1949).

Statistička analiza

Statistička obrada rezultata je izvršena pomoću Mann-Whitney U-testa. Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti za $p < 0,05$.

12. Ispitivanje hepatoprotektivne aktivnosti^a

Jetra je najveći organ ljudskog organizma. Ono što je čini jedinstvenom jesu njen anatomske položaj, specifična građa i histologija (izuzetno metabolički aktivni hepatociti, neparenhimske ćelije i velika populacija imunskih ćelija). Sve to omogućava jetri da obavlja veliki broj funkcija koje su od vitalnog značaja za homeostazu organizma. U jetri se obavljaju mnogobrojni metabolički procesi: anabolizam i katabolizam aminokiselina, proteina, ugljenih hidrata, lipida i lipoproteina, metabolizam ksenobiotika, odnosno vrši detoksifikacija organizma. Osim toga, jetra je organ sa ekskretornom funkcijom (luči žuč) (Ramadori i Saile, 2005).

Oko 45% neparenhimskih ćelija jetre čine Kupferove ćelije (20%) i limfociti (25%). Ove ćelije predstavljaju veoma važan deo imunskog sistema i imaju ulogu u imunološkoj odbrani organizma od različitih antigena (patogeni, toksini, tumorske ćelije, antigeni iz hrane) koji u jetru prvenstveno dospevaju posredstvom portalnog krvotoka (Ramadori i Saile, 2005).

Jetra na prisustvo endogenih i egzogenih potencijalno štetnih supstanci (ksenobiotici) reaguje nespecifično, mehanizmima urođene imunosti i veoma često inflamatornom reakcijom. Glavni medijatori ovih procesa su citokini, koje luče različiti tipovi ćelija jetre. Jetru karakteriše i veoma velika moć regeneracije tkiva, tj. hepatocita. Čak i posle odstranjenja oko 70% tkiva (parcijalna hepatektomija), jetra je sposobna da se u potpunosti regeneriše i to kako funkcionalno tako i anatomske (Ramadori i Saile, 2005).

U savremenom društvu bolesti jetre su među najznačajnijim uzrocima morbiditeta i mortaliteta, nezavisno od rase, pola i uzrasta. Zato je pronalaženje postupaka ili lekova za prevenciju ili tretman oštećenja jetre, do kojih dovode različiti agensi, jedan od najvažnijih zadataka moderne medicine i farmacije.^b U tu svrhu do danas je razvijen veliki broj *in vivo* i *in vitro* modela eksperimentalnog oštećenja jetra koji se koriste za ispitivanje hepatoprotektivnog dejstva potencijalnih lekova.

Najčešće korišćena supstanca za izazivanje oštećenja jetre kod eksperimentalnih životinja je ugljen-tetrahlorid (CCl₄). Vrsta i obim oštećenja jetre koje prouzrokuje

^a Nacionalni centar za kontrolu trovanja, Vojnomedicinska akademija, Beograd

^b <http://www.who.int/immunization/topics/hepatitis/en/index.html> (12.07.2012.)

ugljen-tetrahlorid obuhvata široku lepezu efekata na koje se može uticati na različite načine (Weber i sar., 2003). Ugljen-tetrahlorid može biti aplikovan pre ili nakon primene supstanci, tj. izolata čiji se terapijski efekat ispituje, pa se u zavisnosti od toga, u stvari, procenjuje njihov preventivni, odnosno reparativni (terapijski, kurativni) efekat (Chandan i sar., 2007; Pradeep i sar., 2007).

U okviru ove doktorske disertacije korišćen je eksperimentalni model oštećenja jetre, pri čemu je ugljen-tetrahlorid primenjivan pre ispitivanih ekstrakata (suvi metanolni ekstrakti herbi odabranih vrsta roda *Stachys*), čime je omogućena procena njihovog reparativnog (kurativnog) efekta.

Eksperimentalne životinje

U eksperimentu su korišćeni odrasli Wistar pacovi muškog pola, stari 6-8 nedelja i telesne mase od 180-220 g, odgajani na Farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije. Životinje su držane su standardnim laboratorijskim uslovima (ciklus svetlo/tama 12 h/12 h, relativna vlažnost vazduha 30-70%), u plastičnim kavezima, u grupama od 5 do 10 životinja. Hranjene su briketiranom hranom za pacove (Veterinarski zavod, Zemun) i pojene pijaćom vodovodnom vodom preko plastičnih pojilica. Pre izvođenja eksperimenta životinje su hranu i vodu imale stalno na raspolaganju. U eksperimentu su korišćene životinje koje su prethodno gladovale 18 do 20 sati, uz slobodan pristup vodi.

Eksperiment je sproveden u skladu sa „Smernicama za eksperimente sa životinjama № 282-12/2002“ (Etički komitet Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Republika Srbija).

Postupak

Pre uvođenja u eksperimente, sve životinje, metodom slučajnog izbora, bile su podeljene u 15 eksperimentalnih grupa. Tretiranim životinjama je smeša ugljen-tetrahlorida (CCl₄) i maslinovog ulja (1:1) aplikovana subkutano (*s.c.*), jednokratno, prvog dana ispitivanja, 30 minuta pre aplikacije ispitivanih biljnih ekstrakta. Naredna četiri dana, po isteku 24 h, biljni ekstrakti su aplikovani *p.o.* u istoj dozi jednom dnevno. Tretman svih životinja obavljen je na način predstavljen u Tabeli 22.

Tabela 22. Tretman eksperimentalnih životinja

Grupa	Tretman		
Kontrola	K0	0,9% fiziološki rastvor ^a	intaktna kontrola
	K1	CCl ₄ i maslinovo ulje (1:1) ^b	pozitivna kontrola
	K3	maslinovo ulje ^b	negativna kontrola
	K2SA	SA (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
	K2SB	SB (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
	K2SP	SP (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
	K2SAD	SAD (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T1SA	CCl ₄ i maslinovo ulje (1:1) ^b +	SA (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T2SA		SA (100 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T1SB		SB (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T2SB		SB (100 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T1SP		SP (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T2SP		SP (100 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T1SAD		SAD (200 mg/kg <i>p.o.</i>)	
T2SAD		SAD (100 mg/kg <i>p.o.</i>)	

^a 1 ml/kg *p.o.*; ^b 2,5 ml/kg *s.c.*; SA – ekstrakt herbe *S. anisochila*; SB – ekstrakt herbe *S. beckeana*; SP – ekstrakt herbe *S. plumosa*; SAD – ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*

Patoanatomski pregled životinja

Žrtvovanje životinja iz svih grupa obavljeno je petog dana ispitivanja, 6 h posle poslednje aplikacije ispitivanih supstanci. Posle žrtvovanja izvršena je procena izgleda životinja po osnovnim principima spoljašnjeg (identifikacija leša, telesna građa i stanje uhranjenosti, posmortalni znaci i spoljašnji pregled leša u celini) i unutrašnjeg (skidanje kože, otvaranje i pregled trbušne duplje, otvaranje, pregled i vađenje organa grudne duplje, vađenje i pregled vratnih organa i egzenteracija i pregled organa trbušne duplje) patoanatomskog pregleda.

Priprema tkiva jetre pacova za patohistološku dijagnostiku

Posle obavljenog patoanatomskog pregleda izvršena je ekscizija jetre u celosti. Pojedinačni, patoanatomski najmarkantnije promenjeni, delovi tkiva jetre fiksirani su u 10% neutralnom formalinu tokom 7 dana. Posle završenog procesa fiksacije, uzorci tkiva su dehidrirani u alkoholu rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%), ksilolu i uklopljeni u parafin. Na kraju, parafinski isecci tkiva, debljine 1-2 μm, bojani su

hematoksilin i eozin (HE) metodom bojenja i analizirani pod mikroskopom (Olympus-2 mikroskop).

Semikvantitativna analiza patohistoloških isečaka tkiva jetre pacova

Semikvantitativno su na po 10 isečaka tkiva jetre od svake životinje, pri uveličanju 20×, određivani sledeći parametri:

- procena vrste i stepena intenziteta degenerativnih promena i zastupljenost ćelija inflamacije (degenerativne promene)
- procena intenziteta, veličine i karaktera krvarenja (vaskularne promene) (Tabela 23).

Tabela 23. Procena degenerativnih i vaskularnih promena u tkivu jetre pacova

Stepen	Vrsta patohistoloških promena	
	Degenerativne promene	Vaskularne promene
0	Sve ćelije su sa očuvanom ćelijskom membranom, citoplazmom i jedrima, koja su normalnog oblika i položaja.	Jasno izraženi kontinuirani kapilari sa neprekidnim slojem endotela i bazalne membrane i prečnikom lumena od 5 - 10 µm.
1	Pojedinačne ćelije imaju sitnozrnast izgled citoplazme, sa blagim povećanjem obima ćelije i normalnim izgledom jedra.	Blaga dilatacija malog broja krvnih sudova bez promena kontinuiteta njihovog zida,
2	U većem broju ćelija (više od 50%) uočava se blaga vakuolizacija citoplazme i nukleoplazme.	Povećan volumen krvi i jaka vazodilatacija krvnih sudova sa nagomilavanjem eritrocita (staza), praćenih hiperemijom i edemom.
3	U svim ćelijama izražena je vakuolizacija citoplazme i nukleoplazme sa piknotičnim jedrima.	Transmuralna ruptura malog broja (do 50%) krvnih sudova (blaga fokalna dijapedezna krvarenja), praćena nakupljanjem polimorfonuklearnog ćelijskog infiltrata.
4	Izražena plazmoliza i kariolizom i difuzna pojava velikog broja polimorfnog inflamatornog infiltrata koji okružuju i fagocituju grupe mrtvih ćelija.	Potpuni gubitak bazalne membrane i endotelnih ćelija velikog broja krvnih sudova (preko 50%), dijapedezna krvarenja visokog intenziteta.
5	Aktivacija i proliferacija fibroblasta, sa produkcijom vezivnog tkiva, koji okružuju mrtve ćelije.	Difuzna hemoragična infiltracija organa, sa ili bez vidljivih krvnih sudova.

Na osnovu ovih parametara za svaku grupu je, na osnovu zastupljenosti i obima patohistoloških promena, određen stepen oštećenja tkiva (SOT), a vrednosti su date u Tabeli 24.

Tabela 24. Procena oštećenja tkiva jetre pacova – stepen oštećenja tkiva (SOT)

Stepen	Vrsta patohistoloških promena
0	Normalan oblik i veličina hepatocita, homogena citoplazma i centralno položena jedra. Kapilari sa neprekidnim slojem endotela i bazalne membrane.
1	Blago povećanje obima hepatocita, citoplazma ima sitnozrnast izgled, a jedra normalnog oblika i položaja. Diskretna dilatacija krvnih sudova bez promena kontinuiteta njihovog zida.
2	Pojedinačne citoplazmatske vakuole u više od 50% hepatocita. Jedra hipohromatska. Jaka vazodilatacija krvnih sudova sa nagomilavanjem eritrocita (staza). Izražena hiperemija i edem u tkivu jetre.
3	Citoplazma hepatocita ispunjena vakuolama, jedra piknotična. Fokalna krvarenja i perivaskularno nakupljanje polimorfonuklearnog ćelijskog infiltrata.
4	Izražena plazmoliza i karioliza. Difuzna krvarenja i masivni polimorfonuklearni ćelijski infiltrati u parenhimu jetre
5	Nekroza hepatocita. Aktivacija i proliferacija fibroblasta. Hemoragična infiltracija parenhima jetre.

Priprema uzoraka krvi za određivanje nivoa enzima u krvnom serumu^c

Prilikom žrtvovanja, metodom dekapitacije, od svake jedinke pojedinačno je prikupljena celokupna krv u staklene epruvete i ostavljena da stoji 10 do 15 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci krvi su centrifugovani (Beckman centrifuga) 10 minuta na 2000 obrtaja/min. Po 1 ml izdvojenog krvnog seruma iz svake epruvete čuvan je na temperaturi zamrzavanja.

Aktivnost enzima u aspartat aminotransaminaze (AST), alanin aminotransaminaze (ALT) i alkalne fosfataze (AP) je određena spektrofotometrijski uz upotrebu komercijalnih setova za analizu (Randox Laboratories, UK). Aktivnost enzima je izražena u U/L.

^c Katedra za medicinsku biohemiju, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet.

Statistička analiza

Svi rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SD. Dobijeni podaci su analizirani primenom jednofaktorske ANOVA, uz korišćenje *post hoc* Tukey's testa. Obrada podataka izvršena je softverskom analizom eksperimentalnih podataka ("GraphPad Prism", v. 4.0).

13. Ispitivanje inhibicije enzima MAO^a

Monoamin-oksidaza (MAO) je flavoenzim smešten na spoljašnjoj membrani mitohondrija. MAO katališe oksidativnu dezaminaciju primarnih, sekundarnih i tercijarnih amina. Postoje dve izoforme ovog enzima: MAO-A i MAO-B, pri čemu MAO-A prvenstveno oksidiše serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) i noradrenalin i može se selektivno inhibisati hlorgilinom, dok MAO-B preferencijalno oksidiše feniletilamine, a selektivno ga inhibiraju selegilin i rasagilin. Dopamin i tiramin su supstrati obe forme izoenzima (Pisani i sar., 2011).

U centralnom nervnom sistemu MAO-A je smeštena ekstraneuronski, kao i u dopaminergičkim, serotonergičkim i noradrenergičkim nervnim završecima, dok je MAO-B uglavnom smešten u glija ćelijama. Glavna uloga enzima MAO-A i MAO-B je metabolizam egzogenih amina i regulacija nivoa neurotransmitera i intracelularnih rezervi neurotransmitera (Pisani i sar., 2011).

Selektivni inhibitori MAO-A se koriste u lečenju depresije, jer se smatra se da patologija depresije uključuje nedostatak serotonina (5-HT) i noradrenalina. Selektivni MAO-B inhibitori se koriste u lečenju Parkinsonove bolesti, jer su za nastanak bolesti značajni selektivni gubitak dopaminergičkih neurona u *pars compacta Substantia nigra* i smanjeni nivoi dopamina u strijatumu. U novije vreme MAO inhibitori se često spominju u kontekstu terapije neurodegenerativnih bolesti (Alchajmerova bolest, Hantingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza) (Pisani i sar., 2011).

Priprema preparata mikrozoma jetre

Mikrozomi, kao nosioci aktivnosti MAO u *in vitro* uslovima, izolovani su iz jetre pacova metodom koju su opisali Holt i saradnici (1997). Jetra je homogenizovana u 40 zapremina hladne 0,3 M saharoze pomoću električnog homogenizera. Nakon centrifugiranja homogenata (10 minuta, 1000 g, 4 °C), odvojeni su supernatanti, koji su ponovo centrifugirani (30 minuta, 10000 g, 4 °C). Odvajanje je talog sa grubo prečišćenom mitohondrijalnom frakcijom hepatocita, koji je zatim resuspendovan u 4 ml hladnog rastvora 0,3 M saharoze, pa naliven na rastvor 1,2 M saharoze (40 ml) i centrifugiran (2 h, 53000 g, 4 °C). Saharozna iz taloga je uklonjena pomoću kalijum-

^a Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Univerzitet u Beogradu.

fosfatnog pufera (200 mM K_2HPO_4 , 200 mM KH_2PO_4 , pH=7,6), a nataloženi mikrozomi su resuspendovani u 8 puta većoj zapremini istog pufera u odnosu na početnu masu tkiva (40 ml), brzo zamrznuti u tečnom azotu i čuvani na $-70\text{ }^\circ\text{C}$ do upotrebe.

Postupak

Aktivnost mikrozomalne MAO *in vitro* praćena je preko stepena razgrađivanja ^{14}C -serotonina (supstrat za MAO-A) i ^{14}C -feniletilamina (supstrat za MAO-B) (Yu i Hertz, 1982).

Osnovni rastvori metanolnih ekstrakata ispitivanih taksona roda *Stachys* su pripremljeni u 20% dimetilsulfoksidu (DMSO) i čuvani na temperaturi od $4\text{ }^\circ\text{C}$. Potrebna razblaženja su pravljena u kalijum-fosfatnom puferu (50 mM K_2HPO_4 , 50 mM KH_2PO_4 , pH=7,5) na dan eksperimenta. Eksperimenti su rađeni u dva ponavljanja, a finalne koncentracije ekstrakata su bile $1,5 \times 10^{-1}$, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} i 10^{-5} mg/ml.

Ranije pripremljeni mikrozomi su preinkubirani (10 minuta na $37\text{ }^\circ\text{C}$) sa različitim koncentracijama ispitivanih ekstrakata u kalijum-fosfatnom puferu. Ukupna zapremina smeše je bila 200 μl . Reakcija je započeta dodavanjem 50 μl supstrata i uzorci su ponovo inkubirani (10 minuta na $37\text{ }^\circ\text{C}$ za MAO-A, 3 minuta na $37\text{ }^\circ\text{C}$ za MAO-B). Po isteku inkubacije reakcija je prekinuta dodavanjem 100 μl limunske kiseline (4 M) i uzorci su prebaćeni na led. Proizvod reakcije je ekstrahovan energičnim mućkanjem sa mešavinom toluena i etilacetata (1:1) na vorteks aparatu i prebaćen u scintilacioni koktel na bazi toluena [toluen, 2,5-difeniloksazol, 1,4-bis(5-fenil-2-oksazolil)benzen]. Radioaktivnost je merena na scintilacionom brojaču. Dodavanjem limunske kiseline pre prve inkubacije inhibirana je aktivnost obe izoforme enzima i dokazano da se samo radioaktivno obeleženi proizvod reakcije ekstrahuje smešom toluena i etilacetata.

Statistička analiza

Koncentracije ekstrakata koje inhibiraju 50% aktivnosti enzima MAO (IC_{50}) određene su softverskom analizom eksperimentalnih podataka ("GraphPad Prism", v. 4.0).

14. Bihevioralna karakterizacija^a

γ -Aminobuterna kiselina (GABA) je važan inhibitorni neurotransmiter. Svoje efekte ostvaruje putem dva tipa receptora koji se nalaze na ćelijskoj membrani – jonotropnih GABA_A i metabotropnih (vezani za G-protein) GABA_B receptora (Johnston, 2005).

GABA_A receptori su pentameri, čije transmembranske podjedinice ovičavaju centralnu poru (jonski Cl⁻ kanal). Identifikovano je 16 različitih podjedinica, i s obzirom na njihove moguće različite kombinacije, jasno je da su GABA receptori veoma heterogeni i da podjedinice određuju njihovu osetljivost i farmakološka svojstva. GABA_A receptori su uglavnom smešteni postsinaptički i deluju inhibitorno, ali su neki smešteni i van sinapsi i regulišu potencijal mirovanja neurona. Zbog svega toga se smatra da su GABA_A receptori povezani sa nizom poremećaja poput anksioznosti, epilepsije, poremećaja sna i ponašanja, poremećaja raspoloženja i šizofrenije (Johnston, 2005; Rudolph i Möhler, 2006).

Putem GABA_A receptora svoje farmakološke efekte ispoljavaju različite supstance i lekovi: etanol, opšti anestetici, barbiturati, benzodiazepini. Oni se vezuju za odgovarajuća mesta na receptoru i moduliraju njegovu aktivnost. Mesto vezivanja benzodiazepina (BZD) je jedna od najvažnijih ciljnih struktura moderne farmakologije. Mnoge supstance se vezuju za benzodiazepinsko mesto na GABA_A receptoru, pozitivno ili negativno modulirajući njegovu aktivnost, i dovode do različitih farmakoloških efekata, od kojih su neki klinički veoma značajni (anksiolitičko delovanje, sedacija, hipnotički efekat) (Rowlet i sar., 2005).

Najveći broj GABA_A receptora u CNS se sastoji iz dve α , dve β i jedne γ ili δ podjedinice. Utvrđeno je da aktivacija GABA_A receptora sa $\alpha_{2/3}$ podjedinicama dovodi do anksiolitičkih efekata, receptora sa α_1 podjedinicama do sedativnih efekata, dok su efekti na učenje i pamćenje vezani za α_5 -podjedinicu GABA_A receptora. Miorelaksantni efekat i poremećaji motorike se povezuju sa α_2 , α_3 i α_5 podjedinicama ovih receptora (Johnston, 2005; Rudolph i Möhler, 2006).

S obzirom na univerzalnu uključenost GABA receptora u različite funkcije i procese u CNS-u, potenciran je i značaj svih supstanci koje imaju afinitet za vezivanje za GABA receptore i moduliranje GABA-ergičke aktivnosti. Jedan od važnih izazova

^a Katedra za farmakologiju, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet.

moderne farmakologije je identifikacija i sinteza supstanci koje bi se selektivno vezivale za pojedine podjedinice ili mesta na GABA_A receptoru, ispoljavajući „čiste“ efekte (npr. anksiolitik koji nema sedativno delovanje i ne utiče na motoriku).

Važan segment farmakoloških ispitivanja ovakvih supstanci (prirodnog ili sintetskog porekla) uključuje ispitivanja na životinjama (bihejvioralni testovi) ili *in vitro* ispitivanja na rekombinantnim GABA_A receptorima. Pri tome se koriste i različiti antagonisti (blokatori), koji omogućavaju dodatno objašnjenje ispoljenih efekata.

U ovoj disertaciji ispitivanja ekstrakata su sprovedena korišćenjem standardnih bihejvioralnih testova: ponašanje u uzdignutom plus lavirintu, test spontane lokomotorne aktivnosti i test jačine stiska, a u cilju procene njihovog anksiolitičkog, sedativnog i miorelaksantnog delovanja.

Eksperimentalne životinje

Odrasli Wistar pacovi muškog pola, mase 220-250 g, odgajani su na Farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Životinje su držane u standardnim laboratorijskim uslovima, u plastičnim kavezima, u grupama od 6 životinja, uz slobodan pristup briketiranoj hrani i vodi. Sve životinje su u eksperimentima korišćene samo jednom, osim u testu jačine stiska, koji je sproveden odmah posle praćenja spontane lokomotorne aktivnosti.

Svi eksperimenti su sprovedeni u skladu sa Direktivom 86/609 Evropske unije.

Supstance

β -CCt (*t*-butil- β -karbolin-3-karboksilat), selektivni antagonist na benzodiazepinskom mestu vezivanja GABA_A receptora koji sadrže α_1 -podjedinicu, sintetisan je na Institutu za hemiju i biohemiju Univerziteta u Viskonsinu (Department of Chemistry and Biochemistry, University of Wisconsin, Milwaukee, USA) (Cox i sar., 1995).

Bihejvioralni eksperimenti

Svi bihejvioralni testovi su sprovedeni tokom dnevne faze diurnalnog ciklusa. Ponašanje životinja je snimano kamerom postavljenom na plafon, a analizirano pomoću softvera "ANY-maze Video Tracking System software" (Stoelting Co Wood Dale, IL,

USA). Suvi metanolni ekstrakti odabranih vrsta roda *Stachys* rastvoreni su, odnosno suspendovani u pogodnom rastvaraču (destilovana voda-propilenglikol-Tween 80=85:14:1, V/V/V). Ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* su primenjeni intraperitonealno (*i.p.*) u dozama od 100, 200 i 400 mg/kg, 20 minuta pre početka testiranja.

14.1. Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu (EPM^b test)

Aparatura se sastoji iz po dva otvorena (50 × 10 cm, ivica uzdignuta 0,3 cm) i dva zatvorena kraka (50 × 10 × 40 cm), povezana centralnom kvadratnom površinom (10 × 10 cm). Na početku eksperimenta, pacov je stavljen u centar lavirinta, okrenut ka zatvorenom kraku. Ponašanje životinje je praćeno tokom 5 minuta. Kao jedan ulazak u otvoreni ili zatvoreni krak je računato kada 90% tela životinje pređe zamišljenu liniju koja deli centralni kvadrat od kraka, dok je kao izlazak računato kada više od 90% tela životinje izađe iz odgovarajućeg kraka. Analizirani su parametri vezani za anksioznost (procenat ulazaka u otvorene krake i procenat vremena provedenog u otvorenim kracima) i parametri vezani za aktivnost (ukupni pređeni put, broj ukupnih ulazaka i broj ulazaka u zatvorene krake).

U EPM eksperimentu svaki od ispitivanih ekstrakata (*S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*) primenjivan je u dozama od 100, 200 i 400 mg/kg, u poređenju sa kontrolom (rastvarač).

14.2. Merenje spontane lokomotorne aktivnosti (SLA^c test)

Aktivnost svake pojedinačne životinje, smeštene u providnim kavezima od pleksiglasa (40 × 25 × 35 cm) pod difuznim crvenim osvetljenjem (20 lux), praćena je ukupno 30 minuta, bez perioda privikavanja, uz upotrebu "ANY-maze" softvera. Praćeni su ukupan pređeni put, kao i lokomotorna aktivnost u pojedinačnim periodima od po 5 minuta. Kao centralna zona označeno je središnjih 20% površine dna kaveza

^b Eng. elevated plus maze.

^c Spontana lokomotorna aktivnost.

(200 cm²). Kao boravak u centralnoj zoni je računato ako se u toj zoni nađe najmanje 70% tela životinje i u njoj zadrži 50% površine tela.

Izvedena su tri eksperimenta. U prvom je ispitan uticaj ekstrakata (400 mg/kg) na lokomotornu aktivnost. U naredna dva eksperimenta je ispitan uticaj na lokomotornu aktivnost ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* (400 mg/kg) i *S. plumosa* (400 mg/kg), u kombinaciji sa β -CCt (20 mg/kg).

14.3. Test jačine stiska

Jačina stiska je merena pomoću odgovarajućeg komercijalnog uređaja (Ugo Basile, Milan, Italy, model 47105). Sila kojom pacov svojim prednjim šapama povlači trouglastu žicu, predstavlja meru jačine stiska u istoimenom testu. Aparat beleži jačinu povlačenja eksperimentatora (u g) neophodnu da se nadvlada stisak kojim se životinja drži. Za svaku životinju su sprovedena tri uzastopna merenja, a za statističku analizu korišćena je srednja vrednost.

U ovom testu su korišćene životinje odmah posle završenog testa za merenje spontane lokomotorne aktivnosti, a svi ekstrakti su primenjeni u dozi od 400 mg/kg.

Statistička analiza

Svi rezultati predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SD. Dobijeni podaci su analizirani primenom jednofaktorske ANOVA, uz korišćenje *post hoc* Dunnett-ovog ili Student-Newman-Keuls-ovog testa. Obrada podataka izvršena je pomoću ANY-maze Video Tracking System software (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) i SigmaStat 2.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

15. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti^a

Uprkos snažnom i brzom razvoju antibiotika, infekcije bakterijskog, gljivičnog ili virusnog porekla i dalje predstavljaju važan medicinski problem. Preterana i neracionalna primena klasičnih antibiotika dovela je do razvoja rezistencije velikog broja mikroorganizama, tako da se mogućnosti za izolaciju i sintezu novih, efikasnijih molekula stalno istražuju. Biljke su naročito zanimljive kao bogat izvor biološki aktivnih supstanci. Mnoge od njih deluju antimikrobno (Tabela 25). Biljni proizvodi su lako dostupni, ispoljavaju minimum neželjenih efekata i nisku toksičnost (Cowan,1999).

Tabela 25. Mehanizam antimikrobnog delovanja nekih sekundarnih metabolita biljaka

Tip jedinjenja	Mehanizam delovanja	Primer
Prosti fenoli i fenolkarboksilne kiseline	Inhibicija enzima	Kafena kiselina (antimikrobno delovanje na viruse, bakterije i gljivice). Eugenol deluje bakteriostatski i fungistatski.
Hinoni	Ireverzibilno vezivanje za nukleofilne aminokiseline u molekulima adhezina, polipeptidima ćelijskog zida i membranskim enzimima	
Flavonoidi	Kompleksiraju ekstracelularne proteine i komponente bakterijskog zida. Lipofilni flavonoidi imaju sposobnost razaranja ćelijskog zida.	Svercifranhezid i hrizin inhibiraju HIV. Alpinumizoflavon pri topikalnoj primeni sprečava šizostomalnu infekciju. Galangin deluje antimikrobno prema širokom spektru Gram (+) bakterija, gljivicama i virusima (naročito na HSV-1 i koksaki B virus tip I). Katehini neutrališu kolera toksin i aktivnost glukoziltransferaza izolovanih iz <i>S. mutans</i> .
Tanini	Građenje kompleksa sa proteinima, čime inaktiviraju molekule adhezina, enzima i različitih transportnih proteina bakterijske ćelije.	Tanini su toksični za filamentozne gljivice, kvasnice i bakterije. Kondenzovani tanini se vezuju za ćelijski zid ruminalnih bakterija, sprečavajući njihov rast i proteaznu aktivnost.
Kumarini	Stimulišu makrofage	Kumarin inhibira <i>C. albicans in vitro</i> .
Alkaloidi	Ugradnja u ćelijski zid i/ili DNK molekul	Berberin deluje antimikrobno na tripanozome i plazmodijum. Solamargin deluje povoljno kod infekcija HIV.
Lektini i polipeptidi	Stvaranje jonskih kanala u membrani mikroorganizma ili kompetitivna inhibicija adhezionih molekula	Tionini su deluju toksično na kvasnice, Gram (+) i Gram (-) bakterije. Veliki lektinski molekuli deluju inhibitory na proliferaciju HIV i CMV.

^a Katedra za mikrobiologiju i imunologiju, Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet.

Značajno antimikrobno delovanje ispoljavaju i etarska ulja, kompleksne mešavine isparljivih jedinjenja. Skoro sva ispitana etarska ulja ispoljavaju izvesno antimikrobno delovanje. Aktivnost zavisi od samog etarskog ulja, vrste testiranog mikroorganizma i primenjene metode, ali je skoro uvek dozno zavisna i zavisi od sastava etarskog ulja. Od praktičnog je značaja što je antimikrobni efekat etarskih ulja brz i dugotrajan (Kalemba i Kunicka, 2003).

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti koriste se najčešće agar difuzioni i bujon mikrodilucioni test. Osim toga razvijeno je i niz drugih specifičnijih metoda. Ispitivanja se uglavnom sprovode na standardnim sojevima mikroorganizama (ATCC) ili se koriste klinički izolati mikroorganizama koji izazivaju infekcije čoveka ili nekih životinja.

U ovom radu antimikrobna aktivnost metanolnih ekstrakata i izolovanih etarskih ulja ispitana je na sedam standardnih ATCC bakterijskih sojeva i jednom soju *C. albicans* korišćenjem agar difuzionog testa (Acar i Goldstein, 1996).

Sojevi mikroorganizama

Standardni bakterijski sojevi *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 29665, *Escherichia coli* ATCC 25922 i jedan soj gljivice *Candida albicans* ATCC 24433 (Institut za imunologiju i virusologiju „Torlak“, Beograd).

Standardne supstance

Za procenu aktivnosti korišćeni su antibiotici: ampicilin (10 µg/disk), amikacin (30 µg/disk) i nistatin (100 IJ/disk).

Kultivacija mikroorganizama

Sve bakterije korišćene u eksperimentu su prvo presejane u 10 ml Müller-Hinton bujona i inkubirane na 37 °C. Posle 24 h bakterije su presejane na 10 ml sveže tečne podloge, pa inkubirane 18 h. Dobijena kultura mikroorganizama je korišćena za zasejavanje agara. Isti postupak je korišćen i za *C. albicans*, ali je u tom slučaju korišćen Sabouraud bujon.

Podloge

Za ispitivanje osetljivosti bakterija i *C. albicans* agar difuzionim testom korišćeni su Müller-Hinton i Sabouraud agar (Institut za imunologiju i virusologiju „Torlak“, Beograd), redom.

15.1 Agar difuzioni test

Autoklaviran agar je razliven u Petrijeve šolje, da bi se formirao oko 4 mm debeo sloj hranljive podloge. Na očvrnutu i ohlađenu podlogu zasejan je ispitivani soj, inokulum od oko 10^6 CFU^b/ml, da bi se obezbedio semikonfluentan rast. Suvi metanolni ekstrakti su rastvoreni u metanolu (2 i 4%), a na podloge je naneto po 15 µl rastvora, što odgovara količinama od 300 i 600 µg ekstrakta. Etarska ulja su rastvorena u apsolutnom etanolu (2 i 4%), a na hranljivi agar zasejan mikroorganizmima je naneto po 15 µl rastvora etarskog ulja, što odgovara količinama od 0,3 i 0,6 µl ulja. Podloge su zatim inkubirane 18 h na 37 °C, a nakon završene inkubacije mereni su prečnici zona inhibicije rasta mikroorganizma (u mm) i rezultati poređeni sa standardnim antibioticima.

^b Colony forming unit

REZULTATI I DISKUSIJA

1. Osnovna hemijska ispitivanja

Sadržaj vlage, pepela i u kiselini nerastvorljivog pepela (SiO_2) u nadzemnim delovima u cvetu odabranih vrsta roda *Stachys* nalaze se u uobičajenim granicama koje propisuju farmakopeje i drugi stručni propisi za najveći broj biljnih lekovitih sirovina. Nešto veći sadržaj SiO_2 u *S. anisochila* i *S. beckeana* je posledica rasta ovih biljaka na staništima bogatim mineralnim materijama (krečnjak, sipar). Najveći prinos vodenog ekstrakta dala je herba *S. alpina* subsp. *dinarica* (26,92%) (Tabela 26).

Tabela 26. Rezultati osnovnih hemijskih ispitivanja

Herba	Vlaga (%)	Pepeo (%)	SiO_2 (%)	Vodeni ekstrakt (%)
<i>S. anisochila</i>	8,07	6,20	8,86	19,89
<i>S. beckeana</i>	5,10	6,19	10,98	20,95
<i>S. plumosa</i>	3,25	6,12	2,64	24,99
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	3,66	6,84	2,28	26,92

2. Kvalitativna i kvantitativna hemijska analiza**2.1. Tanini i ukupni polifenoli**

Opštim taložnim i bojenim reakcijama u ispitivanim herbama dokazano je prisustvo tanina (Tabela 27).

Tabela 27. Rezultati opštih taložnih i bojenih reakcija za dokazivanje tanina

	<i>S. anisochila</i>	<i>S. beckeana</i>	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>
želatin (10 g/l)	slabo zamućenje	vrlo slabo zamućenje	slabo zamućenje	-
strinhin-sulfat (1 g/l)	slabo zamućenje	pahuljičasto zamućenje	vrlo slabo zamućenje	-
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (100 g/l)	žutonarandžast talog	žut pahuljičast talog	pahuljičast talog	pahuljičast talog
FeCl_3 (20 g/l)	tamnozeleno boja	tamnozeleno boja	tamnozeleno boja	tamnozeleno boja

Po dodatku FeCl_3 u svim uzorcima se razvila tamnozeleno boja, što ukazuje na prisustvo kondenzovanih tanina. To je potvrđeno i tanoforskom probom.

U slučaju dekokta herbe *S. plumosa*, u filtratu posle izvođenja tanoformske probe po dodatku kristalnog natrijum-acetata i rastvora gvožđe(III)-amonijum sulfata, stvorio se plavoljubičasti prsten, a u dekoktu herbe *S. beckeana* razvilo se slabo plavoljubičasto obojenje, čime je dokazano prisustvo galnih tanina.

Rezultati određivanja tanina u herbama odabranih vrsta roda *Stachys* i ukupnih polifenola u njihovim metanolnim ekstraktima prikazani su u Tabeli 28.

Tabela 28. Sadržaj tanina u herbama i ukupnih polifenola u suvim metanolnim ekstraktima herbi

Herba/MeOH ekstrakt	Tanini (%) ^a	Ukupni polifenoli ^b
<i>S. anisochila</i>	5,72	192,16
<i>S. beckeana</i>	3,77	189,67
<i>S. plumosa</i>	1,76	65,63
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	2,49	141,53

^a u herbi, ^b µg katehin /mg suvog ekstrakta.

Najveći sadržaj tanina i kao i ukupnih polifenola utvrđen je u herbi i metanolnom ekstraktu herbe *S. anisochila*, a najniži u herbi i metanolnom ekstraktu herbe *S. plumosa*.

Hanzagy-Radnai i saradnici (2006b) su u herbama nekoliko vrsta roda *Stachys* utvrdili sadržaj tanina 1,46-8,11%. Prema rezultatima ispitivanja koje su sproveli Bilušić-Vundać i saradnici (2007), u herbama nekoliko drugih vrsta ovog roda sadržaj tanina je iznosio 0,64-2,03%. Sadržaj tanina u herbi tipske podvrste *S. alpina* [subsp. *alpina*] prema nalazima istraživanja Hanzagy-Radnai i saradnici (2006b) iznosio je 2,3%, što je veoma slično utvrđenom sadržaju tanina u herbi podvrste *S. alpina* subsp. *dinarica*. Prema rezultatima drugih autora (Bilušić-Vundać i sar., 2007) sadržaj tanina u herbi *S. alpina* [subsp. *alpina*] bio je niži (1,02%).

2.2. Flavonoidi i antocijani

U nadzemnim delovima u cvetu svih odabranih vrsta roda *Stachys* cijanidinskom reakcijom utvrđeno je prisustvo flavonoida (flavona, flavonola ili flavanonola). Wilson-Taubök-ova reakcija bila je pozitivna u slučaju *S. beckeana* (svetlozelena fluorescencija u UV svetlosti), *S. anisochila* (zelena fluorescencija u UV svetlosti) i *S. plumosa* (zelena

fluorescencija na dnevnoj i u UV svetlosti), što ukazuje na prisustvo 3- i 5-hidroksi flavona.

Rezultati određivanja flavonoida i antocijana u ispitivanim herbama ispitivanih vrsta roda *Stachys* prikazani su u Tabeli 29. Sadržaj flavonoida bio je najveći u herbi *S. anisochila* (0,65%). Prisustvo antocijana utvrđeno je samo u herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* (sadržaj je iznosio svega 0,075%).

Tabela 29. Sadržaj flavonoida i antocijana

Herba	Flavonoidi (%)	Antocijani (%)
<i>S. anisochila</i>	0,65	-
<i>S. beckeana</i>	0,27	-
<i>S. plumosa</i>	0,30	-
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	0,41	0,075

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije slični su utvrđenom sadržaju flavonoida u herbama nekoliko vrsta roda *Stachys* (0,13-0,30%, izraženo kao kvercetin) U herbi *S. alpina* [subsp. *alpina*] sadržaj flavonoida iznosio je 0,3% (Bilušić-Vundać i sar., 2007), odnosno bio je nešto niži u poređenju sa sadržajem flavonoida u herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* (0,41%, izraženo kao hiperozid) određenim u okviru ove doktorske disertacije.

2.3. Derivati hidroksicimetne kiseline

Rezultati određivanja derivata hidroksicimetne kiseline u nadzemnim delovima u cvetu odabranih vrsta roda *Stachys* prikazani su u Tabeli 30. Sadržaj ovih jedinjenja bio je najveći u herbama *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica*.

Tabela 30. Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline, izraženo kao hlorogenska kiselina, odnosno izraženo kao akteozid

Herba	Izraženo kao hlorogenska kiselina (%)	Izraženo kao akteozid (%)
<i>S. anisochila</i>	1,76 ± 0,03	1,79 ± 0,03
<i>S. beckeana</i>	3,10 ± 0,11	3,16 ± 0,11
<i>S. plumosa</i>	1,42 ± 0,13	1,45 ± 0,13
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	2,56 ± 0,15	2,62 ± 0,16

Hanzagy-Radnai i saradnici (2006a) su utvrdili da u herbama nekoliko vrsta roda *Stachys* sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline iznosi 1,31-4,59% (izraženo kao kafena kiselina). Rezultati do kojih su došli Bilušić-Vundać i saradnici (2007) ukazuju da je sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u nekim vrstama roda *Stachys* bio nešto veći - 1,65-6,37%, izraženo kao rozmarinska kiselina.

Prema ovim literaturnim podacima sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline u herbi *S. alpina* [subsp. *alpina*] iznosio je od 1,31%, izraženo kao kafena kiselina (Hanzagy-Radnai i sar., 2006a). Rezultat određivanja derivata hidroksicimetne kiseline u herbi *S. alpina* [subsp. *alpina*] do kojih su došli Bilušić-Vundać i saradnici (2007) (2,01%, izraženo kao rozmarinska kiselina) je sličniji rezultatu određivanja derivata hidroksicimetne kiseline u herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* (2,56%, izraženo kao hlorogenska kiselina) dobijenom u okviru ove doktorske disertacije.

2.4. Alkaloidi

Opštim taložnim reakcijama prisustvo alkaloida dokazano je samo u nadzemnim delovima u nadzemnim delovima u cvetu *S. anisochila* i *S. beckeana*. Sadržaj alkaloida, određen gravimetrijskim postupkom, u obe herbe bio je veoma nizak (0,102 i 0,063%, redom; Tabela 31).

Tabela 31. Rezultati ispitivanja prisustva alkaloida i njihov sadržaj

Reagens	Herba			
	<i>S. anisochila</i>	<i>S. beckeana</i>	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>
Dragendorfov reagens	svetlosmeđ talog	slabo zamućenje	-	-
Majerov reagens	svetlosmeđi talog	slabo zamućenje	-	-
Rastvor tanina	-	jako zamućenje	-	-
Pikrinska kiselina	slabožuto zamućenje	slab kristalan talog	-	-
KJ ₃	slabo zamućenje	zamućenje	-	-
Bertrandov reagens	žut talog	smeđ talog	-	-
Sadržaj (%)	0,102	0,063	-	-

3. TLC analiza

3.1. TLC analiza fenolnih jedinjenja

TLC analizom potvrđeno je da su u ispitivanim ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Stachys* glavna polifenolna jedinjenja flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline (Slike 10 i 11).

U svim ispitivanim ekstraktima najzastupljenija su jedinjenja sa R_f vrednostima 0,5-0,75 u sistemu za flavonoidne heterozide (etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda=100:11:11:26, V/V/V/V). Na osnovu R_f vrednosti i izgleda zona na dnevnoj i u UV svetlosti pre i posle derivatizacije NP-PEG reagensom može se zaključiti da se radi o flavonoidnim monozidima i biozidima.

U ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* najzastupljeniji su flavonoidi koji su na dnevnoj svetlosti žutosmeđe obojeni, dok u UV svetlosti (365 nm) gase fluorescenciju (R_f -0,46; 0,48; 0,54; 0,69; 0,71; 0,76). Nakon derivatizacije NP/PEG reagensom, boja ovih zona na hromatogramu se intenzivira i postaje žuta do žutonarandžasta, dok u UV svetlosti ove zone i dalje gase fluorescenciju. Ovo ukazuje na strukturu flavona ili 3-metoksiflavonola sa supstituentima na C6 i/ili C8.

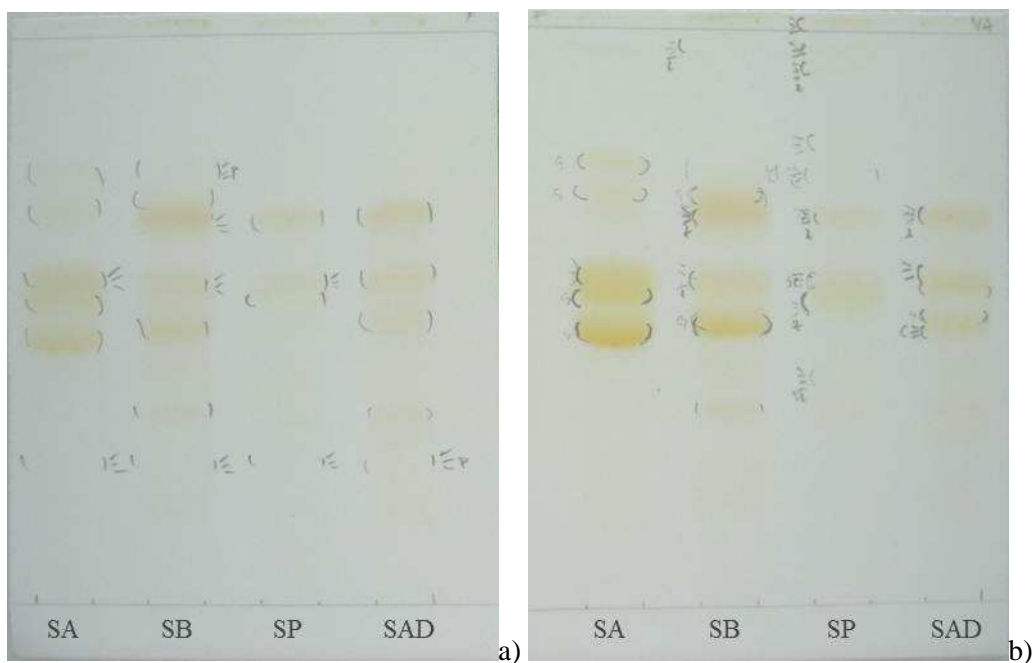
Zone koje su pre derivatizacije fluorescirale svetloplavo, a čiji se intenzitet pojačao nakon derivatizacije NP/PEG reagensom, odgovaraju najverovatnije fenolkarboksilnim kiselinama. One su teže uočljive pošto su obično prekrivene zonama flavonoida.

Na osnovu izgleda TLC hromatograma uočava se da su metanolni ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* međusobno veoma slični i istovremeno znatno drugačiji od hemijskog profila ekstrakta herbe *S. plumosa*.

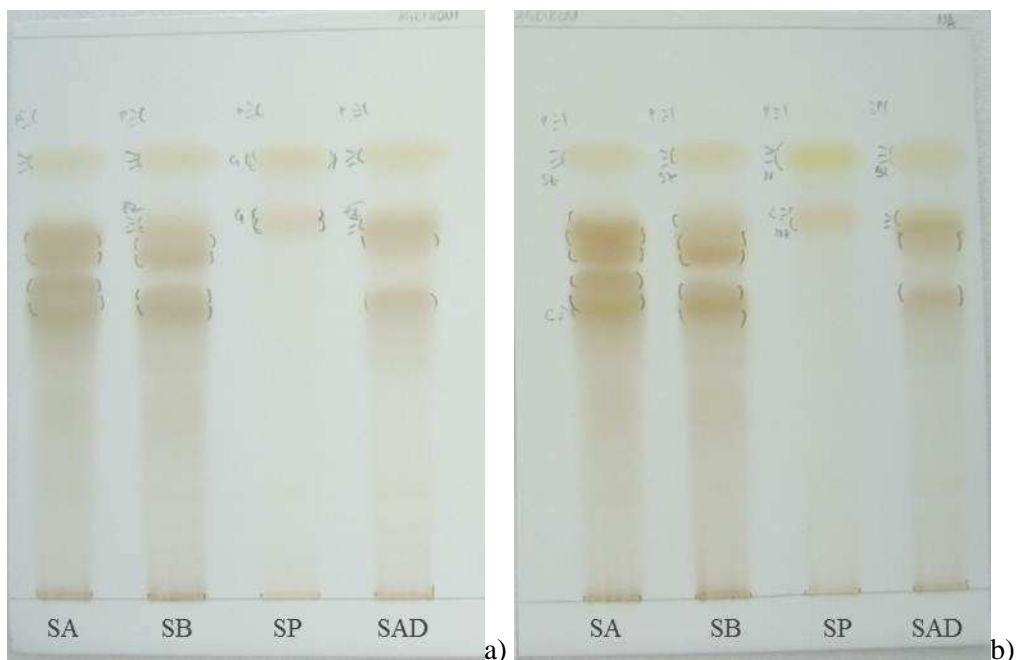
Analiza etilacetatnih frakcija metanolnih ekstrakata nakon kisele hidrolize potvrdila je uočene sličnosti i razlike u profilu fenolnih jedinjenja odabranih vrsta roda *Stachys* (Slika 11). Na TLC hromatogramima *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* u sistemu za flavonoidne aglikone (toluen-etilacetat-mravlja kiselina=5:4:1, V/V/V), prisutno je nekoliko smeđih zona (R_f -0,49-0,64), koje u UV svetlosti gase fluorescenciju pre i posle derivatizacije NP/PEG reagensom. Ove zone odgovaraju

flavonoidnim aglikonima koji su po svojoj strukturi flavoni ili 3-metoksiflavonoli sa supstituentima u položajima C6 i/ili C8.

I dosadašnja ispitivanja drugih autora pokazuju da je hemijski profil *S. plumosa* znatno drugačiji u odnosu na ostale tri ispitivane vrste (Marin i sar., 2004; Lenherr i sar., 1984a; Lenherr i Mabry, 1987; Bankova i sar., 1999; Buchwald i Czapska, 1995).



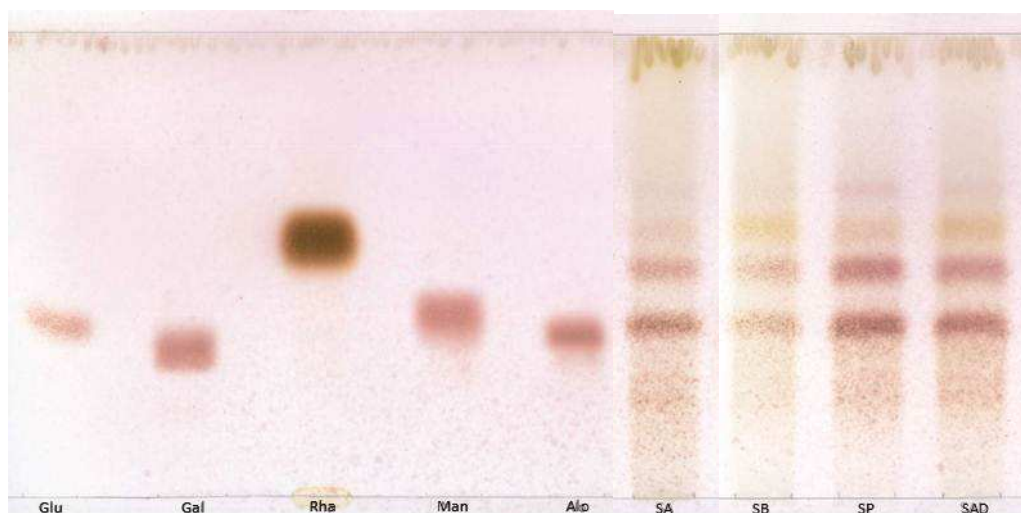
Slika 10. TLC hromatogram metanolnih ekstrakata herbi (SA – *S. anisochila*, SB – *S. beckeana*, SAD – *S. alpina* subsp. *dinarica*, SP – *S. plumosa*); mobilna faza: etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-metanol-voda=100:11:11:26 (V/V/V/V); detekcija na dnevnoj svetlosti: (a) pre derivatizacije, (b) nakon derivatizacije NP/PEG reagensom.



Slika 11. TLC hromatogram etilacetatnih frakcija metanolnih ekstrakata herbi (SA – *S. anisochila*, SB – *S. beckeana*, SAD – *S. alpina* subsp. *dinarica*, SP – *S. plumosa*) nakon hidrolize; mobilna faza: toluen-etilacetat- mravlja kiselina =5:4:1 (V/V/V); detekcija na dnevnoj svetlosti: (a) pre derivatizacije, (b) nakon derivatizacije NP/PEG reagensom.

3.2. TLC analiza monosaharida nakon kisele hidrolize

TLC analizom u vodenim frakcijama svih metanolnih ekstrakata nakon kisele hidrolize utvrđena je slična kompozicija većeg broja monosaharida, od kojih zone Rf vrednosti 0,34; 0,36 i 0,55 odgovaraju alozi, glukozi i ramnozi (Slika 12).



Slika 12. TLC hromatogram standarda monosaharida (Glu - glukoza, Gal - galaktoza, Rha - ramnoza, Man - manoz, Alo - aloza) i vodenih frakcija metanolnih ekstrakata herbi (SA – *S. anisochila*, SB – *S. beckeana*, SP – *S. plumosa*, SAD – *S. alpina* subsp. *dinarica*) nakon kisele hidrolize; mobilna faza: etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-metanol-voda=60:15:15:10 (V/V/V/V); detekcija: timol-sumporna kiselina uz zagrevanje/dnevna svetlost.

4. Identifikacija flavonoida izolovanih iz metanolnog ekstrakta herbe *Stachys alpina* subsp. *dinarica*

Iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* izolovana su tri jedinjenja: **1** (6,4 mg), **2** (1,8 mg) i **3** (2,0 mg). Njihova struktura je utvrđena analizom UV, MS, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka (Tabele 32-35; Slike 1-14 u Prilogu).

4.1. Identifikacija jedinjenja 1 (4'-*O*-metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid)

4.1.1. UV analiza

U UV spektru jedinjenja **1** u metanolu uočavaju se tri maksimuma: 278, 306 i 326 nm (Tabela 32, Slika 1 u prilogu). Maksimum na 326 nm (traka I) ukazuje na strukturu flavona (304-350 nm) (Mabry i sar., 1970). Traka II ima samo jedan maksimum, što ukazuje na prisustvo samo jedne OH grupe u B prstenu. Na prisustvo OH grupe u položaju 8 flavonoida ukazuje maksimum od 278 nm (jako batohromno pomeren traka II) (Lenherr i sar., 1984b).

4.1.2. MS analiza

Analizom masenog spektra jedinjenja **1** (Tabela 33, Slika 2 u prilogu) utvrđeno je prisustvo fragmentnog jona $m/z=665$, koji predstavlja molekulsku masu molekula umanjenu za jedinicu. Fragmentni jon $m/z=299$ potiče od molekula aglikona i predstavlja njegovu masu umanjenu za jedinicu. Prisustvo fragmentnog jona $m/z=433$ [M-180-OAc]⁻ ukazuje na prisustvo acetil grupe na molekulu terminalne heksoze.

MS analizom utvrđena je molekulaska masa jedinjenja **1** od 666, čemu odgovara molekulaska formula C₃₀H₃₄O₁₇. Masa aglikona iznosi 300 i odgovara 4'-metilizoskutelareinu.

4.1.3. NMR analiza

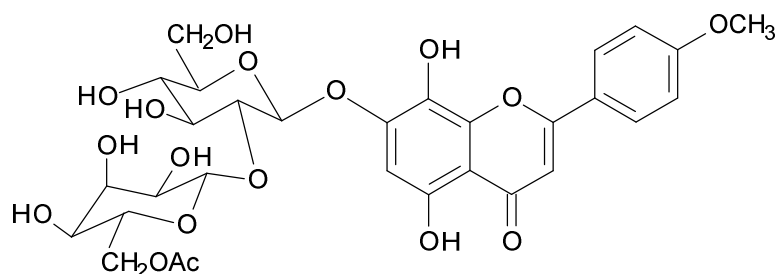
¹H NMR spektar jedinjenja **1** odgovara strukturi flavonoidnog heterozida. Signali protona aglikona nalaze se u oblasti δ 6,4-8,0 ppm, a signali protona šećera u oblasti δ 3,3-5,05 ppm (Tabela 34, Slika 3 u prilogu).

Proton H-3 daje jasan signal na δ 6,68 ppm i ukazuje na flavonsku strukturu jedinjenja. Proton H-6 daje signal na δ 6,79 ppm. Protoni H-2' i H-6' daju dublet na δ 8,01 ppm, a

protoni H-3' i H-5' na δ 7,09 ppm. Anomerni proton molekula glukoze daje dublet na δ 4,94 ppm, a molekula aloze na δ 5,06 ppm. Konstante sprezanja ($J \sim 7,4$ Hz i 8 Hz, redom) ukazuju na β -D-piranozni oblik molekula ovih šećera. Signal na δ 3,94 ppm potiče od protona metoksi grupe na C-4', a signal na δ 1,98 ppm od protona acetil grupe.

Podaci dobijeni analizom ^{13}C NMR spektara (Tabela 35) takođe ukazuju na flavonsku strukturu jedinjenja **1**: korelacija atoma u položaju 3 molekula aglikona u HSQC spektru (δ_{H} 6,68 i δ_{C} 105,0 ppm), odnosno HMBC spektru (δ_{C} 185,0 (C-4), 167,2 (C-2), 123,4 (C-1') i 108,3 (C-10); Slike 4 i 5 u prilogu) (Albach i sar., 2003; Rodríguez-Lyon i sar., 2000). Signal C-2 atoma glukoze δ 84,4 ukazuje na strukturu disaharida, u kojem je glikozidna veza ostvarena preko C-2. Na piranozni oblik šećera ukazuju signali anomernih C-1 atoma glukoze i aloze: δ 103,4 i 105,1 ppm, redom. Signal C-6 glukoze je na δ 62,9 ppm, dok signal C-6 atoma aloze na oko δ 65,8 ppm (pomeranje ka nižem polju za oko 3 ppm) ukazuje da je u pitanju 6'''-acetilalozil derivat (Lenherr i sar., 1984b).

Na osnovu rezultata UV, MS, ^1H NMR i ^{13}C NMR analize utvrđeno je da jedinjenje **1** predstavlja **4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid** (Slika 13).



Slika 13. 4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **1**)

4.2. Identifikacija jedinjenja 2 (3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid)

4.2.1. UV analiza

U UV spektru jedinjenja **2** uočavaju se četiri maksimuma: 254, 276, 302 i 340 nm (Tabela 32, Slika 6 u prilogu). Maximum trake I (340 nm) ukazuje na strukturu flavona. Na supstituciju OH grupom u položaju 8 ukazuje položaj trake II na 276 nm

(batochromno pomeranje trake II). Supstitucija OH grupom u položaju 3' molekula izoskutelareina uslovljava pojavu još jednog apsorpcionog maksimuma u traci II na 254 nm (3',4'-dihidroksi supstitucija) (Lenherr i sar., 1984b).

4.2.2. MS analiza

U masenom spektru jedinjenja **2** (Tabela 33, Slika 7 u prilogu) uočava se prisustvo fragmentnog jona $m/z=681$, koji predstavlja molekulska masu molekula umanjenu za jedinicu $[M-H]$, kao i fragmentnog jona $m/z=315$, koji potiče od molekula aglikona i predstavlja njegovu masu umanjenu za jedinicu. Prisustvo fragmentnog jona $m/z=459$ $[M-180-OAc]$ ukazuje na prisustvo acetil grupe na molekulu terminalne heksoze.

MS analizom utvrđeno je da je molekulska masa jedinjenja **2** iznosi 682, čemu odgovara molekulska formula $C_{30}H_{34}O_{18}$. Masa aglikona iznosi 316 i odgovara 3'-hidroksi-4'-metilizoskutelareinu (4'-metilhipolaetinu).

4.2.3. NMR analiza

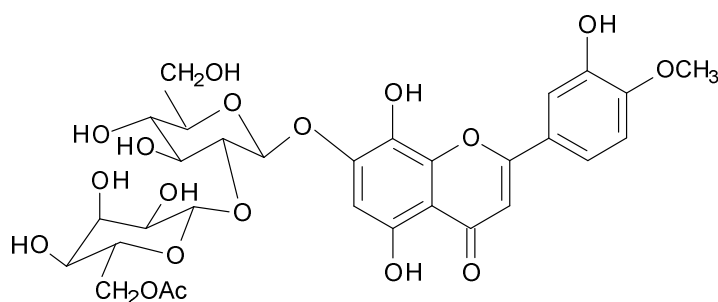
1H NMR spektar jedinjenja **2** odgovara strukturi flavonoidnog heterozida. Signali protona aglikona nalaze se u oblasti δ 6,4-8,0 ppm, a signali protona šećera u oblasti δ 3,3-5,05 ppm (Tabela 34, Slika 8 u prilogu).

Proton H-3 daje jasan signal na δ 6,64 ppm i ukazuje na flavonsku strukturu jedinjenja. Proton H-6 daje signal na δ 6,79 ppm. Tri signala na δ 7,48 ppm, 7,09 ppm i 7,58 ppm odgovaraju protonima H-2', H-5' i H-6', redom. Ovakav raspored multiplleta je karakterističan za 3',4'-*O,O*-disupstituciju u molekulu flavonoida (Albach i sar., 2003). Anomerni proton molekula glukoze daje dublet na δ 4,94 ppm, a molekula aloze na 5,07 δ ppm. Konstante sprežanja ($J \sim 7,6$ i 8,0 Hz, redom) ukazuju na β -D-piranozni oblik molekula ovih šećera. Signal na δ 3,96 ppm potiče od protona metoksi grupe na C-4', a signal na δ 2,00 ppm od protona acetil grupe.

Podaci dobijeni analizom ^{13}C NMR spektara (Tabela 35) takođe ukazuju na flavonsku strukturu jedinjenja **2**: korelacija atoma u položaju 3 molekula aglikona u HSQC spektru (δ_H 6,64 i δ_C 104,2 ppm; Slika 9 u prilogu), odnosno HMBC spektru (δ_C 184,8 (C-4), 167,2 (C-2), 122,8 (C-1') i 108,2 (C-10); Slika 10 u prilogu). Metoksi supstituciju u položaju C-4' potvrđuje korelacija δ_H 3,96 (4'-OCH₃), 7,48 (H-2') i 7,58 (H-6') sa δ_C 153,0 (C-4') (Albach i sar., 2003). Na piranozni oblik šećera ukazuju i

signali anomernih C-1 atoma glukoze i aloze: δ 103,6 i 104,8 ppm, redom. Signal C-2 atoma glukoze δ 84,1 ukazuje na strukturu disaharida, u kojem je glikozidna veza ostvarena preko C-2. Signal C-6 glukoze je na δ 62,6 ppm, dok signal C-6 atoma aloze na oko δ 65,4 ppm (pomeranje ka nižem polju za oko 3 ppm), ukazuje da je u pitanju 6'''-acetilalozil derivat (Lenherr i sar., 1984b).

Na osnovu rezultata UV, MS, ^1H NMR i ^{13}C NMR analize utvrđeno je da jedinjenje **2** predstavlja **3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid** (4'-O-metilhipolaetin 7-O-[6'''-O-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid) (Slika 14).



Slika 14. 3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **2**)

4.3. Identifikacija jedinjenja **3** (izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid)

4.3.1. UV analiza

U UV spektru jedinjenja **3** u metanolu uočavaju se tri maksimuma: 276, 306 i 326 nm (Tabela 32, Slika 11 u prilogu). Maksimum na 326 nm (traka I) ukazuje na strukturu flavona. Traka II ima samo jedan maksimum, što ukazuje na prisustvo samo jedne OH grupe u B prstenu. Na prisustvo OH grupe u položaju C8 flavonoida ukazuje maksimum od 276 nm (jako batohromno pomeranja trake II) (Lenherr i sar., 1984b).

4.3.2. MS analiza

U masenom spektru jedinjenja **3** (Tabela 33, Slika 12 u prilogu) uočava se prisustvo fragmentnih jona $m/z=651$ i $m/z=285$, koji predstavljaju molekulske mase molekula

odnosno aglikona umanjene za jedinicu. Prisustvo fragmentnog jona $m/z=429$ [M-180-OAc] ukazuje na prisustvo acetil grupe na molekulu terminalne heksoze.

Na osnovu analize MS podataka utvrđeno je da molekulska masa jedinjenja **3** iznosi 652, čemu odgovara molekulska formula $C_{29}H_{32}O_{17}$. Masa aglikona iznosi 286 i odgovara izoskutelareinu.

4.3.3. NMR analiza

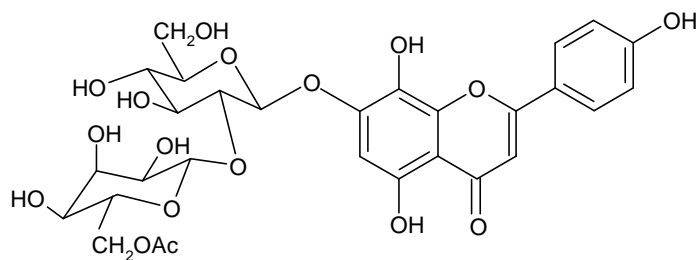
1H NMR spektar jedinjenja **3** odgovara strukturi flavonoidnog heterozida. Signali protona aglikona nalaze se u oblasti δ 6,4-8,0 ppm, a signali protona šećera u oblasti δ 3,3-5,05 ppm (Tabela 34, Slika 13 u rilogu).

Jasan signal na δ 6,55 ppm potiče od protona H-3 i ukazuje na flavonsku strukturu jedinjenja. Proton H-6 daje signal na δ 6,73 ppm. Protoni H-2' i H-6' daju dublet na δ 7,86 ppm, a protoni H-3' i H-5' na δ 6,90 ppm. Anomerni proton molekula glukoze daje dublet na δ 4,92 ppm, a molekula aloze na 5,04 δ ppm. Konstante sprezanja ($J \sim 7,4$ i 8,0 Hz, redom) ukazuju na β -D-piranozni oblik molekula ovih šećera. Signal na δ 2,00 ppm potiče od protona acetil grupe. 1H NMR podaci jedinjenja **3** u skladu su sa literaturnim podacima za izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1 \rightarrow 2)]-glukopiranozid (Albach i sar., 2003; Rodríguez-Lyon i sar., 2000).

Podaci dobijeni analizom ^{13}C NMR spektara (Tabela 35) takođe ukazuju na flavonsku strukturu jedinjenja **1**: korelacija atoma u položaju 3 molekula aglikona u HMBC spektru (δ_c 185,0 (C-4), 167,2 (C-2), 123,6 (C-1') i 108,2 (C-10); Slika 14 u prilogu) (Albach i sar., 2003).

Signal C-2 atoma glukoze δ 84,5 ukazuje na strukturu disaharida, u kojem je glikozidna veza ostvarena preko C-2. Na piranozni oblik šećera ukazuju signali anomernih C-1 atoma glukoze i aloze: δ 103,4 i 104,7 ppm, redom. Signal C-6 glukoze je na δ 62,8 ppm, dok signal C-6 atoma aloze na oko δ 65,5 ppm (pomeranje ka nižem polju za oko 3 ppm), ukazuje da je u pitanju 6'''-acetilalozil derivat (Lenherr i sar., 1984b).

Na osnovu rezultata UV, MS, 1H NMR i ^{13}C NMR analize utvrđeno je da jedinjenje **3** predstavlja **izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranzil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid** (Slika 15).



Slika 15. Izooskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje 3)

Tabela 32. UV maksimumi (u metanolu) jedinjenja 1-3

	Jedinjenje 1	Jedinjenje 2	Jedinjenje 3
Traka I	306 ^{sh} , 326	302 ^{sh} , 340	306 ^{sh} , 326
Traka II	278	254, 278	276

Tabela 33. MS podaci za jedinjenja 1-3 (negativni joni)

	Jedinjenje 1	Jedinjenje 2	Jedinjenje 3
Fragment	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>	<i>m/z</i>
[A-H] ⁻	299	315	285
[M-180-OAc] ⁻	443	459	429
[M-H] ⁻	665	681	651

Tabela 34. ¹H NMR podaci (hemijsko pomeranje, multiciplet, konstante sprezanja) za jedinjenja 1-3

	Atom	Jedinjenje 1	Jedinjenje 2	Jedinjenje 3
Aglikon	3	6,68 <i>s</i>	6,64 <i>s</i>	6,55 <i>s</i>
	6	6,79 <i>s</i>	6,79 <i>s</i>	6,73 <i>s</i>
	2'	8,01 <i>d</i> (8,9)	7,48 <i>d</i> (2,3)	7,86 <i>d</i> (8,9)
	3'	7,09 <i>d</i> (8,9)		6,90 <i>d</i> (8,9)
	5'	7,09 <i>d</i> (8,9)	7,09 <i>d</i> (8,7)	6,90 <i>d</i> (8,9)
	6'	8,01 <i>d</i> (8,9)	7,58 <i>dd</i> (8,6; 2,3)	7,86 <i>d</i> (8,9)
	OCH ₃	3,94 <i>s</i>	3,96 <i>s</i>	
Glukoza	1''	4,94 <i>d</i> (8,0)	4,94 <i>d</i> (8,0)	4,92 <i>d</i> (8,0)
	2''-6''	3,50-3,94 <i>m</i>	3,50-3,94 <i>m</i>	3,50-3,94 <i>m</i>
Aloza	1'''	5,06 <i>d</i> (7,4)	5,07 <i>d</i> (7,6)	5,04 <i>d</i> (7,4)
	2'''-6'''	3,45-4,35 <i>m</i>	3,45-4,33 <i>m</i>	3,45-4,35 <i>m</i>
OAc		1,98 <i>s</i>	2,00 <i>s</i>	2,00 <i>s</i>

Tabela 35. ^{13}C NMR podaci (hemijska pomeranja) za jedinjenja 1-3

	Atom	Jedinjenje 1	Jedinjenje 2	Jedinjenje 3
Aglikon	2	167,2	167,2	167,2
	3	105,0	104,2	104,2
	4	185,0	184,8	185,0
	5	152,4	152,5	152,4
	6	102,5	102,5	102,2
	7	154,5	154,3	154,5
	8	130,2	130,4	130,2
	9	145,7	145,8	145,9
	10	108,3	108,2	108,2
	1'	123,4	122,8	123,6
	2'	130,4	115,0	130,3
	3'	116,2	146,5	117,5
	4'	163,9	153,0	163,5
	5'	116,5	113,0	117,5
	6'	130,4	121,1	130,3
	Glukoza	OCH ₃	56,6	57,0
1''		103,5	103,6	103,4
2''		84,4	84,1	84,5
3''		78,0	78,1	78,0
4''		71,0	71,2	71,3
5''		79,0	79,1	79,0
Aloza	6''	62,9	62,6	62,8
	1'''	105,1	104,8	104,7
	2'''	73,6	73,5	73,6
	3'''	73,0	73,0	73,1
	4'''	69,0	68,7	69,0
	5'''	73,9	73,9	73,9
OAc	6'''	65,8	65,4	65,5
		21,4	21,4	21,3
		174,2	174,0	173,5

Sva tri izolovana flavonska heterozida su prvi put identifikovana u *S. alpina* subsp. *dinarica*.

4'-*O*-Metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje 1) su prvi put izolovali Chari i saradnici (1981) iz nadzemnog dela vrste *Veronica filiformis* Sm. (Scrophulariaceae). U okviru roda *Stachys* ovaj flavonoid je identifikovan u nadzemnim delovima vrsta *S. recta* (Lenherr i sar., 1984b; Karioti i sar.,

2010), *S. atherocalyx*, *S. baldaccii*, *S. labiosa*, *S. subcrenata*, *S. leucoglossa*, *S. menthifolia*, *S. annua*, *S. angustifolia* (Lenherr i sar., 1984a), *S. plumosa*, *S. germanica*, *S. sylvatica*, *S. thracica* (Bankova i sar., 1999), *S. anisochila* (Marin i sar., 2004; Lenherr i Mabry, 1987), *S. ionica* (Meremeti i sar., 2004), *S. corsica* (Serilli i sar., 2005) i *S. lanata*^a (Murata i sar., 2008).

3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid (jedinjenje **2**) prvi put je izolovan iz listova *S. recta* (Lenherr i sar., 1984b). Kasnije je takođe identifikovan i u nadzemnim delovima vrsta *S. anisochila* (Lenherr i sar., 1984a; Lenherr i Mabry, 1987), *S. annua*, *S. atherocalyx*, *S. subcrenata*, *S. labiosa*, *S. beckeana*, *S. baldaccii*, *S. parolinii*, *S. leucoglossa* (Lenherr i sar., 1984a) i *S. lanata*^a (Murata i sar., 2008).

Izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid (jedinjenje **3**) prvi put je takođe izolovan iz listova *S. recta* (Lenherr i sar., 1984b), a potom i iz nadzemnih delova drugih vrsta ovog roda: *S. anisochila* (Lenherr i sar., 1984a; Lenherr i Mabry, 1987; Marin i sar., 2004), *S. atherocalyx*, *S. beckeana*, *S. baldaccii*, *S. labiosa*, *S. subcrenata*, *S. leucoglossa*, *S. parolinii*, *S. tetragona*, *S. menthifolia*, *S. annua*, *S. angustifolia* (Lenherr i sar., 1984a), *S. aegyptiaca* (El-Ansari i sar., 1991), *S. ionica* (Meremeti i sar., 2004), *S. plumosa* (Marin i sar., 2004), *S. corsica* (Serilli i sar., 2005), kao i iz korena endemične vrste *S. mialhesi* (Laggoune i sar., 2011a).

Flavonoidi ovog tipa su osim u vrstama roda *Stachys*, identifikovani i u vrstama rodova *Sideritis*, *Veronica* i *Galeopsis*.

U literaturi postoje podaci o farmakološkoj aktivnosti ova tri flavonoida izolovana iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*.

Utvrđeno je da snažno neutrališu DPPH radikal: SC₅₀ vrednosti za jedinjenja **1**, **2** i **3** iznose 11,1, 11,4 i 6,6 µg/ml, redom (Uriarte-Pueyo i Calvo, 2010). Za jedinjenja **2** i **3** ustanovljeno je da deluju antiinflamatorno i antinociceptivno (Güvenç i sar., 2010). Za 3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid (jedinjenje **2**) utvrđeno je da deluje neuroprotektivno i kao inhibitor acetilholin-esteraze, pa se smatra da bi mogao biti potencijalni kandidat za lek za Alchajmerovu bolest (Uriarte-Pueyo i Calvo, 2010).

^a sinonim za *S. byzantina*

5. HPLC-UV i HPLC-MS analiza

5.1. Metanolni ekstrakt herbe *S. anisochila*

U metanolnom ekstraktu herbe *S. anisochila* glavnu frakciju činili su flavonoidi (oko 52%) - heterozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata. Svih 9 prisutnih flavonoidnih heterozida su 7-O-biozidi: alozilglukozidi, acetilalozilglukozidi i diacetilalozilglukozidi. Među njima najzastupljeniji su bili izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F4**) (25,97%), 3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F5**) (11,99%) i hipolaetin 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F3**) (6,08%). Hipolaetin 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid i izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid su po prvi put identifikovani, pored sedam ranije identifikovanih 7-O-heterozida izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata (Lenherr i sar., 1984a; Lenherr i Mabry, 1987; Marin i sar., 2004). Prisustvo apigenin 7-O-*p*-kumaroilglukozida, prethodno detektovanog u ekstraktu herbe *S. anisochila* (Marin i sar., 2004), u okviru ove doktorske disertacije nije ustanovljeno.

Od fenolkarboksilnih kiselina prvi put je identifikovana hlorogenska (12,57%) i detektovana jedna dikafeoilhina kiselina (1,54%).

Takođe, po prvi put su identifikovani feniletanski heterozidi akteozid (1,09%) i lavandulifoliozid (u tragovima) (Slika 16, Tabela 36).

5.2. Metanolni ekstrakt herbe *S. beckeana*

U metanolnom ekstraktu herbe *S. beckeana* najzastupljenija klasa jedinjenja bili su flavonoidni heterozidi (oko 22%). Svih 11 detektovanih jedinjenja ove klase su 7-O-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata. Identifikovano je 8 flavonoidnih heterozida, a među njima su zastupljeni alozilglukozidi, acetilalozilglukozidi i diacetilalozilglukozidi. Glavni su 3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F5**) (5,95%), hipolaetin 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F3**) (5,42%) i izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F4**) (4,13%). Lenherr i saradnici (1984a) su ranije takođe identifikovali izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-

glukopiranozid i 4'-O-metilhipolaetin 7-O-[6'''-O-acetilalopiranozil-(1→2)]-glukopiranozid, dok je prisustvo ostalih 6 flavonoidnih heterozida u okviru ove doktorske disertacije utvrđeno po prvi put.

Takođe, po prvi put u ovoj vrsti identifikovana je hlorogenska kiselina (6,33%). Detektovano je 7 feniletanskih heterozida, od kojih su identifikovani, i to po prvi put, akteozid, izoakteozid, lavandulifoliozid i martinozid. Najzastupljeniji je bio akteozid (9,07%). Tri su zastupljena u koncentraciji manjoj od 1% (identifikovani su lavandulifoliozid - 0,84%, i izoakteozid - 0,65%), a dva u tragovima (identifikovan je martinozid) (Slika 17, Tabela 37).

5.3. Metanolni ekstrakt herbe *S. plumosa*

Flavonoidna frakcija metanolnog ekstrakta herbe *S. plumosa* bitno se razlikuje od flavonoidne frakcije ekstrakata herbi ostalih odabranih vrsta roda *Stachys*. Detektovano je 8 flavonoidnih heterozida: tri 7-O-biozida hrizoeriola i pet monozida apigenina.

Od biozida hrizoeriola dva su identifikovana: hrizoeriol 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (stahispinozid), koji je ujedno i glavni flavonoid u ekstraktu (10,74%), i njegov dezacetil analog. Stahispinozid je prvi put izolovan iz herbe *S. spinosa* (Kotsos i sar., 2001). Kasnije je identifikovan i u herbi *S. bombycina* (Delazar i sar., 2005a) i kao dominantan flavonoid u tri podvrste *S. swainsonii* (*S. s.* subsp. *melangavica*, *S. s.* subsp. *scyronica* i *S. s.* subsp. *swainsonii*) (Skaltsa i sar., 2007). U *S. plumosa* ranije je takođe utvrđeno prisustvo jednog jedinjenja ovog tipa – hrizoeriol 7-O-acetilalozilglukozida (Marin i sar., 2004).

Šećernu komponentu svih monozida apigenina čini esterifikovana heksoza. Dominiraju *p*-E-kumaroil derivati; od 4 detektovana jedinjenja, identifikovana su dva: apigenin 7-O-(6''-*p*-E-kumaroil)-glukopiranozid i apigenin 7-O-(3''-*p*-E-kumaroil)-glukopiranozid. Takođe, detektovan je i jedan acetilheksozid, ali njegova tačna struktura nije utvrđena. Prethodno je u *S. plumosa* utvrđeno prisustvo jednog jedinjenja ovog tipa – apigenin 7-O-acetilalozilglukozida (Marin i sar., 2004).

U ekstraktu herbe *S. plumosa* heterozidi izoskutelareina i hipolaetina (4'-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid i izoskutelarein 7-O-acetilalozilglukozid) i luteolin 7-O-glukozida, čije je prisustvo prethodno utvrđeno u

ovoj vrsti od strane drugih autora (Bankova i sar., 1999; Marin i sar., 2004), u okviru ove doktorske disertacije nisu detektovani.

Od fenolkarboksilnih kiselina po prvi put u ovoj vrsti detektovana je samo hlorogenska (3,57%).

Detektovano je 8 feniletanskih heterozida, od kojih su identifikovani akteozid, izoakteozid, lavandulifoliozid i martinozid. Akteozid je najzastupljeniji (2,69%), dok su ostali prisutni u koncentraciji manjoj od 1% ili u tragovima (Slika 18, Tabela 38). Prema dostupnim literaturnim podacima u ekstraktu herbe *S. plumosa* ranije su identifikovani feniletanski heterozidi: akteozid, martinozid i forzitozid B (Bankova i sar., 1999). U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktu herbe *S. plumosa* prvi put su identifikovani lavandulifoliozid i izoakteozid, dok prisustvo forzitozida B nije utvrđeno.

5.4. Metanolni ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*

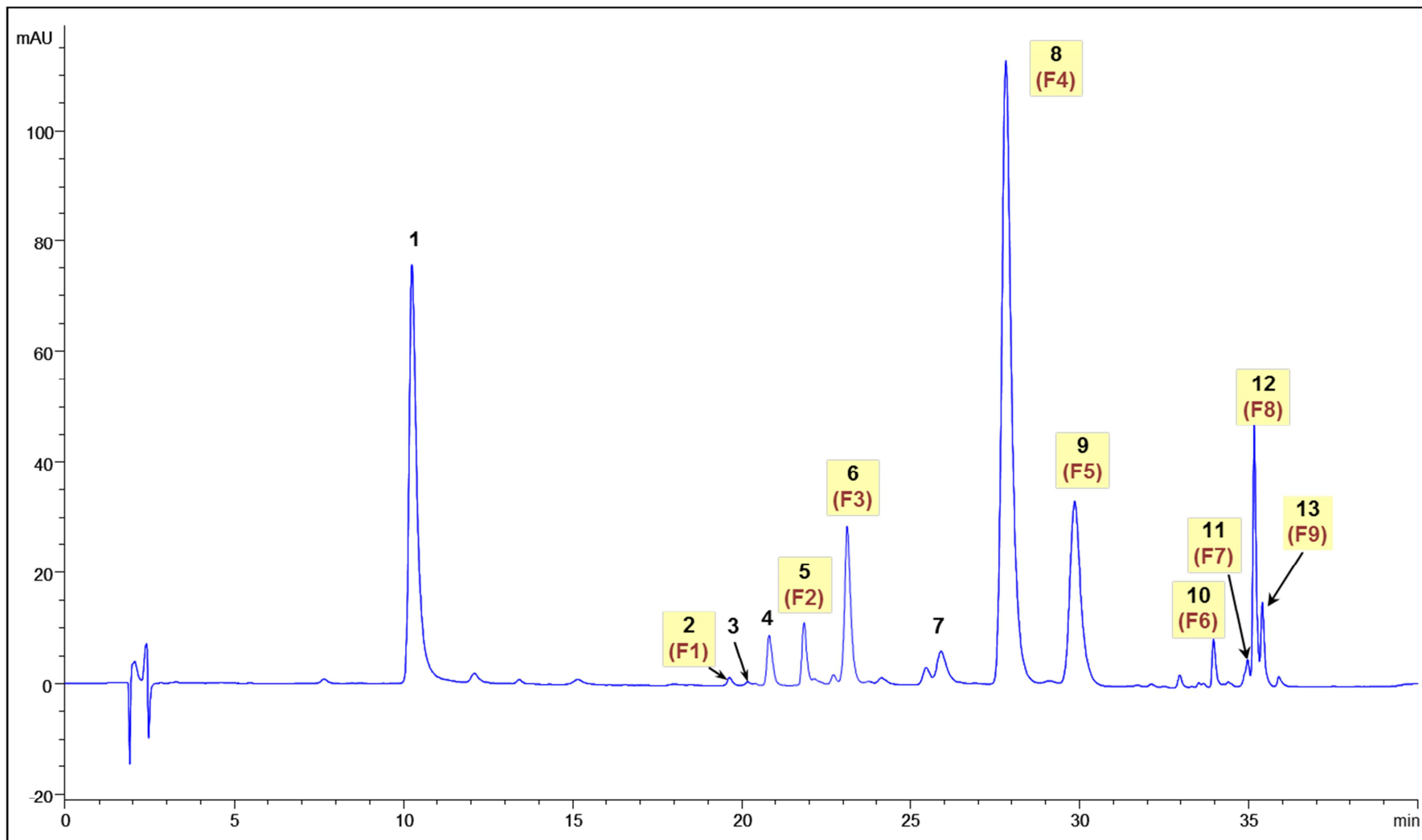
U metanolnom ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* detektovano je ukupno 14 flavonoidnih heterozida. Devet identifikovanih flavonoida čine ujedno i glavnu frakciju (preko 9,6%) i svi su 7-O-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata: alozilglukozidi, acetil- i diacetilalozilglukozidi. Najzastupljeniji je izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F4**) (4,08%). U ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* detektovana su i dva 7-O-diheksozida luteolina, od kojih je šećerna komponenta jednog acetilovana.

Od fenolkarboksilnih kiselina prisutne su hlorogenska (3,17%) i jedan derivat ferula kiseline.

Detektovano je 7 feniletanskih heterozida, od kojih su identifikovani akteozid, betoniozid E, lavandulifoliozid, leukoskeptozid A i martinozid. Najzastupljeniji je akteozid (3,97%), dok su ostali prisutni u koncentraciji manjoj od 1% (betoniozid E - 0,78%, lavandulifoliozid - 0,78%, leukoskeptozid A - 0,53%) ili u tragovima (Slika 19, Tabela 39).

Ranijim ispitivanjima je u herbi tipske podvrste *S. alpina* [subsp. *alpina*] utvrđeno prisustvo tri flavonska heterozida: 7-O-acetilalozilglukozida izoskutelareina, hipolaetina i 4'-metilhipolaetina (Marin i sar., 2004) i fenolkarboksilnih kiselina: kafene, sinapinske, protokatehinske (Ross i Zinchenko, 1975), hlorogenske (Ross i Zinchenko,

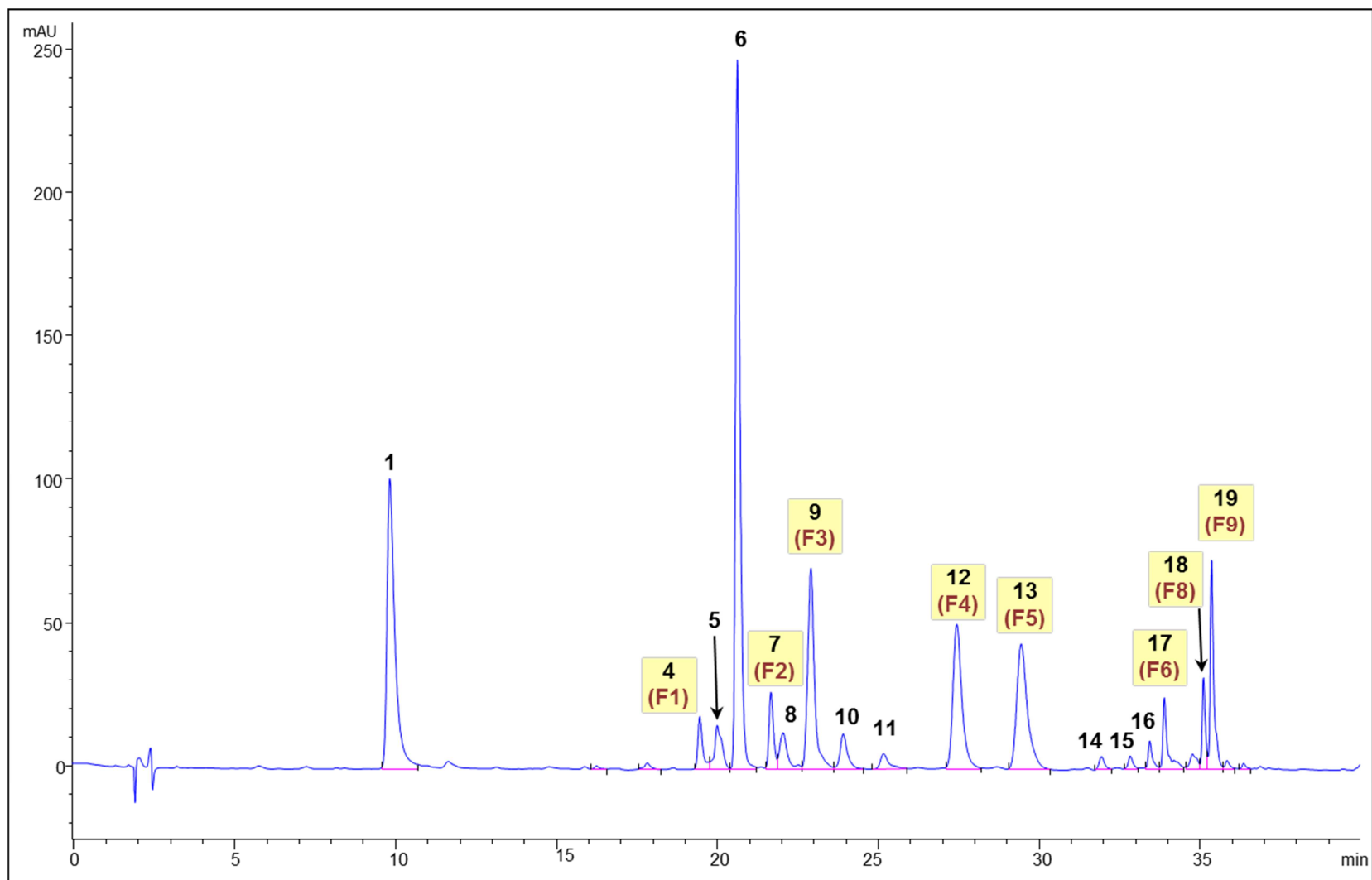
1975; Buchwald i Czapska, 1995; Bilušić Vundać i sar., 2005) i rozmarinske (Ross i Zinchenko, 1975; Czigle i sar., 2007).



Slika 16. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *S. anisochila* ($\lambda=330$ nm)

Tabela 36. Jedinjenja detektovana u ekstraktu herbe *S. anisochila*

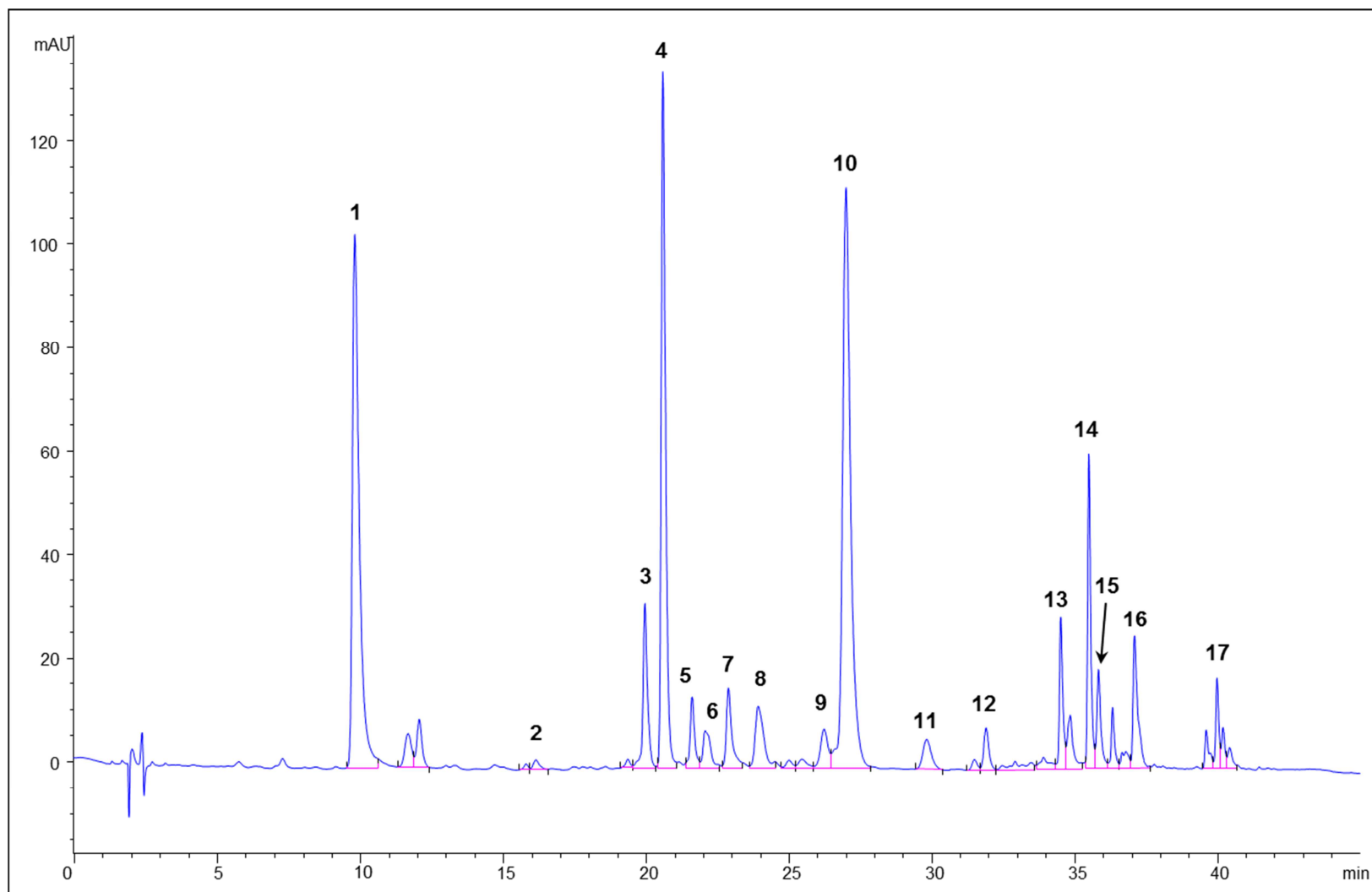
	Rt (min)	Jedinjenje	UV maksimumi (nm)	MS podaci (negativni mod)
1	10,2	Hlorogenska kiselina	298, 324	179, 191, 353 [M-H] ⁻
2	19,6	Hipolaetin 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F1)	255, 277, 301, 337	301, 625 [M-H] ⁻
3	20,2	Lavandulifoliozid	291, 328	593 [M-kafeoil] ⁻ , 607, 623, 755 [M-H] ⁻
4	20,9	Akteozid	291, 330	623 [M-H] ⁻
5	21,8	Izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F2)	278,306, 326	285, 429 [M-180] ⁻ , 609 [M-H] ⁻
6	23,1	Hipolaetin 7-O-[6'''-acetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F3)	254, 276, 300, 340	301, 667 [M-H] ⁻
7	26,0	Dikafeoilhina kiselina	298, 328	135,191, 191, 353, 515 [M-H] ⁻
8	27,8	Izoskutelarein 7-O-[6'''-acetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F4)	276, 306, 326	285 [A-H], 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
9	29,9	3'-Hidroksi-4'-O- metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F5)	254, 277, 300, 336	315 [A-H] ⁻ , 459 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-H] ⁻
10	34,0	Hipolaetin 7-O-[6'', 6'''-diacetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F6)	255, 276, 302, 340	301, 709 [M-H] ⁻
11	35,0	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F7)	279, 307, 325	299, 665 [M-H] ⁻
12	35,2	Izoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F8)	277, 306, 325	285, 693 [M-H] ⁻
13	35,4	3'-Hidroksi-4'-O- metilizoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F9)	255, 277, 301, 336	315, 501 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-OAc] ⁻ , 723 [M-H] ⁻



Slika 17. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *S. beckeana* ($\lambda=330$ nm)

Tabela 37. Jedinjenja detektovana u ekstraktu herbe *S. beckeana*

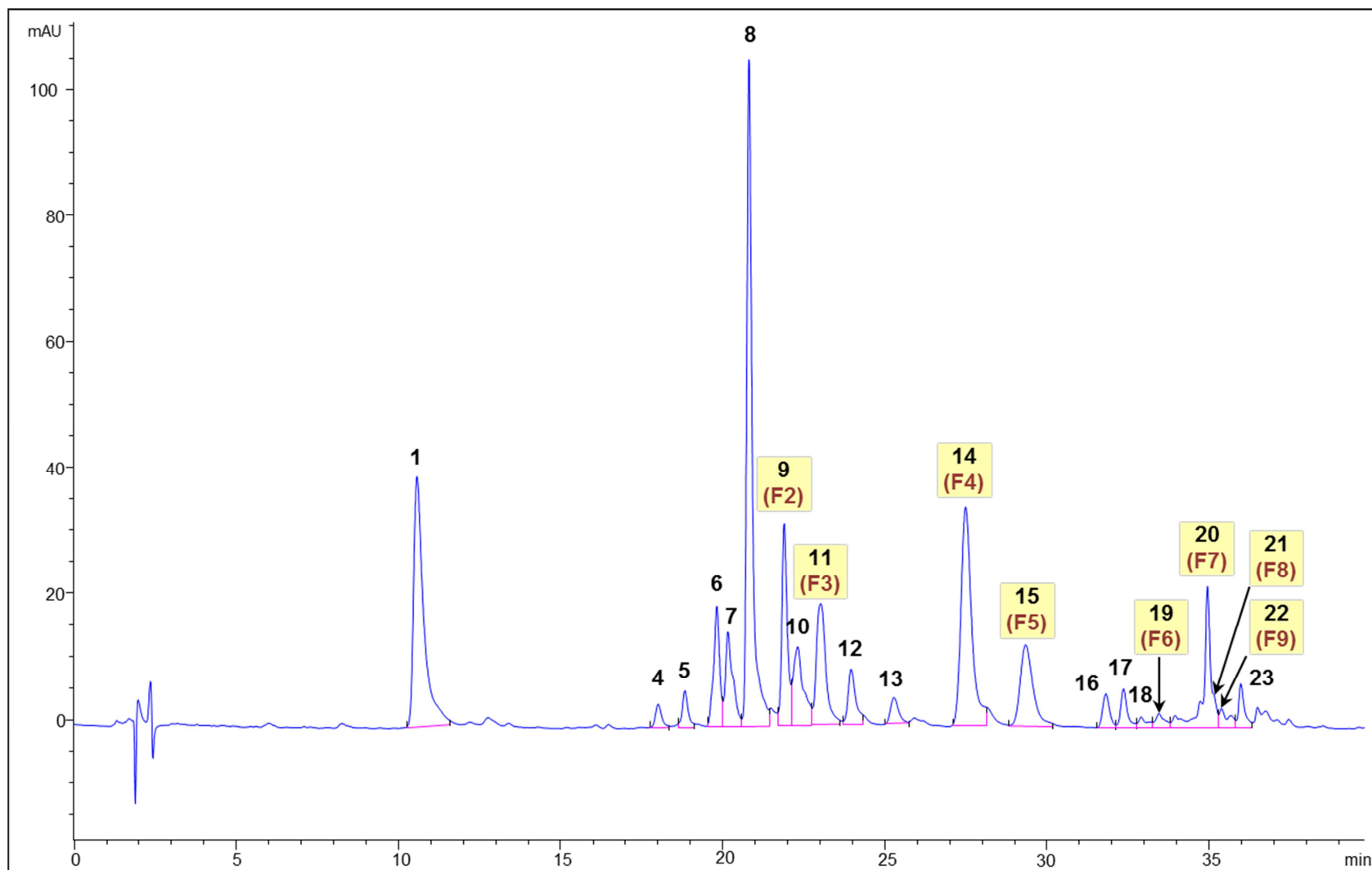
Rt (min)	Jedinjenje	UV maksimumi (nm)	MS podaci (negativni mod)	
1	9,8	Hlorogenska kiselina	298, 324	179, 191, 353 [M-H] ⁻
2	16,3	Feniletanski heterozid	292, 328	161, 621 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 639 [M-H] ⁻
3	16,6	Feniletanski heterozid	292, 328	161, 621 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 639 [M-H] ⁻
4	19,5	Hipolaetin-7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F1)	255, 277, 301, 337	301, 445 [M-180] ⁻ , 463 [M-162] ⁻ , 625 [M-H] ⁻
5	20,0	Lavandulifoliozid	291, 328	593 [M-kafeoil] ⁻ , 607, 623, 755 [M-H] ⁻
6	20,6	Akteozid	291, 330	623 [M-H] ⁻
7	21,7	Izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F2)	278,306, 326	285, 429 [M-180] ⁻ , 609 [M-H] ⁻
8	22,0	Izoakteozid	254, 268, 348	161, 461, 623 [M-H] ⁻
9	22,9	Hipolaetin 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F3)	255, 277, 299, 338	301, 667 [M-H] ⁻
10	23,9	Feniletanski heterozid	291, 330	175, 193 [feruloil] ⁻ , 461, 593 [M-feruloil-pentoza] ⁻ , 637, 769 [M-H] ⁻
11	25,2	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 12)	276, 306, 326	285 [A-H], 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
12	27,4	Izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F4)	276, 306, 326	285 [A-H], 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
13	29,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein-7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F5)	254, 277, 300, 336	315 [A-H] ⁻ , 459 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-H] ⁻
14	31,9	Martinozid	286, 330	175, 651 [M-H] ⁻
15	32,8	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 12)	278, 304, 326	285 [A-H], 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
16	33,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O- acetildiheksozid (izomer jedinjenja 13)	254, 277, 300, 336	315 [A-H] ⁻ , 459 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-H] ⁻
17	33,9	Hipolaetin 7-O-[6'', 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F6)	256, 276, 300, 342	301, 709 [M-H] ⁻
18	35,1	Izoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F8)	278, 306, 326	285, 693 [M-H] ⁻
19	35,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F9)	255, 278, 300, 338	315, 501 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-OAc] ⁻ , 723 [M-H] ⁻



Slika 18. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *S. plumosa* ($\lambda=330$ nm)

Tabela 38. Jedinjenja detektovana u ekstraktu herbe *S. plumosa*

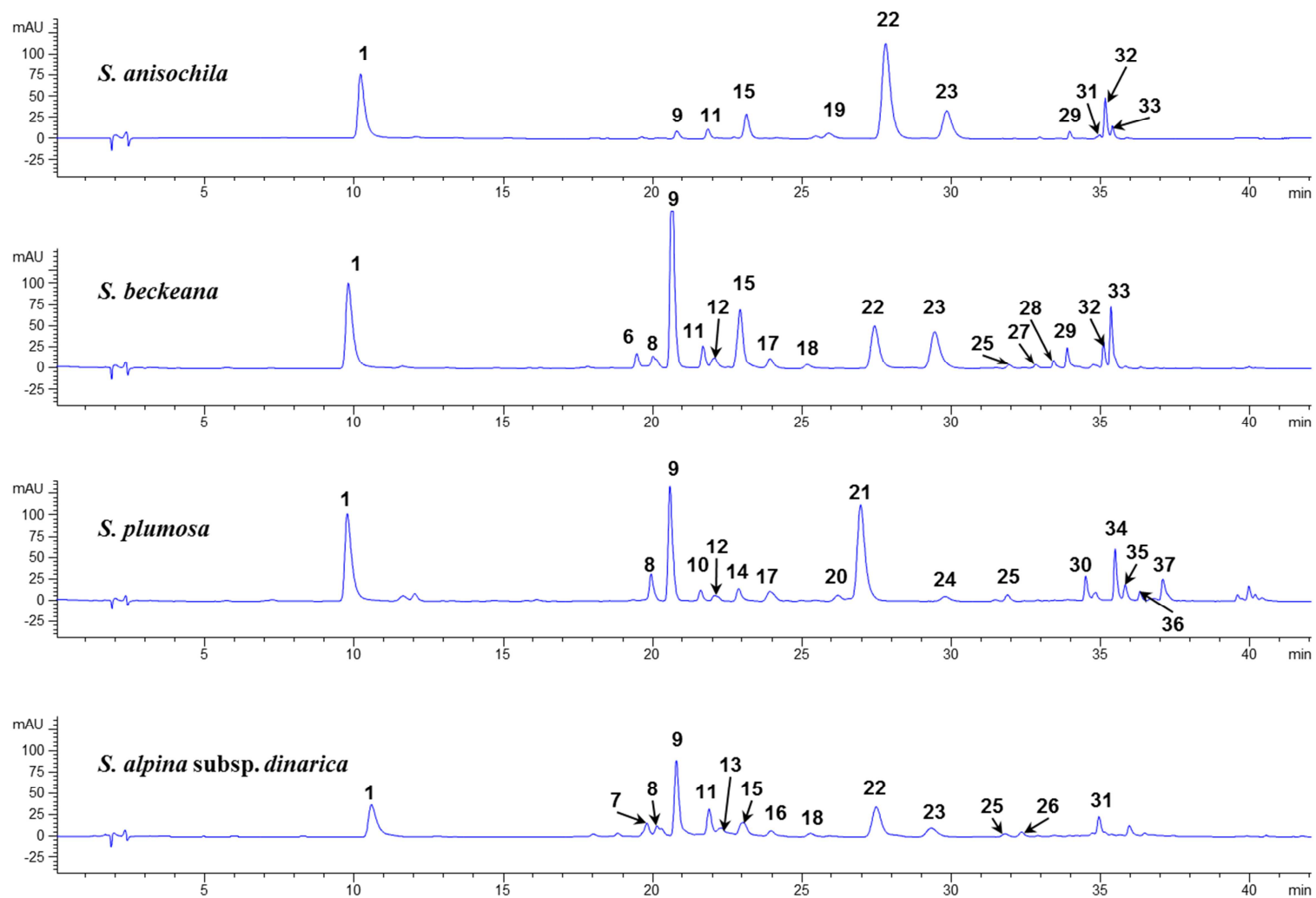
Rt (min)	Jedinjenje	UV maksimumi (nm)	MS podaci (negativni mod)	
1	9,8	Hlorogenska kiselina	298, 324	179, 191, 353 [M-H] ⁻
2	16,1	Feniletanski heterozid	292, 328	161, 179, 621 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 639, 771 [M-H] ⁻
3	19,9	Lavandulifoliozid	291, 328	593 [M-kafeoil] ⁻ , 623, 755 [M-H] ⁻
4	20,6	Akteozid	291, 330	623 [M-H] ⁻
5	21,6	Hrizoeriol 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	252, 268, 342	299, 461 [M-heksoza] ⁻ , 623 [M-H] ⁻
6	22,1	Izoakteozid	290, 330	161, 461, 623 [M-H] ⁻
7	22,9	Feniletanski heterozid	290, 330	175, 193, 461, 593 [M-feruloil] ⁻ , 637, 769 [M-H] ⁻
8	23,9	Feniletanski heterozid	290, 330	175, 193, 461, 593 [M-feruloil] ⁻ , 637, 769 [M-H] ⁻
9	26,2	Hrizoeriol 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 10)	254, 269, 344	299, 665 [M-H] ⁻
10	27,0	Hrizoeriol 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (stahispinozid)	254, 269, 344	299, 665 [M-H] ⁻
11	29,8	Feniletanski heterozid	290, 330	175, 193, 783 [M-H] ⁻
12	31,9	Martinozid	286, 330	175, 651 [M-H] ⁻
13	34,5	Apigenin acetilheksozid	280, 306, 326	269, 473 [M-H] ⁻
14	35,5	Apigenin 7-O-(6"- <i>p</i> -E-kumaroil)-glukopiranozid	270, 318	269 [A-H], 431, 577 [M-H] ⁻
15	35,8	Apigenin 7-O-(<i>p</i> -E-kumaroil)-heksozid	270, 318	269 [A-H], 577 [M-H] ⁻
16	37,1	Apigenin 7-O-(3"- <i>p</i> -E-kumaroil)-glukopiranozid	268, 318	145, 269, 431, 577 [M-H] ⁻
17	40,0	Apigenin 7-O-(di- <i>p</i> -E-kumaroil)-heksozid	266, 316	145, 269, 577, 723 [M-H] ⁻



Slika 19. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* ($\lambda=330$ nm)

Tabela 39. Jedinjenja detektovana u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*

	Rt (min)	Jedinjenje	UV maksimumi (nm)	MS podaci (negativni mod)
1	10,5	Hlorogenska kiselina	298, 324	179, 191, 353 [M-H] ⁻
2	16,1	Feniletanski heterozid	292, 328	591 [M-kafeoil] ⁻ , 639 [M-apioza] ⁻ , 621, 753 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 771 [M-H] ⁻
3	16,5	Feniletanski heterozid	292, 328	591 [M-kafeoil] ⁻ , 639 [M-apioza] ⁻ , 621, 753 [M-H ₂ O-H] ⁻ , 771 [M-H] ⁻
4	18,0	Derivat ferula kiseline	220, 296, 322	161, 179
5	18,8	Luteolin 7-O-diheksozid	252, 268, 342	285, 447 [M-heksoza] ⁻ , 609 [M-H] ⁻
6	19,8	Betoniozid E	292, 332	161, 623, 785 [M-H] ⁻
7	20,1	Lavandulifoliozid	291, 328	593 [M-kafeoil] ⁻ , 607 [M-arabinoza] ⁻ , 623, 755 [M-H] ⁻
8	20,8	Akteozid	291, 330	623 [M-H] ⁻
9	21,9	Izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F2)	278, 306, 326	285 [A-H] ⁻ , 429 [M-180] ⁻ , 609 [M-H] ⁻
10	22,3	Luteolin 7-O-acetildiheksozid	254, 268, 348	285 [A-H] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
11	23,0	Hipolaetin 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F3)	255, 277, 299, 338	301 [A-H] ⁻ , 667 [M-H] ⁻
12	24,0	Leukoskeptoizid A	290, 330	175, 193, 461 [M-feruloil] ⁻ , 637 [M-H] ⁻
13	25,3	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 14)	276, 306, 326	285 [A-H] ⁻ , 471 [M-180] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
14	27,5	Izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F4)	276, 306, 326	285 [A-H] ⁻ , 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
15	29,3	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F5)	254, 277, 300, 336	315 [A-H] ⁻ , 459 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-H] ⁻
16	31,8	Martinozid	290, 330	175, 475 [M-feruloil] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
17	32,3	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	280, 306, 326	299 [A-H] ⁻ , 623 [M-H] ⁻
18	32,8	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 14)	278, 306, 326	285 [A-H] ⁻ , 429 [M-180-OAc] ⁻ , 651 [M-H] ⁻
19	33,6	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 15)	254, 277, 300, 336	315 [A-H] ⁻ , 501 [M-180] ⁻ , 681 [M-H] ⁻ ,
20	33,9	Hipolaetin 7-O-[6'', 6'''-diacetil-alozil-(1→2)]-glukopiranozid (F6)	278, 306, 326	301 [A-H] ⁻ , 709 [M-H] ⁻
21	34,9	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F7)	279, 307, 325	299 [A-H] ⁻ , 665 [M-H] ⁻
22	35,2	Izoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F8)	277, 306, 325	285 [A-H] ⁻ , 693 [M-H] ⁻
23	35,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'', 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F9)	255, 277, 301, 336	315 [A-H] ⁻ , 501 [M-180-OAc] ⁻ , 681 [M-OAc] ⁻ , 723 [M-H] ⁻



Slika 20. Uporedni prikaz HPLC hromatograma ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* ($\lambda=330$ nm)

Tabela 40. Uporedni prikaz rezultata kvalitativne i kvantitativne HPLC-UV i HPLC-MS analize ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) (jedinjenja poredana po redosledu eluiranja)

	Rt (min)	Jedinjenje	Sadržaj (%)			
			SA	SB	SP	SAD
1.	9,8-10,2	Hlorogenska kiselina	12,57	6,33	3,57	3,17
2.	16,1-16,3	Feniletanski heterozid	-	tr	tr	tr
3.	16,5-16,6	Feniletanski heterozid	-	tr	-	tr
4.	18,0	Derivat ferula kiseline	-	-	-	+
5.	18,8	Luteolin 7-O-diheksozid	-	-	-	+
6.	19,5-19,7	Hipolaetin 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F1)	tr	+	-	-
7.	19,8	Betoniozid E	-	-	-	0,78
8.	19,9-20,4	Lavandulifoliozid	tr	0,84	0,70	0,78
9.	20,6-20,8	Akteozid	1,09	9,07	2,96	3,97
10.	21,6	Hrizoeriol 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	-	-	+	-
11.	21,7-22,1	Izokutelarein 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid (F2)	1,60	1,35	-	1,48
12.	22,1-22,4	Izoakteozid	-	0,65	tr	-
13.	22,3	Luteolin 7-O-acetildiheksozid	-	-	-	+
14.	22,9	Feniletanski heterozid	-	-	0,38	-
15.	22,9-23,1	Hipolaetin 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F3)	6,08	5,42	-	1,83
16.	24,0	Leukoskeptoizid A	-	-	-	0,53
17.	23,9- 24,1	Feniletanski heterozid	-	0,76	0,34	-
18.	25,3	Izokutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 22)	-	+	-	+
19.	26,0	Dikafeoilhina kiselina	1,54	-	-	-
20.	26,2	Hrizoeriol 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 21)	-	-	+	-
21.	27,0	Hrizoeriol 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (stahispinozid)	-	-	10,74	-
22.	27,4 -28,3	Izokutelarein 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F4)	25,97	4,13	-	4,08
23.	29,3-30,3	3'-Hidroksi-4'-O- metilizokutelarein 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F5)	11,99	5,95	-	2,08

Rezultati i diskusija

24.	29,8	Feniletanski heterozid	-	-	+	-
25.	31,8-31,9	Martinozid	-	tr	+	+
26.	32,3	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	-	-	-	+
27.	32,8	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 22)	-	tr	-	+
28.	33,4-33,6	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 23)	-	tr	-	tr
29.	33,9-34,0	Hipolaetin 7-O-[6", 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F6)	1,27	1,48	-	tr
30.	34,5	Apigenin acetilheksozid	-	-	+	-
31.	34,9-35,0	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F7)	tr	-	-	1,43
32.	35,1-35,2	Izoskutelarein 7-O-[6", 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F8)	3,71	1,18	-	tr
33.	35,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6", 6'''-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F9)	2,08	3,36	-	tr
34.	35,5	Apigenin 7-O-(6"-E-p-kumaroil)-glukopiranozid	-	-	+	-
35.	35,8	Apigenin 7-O-(E-p-kumaroil)-heksozid	-	-	+	-
36.	37,1	Apigenin 7-O-(3"-E-p-kumaroil)-glukopiranozid	-	-	+	-
37.	40,0	Apigenin 7-O-(di-E-p-kumaroil)-heksozid	-	-	+	-

+ - nije kvantifikovano; tr - tragovi (<0,1%).

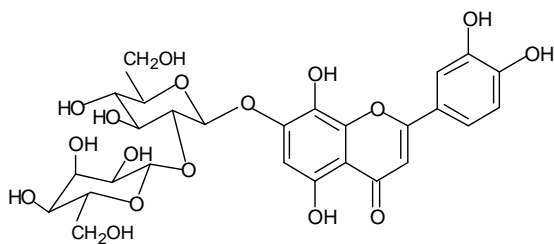
Tabela 41. Usporedni prikaz rezultata kvalitativne i kvantitativne HPLC-UV i HPLC-MS analize ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) (jedinjenja grupisana po klasama)

Rt (min)	Klasa jedinjenja/jedinjenje	Sadržaj (%)			
		SA	SB	SP	SAD
	Flavonski heterozidi				
	Heterozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata				
19,5-19,7	Hipolaetin 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F1)	tr	+	-	-
21,7-22,1	Izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid (F2)	1,60	1,35	-	1,48
22,9-23,1	Hipolaetin 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F3)	6,08	5,42	-	1,83
25,3	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 22)	-	+	-	+
27,4 -28,3	Izoskutelarein 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F4)	25,97	4,13	-	4,08
29,3-30,3	3'-Hidroksi-4'-O- metilizoskutelarein 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F5)	11,99	5,95	-	2,08
32,3	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	-	-	-	+
32,8	Izoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 22)	-	tr	-	+
33,4-33,6	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 23)	-	tr	-	tr
33,9-34,0	Hipolaetin 7-O-[6", 6"-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F6)	1,27	1,48	-	tr
34,9-35,0	4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F7)	tr	-	-	1,43
35,1-35,2	Izoskutelarein 7-O-[6", 6"-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F8)	3,71	1,18	-	tr
35,4	3'-Hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6", 6"-diacetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (F9)	2,08	3,36	-	tr
	Ukupno	51,92	21,86	-	9,58
	Heterozidi hrizoeriola				
21,6	Hrizoeriol 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid	-	-	+	-
26,2	Hrizoeriol 7-O-acetildiheksozid (izomer jedinjenja 21)	-	-	+	-
27,0	Hrizoeriol 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (stahispinozid)	-	-	10,74	-
	Ukupno	-	-	10,74	-
	Heterozidi luteolina				
18,8	Luteolin 7-O-diheksozid	-	-	-	+
22,3	Luteolin 7-O-acetildiheksozid	-	-	-	+

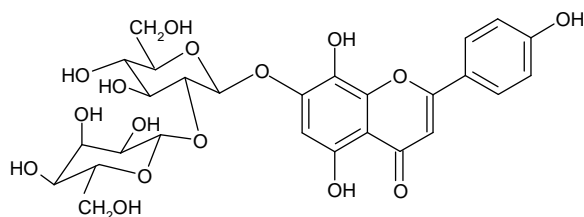
Rezultati i diskusija

	Heterozidi apigenina				
34,5	Apigenin acetilheksoid	-	-	+	-
35,5	Apigenin 7-O-(6"-p-E-kumaroil)-glukopiranozid	-	-	+	-
35,8	Apigenin 7-O-(p-E-kumaroil)-heksoid	-	-	+	-
37,1	Apigenin 7-O-(3"-p-E-kumaroil)-glukopiranozid	-	-	+	-
40,0	Apigenin 7-O-(di-p-E-kumaroil)-heksoid	-	-	+	-
	Feniletanski heterozidi				
16,1-16,3	Feniletanski heterozid	-	tr	tr	tr
16,5-16,6	Feniletanski heterozid	-	tr	-	tr
19,8	Betoniozid E	-	-	-	0,78
19,9-20,4	Lavandulifoliozid	tr	0,84	0,70	0,78
20,6-20,8	Akteozid	1,09	9,07	2,96	3,97
22,1-22,4	Izoakteozid	-	0,65	tr	-
22,9	Feniletanski heterozid	-	-	0,38	-
24,0	Leukoskeptozid A	-	-	-	0,53
23,9- 24,1	Feniletanski heterozid	-	0,76	0,34	-
29,8	Feniletanski heterozid	-	-	+	-
31,8-31,9	Martinozid	-	tr	+	+
	Ukupno	1,09	11,31	4,39	6,06
	Fenolkarboksilne kiseline				
9,8-10,5	Hlorogenska kiselina	12,57	6,33	3,57	3,17
18,0	Derivat ferula kiselina	-	-	-	+
26,0	Dikafeoilhina kiselina	1,54	-	-	-
	Ukupno	14,18	6,33	3,57	3,17
	Ukupan sadržaj flavonskih i feniletanskih heterozida i fenolkarboksilnih kiselina	61,81	39,50	18,70	18,81

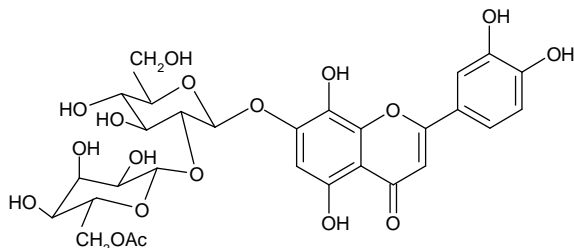
+ - nije kvantifikovano tr – tragovi (<0,1%).



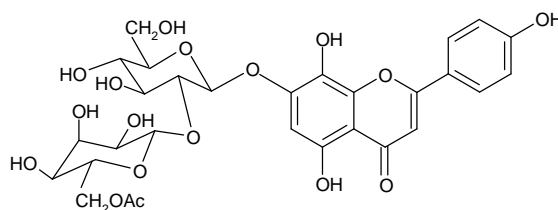
Hipolaetin 7-O-[[β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F1)



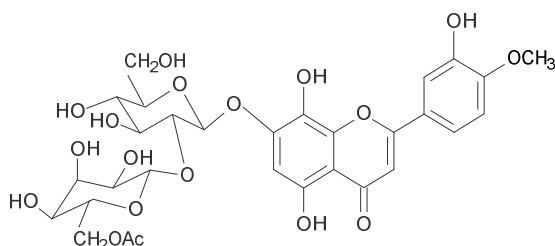
Izoskutelarein 7-O-[[β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F2)



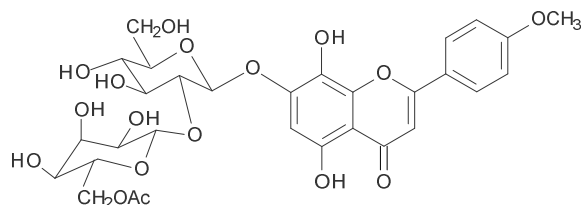
Hipolaetin 7-O-[[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F3)



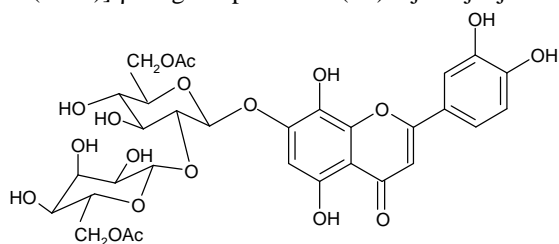
Izoskutelarein 7-O-[[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F4) – jedinjenje 3



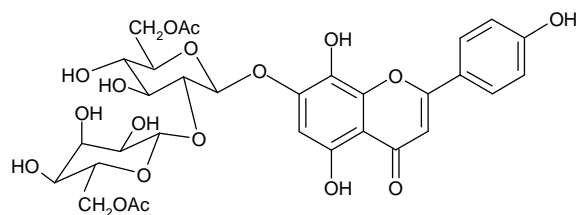
4'-O-Metilhipolaetin 7-O-[[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F5) – jedinjenje 2



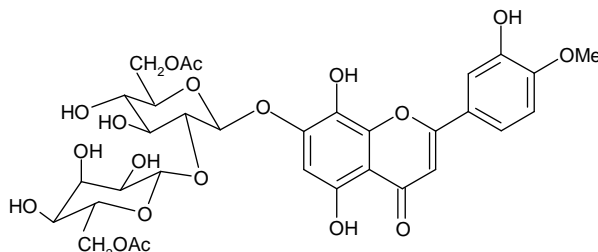
4'-O-Metilizoskutelarein 7-O-[[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F7) – jedinjenje 1



Hipolaetin 7-O-[[6'', 6'''-diacetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F6)

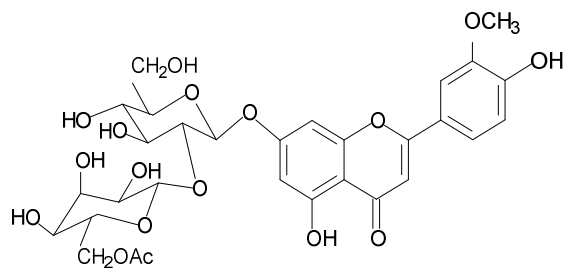


Izoskutelarein 7-O-[[6'', 6'''-diacetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F8)

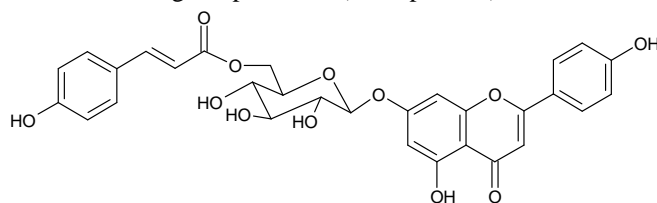


4'-O-metilhipolaetin 7-O-[[6'', 6'''-O-diacetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (F9)

Slika 21. Glavni heterozidi 8-hidroksiflavona identifikovani u ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica*

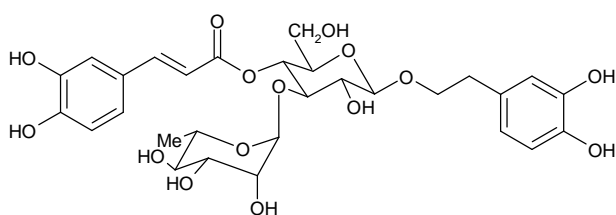


Hrizoeriol 7-O-[6'''-acetyl- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (stahispinozid)

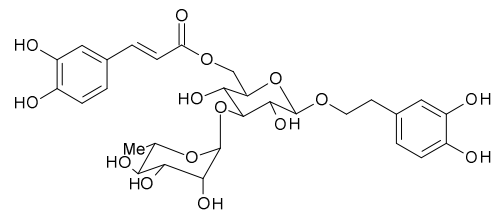


Apigenin 7-O-(6''-p-kumaroil)-glukopiranozid

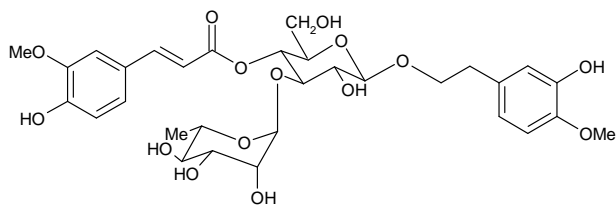
Slika 22. Flavonski heterozidi identifikovani u ekstraktu herbe *S. plumosa*



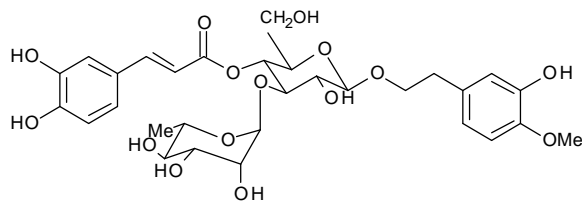
Akteozid



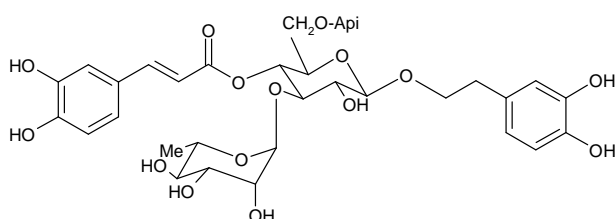
Izoakteozid



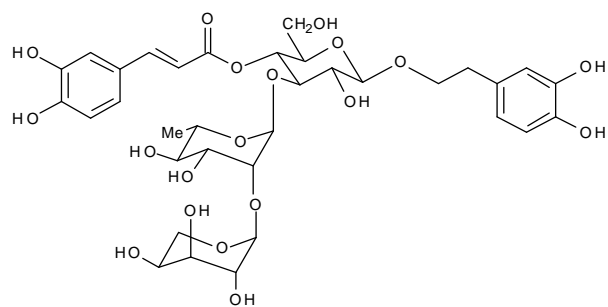
Martinozid



Leukoskeptozid A



Forzitozid B



Lavandulifoliozid

Slika 23. Feniletanski heterozidi identifikovani u ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Stachys*

Rezultati kvalitativne i kvantitativne HPLC analize suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* ukazali su na njihove međusobne sličnosti i razlike. U svim ekstraktima dominiraju flavonski heterozidi, a pored njih zastupljeni su i feniletanski heterozidi i fenolkarboksilne kiseline. Utvrđeno prisustvo ovih klasa sekundarnih metabolita je u skladu sa literaturnim podacima koji se odnose na mnoge druge vrste ovog roda (Meremeti i sar., 2004; Marin i sar., 2004).

Feniletanski heterozidi su veoma rasprostranjeni u biljnom svetu. U okviru familije *Lamiaceae* jedinjenja ovog tipa ograničena su na podfamilije sa heksakolpatnim polenovim zrnima (*Lamioideae s.l.*) (Pedersen, 2000). U skladu sa tim produkcija feniletanskih heterozida je karakteristična za vrste roda *Stachys*, čemu u prilog idu i rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije. Feniletanskim heterozidima najbogatiji je ekstrakt herbe *S. beckeana* (oko 11%). Slede ekstrakti herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* (oko 6%) i *S. plumosa* (oko 4%), dok su u ekstraktu herbe *S. anisochila* feniletanski heterozidi zastupljeni svega oko 1%. U svim ekstraktima prisutni su akteozid i lavandulifoliozid. U ekstraktima herbi *S. beckeana*, *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* detektovani su, pored ova dva, i drugi feniletanski heterozidi: u sva tri martinozid; u ekstraktima herbi *S. beckeana* i *S. plumosa* i izoakteozid, a u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* još i betoniozid E i leukoskeptoizid A. Akteozid je najzastupljeniji feniletanski heterozid u svim ekstraktima (prisutan je u opsegu koncentracija od 1,09% u ekstraktu herbe *S. anisochila* do 9,07% u ekstraktu herbe *S. beckeana*). Svi ostali feniletanski heterozidi zastupljeni su u koncentraciji manjoj od 1% ili u tragovima. Ekstrakt herbe *S. anisochila* izdvaja se od ostala tri ispitivana ekstrakta po najmanjoj količini (svega oko 1%) i najmanjem broju prisutnih feniletanskih heterozida (svega dva jedinjenja). Najveća kvalitativna sličnost u pogledu kompozicije feniletanskih heterozida uočava se između ekstrakata herbi *S. beckeana* i *S. plumosa*.

Feniletanski heterozidi koji su identifikovani u ekstraktima odabranih vrsta roda *Stachys* u okviru ove doktorske disertacije, poput akteozida, izoakteozida, forzitozida B i martinozida, uobičajena su i široko rasprostranjena jedinjenja iz ove grupe sekundarnih biljnih metabolita. Prisutni su ne samo u velikom broju vrsta roda *Stachys*, već i u vrstama drugih rodova i familija.

U ekstraktu herbe *S. anisochila* utvrđen je najveći sadržaj fenolkarboksilnih kiselina (oko 14%). Po količini sledi ekstrakt herbe *S. beckeana* (oko 6%), dok je najmanji sadržaj utvrđen u ekstraktima herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (oko 3%). Od fenolkarboksilnih kiselina, prisustvo hlorogenske kiseline utvrđeno je u svim ispitivanim ekstraktima (zastupljena je u opsegu koncentracija od 3,17% u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* do 12,57% u ekstraktu herbe *S. anisochila*). Dikafeoilhina kiselina je detektovana samo u metanolnom ekstraktu herbe *S. anisochila*. U ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, osim hlorogenske kiseline, detektovan je i jedan derivat ferula kiseline. I u mnogim drugim vrstama roda *Stachys* (*S. alpina*, *S. annua*, *S. arvensis*, *S. byzantina*, *S. germanica*, *S. grandiflora*, *S. macrantha*, *S. officinalis*, *S. palustris*, *S. recta*, *S. recta* subsp. *subcretica*, *S. salviifolia*, *S. sylvatica*), utvrđeno je prisustvo različitih fenolkarboksilnih kiselina (Bilušić Vundać i sar., 2005; Buchwald i Czapska, 1995; Czigle i sar., 2007), među kojima je hlorogenska takođe bila najzastupljenija.

Najveći sadržaj flavonoidnih heterozida utvrđen je u ekstraktu herbe *S. anisochila* (oko 52%), a značajan sadržaj prisutan je i u ekstraktu herbe *S. beckeana* (preko 20%) (obe vrste pripadaju grupi *S. recta* u okviru sekcije *S. sect. Olisia*). Po količini slede ekstrakti herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, sa oko 10% flavonoidnih heterozida.

Od flavonoidnih heterozida u ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* najzastupljeniji su 7-O-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata. U sva tri ekstrakta dominiraju tri ista flavonoidna heterozida (zastupljenost zavisi od biljne vrste): izoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F4**) (4,08-25,97%), 3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F5**) (2,08-11,99%) i hipolaetin 7-O-[6'''-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (**F3**) (1,83-6,08%) (Tabele 40 i 41). Dodatno, u ekstraktu herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* detektovana su i dva 7-O-diheksozida luteolina (šećerna komponenta jednog je acetilovana). Prisustvo alozilglukozida 8-hidroksiflavona karakteristično je za većinu drugih do sada ispitivanih vrsta roda *Stachys* (Meremeti i sar., 2004; Karioti i sar., 2010).

Flavonoidna frakcija ekstrakta herbe *S. plumosa* se kvalitativno značajno razlikuje od flavonoidne frakcije prethodna tri ekstrakta: u ekstraktu herbe *S. plumosa* čine je 7-O-biozidi hrizoeriola i monoizidi apigenina, dok heterozidi hipolaetina i izoskutelareina izostaju.

7-O-Biozidi hrizoeriola su u okviru roda *Stachys* ređe zastupljeni. Do sada je njihovo prisustvo utvrđeno u manjem broju vrsta iz različitih sekcija: *S. germanica* (*S. sect. Eriostomum*), *S. sylvatica* (*S. sect. Stachys*) (Marin i sar., 2004), *S. swainsonii* (*S. sect. Swainsoniana*) (Skaltsa i sar., 2007), *S. spinosa* (Kotsos i sar., 2001) i *S. bombycina* (Delazar i sar., 2005a), obe iz *S. sect. Olisia*, i vrstama *S. candida* i *S. chrysantha* (*S. sect. Candida*) (Skaltsa i sar., 2000).

Akumulacija 7-O-heterozida hrizoeriola, uz istovremeno odsustvo heterozida 8-hidroksiflavona utvrđena je još samo za vrstu *S. swainsonii* (Skaltsa i sar., 2007), koja kao i *S. plumosa*, pripada *S. sect. Swainsoniana*.

Za monoizide apigenina koji su detektovani u ispitivanom ekstraktu herbe *S. plumosa* karakteristično je da je njihova šećerna komponenta esterifikovana, pri čemu dominiraju *p*-kumariol derivati. *p*-Kumaroilglukozidi apigenina su do sada detektovani i u nekim drugim vrstama roda *Stachys* (Marin i sar., 2004; Meremeti i sar., 2004), ali je njihovo istovremeno prisustvo sa heterozidima hrizoeriola, kao u slučaju ispitivanog ekstrakta herbe *S. plumosa*, do sada zabeleženo još samo u vrstama *S. bombycina* (*S. sect. Olisia*) (Delazar i sar., 2005a) i *S. schtschegleevii*^a (*S. sect. Ambleia*) (Nazemiyeh i sar., 2006).

Distribucija flavonoidnih heterozida u ispitivanim taksonima roda *Stachys* u skladu je sa njihovom taksonomskom pripadnošću. Naime, najveća sličnost u pogledu kompozicije flavonoidnih heterozida uočava se između ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana*, koje pripadaju istoj sekciji (*S. sect. Olisia*) i istoj grupi *S. recta*. Ove vrste su u pogledu kompozicije flavonoidnih heterozida sličnije *S. alpina* (*S. sect. Eriostomum*), nego *S. plumosa* (*S. sect. Swainsoniana*). Na osnovu ovoga može se pretpostaviti i da između sekcija *S. sect. Olisia* i *S. sect. Eriostomum* postoji veći nivo srodnosti. Za proveru ove hipoteze potrebni su detaljniji podaci o hemijskom sastavu ostalih vrsta ovih sekcija, kao i podaci o njihovoj molekularnoj filogeniji.

^a sinonim za *S. inflata* var. *caucasica*.

6. Etarska ulja

6.1. Etarsko ulje herbe *Stachys plumosa*

Etarsko ulje izolovano destilacijom vodenom parom (postupak I prema Ph. Jug. IV) iz nadzemnih delova u cvetu *S. plumosa* je bistra, žuta tečnost specifičnog mirisa. Prinos etarskog ulja iznosio je 0,15% (V/m). U njemu je identifikovano 45 jedinjenja (86,9%) (Tabela 42). Najzastupljeniju frakciju čine diterpeni (74,3%), dok su monoterpeni i seskviterpeni prisutni u znatno manjoj količini (8,7 i 3,2%, redom). Glavna komponenta etarskog ulja je diterpen dehidroabietan ($\equiv ar$ -abietatrien) (61,2%). Ostali diterpeni su znatno manje zastupljeni (kauren, biformen i abieta-8,11,13-trien-7-on: 3,2; 3,0 i 1,8%, redom). Među monoterpenima najzastupljeniji su β -pinen (2,4%) i terpinen-4-ol (1,0%). Ostali sastojci ulja prisutni su u količini manjoj od 1%.

Tabela 42. Sastav etarskog ulja herbe *S. plumosa*

Jedinjenje	RI	Sadržaj (%)	Jedinjenje	RI	Sadržaj (%)
α -Pinen	932	0,8	β -Kariofilen	1423	tr
Kamfen	952	0,1	<i>ar</i> -Kurkumen	1488	0,4
Sabinen	961	0,1	β -Jonon	1490	0,1
β-Pinen	975	2,4	α -Muurolen	1505	0,1
<i>p</i> -Cimen	1025	0,1	γ -Kadinen	1520	0,1
Limonen	1029	0,1	δ -Kadinen	1529	0,3
1,8-Cineol	1031	0,6	<i>trans</i> -Nerolidol	1569	0,2
Linalool	1103	0,1	Spatulenol	1583	0,3
<i>n</i> -Nonanal	1107	tr	α -Bisabolol	1691	0,6
α -Kamfolenal	1127	0,2	<i>n</i> -Pentadekanol	1749	0,3
<i>trans</i> -Pinokarveol	1140	0,7	Heksahidrofarnesil aceton	1853	0,7
<i>cis</i> -Verbenol	1143	0,5	Pimaradien	1919	1,2
<i>trans</i> -Verbenol	1147	0,2	3Z-Cembren A	1938	0,9
Kamfor	1151	0,1	Palmitinska kiselina	1993	0,4
Pinokarvon	1163	0,6	Manoil oksid	2000	0,8
Borneol	1168	0,1	Biformen	2026	3,0
<i>n</i> -Nonanol	1176	0,3	Kauren	2048	3,2
Terpinen-4-ol	1180	1,0	Dehidroabietan	2084	61,2
<i>trans</i> -Karveol	1223	0,1	Tunbergol	2190	1,0
Bornil acetat	1288	0,5	<i>cis</i> -Totarol	2257	0,8
α -Terpinil acetat	1353	0,1	Abieta-8,11,13-trien-7-one	2312	1,8
α -Kopaen	1380	0,3	Dehidro abietol	2378	0,4
β -Bourbonen	1388	0,1			

Ukupno	86,9
Monoterpeni	8,4
Monoterpenski ugljovodonici	3,6
Oksidovani monoterpeni	4,8
Seskviterpeni	3,1
Seskviterpenski ugljovodonici	1,3
Oksidovani seskviterpeni	1,8
Diterpeni	74,3
Alifatična jedinjenja	1,0

tr - tragovi (< 0,05%); RI - retencioni indeks na HP-5MS koloni.

6.2. Etarsko ulje herbe *Stachys alpina* subsp. *dinarica*

Etarsko ulje izolovano destilacijom vodenom parom (postupak III prema Ph. Jug. IV) iz herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* je bistra žuta tečnost specifičnog mirisa. Hlađenjem se zgušnjava i izdvajaju se mlečnobeli stearopteni. Prinos etarskog ulja iznosio je 0,03% (*m/m*). U ulju je identifikovano 71 jedinjenje (87,2%) (Tabela 43). Najzastupljenije komponente etarskog ulja su: (*E*)-kariofilen (13,4%), germakren D (12,3%), kariofilen-oksidi (5,7%), *n*-nonanal (5,3%) i (*E*)-nerolidol (4,8%). Dominantnu klasu čine seskviterpeni (60,5%) i to pretežno ugljovodonici (41,0%), dok je sadržaj monoterpena veoma nizak (4,3%). Diterpeni su takođe veoma malo zastupljeni (1,6%). Ispitivano ulje karakteriše i visok sadržaj alifatičnih jedinjenja: aldehida (11,0%) i ugljovodonika (6,9%).

Tabela 43. Sastav etarskog ulja herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*

Jedinjenje	RI	Sadržaj (%)	Jedinjenje	RI	Sadržaj (%)
1-Okten-3-ol	976	1,2	(<i>E</i>)- β -Jonon	1484	1,5
2-Pentil furan	987	tr	Biciklogermakren	1499	1,1
3-Oktanol	989	tr	α -Muurolen	1500	0,4
<i>n</i> -Oktanal	996	0,5	β -Bisabolen	1503	0,7
(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	1007	tr	(<i>E,E</i>)- α -Farnezen	1505	0,6
<i>p</i> -Cimen	1024	tr	γ -Kadinen	1510	0,6
β -Felandren	1028	tr	δ -Kadinen	1524	0,8
(<i>Z</i>)- β -Ocimen	1038	0,4	(<i>E</i>)-Nerolidol	1564	4,8
(<i>E</i>)- β -Ocimen	1051	0,9	Germakren D-4-ol	1574	0,8
<i>n</i> -Oktanol	1068	tr	Kariofilen-oksidi	1581	5,7
Linalool	1098	1,7	Humulen epoksid II	1605	0,6
<i>n</i>-Nonanal	1100	5,3	Kariofila-4(14),8(15)-dien-5- α -ol	1639	0,3
Kamfor	1143	tr	α -Muurolol	1643	0,7

Rezultati i diskusija

2E-Nonen-1-al	1159	tr	α -Kadinol	1653	1,3
Terpinen-4-ol	1175	tr	α -Bisabolol	1685	1,6
α -Terpineol	1186	0,4	<i>n</i> -Heptadekane	1700	0,3
<i>n</i> -Dekanal	1204	0,6	δ -Dodekalakton	1702	0,4
β -Ciklocitral	1214	0,5	Pentadekanal	1707	0,7
Citronelol	1221	tr	Mint sulfid	1738	0,4
Geraniol	1252	tr	Heksadekanal	1822	1,2
2E-Decenal	1260	1,3	Neofitadien	1840	0,2
Geranial	1266	tr	Heksahidrofarnezil aceton	1850	1,2
Undekanal	1305	0,3	<i>n</i> -Nonadekan	1900	0,3
α -Kopaen	1375	0,4	Farnezil aceton	1915	0,5
(E)- β -Damascenon	1386	0,5	Heksadekanska kiselina	1971	0,6
β -Burbonen	1387	2,0	<i>n</i> -Oktadekanol	2081	0,3
β -Kubeben	1388	0,3	<i>n</i> -Heneikozane	2100	0,4
β -Elemen	1390	1,5	Fitol*	2111	1,4
Dodekanal	1405	1,1	<i>n</i> -Dokozan	2200	0,3
(E)-Kariofilen	1418	13,4	<i>n</i> -Trikozan	2300	1,1
β -Kopaen	1430	0,6	<i>n</i> -Tetrakozan	2400	0,3
β -Gurjunen	1431	0,3	<i>n</i> -Pentakozan	2500	0,7
α -Humulen	1450	2,8	<i>n</i> -Heptakozan	2700	1,3
Geranil aceton	1452	0,4	<i>n</i> -Oktakozan	2800	0,2
(E)- β -Farnezen	1455	3,2	<i>n</i> -Nonakozan	2900	2,0
Germakren D	1481	12,3			
Ukupno	87,2				
Monoterpeni	4,3				
Monoterpenski ugljovodonici	1,3				
Oksidovani monoterpeni	3,0				
Seskviterpeni	60,9				
Seskviterpenski ugljovodonici	41,4				
Oksidovani seskviterpeni	19,5				
Diterpeni	1,6				
Alifatična jedinjenja	19,4				
Alkoholi	1,5				
Aldehidi	11,0				
Ugljovodonici	6,9				
Ostalo	1,0				

Tr - tragovi (< 0,1%); RI - retencioni indeks na HP-5MS koloni; * - tačan izomer nije identifikovan

Utvrđen nizak sadržaj etarskog ulja u osušenim herbama *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (0,15% (V/m) i 0,03% (m/m), redom) u skladu je sa literaturnim podacima koji ukazuju da su vrste roda *Stachys* siromašne etarskim uljima. Do sada utvrđen sadržaj etarskog ulja u drugim vrstama ovog roda iznosio je 0,01-0,5% (Radulović i sar., 2007; Goren i sar., 2011). Nizak sadržaj etarskog ulja je karakteristika i ostalih rodova podfamilije *Lamioideae s.l.*

Ispitivana etarska ulja međusobno se veoma razlikuju u pogledu hemijskog sastava (Tabela 44).

Tabela 44. Uporedni prikaz zastupljenosti klasa jedinjenja u ispitivanim etarskim uljima

	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>
Monoterpeni	8,4	4,3
Monoterpenski ugljovodonici	3,6	1,3
Oksidovani monoterpeni	4,8	3,0
Seskviterpeni	3,1	60,9
Seskviterpenski ugljovodonici	1,3	41,4
Oksidovani seskviterpeni	1,8	19,5
Diterpeni	74,3	1,6
Alifatična jedinjenja	1,0	19,4
Alkoholi	-	1,5
Aldehidi	-	11,0
Ugljovodonici	-	6,9
Ostalo	-	1,0

Etarsko ulje *S. plumosa*, za razliku od većine ranije ispitivanih etarskih ulja vrsta ovog roda, karakteriše neuobičajeno visok sadržaj diterpena (74,3%). Glavna komponenta ovog ulja bio je diterpen dehidroabietan (61,2%). Ovo je u skladu sa rezultatima ispitivanja etarskog ulja ove vrste iz okoline Bosilegrada koje su sproveli Radulović i sar. (2007) i u kome su dominantnu frakciju takođe činili diterpeni (50,0%). Glavna komponenta ovog ulja je bio, kao i u ulju ispitivanom u okviru ove doktorske disertacije, dehidroabietan (45,5%). Takođe, dehidroabietan je bio glavni diterpen i u etarskim uljima uzoraka *S. plumosa* iz okoline Vranja (Grujić-Jovanović i sar., 2001, 2004). U ovim uzorcima, međutim, ukupan sadržaj diterpena bio je značajno niži (14,8% i 5,2%), dok su dominantnu frakciju činili monoterpeni (54,9% i 73,2%, redom). Dehidroabietan identifikovan je takođe i u etarskim uljima herbi *S. spruneri*, *S. swainsonii* i *S. ionica* (0,1-7,6%), koje kao i *S. plumosa* pripadaju *S. sect. Swainsoniana* (Skaltsa i sar., 2001), i u tragovima u etarskom ulju *S. glutinosa* (*S. sect. Aucheriana*) (Mariotti i sar., 1997). Literaturni podaci ukazuju da su diterpeni veoma zastupljeni u etarskim uljima još nekih vrsta roda *Stachys*: *S. candida* (Skaltsa i sar., 1999), vrste podsekcije *S. subsect. Swainsonianae* (Skaltsa i sar., 2001), *S. cretica* subsp. *cretica* (Skaltsa i sar., 2003), *S. laetivirens* (Duman i sar., 2005), *S. macrantha*

(Hahnagy-Radnai i sar., 2007) i *S. menthifolia* (Skaltsa i sar., 2003; Ćavar i sar., 2010) (Tabela 14).

Seskviterpeni su u etarskom ulju herbe *S. plumosa* zastupljeni sa svega 3,2%. (*E*)-kariofilen je prisutan samo u tragovima, dok germakren D i kariofilen-oksidi, glavni i tipični seskviterpenski sastojci etarskog ulja herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, kao i većine drugih vrsta roda *Stachys*, u ispitivanom etarskom ulju herbe *S. plumosa* nisu identifikovani.

U etarskom ulju herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* seskviterpeni čine dominantnu frakciju (60,9%). Uglavnom se radi o ugljovodonicima (41,4%), koji su i inače najzastupljenija frakcija većine do sada ispitanih etarskih ulja vrsta roda *Stachys*. Glavne komponente ovog ulja: germakren D, (*E*)-kariofilen i kariofilen-oksidi predstavljaju glavne sastojke većine do sada ispitanih etarskih ulja vrsta roda *Stachys* (Piozzi i Bruno, 2009; Goren i sar., 2011). U okviru podsekcije *S. subsect. Germanicae*, kojoj pripada *S. alpina* subsp. *dinarica*, germakren D je identifikovan kao glavna komponenta u etarskim uljima: *S. balansae* subsp. *balansae* (38,3%), *S. sericantha* (32,4%), *S. pinetorum* (28,8%; Goren i sar., 2011), *S. obliqua* (25,4-45,3%; Harmandar i sar., 1997; Goren i sar., 2011), *S. germanica* subsp. *bithynica* (23,3%; Goren i sar., 2011), *S. germanica* subsp. *heldreichii* (21,3-27,1%; Skaltsa i sar., 2003; Goren i sar., 2011), *S. huber-morathii* (18,4%; Goren i sar., 2011) i *S. germanica* (16,5%) (Grujić-Jovanović i sar., 2004). (*E*)-kariofilen je identifikovan kao glavna komponenta u etarskim uljima manjeg broja vrsta: *S. balansae* (17,9-29,9%; Ćakir i sar., 1997; Goren i sar., 2011), *S. germanica* subsp. *heldreichii* (12,8-18,4%, Skaltsa i sar., 2003; Goren i sar., 2011), *S. sericantha* (23,2%), *S. obliqua* (16,7%), *S. huber-morathii* (14,5%) i *S. pinetorum* (11,3%; Goren i sar., 2011), dok je kariofilen-oksidi dominantna komponenta etarskog ulja *S. pinetorum* (8,3%; Goren i sar., 2011).

U etarskom ulju *S. alpina* subsp. *dinarica* značajnu frakciju čine i alifatična jedinjenja (19,4%), naročito aldehidi (11,0%), što je u skladu sa ranijim ispitivanjima etarskog ulja herbe *S. alpina* [subsp. *alpina*]. Prema ranijim ispitivanjima u etarskom ulju herbe tipske podvrste *S. alpina* [subsp. *alpina*] iz Mađarske (Hahnagy-Radnai i sar., 2007), najzastupljeniji su bili seskviterpenski ugljovodonici (41,9%), a značajnu frakciju su činila alifatična jedinjenja (10,5%). Glavne komponentne ulja bile su γ -muurolen (23,5%), nezukol (6,2%) i metillinoleat (5,5%). U etarskom ulju herbe

S. alpina [subsp. *alpina*] poreklom iz Hrvatske, koje su analizirali Bilušić Vundać i saradnici (2006), glavnu frakciju su činili alifatični aldehidi (31,8%). Takođe, u značajnom procentu su bili prisutni oksidovani seskviterpeni (28%) i alifatični alkoholi (9,7%). Glavne komponente ulja bile su (E)-nerolidol (22,1%), nonanal (9,8%), dodekanol (9,7%), 1-okte-3-ol (8,7%) i germakren D (5,9%).

Visok sadržaj alifatičnih i aromatičnih jedinjenja karakterističan je i za etarska ulja nekih drugih vrsta iz *S. subsect. Germanicae*: *S. persica* (44,2-58,6%, Khanavi i sar., 2004), *S. balansae* (19,5%; Rezazadeh i sar., 2006), *S. germanica* (25,5%; Grujić-Jovanović i sar., 2004) i *S. germanica* subsp. *heldreichii* (7,3%; Skaltsa i sar., 2001). *n*-Nonanal, jedan od glavnih sastojaka etarskog ulja *S. alpina* subsp. *dinarica* (5,3%), u značajnom je procentu zastupljen u etarskom ulju *S. alpina* [subsp. *alpina*] (9,8%; Bilušić Vundać i sar., 2006), kao i u *S. swainsonii* subsp. *argolica* (*S. sect. Swainsoniana*) (8,5%; Skaltsa i sar., 2001).

7. Antioksidantna aktivnost

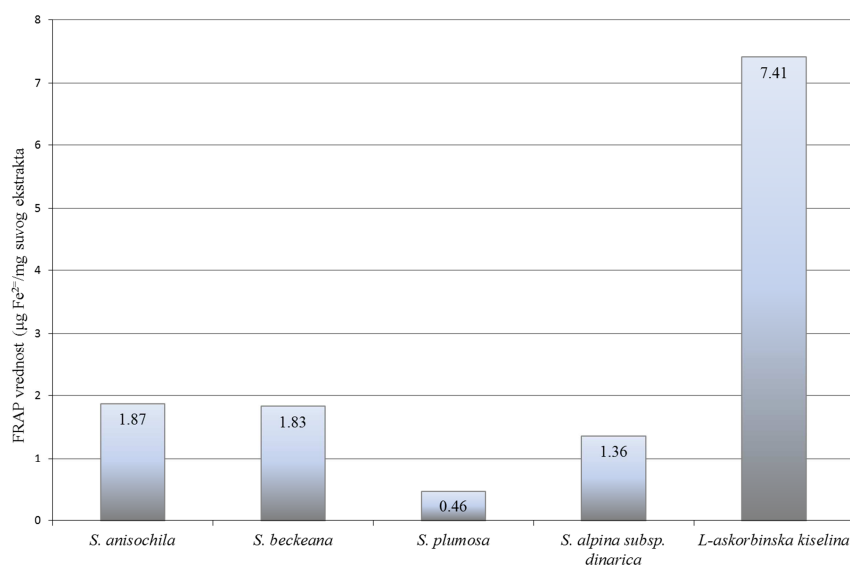
7.1. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test)

Ukupna antioksidantna aktivnost suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* ispitivana je FRAP testom (Tabela 45, Slika 24). Najveću aktivnost ispoljili su ekstrakti herbi *S. anisochila* i *S. beckeana*. Nešto manja FRAP vrednost zabeležena je za ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*. U poređenju sa FRAP vrednošću L-askorbinske kiseline (7,41 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$) ove vrednosti su bile oko 5 puta manje. Najnižu aktivnost ispoljio je ekstrakt herbe *S. plumosa*.

Tabela 45. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP vrednosti) ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys*

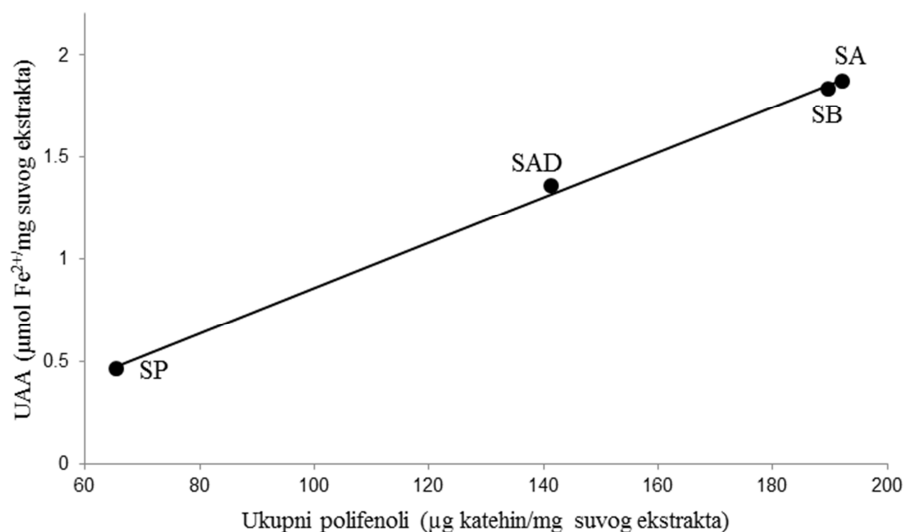
	FRAP vrednost ^a
<i>S. anisochila</i>	1,87
<i>S. beckeana</i>	1,83
<i>S. plumosa</i>	0,46
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	1,36

^a u $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ suvog ekstrakta.



Slika 24. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP vrednosti) ispitivanih ekstrakata odabranih taksona roda *Stachys* i L-askorbinske kiseline

Ukupna antioksidantna aktivnost ispitivanih ekstrakata visoko je korelisana sa sadržajem ukupnih polifenola ($r=0,999$) (Slika 25).



Slika 15. Korelacija sadržaja ukupnih polifenola i ukupne antioksidantne aktivnosti (UAA) ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD)

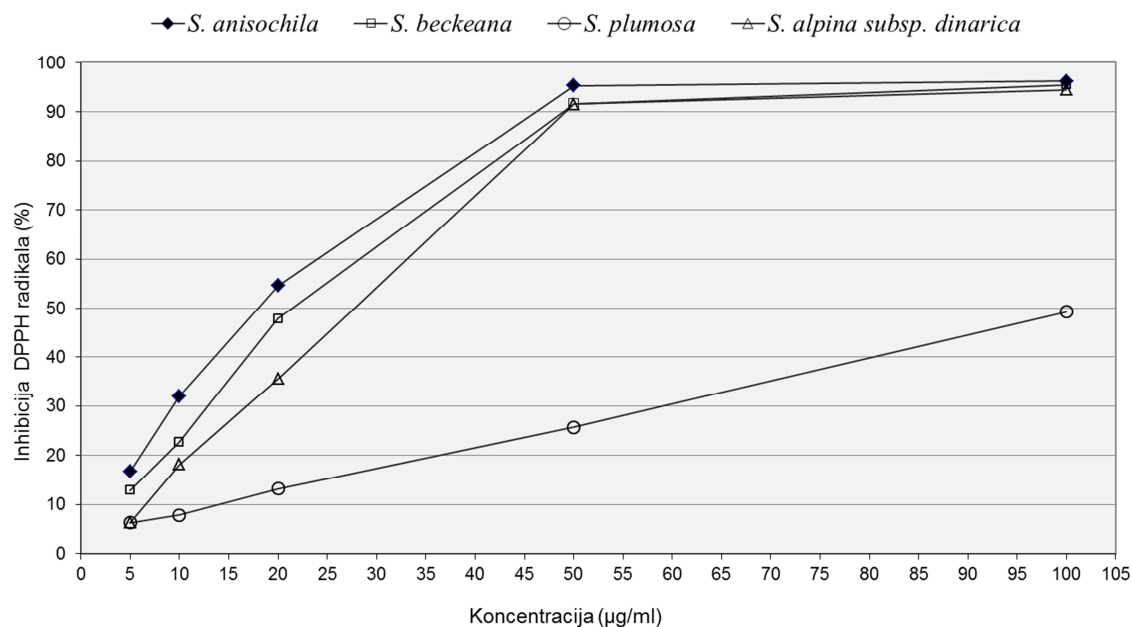
7.2. Neutralizacija DPPH radikala (DPPH test)

Suvi metanolni ekstrakti herbi svih odabranih vrsta roda *Stachys* ispoljili su u DPPH testu koncentraciono zavisnu aktivnost (Tabela 46, Slika 26). Izuzetno visoku anti-DPPH aktivnost pokazali su ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SC_{50} vrednosti $< 50 \mu\text{g/ml}$), dok je aktivnost ekstrakta herbe *S. plumosa* bila slaba ($SC_{50} = 101,61 \mu\text{g/ml}$). SC_{50} vrednost za L-askorbinsku kiselinu, koja je korišćena kao standard, iznosila je $4,09 \mu\text{g/ml}$. Anti-DPPH aktivnost ispitivanih ekstrakata bila je takođe u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola u ($r=-0,948$) (Slika 27).

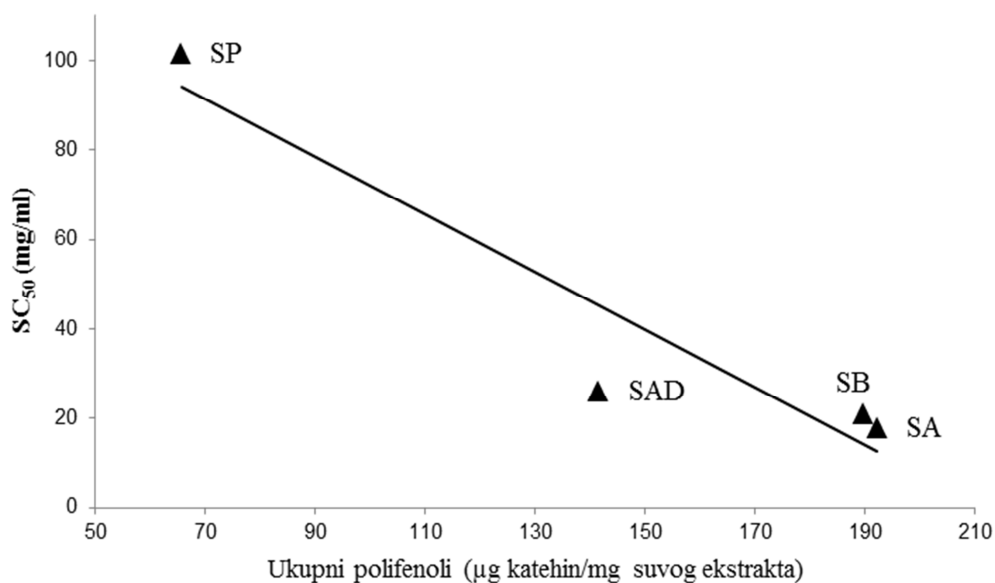
Tabela 46. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na neutralizaciju DPPH radikala ("scavenging" efekat, tj. % neutralizacije)

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. anisochila</i>	<i>S. beckeana</i>	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>
5	$19,71 \pm 1,67$	$12,88 \pm 1,12$	$6,22 \pm 0,02$	$6,82 \pm 1,33$
10	$31,97 \pm 0,95$	$22,76 \pm 0,08$	$7,80 \pm 0,63$	$18,18 \pm 0,49$
20	$54,56 \pm 1,63$	$47,87 \pm 0,74$	$13,24 \pm 0,02$	$35,57 \pm 0,35$
50	$95,33 \pm 0,16$	$91,66 \pm 1,57$	$25,73 \pm 0,35$	$91,60 \pm 0,07$
100	$96,24 \pm 0,00$	$95,45 \pm 0,08$	$49,30 \pm 0,18$	$94,47 \pm 0,42$
200	$96,13 \pm 0,04$	$95,16 \pm 0,17$	$87,45 \pm 1,06$	-
SC_{50}	17,90	20,90	101,61	26,14

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja \pm SD S.D.



Slika 26. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na neutralizaciju DPPH radikala ("scavenging" efekat, tj. % neutralizacije)



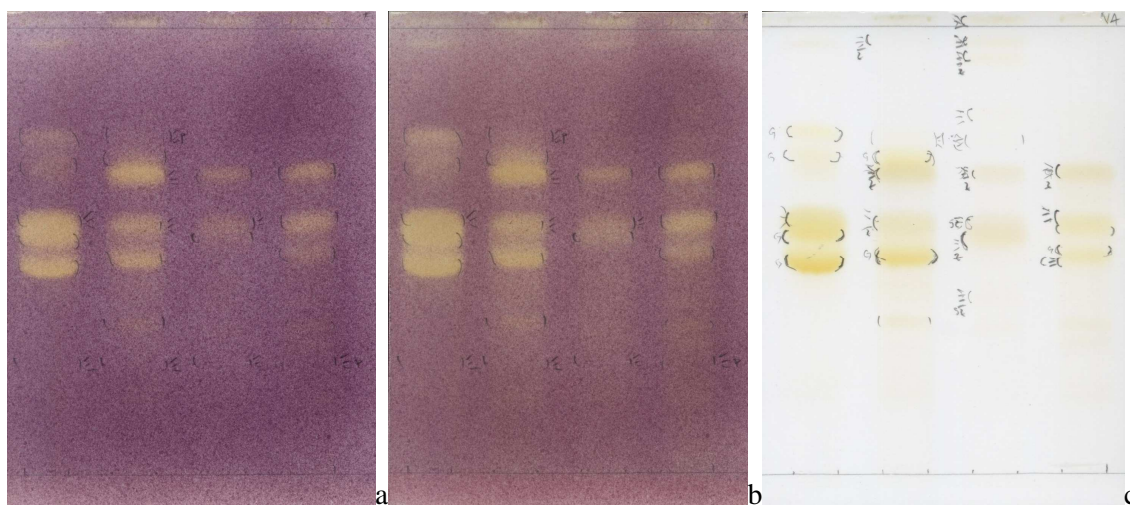
Slika 27. Korelacija sadržaja ukupnih polifenola i sposobnosti neutralizacije DPPH radikala (SC₅₀ vrednosti) ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina subsp. dinarica* (SAD)

7.3. TLC-DPPH test

Suvi metanolni ekstrakti herbi odabranih vrsta roda *Stachys* rastvoreni su u metanolu i razdvajani u sistemu za flavonoide heterozide (etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-mravlja kiselina-voda=100:11:11:26, V/V/V/V). Nakon razvijanja hromatograma, ploče su prskane 0,2% rastvorom DPPH.

Odmah nakon prskanja ljubičastim rastvorom DPPH radikala intenzivno žuto su se obojile zone Rf vrednosti oko 0,46; 0,54 i 0,57 ekstrakta herbe *S. anisochila* i Rf vrednosti oko 0,48; 0,57 i 0,67 ekstrakta herbe *S. beckeana*. Manje intenzivno žuto su se obojile zone Rf vrednosti oko 0,49; 0,57 i 0,69 ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*. Najslabije žuto su se obojile zone Rf vrednosti 0,53; 0,57 i 0,69 ekstrakta herbe *S. plumosa* i Rf vrednosti oko 0,69 i 0,76 ekstrakta herbe *S. anisochila*.

Nakon 15 minuta došlo je do pojave novih zona neutralizacije DPPH radikala, a intenzitet svih zona se nakon 2 sata znatno pojačao, uz pojavu novih, manje intenzivnih zona (Slike 28a i 28b).

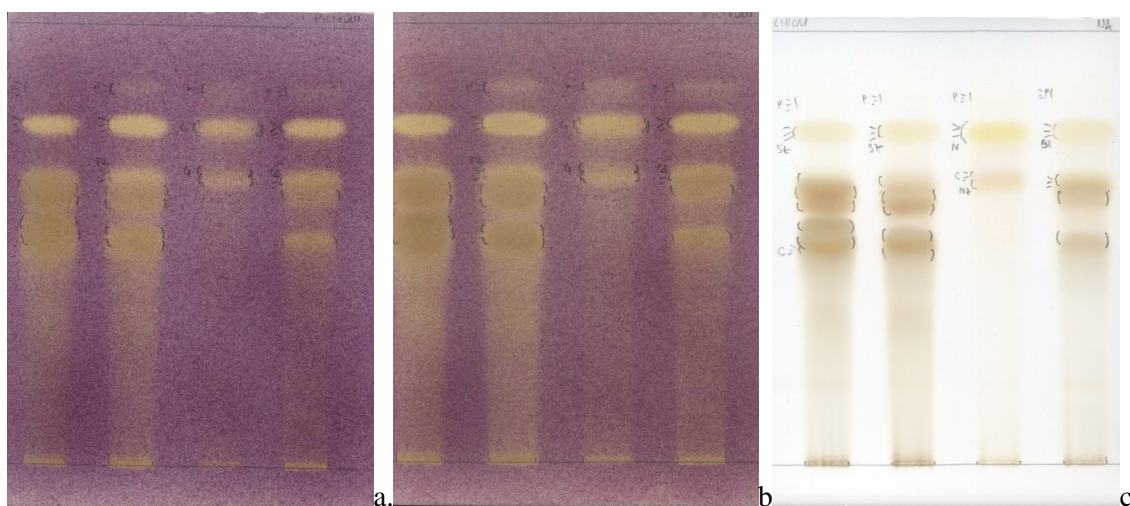


Slika 28. TLC hromatogram ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD); mobilna faza: etilacetat-glacijalna sirćetna kiselina-metanol-voda=100:11:11:26 (V/V/V/V); detekcija na dnevnoj svetlosti: rastvorom DPPH radikala (a) nakon 15 minuta, (b) nakon 2 h, (c) NP/PEG reagensom.

Na osnovu iznetog može se zaključiti da komponente ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana* najintenzivnije neutrališu DPPH radikal. Aktivnost ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* je nešto slabija, a ekstrakta *S. plumosa* najslabija. Poređenjem

ovih hromatograma sa hromatogramom metanolnih ekstrakata nakon derivatizacije NP/PEG reagensom, može se zaključiti da zone koje najintenzivnije neutrališu DPPH radikal odgovaraju zonama flavonoidnih heterozida (Slika 28c). Rezultat TLC-DPPH testa je u skladu sa rezultatima određivanja sadržaja ukupnih polifenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima (Tabele 28 i 29).

TLC-DPPH test sproveden je i za etilacetatne frakcije metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Stachys* nakon kisele hidrolize (Slika 29). Kao i u prethodnom slučaju, najbrojnije i najintenzivnije žuto obojene bile su zone na hromatogramima etilacetatnih frakcija metanolnih ekstrakata herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica*. Na hromatogramu etilacetatne frakcije metanolnog ekstrakta herbe *S. plumosa* mogle su se uočiti svega dve zone koje snažno neutrališu DPPH radikal ($R_f \sim 0,64$ i $0,77$).



Slika 29. TLC hromatogram etilacetatnih frakcija ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) nakon kisele hidrolize; mobilna faza: toluen-etilacetat- mravlja kiselina =5:4:1 (V/V/V); detekcija na dnevnoj svetlosti: rastvorom DPPH radikala (a) nakon 15 minuta, (b) nakon 2 h, (c) NP/PEG reagensom.

7.4. Neutralizacija OH radikala (2-dezoksiriboza test)

Suvi metanolni ekstrakti herbi svih odabranih vrsta roda *Stachys* su koncentraciono zavisno neutralisali OH radikal (Tabela 47, Slika 30). U opsegu koncentracija 6,25-50 $\mu\text{g/ml}$, svi ekstrakti inhibirali su degradaciju 2-dezoksiriboze preko 40%. Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* pokazali su najveću aktivnost u koncentraciji

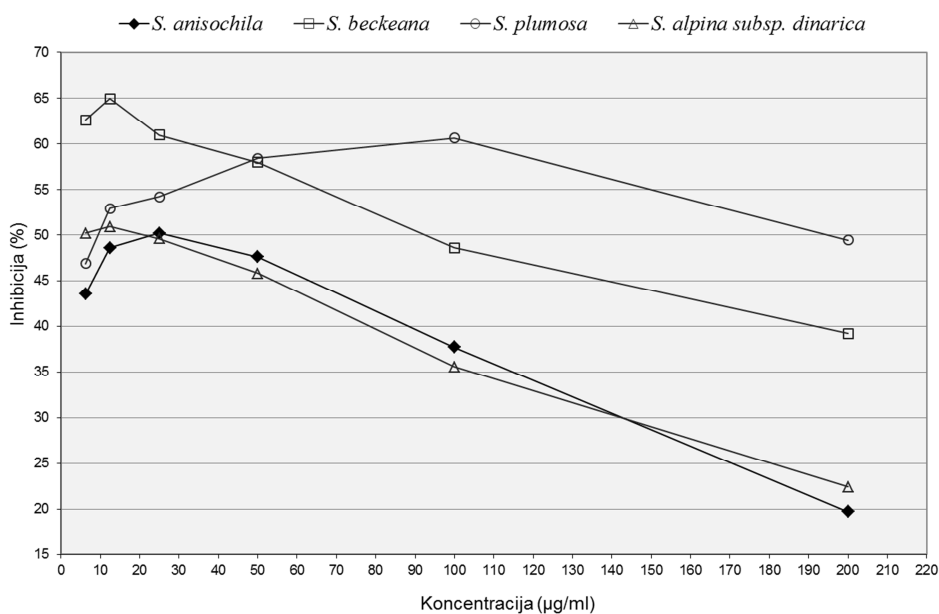
12,5 µg/ml (64,97% i 50,94%, redom), ekstrakt herbe *S. anisochila* u koncentraciji 25 µg/ml (50,22%), a ekstrakt herbe *S. plumosa* u koncentraciji 100 µg/ml (60,67%). Kvercetin, korišćen kao standard, neutralisao je 50% OH radikala u koncentraciji 3,1 µg/ml.

Evidentno je, takođe, da svi ekstrakti u višim koncentracijama pokazuju slabiju aktivnost, što se može objasniti prooksidantim delovanjem.

Tabela 47. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na razgradnju 2-dezoksiriboze (% inhibicije)

Koncentracija (µg/ml)	<i>S. anisochila</i>	<i>S. beckeana</i>	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina subsp. dinarica</i>
6,25	43,50 ± 2,55	62,64 ± 0,35	46,87 ± 0,11	50,23 ± 1,57
12,5	48,60 ± 1,72	64,97 ± 0,01	52,97 ± 1,36	50,94 ± 0,63
25	50,22 ± 1,50	60,99 ± 2,02	54,25 ± 2,13	49,63 ± 2,21
50	47,60 ± 3,90	58,02 ± 1,16	58,43 ± 1,20	45,77 ± 3,24
100	37,70 ± 3,76	48,59 ± 0,12	60,67 ± 1,25	35,53 ± 1,64
200	19,70 ± 3,26	39,17 ± 1,99	49,44 ± 1,48	22,41 ± 1,52

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja ± S.D.



Slika 30. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na razgradnju 2-dezoksiriboze (% inhibicije)

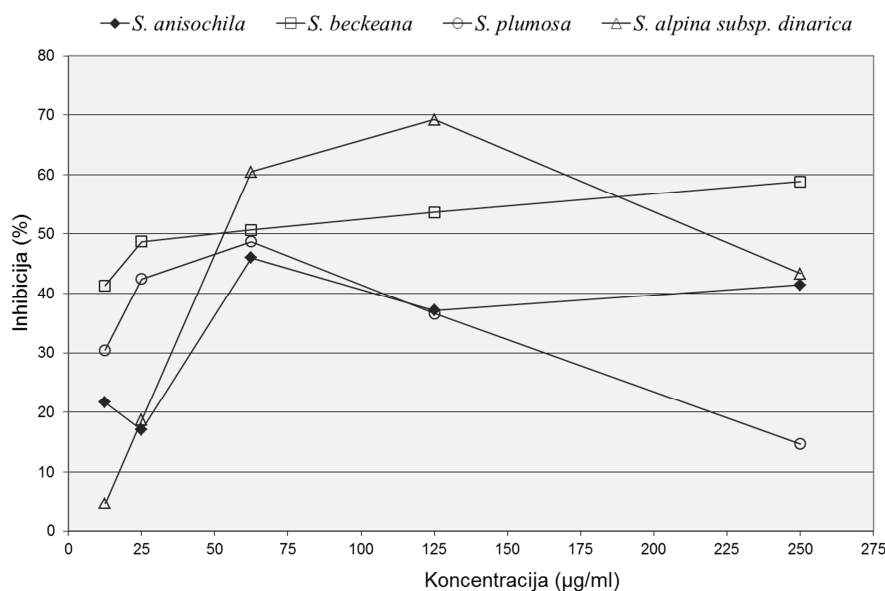
7.5. Inhibicija lipidne peroksidacije (TBA test)

Metanolni ekstrakti odabranih vrsta roda *Stachys* su ispoljili koncentraciono zavisnu inhibiciju lipidne peroksidacije (LP) (Tabela 48, Slika 31). Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* su 50% inhibicije LP postigli pri koncentracijama 25,07 i 49,00 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}), dok ekstrakti herbi *S. anisochila* i *S. plumosa* u primenjenim koncentracijama (12,5-250 $\mu\text{g/ml}$) nisu dostigli 50% inhibicije LP. Za kvercetin, korišćen kao standard, utvrđeno je da 50% inhibicije LP ostvaruje pri koncentraciji od 0,75 $\mu\text{g/ml}$. I u ovom slučaju konstatovano je da pri većim koncentracijama aktivnost ekstrakata opada.

Tabela 48. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na lipidnu peroksidaciju u liposomima (% inhibicije)

Koncentracija ($\mu\text{g/ml}$)	<i>S. anisochila</i>	<i>S. beckeana</i>	<i>S. plumosa</i>	<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>
12,5	21,68 \pm 3,01	41,35 \pm 1,74	30,49 \pm 2,12	4,64 \pm 0,82
25,0	17,05 \pm 1,22	48,73 \pm 1,94	42,46 \pm 0,29	18,72 \pm 2,21
62,5	46,02 \pm 3,77	50,70 \pm 0,70	48,73 \pm 0,68	60,49 \pm 4,49
125,0	37,13 \pm 1,13	53,63 \pm 1,39	36,60 \pm 0,75	69,24 \pm 2,26
250,0	41,47 \pm 3,27	58,81 \pm 0,03	14,71 \pm 2,98	43,35 \pm 4,25
IC_{50}	-	25,07	-	49,00

Rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja \pm S.D.



Slika 31. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na lipidnu peroksidaciju u liposomima (% inhibicije)

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su najznačajniji antioksidansi biljnog porekla različiti polifenoli (flavonoidi, tanini, fenolkarboksilne kiseline i sl.). Iako strukturno veoma raznovrsna, sva ova jedinjenja u osnovi sadrže jednu ili više fenolnih grupa, koje su donori vodonika čime neutrališu slobodne radikale kiseonika (ROS). To uslovljava njihovu antioksidantnu aktivnost, koja je u nekim slučajevima uporediva ili bolja od najčešće korišćenih antioksidanasa (vitamin C, tokoferoli, karotenoidi, koenzim Q₁₀).

Polifenoli biljnog porekla svoje zaštitno delovanje ispoljavaju na nekoliko nivoa:

- heliraju jone prelaznih metala (Fe i Cu)
- redukuju vodonik-peroksid (H₂O₂) ili lipidne perokside
- direktno neutrališu stvorene slobodne radikale kiseonika i azota (ROS/RNS) – sve su ovo antioksidantni mehanizmi
- utiču na aktivnost enzima intracelularnih signalnih kaskada (MAPK i sl.) – moguća uloga signalnih molekula
- moduliraju ekspresiju nekih gena (Niki, 2010).

Dosadašnjim ispitivanjima je za neke ekstrakte biljaka roda *Stachys*, kao i za neka iz njih izolovana jedinjenja, pokazano da ispoljavaju značajno antioksidantno delovanje (Tabela 16).

Značajnu anti-DPPH aktivnost pokazuju metanolni ekstrakti herbi *S. recta* subsp. *recta* (IC₅₀=1,96 µg/ml) i *S. palustris* (IC₅₀=2,7 µg/ml). Metanolni i etanolni ekstrakt herbe *S. alpina* [subsp. *alpina*] u značajnoj meri neutrališu DPPH radikal (IC₅₀=5,2 i 46,6 µg/ml, redom), dok je aktivnost hloroformskog ekstrakta znatno niža (IC₅₀=112 µg/ml) (Bilušić Vundać i sar., 2007). *n*-Butanolni ekstrakt nadzemnog dela *S. ocymastrum* takođe ispoljava snažno antioksidantno delovanje (IC₅₀=6,77 µg/ml; rutin IC₅₀=3,01 µg/ml) (Lakhal i sar., 2011). Većina ostalih ispitivanih polarnih ekstrakata (MeOH, EtOH) različitih vrsta roda *Stachys* snažno neutrališe DPPH radikal (IC₅₀=5-50 µg/ml) (Bilušić Vundać, 2007; Abichandani i sar., 2010).

Iz metanolnog ekstrakta herbe *S. byzantina*, koji ispoljava snažno anti-DPPH delovanje (IC₅₀=15 µg/ml), odnosno iz njegovih najaktivnijih frakcija izolovana su tri feniletanska heterozida: 2'-*O*-arabinozilverbaskozid (**1**), verbaskozid (**2**), ešinantozid C (**3**) i tri flavona: apigenin 7-*O*-glukozid (**4**), apigenin 7-*O*-(6-*p*-kumaroil)-glukozid (**5**) i

apigenin (6). Sva jedinjenja deluju kao DPPH „scavengeri“, a najveću aktivnost pokazuju feniletanoidi **1** i **2** ($IC_{50}=9,6$ i $8,8$ $\mu\text{g/ml}$, redom) (Asnaashari i sar., 2010).

Vodena frakcija metanolnog ekstrakta nadzemnog dela *S. inflata* pokazuje umerenu anti-DPPH aktivnost ($IC_{50}=89,5$ $\mu\text{g/ml}$), dok hloroformska frakcija istog ekstrakta značajno inhibira oksidaciju linolenske kiseline (77,08% vs. 87,59% BHT) (Ebrahimabadi i sar., 2010). Za metanolne ekstrakte nadzemnih delova *S. recta*, *S. annua*, *S. macrantha*, *S. officinalis* i *S. sylvatica* utvrđeno je da inhibiraju lipidnu peroksidaciju u homogenizatu mozga govečeta ($IC_{50}=39,8-93,0$ $\mu\text{g/ml}$). U ovom eksperimentu aktivnost ekstrakta herbe *S. alpina* [subsp. *alpina*] bila je slaba ($IC_{50}=219,4$ $\mu\text{g/ml}$) (Haznagy-Radnai i sar., 2006a).

Za neke od feniletanskih heterozida identifikovanih u ispitivanim ekstraktima, pokazano je da su značajni antioksidansi. Anti-DPPH aktivnost akteozida (verbaskozida) uporediva je sa aktivnošću butilhidroksitoluena (BHT) i značajno veća od aktivnosti α -tokoferola. Martinozid je takođe snažan “scavenger” DPPH radikala (Aligianis i sar., 2003). Antioksidanta aktivnost forzitozida B i akteozida (izolovani iz rizoma *Eremostachys glabra* Boiss. ex Benth., Lamiaceae) u DPPH testu bila je visoka (vrednost SC_{50} je iznosila 6,4 i 7,9 $\mu\text{g/ml}$, redom). SC_{50} vrednost kvercetina u istom testu bila je $2,78 \times 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$ (Delazar i sar., 2005b). Delazar i saradnici (2008) su za ova ista jedinjenja izolovana iz nadzemnog dela *Phlomis caucasica* Rech. fil. (Lamiaceae) u istom testu utvrdili takođe značajnu aktivnost ($SC_{50}= 4,97$ i $4,27$ $\mu\text{g/ml}$, redom). Neki efekti akteozida pripisuju se njegovom afinitetu da se veže i ugradi u fosfolipidne membrane, kako cviterjonske tako i one sa negativni nabojem, menjajući pri tom neka njihova fizička svojstva. Na taj način, između ostalog, on deluje kao snažan inhibitor lipidne peroksidacije (LP), ali ispoljava i značajno antibakterijsko delovanje, naročito prema Gram-(+) bakterijama kao što je *Staphylococcus aureus* (Funes i sar., 2010).

Fenolkarboksilne kiseline takođe poseduju snažnu anti-DPPH aktivnost, i to u sledećem opadajućem nizu, i u odnosu na α -tokoferol i BHT: rozmarinska > kafena > hlorogenska > α -tokoferol > ferula kiselina > BHT (Chen i Ho, 1997).

Utvrđeno je da su 7-O-(β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozil derivati 5,8-dihidroksiflavona relativno snažni antioksidansi, čija je aktivnost uporediva sa aktivnošću kvercetina. Među njima su i tri jedinjenja izolovana iz metanolnog ekstrakta

herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije: 4'-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **1**), 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **2**) i izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **3**) (Gabrieli i sar., 2005). Jedinjenja **2** i **3** su takođe identifikovana kao glavni flavonoidni heterozidi u ekstraktima herbi *S. anisochila* i *S. beckeana*. U ovim ekstraktu herbe *S. anisochila* jedinjenje **1** je prisutno u tragovima, dok u ekstraktu herbe *S. beckeana* nije detektovano.

Šest flavonoida slične strukture, uz akteozid, izolovano je iz nadzemnog dela *Sideritis brevibracteata* P. H. Davis (Lamiaceae) (BuOH frakcija). U TLC-DPPH testu pokazano je da su ova jedinjenja glavni nosioci antioksidantne aktivnosti. U TBA testu najveću aktivnost ispoljili su hipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid, hipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6'''-acetil- β -D-glukopiranozid i akteozid. Derivati hipolaetina su bili aktivniji od derivata izoskutelareina (Güvenç i sar., 2010).

Flavonoidi slične strukture, izolovani iz listova i korena *Galeopsis ladanum* L. (Lamiaceae) ispoljavaju snažno anti-DPPH delovanje (IC_{50} =2,9-11,4 μ g/ml). Najaktivniji su bili hipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (IC_{50} =2,9 μ g/ml), izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6'''-acetil- β -D-glukopiranozid (IC_{50} =5,6 μ g/ml) i izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **3** izolovano iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije) (IC_{50} =6,6 μ g/ml). Najslabiju, ali veoma značajnu aktivnost ispoljili su i 4'-metil izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (IC_{50} =11,1 μ g/ml), i 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (IC_{50} =11,4 μ g/ml) (jedinjenja **1** i **2**, redom, izolovana iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije) (Uriarte-Pueyo i Calvo, 2010).

Lagounne i saradnici (2011a, 2011b) su za izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **3** izolovano iz metanolnog ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica*), ranije izolovan iz korena i nadzemnog dela endemične vrste *S. mialhesi* Noë, takođe potvrdili snažno anti-DPPH delovanje.

Tehnikom ESR^a određena IC₅₀ vrednost *n*-butanolne frakcije metanolnog ekstrakta herbe iznosila je 47 µg/ml, a izolovanog jedinjenja 66 µg/ml. U istom eksperimentu su kao poredbene supstance korišćeni vitamin E i kvercetin (IC₅₀=25 i 12 µg/ml, redom). Ovo jedinjenje je okarakterisano i kao bolji anti-DPPH agens u odnosu na BHT, odnosno aktivnosti jednake α-tokoferolu (Saracoglu i sar., 2004).

Utvrđeno je da su 8-O-glukuronidi izoskutelareina i hipolaetina su jači anti-DPPH agensi nego kemferol. 2''-Sulfatni derivati ovih flavona ispoljavaju značajno slabiju *in vitro* antioksidantnu aktivnost, ali su veoma dobro rastvorljivi u vodi, što ukazuje na njihovu eventualnu bolju bioraspoloživost i povoljnije *in vivo* efekte (Yang i sar., 2003).

Snažnu inhibiciju oksidacije LDL i značajno neuroprotektivno delovanje ispoljavaju hrizoeriol 4'-O-β-D-glukopiranozid i hrizoeriol 7-O-β-D-glukopiranozid, izolovani iz herbe *Dioscorea opposita* Thunb. (Dioscoreaceae) (Ma i sar., 2005). Hrizoeriol, apigenin i apigenin 7-O-[6''-O-(*p*-kumaroil)]-β-D-glukopiranozid izolovani iz *Leucas aspera* Link. (Lamiaceae) ne ispoljavaju značajnu anti-DPPH aktivnost u TLC-DPPH testu (IC₅₀>500 µM) (Sadhu i sar., 2003). Hrizoeriol 7-O-rutinozid i hrizoeriol 7-O-glukozid (izolovani iz *Phlomis caucasica*, Lamiaceae) su umereni DPPH „scavenger“-i (IC₅₀=94,7 i 98,6 µg/ml, redom) (Delazar i sar., 2008). Luteolin je odličan inhibitor Fe³⁺-katalizovane peroksidacije u lipozomima, aktivniji čak i od *t*-butilhidrohinona (TBHQ) (Arora i sar., 1998).

Za ekstrakte herbi *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije utvrđeno je da ispoljavaju značajnu antioksidantnu aktivnost. Naši rezultati su slični rezultatima ispitivanja nekih drugih vrsta ovog roda (Tabela 16). Visoka korelacija sadržaja ukupnih polifenola sa ukupnom antioksidantnom aktivnošću (UAA), tj. sposobnošću neutralizacije DPPH radikala (Slike 25 i 27) ukazuje da su nosioci ove aktivnosti polifenolna jedinjenja: flavonoidni i feniletanski heterozidi i fenolkarboksilne kiseline. Ovo je u skladu i sa rezultatima TLC-DPPH testa, gde su se kao glavne zone neutralizacije DPPH radikala izdvojile zone koje odgovaraju flavonoidnim heterozidima (Slika 28). Takođe, ako se uzmu u obzir i rezultati kvantitativne HPLC analize (Tabele 40 i 41) jasno je zašto ekstrakt herbe *S. anisochila* ispoljava najjače antioksidantno delovanje – sadrži najviše flavonoidnih

^a Elektron Spin Rezonancija

heterozida (preko 50%) i to upravo onih za koje je utvrđena izuzetno visoka aktivnost (poput jedinjenja **3** i **2**, izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozida i 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozida). Takođe je i sadržaj fenolkarboksilnih kiselina u ovom ekstraktu značajan (14,18%), što znatno doprinosi ispoljenoj aktivnosti. Ekstrakt herbe *S. beckeana* sadrži najviše feniletanskih heterozida, u prvom redu akteozida (9,07%), što uz značajan sadržaj flavonoidnih heterozida (oko 20%) doprinosi njegovoj visokoj antioksidantnoj aktivnosti.

HPLC analiza metanolnog ekstrakta herbe *S. plumosa* takođe može da objasni najslabiju antioksidantnu aktivnost ovog ekstrakta u poređenju sa preostala tri. Ovaj ekstrakt ne sadrži heterozide izoskutelareina i hipolaetina, već heterozide hrizoeriola (10,74%) i apigenina, za koje je utvrđeno relativno slabo antioksidantno delovanje.

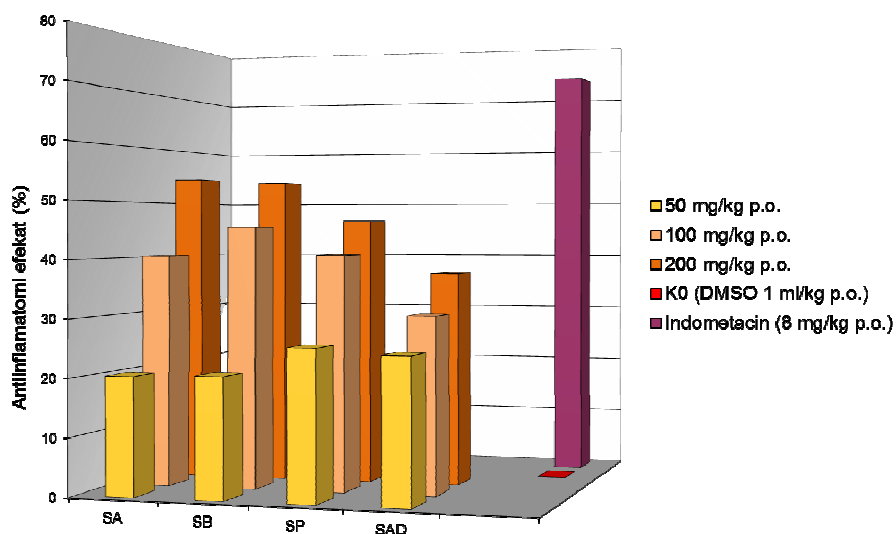
8. Antiinflamatorna aktivnost

Rezultati ispitivanja antiinflamatornog delovanja ispitivanih suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova prikazani su u Tabeli 49 i na Slici 32.

Tabela 49. Antiinflamatorni efekat ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys*

Ekstrakt	Doza (mg/kg p.o.)	Antiinflamatorni efekat (%)	ED ₅₀ (mg/kg p.o.)
<i>S. anisochila</i>	50	20,33 ± 12,11*	162,24
	100	40,39 ± 6,06**	
	200	54,04 ± 11,20**	
<i>S. beckeana</i>	50	20,65 ± 8,97*	154,52
	100	45,43 ± 10,02**	
	200	53,30 ± 5,72**	
<i>S. plumosa</i>	50	25,65 ± 7,19*	220,81
	100	40,65 ± 14,23*	
	200	46,52 ± 14,70*	
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	50	24,67 ± 9,67*	/
	100	30,43 ± 5,39*	
	200	37,17 ± 16,63*	
Indometacin	1	27,14 ± 11,83	2,53
	2	50,37 ± 5,96*	
	4	58,06 ± 13,87*	
	8	74,32 ± 15,70**	

* p<0,05, ** p<0,01 (vs. indometacin 8 mg/kg p.o.); ED₅₀ – srednja efektivna doza.



Slika 32. Antiinflamatorni efekat ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD)

Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su dozno zavisno antiinflamatorno delovanje (Tabela 49, Slika 32). Maksimalni efekti postignuti su primenom najviše testirane doze (200 mg/kg). Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. anisochila* ispoljili su najveću antiinflamatornu aktivnost. U dozi od 200 mg/kg ovi ekstrakti suprimirali su inflamatorni odgovor za 54,04%, odnosno 53,30%. Ekstrakt herbe *S. plumosa* je ispoljio nešto nižu aktivnost u odnosu na prethodna dva ekstrakta, sa maksimalnim antiinflamatornim efektom od 46,52% (200 mg/kg). Najslabiji antiinflamatorni efekat ispoljio je ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* - u najvećoj primenjenoj dozi supresija inflamacije iznosila je 37,17%.

Interesantno je da su Haznagy-Radnai i saradnici (2011) ispitivali antiinflamatorni efekat vodenog ekstrakta herbe tipske podvrste *S. alpina* [subsp. *alpina*] takođe na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova. Ustanovili su da ekstrakt u dozi od 5 mg/kg nakon oralne (*p.o.*) primene ispoljava sličan efekat kao diklofenak-natrijum u istoj dozi. Nakon intraperitonealne (*i.p.*) primene istih doza ekstrakt je bio znatno efikasniji od referentnog leka: suprimirao je edem za oko 80%, a diklofenak-natrijum za oko 40%.

Takođe, neke vrste roda *Stachys* tradicionalno se koriste kod različitih inflamatornih stanja (Tabela 15), a potvrdu ovog delovanja dale su i neke farmakološke studije (Tabela 16). Ekstrakti nadzemnih delova *S. inflata* se u narodnoj medicini Irana koriste

kod infektivnih, reumatskih i drugih inflamatornih bolesti. Maleki i sar. (2001) su ispitivali antiinflamatorno delovanje 70% MeOH ekstrakta nadzemnog dela ove biljke. Intraperitonealno primenjen ekstrakt ispoljava dozno zavisnu inhibiciju otoka šapice pacova izazvanu karageninom u rasponu koncentracija od 50-200 mg/kg. Ekstrakt u dozama 50, 100 i 200 mg/kg ne utiče na prvu fazu inflamacije izazvanu formalinom, dok je uticaj u drugoj fazi statistički značajan. Ekstrakt u dozi 200 mg/kg značajno snižava aktivnost mijeloperoksidaze (MPO), odnosno značajno smanjuje tkivna oštećenja i infiltraciju neutrofila. Utvrđeno je da acetonski i metanolni ekstrakti nadzemnih delova *S. byzantina* u dozama od 50, 100 i 200 mg/kg značajno blokiraju drugu fazu inflamatorne reakcije izazvane formalinom. Dozno zavisno antiinflamatorno delovanje oba ekstrakta u navedenim dozama ispoljavaju i u karagenskom testu. Ovakva antiinflamatorna aktivnost je slična efektima visokih doza indometacina (5 mg/kg) (Khanavi i sar., 2005).

I za mnoge druge biljke, koje se tradicionalno koriste kod inflamatornih stanja, pokazano je da kao glavne aktivne sastojke sadrže akteozid i druge feniletanske heterozide (Deepak i sar., 1999). Tako je utvrđeno da akteozid i forzitozid B selektivno inhibiraju COX-2, pri čemu je forzitozid B aktivniji (Sahpaz i sar., 2002). Poznato je da ekstrakti nekih biljaka, koji sadrže akteozid kao glavnu komponentu, osim antiinflamatornog ispoljavaju i antiulkusno delovanje, što se može pripisati selektivnoj inhibiciji COX-2 (Penido i sar., 2006). Osim toga, akteozid značajano i koncentraciono zavisno inhibira oslobađanje tromboksana B₂ (TXB₂), faktora nekroze tumora α (TNF-α), NO i LPS-indukovanog prostaglandina E₂ (PGE₂) (Diaz i sar. 2003) i ispoljava značajan inhibitorni efekat na LPS-indukovan porast ukupnih leukocita, neutrofila i eozinofila (Küpeli i sar., 2007a). Utvrđeno je da su u mehanizam njegovog antiinflamatornog delovanja takođe uključeni antioksidantno delovanje, inhibicija protein kinaze C (PKC), nishodna regulacija ekspresije intracelularnog adhezionog molekula 1 (eng. intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) i inhibicija 5-hidroksieikozatetraenoične kiseline (5-HETE) i leukotrijena B₄ (LTB₄). Pokazano je i da akteozid umanjuje sekreciju proinflamatornih citokina interleukina 10 (IL-10), faktora nekroze tumora α (TNF-α), interferona γ (INF-γ) i granulocitno-makrofagnog faktora rasta kolonije (GM-CSF) i aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) kod akutnog i hroničnog kolitisa *in vivo* (Hausmann i sar., 2007). Akteozid, izolovan iz *S. sieboldii*,

ispoljava značajno antinefritično delovanje (smanjuje urinarnu ekskreciju proteina i histopatološke promene u GBM^a modelu nefritisa i inhibira ekspanziju mezangijalnih ćelija u anti-Thy1 modelu nefritisa kod pacova). Iako se ovo delovanje akteozida povezuje sa uticajem na imunski odgovor posredovan ćelijama, pokazano je da on ne suprimira stvaranje interleukina 2 (IL-2) i LTB₄, ali smanjuje ekspresiju ICAM-1 i adheziju makrofaga, odnosno da deluje tako što smanjuje adheziju leukocita za endotelne ćelije glomerula i posledično njihovu akumulaciju u glomerulima (Hayashi i sar., 1996). Sintetskim putem je dobijena čitava serija jedinjenja sa piridil-akrilamidnim skeletom, koji su hemijski derivati kafene kiseline i feniletilalkohola. U *in vivo* testovima ispitivano je njihovo antinefritično delovanje i kao najefikasniji se pokazao derivat akteozida označen kao TJN-259 (Sadakane i sar., 2009).

Stachys schtschegleevii se u Iranu tradicionalno upotrebljava kod infektivnih i reumatskih bolesti. Za frakcije etilacetatnog ekstrakta nadzemnog dela ove biljke pre cvetanja, koje ispoljavaju antiinflamatorno delovanje kod pacova u dozi od 100 mg/kg *i.p.*, utvrđeno je da kao glavne sastojke sadrže akteozid, hrizoeriol 7-O-β-[6''-p-kumaroil]-glukozid i apigenin 7-O-β-[6''-p-kumaroil]-glukozid. U takođe aktivnom hloroformskom ekstraktu identifikovani su flavonoidi penduletin, cirzimaritin i ksantomikrol (Maleki-Dizaji i sar., 2008).

Stahiren, flavonoidna frakcija izolovana iz *S. recta*, ispoljava antiinflamatorno, antitoksično i hipoazotemično delovanje kod pacova (Zinchenko i sar., 1981).

Jedinjenja izolovana iz acetonskog ekstrakta herbe *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae): izoskutelarein 7-O-[6'''-acetyl-β-D-alopiranozil-(1→2)]-β-D-glukopiranozid (jedinjenje **3** izolovano iz metanolnog ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije) i izoskutelarein 7-O-[6'''-acetyl-β-D-alopiranozil-(1→2)]-6''-acetyl-β-D-glukopiranozid, ispoljavaju antinociceptivni i antiinflamatorni efekat (Küpeli i sar., 2007a).

Pokazano je takođe da hipolaetin (5,7,8,3',4'-pentahidroksi flavon) i njegov 8-β-D-glukozid selektivno inhibiraju aktivnost lipooksigenaze *in vitro* (Ferrandiz i Alcaraz, 1991). Za hipolaetin 7-O-β-D-glukopiranozid je pokazano da je nosilac antiinflamatornog i antiulkusnog delovanja *Sideritis mugronensis* Borja (Lamiaceae),

^a Anti-glomerular basement membrane

biljke koja se tradicionalno koristi u Španiji kod upala i reumatizma (Villar i sar., 1984, 1985).

Za flavonoide - derivate hipolaetina i izoskutelareina: hipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid, izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **3** izolovano iz metanolnog ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije), 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **2** izolovano iz metanolnog ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije), hipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6''-acetil- β -D-glukopiranozid, izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6''-acetil- β -D-glukopiranozid i 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6''-acetil- β -D-glukopiranozid), kao i za akteozid, koji su izolovani iz nadzemnog dela (BuOH frakcija) *Sideritis brevibracteata* P. H. Davis (Lamiaceae), pokazano je da ispoljavaju antiinflamatorno i antinociceptivno delovanje. Delovanje derivata hipolaetina i akteozida bilo je izraženije u odnosu na derivate izoskutelareina. Takođe je pokazano da izolovana jedinjenja i aktivne frakcije ne ispoljavaju akutnu toksičnost, niti dovode do gastrointestinalnih oštećenja (Güvenç i sar., 2010).

Apigenin i hrizoeriol snažno inhibiraju oslobađanje azot oksida (NO), tj. potencijalno se mogu koristiti kao inhibitori NO-sintaze (NOS) (Liang i sar., 2011). Na produkciju NO modulatorno deluje i akteozid (Harput i sar., 2012). Za nekoliko derivata hrizoeriola (izolovanih iz aktivne frakcije herbe *Sideritis ozturkii* Aytac & Aksoy, Lamiaceae) pokazano je da deluju antiinflamatorno i antinociceptivno; ozturkozid C (hrizoeriol 7-O-[2'''-O-*p*-kumaroil-6'''-O-acetil- β -D-glukopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6''-O-acetil- β -D-glukopiranozid) je bio najaktivniji (Küpeli i sar., 2007b).

Apigenin 7-O-[6''-O-(*p*-kumaroil)- β -D-glukopiranozid] izolovan iz nadzemnog dela *Leucas aspera* Link (Lamiaceae) inhibira PGE₁-, ali ne i PGE₂-indukovanu kontrakciju ileuma morskog praseta (Sadhu i sar., 2003). 7-O- β -D-Glukopiranozidi apigenina i luteolina inhibiraju 15-HETE (Zheng i sar., 2005). 7-O-Glukozidi apigenina i luteolina, luteolin 3'-O-glukozid i β -hidroksiakteozid u dozi 200 mg/kg inhibiraju karageninom indukovanu inflamaciju šapice pacova (Tatli i sar., 2008). Flavonoidi koji su po svojoj strukturi slični luteolinu (sa 3',4',5,7-tetrahidroksi supstitucijom) ispoljavaju i slično

antiinflamatorno delovanje, odnosno inhibiraju LPS-indukovano stvaranje TNF- α (Ueda i sar., 2004).

Za hlorogensku kiselinu je pokazano da deluje antiedematozno na modelu karageninom indukovano zapaljenja šapice pacova, i da suprimira formalinom indukovani bol (dos Santos i sar., 2006). Shan i saradnici (2009) su pokazali da hlorogenska kiselina reguliše ekspresiju inflamatornih citokina u LPS-aktiviranim makrofagima.

Svi ovi podaci ukazuju da su jedinjenja iz grupe flavonoidnih i feniletanskih heterozida i fenolkarboksilne kiseline, nosioci antiinflamatornog delovanja različitih biljaka. U slučaju ispitivanih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* može se zaključiti da su feniletanski heterozidi poput akteozida, flavonoidi - heterozidi izoskutelareina i hipolaetina, poput jedinjenja izolovanih iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije (izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid - jedinjenje **3**, 4'-metilhipolaetin 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid - jedinjenje **2**), i hlorogenska kiselina, barem delom odgovorni za ispoljeno delovanje. Uočava se jasna korelacija sadržaja ovih klasa sekundarnih metabolita i ispoljene antiinflamatorne aktivnosti. Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. anisochila*, koji sadrže najveći procenat feniletanskih heterozida, odnosno flavonoida i hlorogenske kiseline, ispoljili su i najbolje antiinflamatorno delovanje.

Iridoidi su sekundarni metaboliti identifikovani u mnogim vrstama roda *Stachys* (Tabela 9). Za neke iridoide je pokazano da deluju antiinflamatorno putem inhibicije COX i LOX, da smanjuju ekspresiju i sintezu TNF α i IL-6 putem inhibicije NF κ B (Penido i sar., 2006). Haznagy-Radnai i saradnici (2011) nedavno su utvrdili da vodeni ekstrakti nadzemnih delova nekoliko vrsta roda *Stachys* (*S. alpina*, *S. germanica*, *S. officinalis* i *S. recta*) primenjeni oralno (*p.o.*) ili intraperitonealno (*i.p.*) u dozi od 5 mg/kg na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova, ispoljavaju sličan ili bolji antiinflamatorni efekat u odnosu na istu dozu diklofenak-natrijuma. Ustanovljeno je da iridoidi identifikovani u ovim ekstraktima (ajugozid, acetilharpagid, harpagid, a naročito aukubin i harpagozid) primenjeni u istoj dozi (5 mg/kg), takođe deluju antiinflamatorno (Haznagy-Radnai i sar., 2011).

Iridoidi nisu bili predmet proćavanja u okviru ove doktorske disertacije. U literaturi postoje podaci da su u listu *S. anisochila* identifikovani harpagid i 8-acetilharpagid, u listu *S. beckeana* (u zavisnosti od porekla biljnog materijala) melitozid, harpagid, acetilaharpagid, ajugol i ajugozid (Lenherr i sar., 1984a), a u stabljici i listu *S. alpina* [subsp. *alpina*] harpagid (Haznagy-Radnai i sar., 2006a). Za ova jedinjenja ustanovljeno je da selektivno inhibiraju enzim tromboksan-sintetazu, što je verovatni mehanizam njihovog antiinflamatornog delovanja (Bermejo Benito i sar., 2000). Međutim, u listu *S. anisochila* i nadzemnim delovima *S. alpina* [subsp. *alpina*] ukupan sadržaj iridoida je manji od 1% (Lenherr i sar., 1984a; Haznagy-Radnai i sar., 2006b), tako da je malo verovatno da oni znaćajnije doprinose ispoljenom antiinflamatornom delovanju. U listu *S. beckeana* iridoidi su zastupljeni sa oko 3% (Lenherr i sar., 1984a), pa je u ovom slučaju njihov mogući doprinos ispoljenoj antiedematoznoj aktivnosti izvesniji.

Osim oslobađanja citokina, za inflamatorni odgovor je karakteristićna velika produkcija slobodnih radikala, tj. reaktivnih vrsta kiseonika i azota (ROS i RNS). Nastanak ROS poput superoksil anjon radikala (O_2^-), hidroksil radikala (OH) i peroksinitrit anjona ($ONOO^-$), dešava se na mestu inflamacije i doprinosi oštećenju tkiva. Kod akutnog i hronićenog zapaljenja dolazi do stvaranja velike kolićine slobodnih radikala (uglavnom superoksil anjon radikala, O_2^-), što narušava ravnotežu i smanjuje kapacitet enogenih antioksidantnih sistema, doprinoseći dodatnom oštećenju tkiva. Superoksil anjon radikal ispoljava važne proinflamatorne efekte: oštećenje endotelnih ćelija i povećanje mikrovaskularne propustljivosti, formiranje hemotaktićenih faktora (npr. LTB_4), lipidna peroksidacija i oksidacija i oštećenje lanaca DNK. Hidroksil radikal (OH) dovodi do lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i kidanja lanaca DNK. Najveći deo efekata na DNK i ostale organske molekule koji se pripisuju vodonik-peroksidu (H_2O_2) zapravo su efekti OH radikala, koji nastaje iz H_2O_2 u Fentonovoj reakciji (Izzi i sar., 2012). Za slobodne radikale kiseonika (ROS) je takođe pokazano da inflamatorne efekte ispoljavaju putem direktnog delovanja na ciljne ćelije i putem indukcije genske ekspresije, naroćito putem aktivacije redoks-senzitivnog transkripcionog faktora NF- κ B (Menegazzi i sar., 2006). Najveći broj antioksidantnih supstanci direktno neutrališe ROS ili helira jone prelaznih metala (Fe i Cu), dok neki deluju i na proinflamatorne enzime (COX, LOX, NOS) (Sadik i sar., 2003; Sala i sar.,

2006), kao i putem sprečavanja aktivacije kaskade citokina i putem ushodne regulacije adhezionih molekula (Menegazzi i sar., 2006).

Za sve ispitivane ekstrakte herbi odabranih taksona roda *Stachys* pokazano je da deluju antioksidantno, pa se može pretpostaviti da je ta njihova aktivnost delom doprinosi ispoljenim antiinflamatornim efektima. Ovo se naročito uočava u slučaju ekstrakata herbi *S. beckeana* i *S. anisochila*, koji su ispoljili snažno antioksidantno delovanje, a pritom i najsnažniji antiinflamatorni efekat.

9. Hepatoprotektivna aktivnost

Procena hepatoprotektivnog delovanja metanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* izvršena je na osnovu njihovog uticaja na nivo enzima jetre u serumu, kao i na osnovu uticaja na patohistološke promene u tkivu jetre nakon ugljen-tetrahloridom izazvanog oštećenja jetre.

Kod pacova koji su tretirani ugljen-tetrahloridom (pozitivna kontrola, K1) došlo je do pojave hepatocelularnih oštećenja, na šta ukazuje značajan porast nivoa enzima jetre (aspartat aminotransaminaze - AST, alanin aminotransaminaze - ALT i alkalne fosfataze - AP) u serumu ($p < 0,001$ vs. K0) (Tabela 50, Slika 33). Visoke vrednosti parametra SOT¹ kod ovih životinja (4,29) takođe ukazuju na masivne degenerativne i vaskularne promene u jetri (Tabela 51, Slika 34). Kod životinja iz ove grupe normalna građa tkiva parenhima jetre u potpunosti je izmenjena, uz pojavu masnog infiltrata i nekroze. Krvni sudovi su uglavnom pokidani, sa brojnim fokalnim krvavljenjima i značajnim infiltracijama polimorfonukleara (PMN) (Slika 35-II). Promene su bile znatno izraženije u centrilobularnim delovima delovima, nego u periportalnoj oblasti.

Ispitivani ekstrakti, osim u slučaju ekstrakta herbe *S. anisochila*, značajno su snižavali vrednosti AST i ALT. Serumska aktivnost AP bila je značajno snižena pod dejstvom svih ekstrakata u svima dozama ($p < 0,001$ vs. K1) (Tabela 50, Slika 33).

Najbolji i dozno-zavistan efekat ispoljio je ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* (Tabela 51, Slika 34). U dozi od 200 mg/kg (T1 SAD) oštećenje jetre je smanjeno za oko 50% (SOT=2,23). Hepatoprotektivni efekat ostalih ekstrakata bio je takođe uočljiv, ali između primenjenih doza (200 i 100 mg/kg) nije bilo statistički značajnih razlika (Tabela 51). Efekti ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana* međusobno su bili slični i bolji u odnosu na efekte ekstrakta herbe *S. plumosa* (Slike 35-III-V).

Vrednosti SOT kod životinja tretiranih samo maslinovim uljem (2,5 ml/kg s.c.; K3) i samo ispitivanim ekstraktima (200 mg/kg p.o.; K2) su takođe uvek bile značajno više nego vrednosti u kontrolnoj grupi (K0) (Tabela 51, Slika 36). Kod životinja iz grupe K3, pojavile su se takođe izvesne degenerativne i vaskularne promene, kao i kod

¹ Stepen oštećenja tkiva

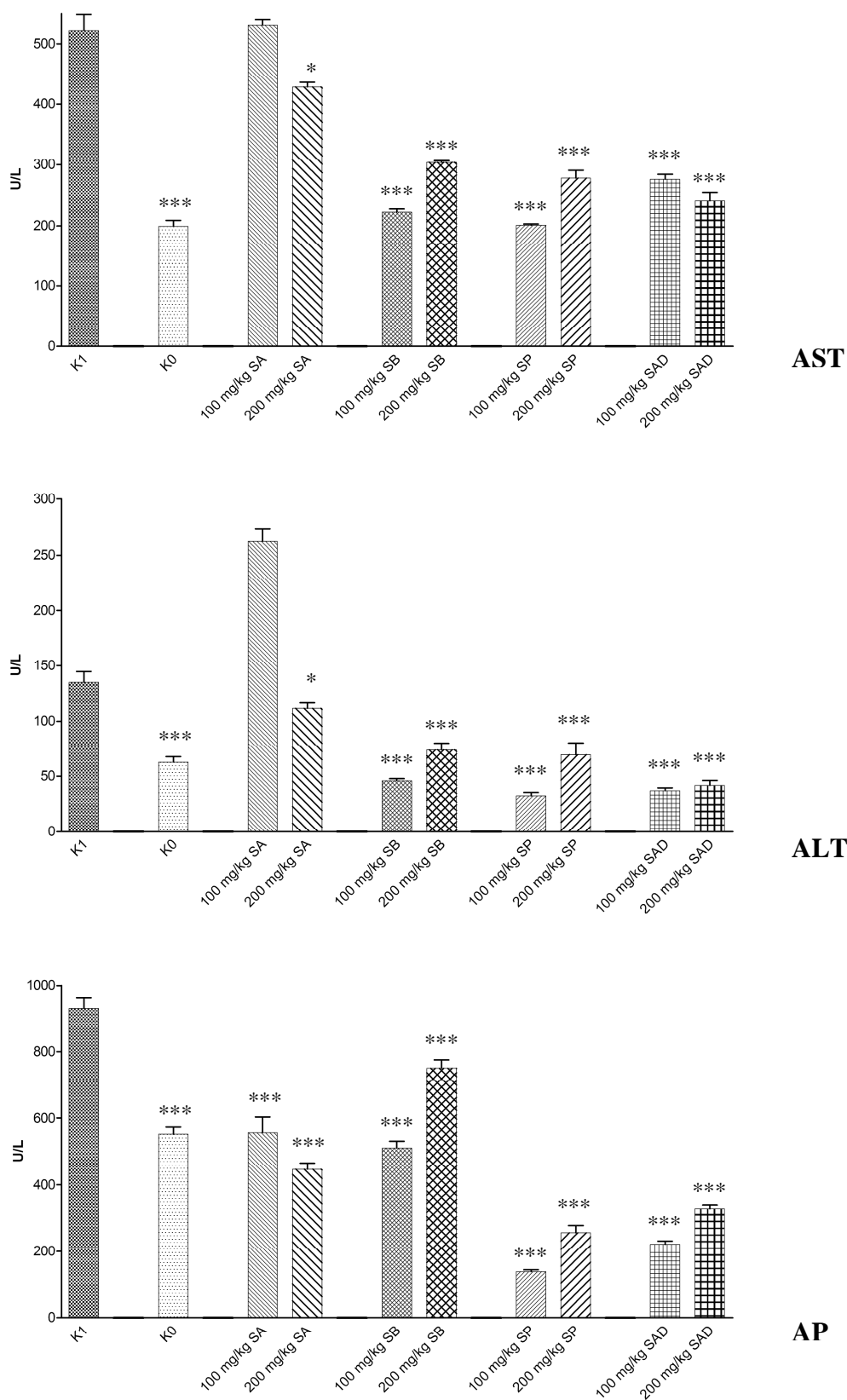
životinja koje su primale čiste ekstrakte (K2) (blago uvećani hepatociti, sa malim citoplazmatskim granulama u normalnim jedrima, umereno prošireni mali krvni sudovi bez promena u kontinuitetu njihovih zidova). Ove promene su bile nešto manje izražene u odnosu na promene u grupi K3, ali razlike među njima nisu bile statistički značajne.

U svim ispitivanim uzorcima tkiva jetre histopatološke promene su bile mnogo izraženije u centrilobularnom nego u periportalnom delu. Ovo je u skladu sa ranijim nalazima da nizak parcijalni pritisak kiseonika pojačava toksične efekte ugljen-tetrahlorida. Lipidna peroksidacija započinje i najefikasnija je pri parcijalnom pritisku kiseonika od 7 mmHg. Pri pritiscima od 35-70 mmHg (parcijalni pritisak kiseonika u venskoj krvi) LP je u početku spora, ali se nakon 30 minuta znatno pojačava i dostiže maksimum (Weber i sar., 2003).

Tabela 50. Uticaj ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na CCl₄-indukovano oštećenje jetre: nivo enzima jetre u serumu

Grupa	AST (U/L)	ALT (U/L)	AP (U/L)
K0	199,04 ± 21,91	62,86 ± 10,97	552,80 ± 47,79
K1	522,05 ± 59,22***	134,90 ± 19,77***	928,80 ± 64,70***
K3	211,62 ± 52,88 ^b	50,98 ± 5,84 ^b	342,40 ± 1,56 ^b
K2 SA	278,05 ± 13,63 ^b	57,27 ± 5,71 ^b	548,90 ± 119,70 ^b
100 mg/kg SA (T2)	531,13 ± 20,79	262,30 ± 21,73 ^b	557,60 ± 92,73 ^b
200 mg/kg SA (T1)	428,64 ± 11,11 ^a	111,70 ± 10,76 ^a	447,60 ± 35,88 ^b
K2 SB	154,70 ± 38,00 ^b	28,64 ± 5,18 ^b	530,20 ± 39,06 ^b
100 mg/kg SB (T2)	222,09 ± 12,68 ^b	46,09 ± 4,20 ^b	510,80 ± 40,69 ^b
200 mg/kg SB (T1)	303,80 ± 5,09 ^b	74,03 ± 13,61 ^b	750,20 ± 55,46 ^b
K2 SP	217,38 ± 24,09 ^b	37,02 ± 5,00 ^b	187,00 ± 55,51 ^b
100 mg/kg SP (T2)	200,80 ± 3,49 ^b	32,48 ± 6,37 ^b	138,20 ± 11,53 ^b
200 mg/kg SP (T1)	277,60 ± 22,69 ^b	69,40 ± 21,87 ^b	256,40 ± 43,85 ^b
K2 SAD	168,66 ± 20,86 ^b	38,06 ± 6,92 ^b	329,50 ± 27,18 ^b
100 mg/kg SAD (T2)	275,87 ± 16,69 ^b	37,01 ± 5,58 ^b	221,70 ± 21,88 ^b
200 mg/kg SAD (T1)	240,60 ± 30,18 ^b	41,90 ± 9,72 ^b	328,40 ± 26,56 ^b

*** p<0,001 (vs. K0); ^a p<0,05, ^b p<0,001 (vs. K1).

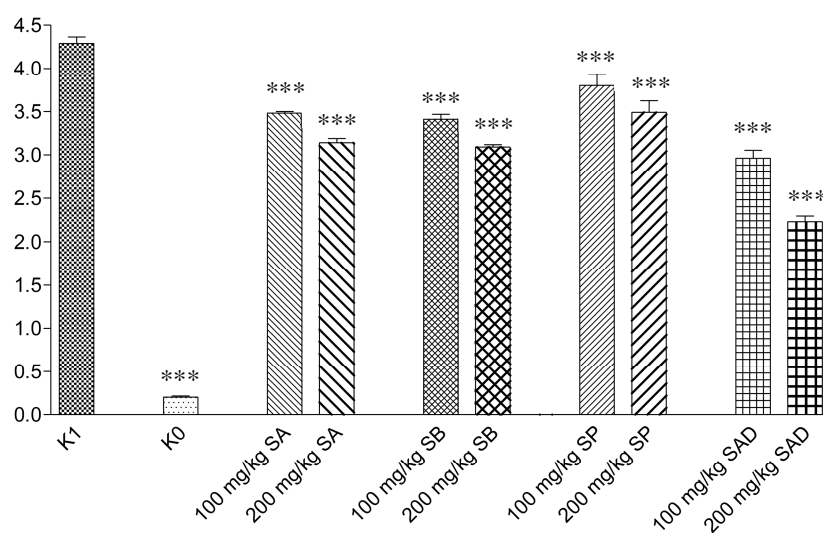


Slika 34. Uticaj ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na CCl₄-indukovano oštećenje jetre: nivo enzima jetre u serumu; srednja vrednost ± S.D; * p<0,05, *** p<0,001 (vs. K1)

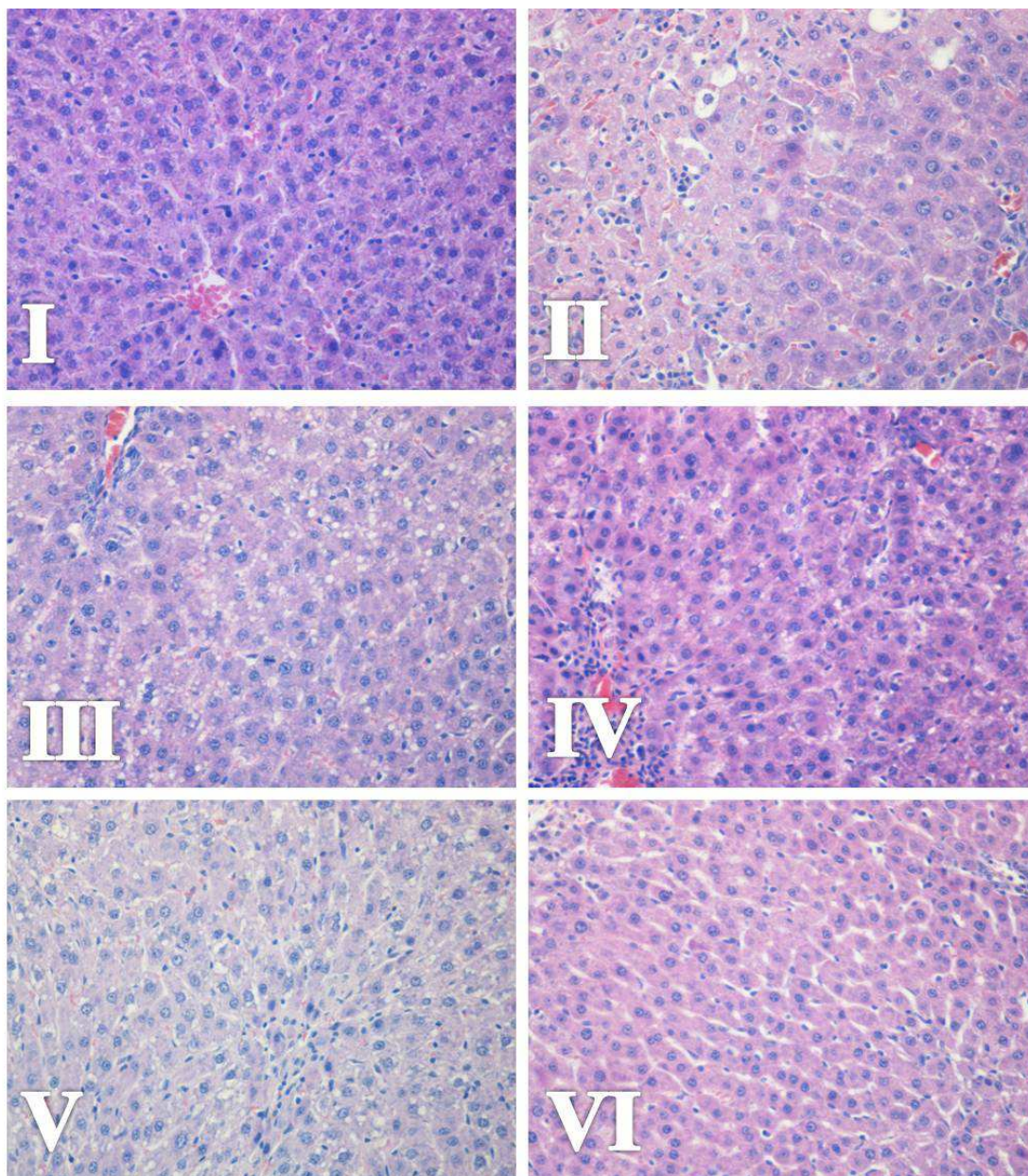
Tabela 51. Uticaj ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na CCl₄-indukovano oštećenje jetre: stepen oštećenja tkiva (SOT)

Grupa	Stepen oštećenja tkiva (SOT)
K0	0,20 ± 0,04
K1	4,29 ± 0,17 ***
K3	1,39 ± 0,08 ^a
K2 SA	1,23 ± 0,08 ^a
100 mg/kg SA (T2)	3,48 ± 0,04 ^a
200 mg/kg SA (T1)	3,14 ± 0,11 ^a
K2 SB	0,84 ± 0,24 ^a
100 mg/kg SB (T2)	3,41 ± 0,13 ^a
200 mg/kg SB (T1)	3,09 ± 0,07 ^a
K2 SP	1,24 ± 0,13 ^a
100 mg/kg SP (T2)	3,80 ± 0,29 ^a
200 mg/kg SP (T1)	3,49 ± 0,30 ^a
K2 SAD	1,36 ± 0,07 ^a
100 mg/kg SAD (T2)	2,96 ± 0,20 ^a
200 mg/kg SAD (T1)	2,23 ± 0,14 ^{a, l}

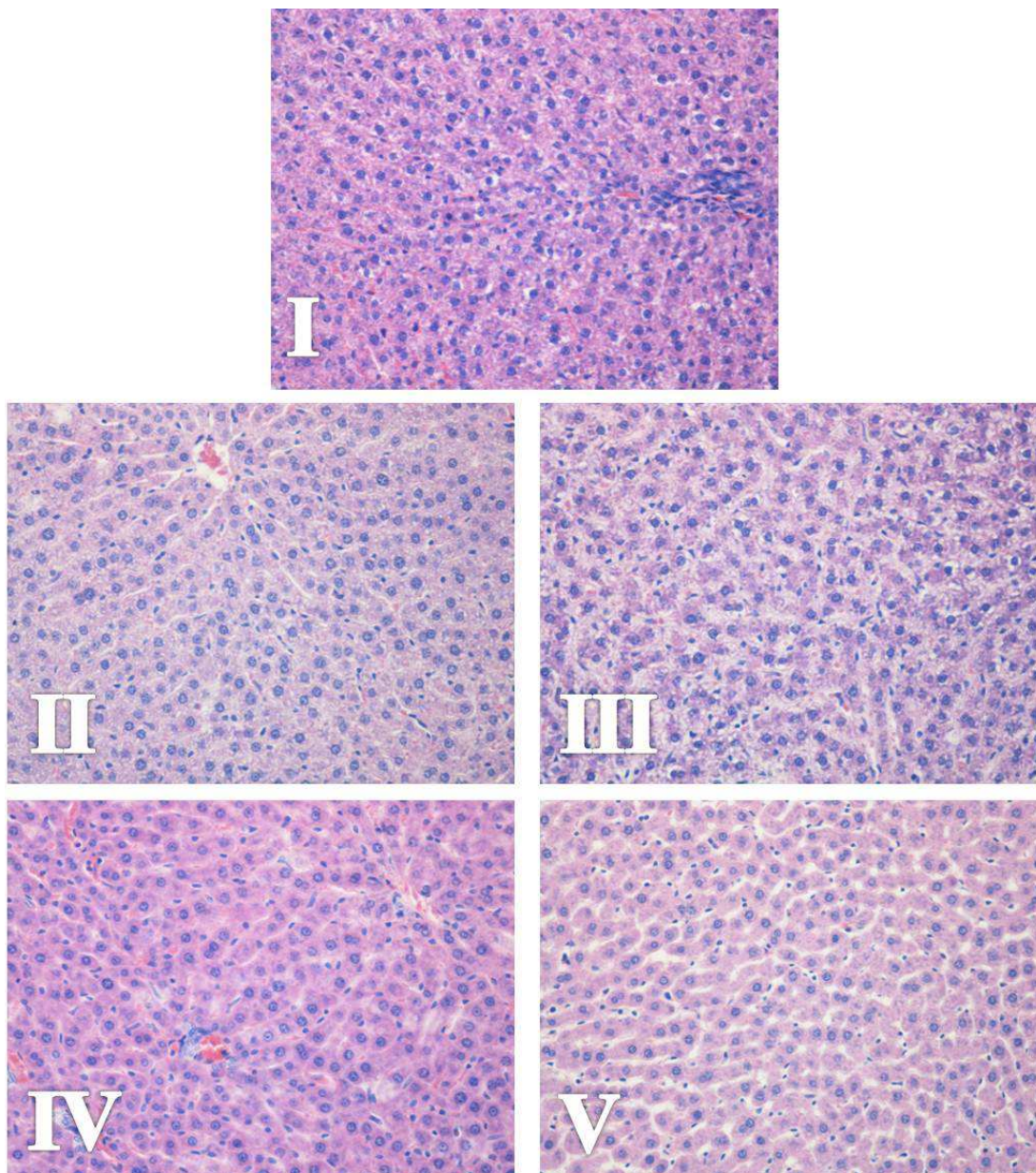
*** p<0,001 (vs. K0); ^a p<0,001 (vs. K1); ^l p<0,001 (T1 vs. T2)



Slika 34. Uticaj ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na CCl₄-indukovano oštećenje jetre: stepen oštećenja tkiva (SOT); srednja vrednost ± S.D; *** p<0,001 (vs. K1)



Slika 35. Uticaj ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na CCl_4 -indukovano oštećenje jetre: stepen oštećenja jetre (SOT). I - grupa K0 (SOT=0,2); II - grupa K1 (SOT=4,29); III - 200 mg/kg SA (SOT=3,14); IV - 200 mg/kg SB (SOT=3,09); V - 200 mg/kg SAD (SOT=2,23); VI - 200 mg/kg SP (SOT=3,49). Bojenje hematoksilin i eozin (HE) metodom; uvećanje 20 \times .



Slika 36. Efekat maslinovog ulja (vehikulum) i ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. beckeana* (SB), *S. plumosa* (SP) i *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD) na intaktnu jetru: stepen oštećenja jetre (SOT). I – grupa K3 (SOT=1,39); II – grupa K2SA (SOT=1,23); III – grupa K2SB (SOT=0,84); IV – grupa K2SP (SOT=1,24); V – grupa K2SAD (SOT=1,36). Bojenje hematoksilin i eozin (HE) metodom; uvećanje 20×.

Mehanizam hepatotoksičnosti ugljen-tetrahlorida je veoma složen i zasniva se na aktivaciji enzima citohroma P450, što dovodi do stvaranja visoko reaktivnih metabolita: trihlorometil ($\cdot\text{CCl}_3$) i trihlorometilperoksi radikala ($\cdot\text{CCl}_3\text{O}_2$). Ove reaktivne vrste su sposobne da se kovalentno vežu za ćelijske makromolekule, a naročito za masne kiseline iz membranskih fosfolipida. Napadom na polinezasićene masne kiseline (eng.

polyunsaturated fatty acids, PUFA) u ćelijskoj membrani, slobodni radikali započinju proces lipidne peroksidacije (LP) i posledičnu lančanu reakciju (Manibusan i sar., 2007). Posledice toga su promene permeabilnosti membrana mitohondrija, edoplazmatskog retikuluma i ćelijske membrane. Zbog narušenog integriteta membrana dolazi, sa jedne strane, do izlaska mikrozomalnih enzima (kao što su AST, ALT i ALP), a na drugoj do poremećaja sekvestracije kalcijuma i ćelijske homeostaze, što znatno doprinosi potonjem oštećenju ćelije. Među degradacionim proizvodima masnih kiselina su i visokoreaktivni aldehidi, naročito 4-hidroksinonenal, koji se lako vezuje za funkcionalne grupe enzima dovodeći do inhibicije njihove aktivnosti. Trovanje ugljen-tetrahloridom takođe dovodi do hipometilacije ćelijskih komponenti, što u slučaju RNK rezultira inhibicijom sinteze proteina, a u slučaju fosfolipida i lipoproteina dovodi do smanjene sekrecije VLDL (eng. very low-density lipoprotein). Ugljen-tetrahlorid takođe reaguje na molekularnom nivou, aktivirajući prvenstveno TNF- α , koji dalje aktivira različite signalne puteve u jetri. Sve ovo zajedno dovodi do novih oštećenja ćelija, a kao rezultat svega toga u jetri dolazi i do stalnih regenerativnih i proliferativnih promena, a krajnji ishod zavisi od doze, vremena izloženosti, prisustva potencirajućih agenasa, kao i od starosti i stanja organizma (Weber i sar., 2003).

Hepatotoksični efekat ugljen-tetrahlorida ogleda se ne samo u porastu nivoa enzima AST, ALT, AP i bilirubina u serumu, već i u smanjenju nivoa antioksidantnih enzima (peroksidaza, Px; katalaza, CAT; glutation peroksidaza, GSH-Px; ksantin oksidaza, XOD; glutation reduktaza, GSHR; redukovani glutation, GSH) i daljeg povećanja nivoa produkata LP (Cabré i sar., 2000). Stoga antioksidansi i "hvatači" slobodnih radikala (eng. free radical scavengers, FRS) mogu da prekinu LP i da budu od koristi u slučajevima kada je jetra izložena toksičnom delovanju ugljen-tetrahlorida.

Ispitivani metanolni ekstrakti su primenjeni oralno 30 minuta nakon *s.c.* primene ugljen-tetrahlorida i tokom naredna četiri dana, tako da je procenjivan njihov reparativni (kurativni, terapijski) efekat. Nakon višednevne primene ispitivanih ekstrakata uočena je tendencija vraćanja vrednosti parametara oštećenja jetre (nivo enzima u serumu i SOT) ka normalnim vrednostima (osim za AST i ALT nakon primene 100 mg/kg SA). S obzirom da su za CCl₄-indukovano oštećenje jetre uglavnom odgovorni povećano stvaranje slobodnih radikala i LP, ispoljeni efekti ekstrakata su najverovatnije

posledica njihovog antioksidantnog i antiradikalskog delovanja. Ovo je u skladu sa rezultatima ispitivanja antioksidantne aktivnosti ekstrakata *in vitro*. Najnižu antioksidantu aktivnost (FRAP vrednosti, neutralizacija DPPH i OH radikala, inhibicija LP), kao i najniži sadržaj polifenola utvrđen je u ekstraktu herbe *S. plumosa*, koji je ispoljio i najslabije hepatoreparativno delovanje. Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* bili su najjači inhibitori LP, pri čemu je ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* ispoljio bolji ukupan inhibitorski efekat na LP (60-70% inhibicije LP u koncentraciji 62,5-125 µg/ml), što je u značajnoj korelaciji sa ispoljenom dozno zavisnom hepatoreparativnom aktivnošću u ovom eksperimentu.

Ispitivani ekstrakti bili su nešto efikasniji pri primeni niže doze (100 mg/kg *p.o.*), što se vidi na primeru enzima jetre. Ovo se može objasniti prooksidativnim efektom, što nije novo, niti neuobičajeno. Poznato je da mnogi sastojci biljnog porekla ispoljavaju dvostruko delovanje, tj. u zavisnosti od primenjene doze/koncentracije ispoljavaju i antioksidantno i prooksidantno delovanje. Prooksidantno delovanje se po pravilu javlja pri primeni većih doza/koncentracija. Za ispitivane ekstrakte je već pokazano da imaju ovakvu tendenciju (Tabele 47 i 48).

Takođe, na osnovu vrednosti SOT uočava se da primena samih ekstrakata (grupe K2), kao i čistog maslinovog ulja (grupa K3) dovodi do određenih promena u parenhimu jetre. Ovo nije neuobičajeno, pošto postoje podaci da *p.o.* primena mineralnog ulja uzrokuje blagu centrilobularnu steatozu, blago povećanje nekroze tokom 12 h i blag porast serumskog nivoa ALT tokom 24 h (Manibusan i sar., 2007).

Na osnovu rezultata HPLC analize i rezultata ispitivanja antioksidantne aktivnosti, takođe se može zaključiti da feniletanski i flavonoidni heterozidi, kao i fenolkarboksilne kiseline, spadaju u glavne nosioce ispoljene aktivnosti. Ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* u odnosu na ostale ispitivane ekstrakte sadrže najviše feniletanskih heterozida (oko 11 i 6%, redom), pri čemu je akteozid najzastupljeniji. Za akteozid je ranije pokazano da ispoljava hepatoprotektivni efekat na modelu ugljen-tetrahloridom indukovano oštećenja jetre kod miševa. Naime, pokazano je da intraperitonealna (*i.p.*) primena akteozida značajno umanjuje oštećenja jetre do kojih dovodi naknadno *i.p.* primenjen CCl₄, što se ogleda značajnom umanjenoj porasta nivoa enzima jetre u serumu i nivoa malondialdehida, kao i histopatološka oštećenja tkiva

jetre. Verovatni mehanizmi ovakvog delovanja su inhibicija CYP 450 i antioksidantna aktivnost. Akteozid inhibira najverovatnije izoenzim CYP 2E1, koji je odgovoran za nastanak veoma reaktivnog trihlormetil radikala ($\bullet\text{CCl}_3$), koji dalje učestvuje u inicijaciji i propagaciji LP. Svojim antioksidantnim efektom akteozid neutrališe stvorene slobodne radikale i umanjuje intenzitet LP. Inhibicija CYP 450 je od značaja jer se time umanjuje i toksičnost, tj. metabolička aktivacija i nekih drugih ksenobiotika (Lee i sar., 2004). Akteozid takođe inhibira apoptozu i dalja oštećenja jetre izazvana D-galaktozaminom i LPS-om. Najverovatniji mehanizam je neutralizacija slobodnih radikala, čije stvaranje indukuje TNF- α , koji je centralni medijator u ovim modelima hepatotoksičnosti (Xiong i sar., 1999). Za akteozid i izoakteozid, koji su izolovani iz *Cistanche tubulosa* (Schrenk) R. Wight (Orobanchaceae), pokazano je da inhibiraju TNF- α -indukovanu citotoksičnost i da deluju značajno hepatoprotektivno (Morikawa i sar., 2010). U svim ispitivanim ekstraktima odabranih taksona roda *Stachys* prisutna je hlorogenska kiselina. Ranije je pokazano da ona ispoljava hepatoprotektivne efekte *in vivo*, koji se ogledaju u poboljšanju histopatološkog stanja jetre i njene funkcije, kao i u smanjenju inflamatornog odgovora kod LPS-indukovanog oštećenja jetre kod miševa. Ovi efekti hlorogenske kiseline su najverovatnije posledica supresije proinflamatornih citokina i inhibicije NF- κ B signalnog puta (Xu i sar., 2010). Takođe, hepatoprotektivni efekti hlorogenske kiseline se, osim njenom antiinflamatornom delovanju, delom pripisuju i njenoj značajnoj antioksidantnoj aktivnosti (Yun i sar., 2012). Ekstrakt herbe *S. anisochila* sadrži najmanje akteozida (1,09%), ali najviše heterozida 8-hidroksiflavona (preko 50%) i hlorogenske kiseline (12,57%). Ekstrakt herbe *S. beckeana* takođe sadrži značajnu količinu ovih jedinjenja (oko 20% i 11,31%). Ranije je pokazano da heterozidi ovog tipa, kao i hlorogenska kiselina, ispoljavaju značajno antioksidantno delovanje, pa se može pretpostaviti da zbog visoke koncentracije uslovljavaju i pojavu prooksidantnog delovanja, što u krajnjoj liniji umanjuje ukupan hepatoprotektivni efekat ovih ekstrakta. Hrizoeriol i hrizoeriol 7-O-ksilozil(1 \rightarrow 2)-arabinozid su glavni hepatoprotektivni sastojci ekstrakta herbe *Schouwia thebica* Webb. (Cruciferae) (Awaad i sar., 2006). Heterozidi hrizoeriola su relativno slabi antioksidantni i antiradikalni agensi, i u ispitivanom ekstraktu herbe *S. plumosa* su malo zastupljeni (oko 4%), što sve ukupno uslovljava relativno slab efekat ovog ekstrakta.

Ispitivani ekstrakti ispoljavaju izvestan blag reparativni efekat u modelu hepatotoksičnosti izazvane CCl₄. Ispoljeni efekat je najverovatnije posledica antioksidantne i antiradikalske aktivnosti njihovih polifenolnih sastojaka, ali ne treba isključiti ni druge moguće mehanizme (inhibicija enzima citohroma P450 i uticaj na različite signalne puteve u ćelijama jetre).

11. Inhibicija enzima MAO

Rezultati ispitivanja uticaja suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na aktivnost enzima MAO date su u Tabeli 52.

Tabela 52. Uticaj ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* na aktivnost enzima MAO

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)	
	MAO-A	MAO-B
<i>S. anisochila</i>	612	1465
<i>S. beckeana</i>	625	327
<i>S. plumosa</i>	316	112
<i>S. alpina</i> subsp. <i>dinarica</i>	390	2416

Vrednosti IC₅₀ svih ekstrakata bile se veoma visoke, tj. značajno veće od 10 µg/ml (Tomić i sar., 2005). Stoga se može zaključiti da nijedan od ekstrakata ne sadrži komponente koje ispoljavaju značajnu inhibiciju MAO.

Među ispitivanim ekstraktima najaktivniji je bio ekstrakt herbe *S. plumosa*, naročito prema MAO-B. Ovo se možda može pripisati prisustvu heterozida apigenina i hrizoeriola (derivat luteolina). Utvrđeno je da apigenin i luteolin inhibiraju MAO sa IC₅₀ vrednostima od 1,76 i 6,47 µg/ml. Aglikoni su bili aktivniji od odgovarajućih heterozida (IC₅₀=36,47 i 53,18 µg/ml za apigenin 7-O-glukuronid i luteolin 7-O-glukozid, redom). Apigenin i luteolin snažno inhibiraju obe izoforme: MAO-A (IC₅₀=0,46 i 3,46 µg/ml, za apigenin i luteolin, redom) i MAO-B (IC₅₀=1,4 i 17,09 µg/ml, redom) (Han i sar., 2007). Još jedna studija je potvrdila snažan inhibitorni uticaj apigenina i hrizina na aktivnost MAO-A (IC₅₀=0,27 i 0,51 µg/ml, redom) (Jäger i Saaby, 2011). Ipak, literaturni podaci su veoma raznoliki i za sada ne daju jasan odgovor o uticaju određene klase flavonoida na aktivnost enzima MAO.

U novije vreme MAO inhibitori se često spominju u kontekstu terapije neurodegenerativnih bolesti (Alchajmerova bolest, Huntingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza). Naime, novi trendovi u terapiji neurodegenerativnih bolesti podrazumevaju korišćenje multifunkcionalnih lekova (MFL). Ovakve supstance ispoljavaju više različitih farmakoloških delovanja, odnosno deluju na nekoliko etioloških faktora: nastanak slobodnih radikala (ROS) i razvoj oksidativnog stresa,

poremećaj metabolizma i agregacija proteina, poremećaj funkcije mitohondrija, inflamacija, poremećaj homeostaze metala i njihova akumulacija na mestima neurodegenerativnih promena (Pisani i sar., 2011). Inhibitori enzima MAO su u ovom smislu potencijalni MFL. Naime, aktivnost MAO ima važnu ulogu u nastanku oksidativnog stresa, jer aktivnošću ovog enzima prilikom degradacije neurotransmitera dolazi do stvaranja H_2O_2 . U prisustvu Fe^{2+} jona H_2O_2 , i sam jak oksidans, može da kroz Fentonovu reakciju dovede do nastanka novih ROS. Smatra se da je oksidativni stres u neuronima odgovoran za nastanak oštećenja i razvoja mnogih neurodegenerativnih poremećaja. Npr., jedinjenje ladostigil, ispoljava neuroprotektivne efekte, a istovremeno deluje i kao inhibitor acetilholinesteraze (AcHE) i kao inhibitor MAO-A/MAO-B u mozgu, i trenutno je u IIa fazi ispitivanja kod ljudi u terapiji demencije kod Parkinsonove bolesti i depresije. Jedinjenje M-30 je lipofilni helator gvožđa, koji lako prolazi krvno-moždanu barijeru, a takođe deluje neuroprotektivno, zatim kao efikasan „scavenger“ slobodnih radikala i kao ireverzibilni inhibitor MAO-A/MAO-B u mozgu (Weinreb i sar., 2009).

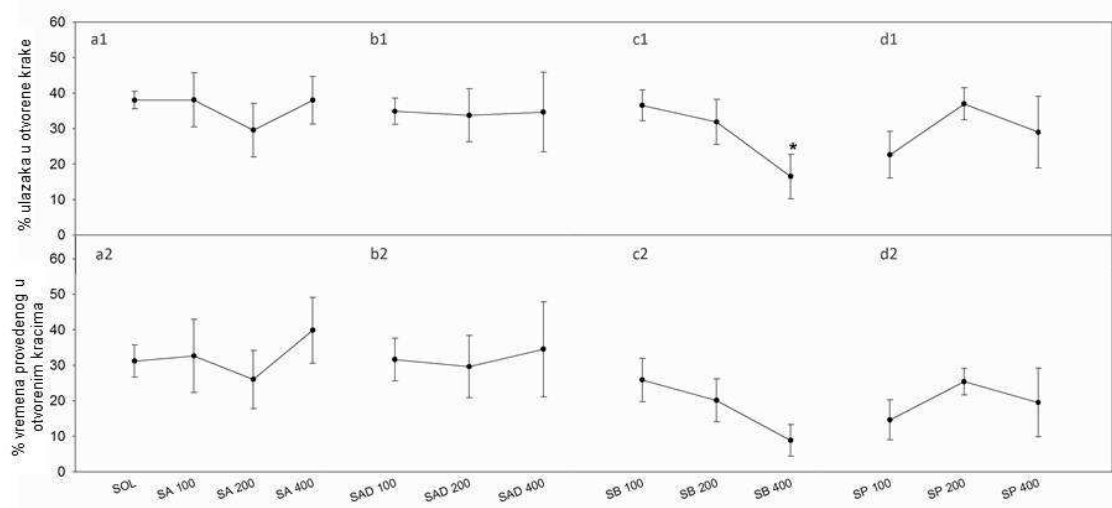
S obzirom da mnogi flavonoidni heterozidi pokazuju izuzetnu antioksidantnu i antiradikalnu aktivnost, antienzimska i neka druga delovanja, oni predstavljaju i moguće potencijalne multifunkcionalne prirodne proizvode. Jedno od takvih jedinjenja je i 3'hidroksi 4'-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **2** izolovano iz metanolnog ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* u okviru ove doktorske disertacije). Za njega je utvrđeno da deluje neuroprotektivno i kao inhibitor acetilholin-esteraze, kao i da ne deluje citotoksično, pa se smatra potencijalnim kandidatom za lek za Alchajmerovu bolest (Uriarte-Pueyo i Calvo, 2010).

10. Bihevioralna karakterizacija

10.1. Ponašanje u uzdignutom plus lavirintu (EPM test)

Metanolni ekstrakti herbi odabranih vrsta roda *Stachys* primenjeni su u dozama od 100, 200 i 400 mg/kg u cilju ispitivanja njihovog anksiolitičkog delovanja i procene parametara vezanih za aktivnost (Slike 37 i 38).

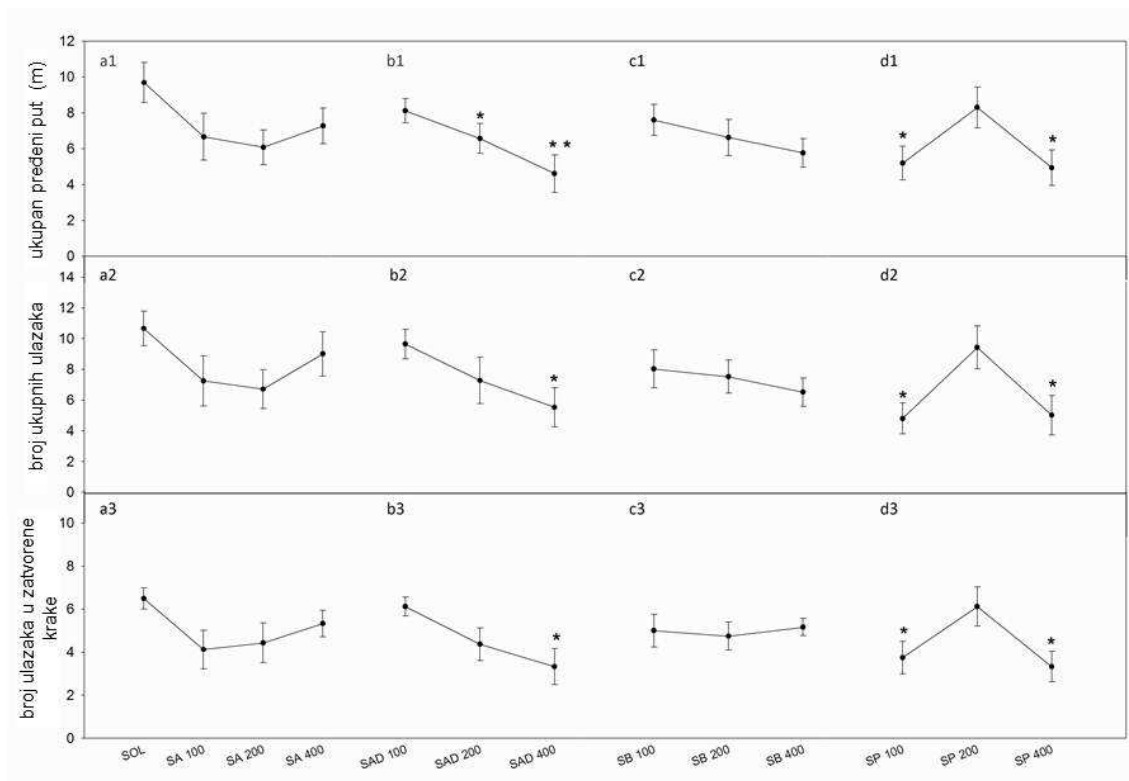
Nijedan od ekstrakata nije značajno uticao na parametre vezane za anksioznost, osim ekstrakta *S. beckeana*, koji je doveo do smanjenja broja ulazaka u otvorene krake ($F=3,0939$, $p=0,047$) (Slika 37c1); *post hoc* testom je utvrđeno da efektivna doza ovog ekstrakta, u poređenju sa rastvaračem, iznosi 400 mg/kg ($p=0,034$).



Slika 37. Efekti ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD), *S. beckeana* (SB) i *S. plumosa* (SP) (100, 200 i 400 mg/kg) na: procenat ulazaka u otvorene krake (a1-d1) i procenat vremena provedenog u otvorenim kracima (a2-d2) u EPM testu. * $p<0,05$ vs. rastvarač (SOL). Broj životinja u grupi 6-8.

Ekstrakti herbi *S. anisochila* i *S. beckeana* u dozama do 400 mg/kg nisu uslovlili nikakve promene parametara vezanih za aktivnost u EPM testu (Slika 38a, odnosno 38c). Dve veće doze ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* (200 i 400 mg/kg) dovele su do značajnog smanjenja ukupnog pređenog puta ($p=0,041$, odnosno $p=0,003$) u poređenju sa rastvaračem (Slika 38b1). Broj ukupnih ulazaka i ulazaka u zatvorene krake bio je značajno smanjen samo nakon primene ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u dozi od 400 mg/kg (Slike 38b2 i 38b3).

Primena ekstrakta herbe *S. plumosa* značajno je uticala na sva tri parametra: ukupni pređeni put ($F(3,24)=4,6444$, $p=0,011$), ukupan broj ulazaka ($F(3,24)=5,4715$, $p=0,005$) i broj ulazaka u zatvorene krake ($F(3,24)=4,1616$, $p=0,017$) (Slika 38, d1-d3). Dozno-efektna kriva je bila u obliku obrnutog slova U: efekti su značajni pri primeni najniže i najviše primenjene doze (100 i 400 mg/kg), ali izostaju pri primeni ekstrakta herbe *S. plumosa* u dozi od 200 mg/kg.

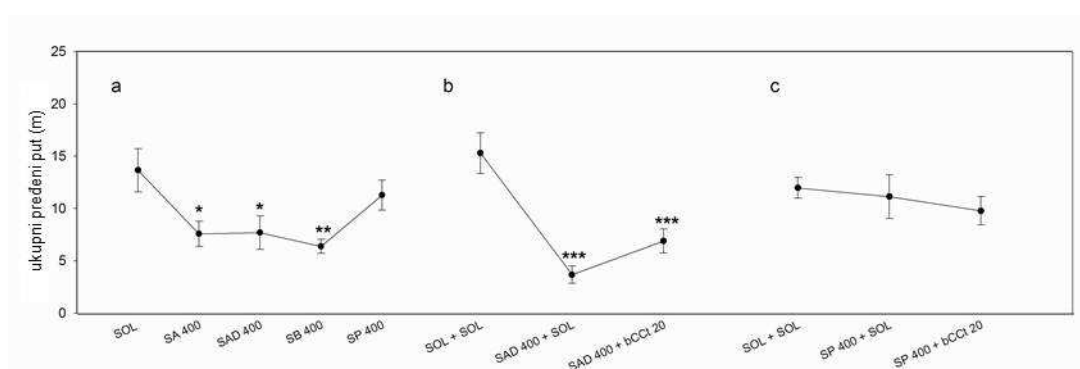


Slika 38. Efekti ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD), *S. beckeana* (SB) i *S. plumosa* (SP) (100, 200 i 400 mg/kg) na: ukupan pređeni put (a1-d1), broj ukupnih ulazaka (a2-d2) i broj ulazaka u zatvorene krake (a3-d3) u EPM testu. * $p<0,05$ vs. rastvarač (SOL), ** $p<0,01$ vs. SOL.

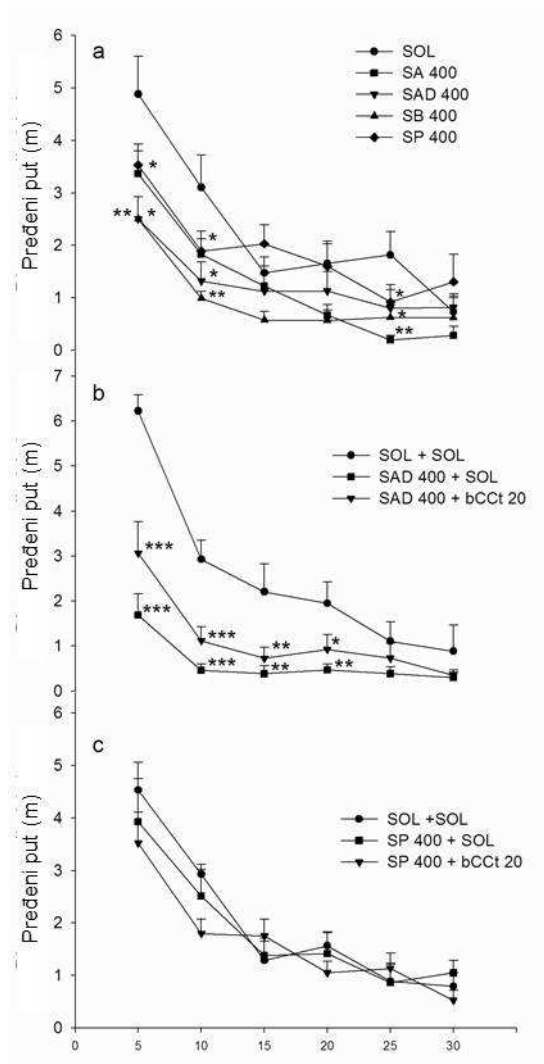
10.2. Test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA test)

Jednofaktorska ANOVA je pokazala da su ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. alpina* subsp. *dinarica*, *S. beckeana* i *S. plumosa* primenjeni u dozi od 400 mg/kg ispoljili značajan efekat na ukupni pređeni put tokom 30 minuta praćenja u SLA ($F(4,32)=4,3472$, $p=0,006$) (Slika 39a). Prema Student-Newman-Keuls testu, statistički

značajno smanjenje motorne aktivnosti u poređenju sa rastvaračem ispoljili su ekstrakti herbi *S. anisochila*, *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. beckeana*.



Slika 39. Efekti: a) ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD), *S. beckeana* (SB) i *S. plumosa* (SP) (400 mg/kg), kombinacija b) SAD (400 mg/kg) i c) SP (400 mg/kg), sa antagonistom β -CCt (20 mg/kg), na ukupni pređeni put u SLA. *,** i ***, $p < 0,05$, 0,01 i 0,001, redom, vs. rastvarač (SOL ili SOL+SOL).



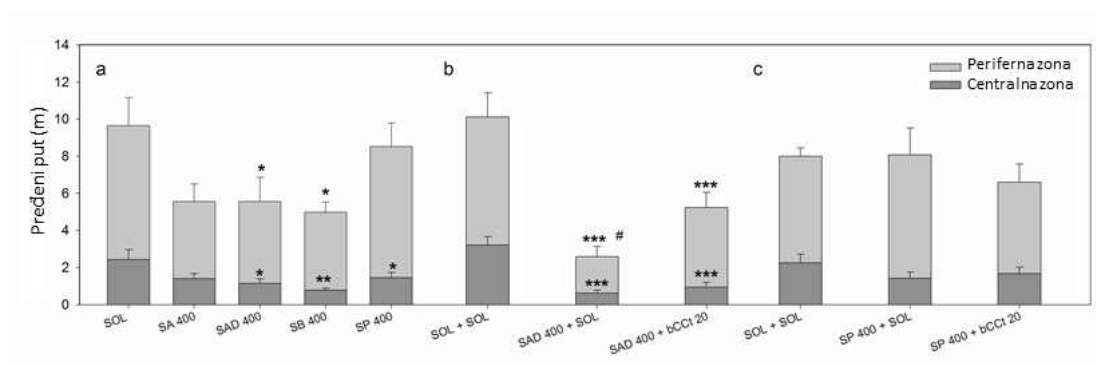
Slika 40. Efekti: a) ekstrakti herbi *S. anisochila* (SA), *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD), *S. beckeana* (SB) i *S. plumosa* (SP) (400 mg/kg); kombinacije b) SAD (400 mg/kg) i c) SP (400 mg/kg), i antagoniste β -CCt (20 mg/kg) na pređeni put u 5-minutnim intervalima tokom 30 min testiranja. *, ** i ***, $p < 0,05$, $0,01$ i $0,001$, redom, vs. rastvarač (SOL ili SOL+SOL).

Kada se aktivnost analizira u petominutnim intervalima, smanjenje lokomotorne aktivnosti je bilo značajno tokom prvih 10 minuta praćenja (za ekstrakte herbi *S. alpina* subsp. *dinarica*, *S. beckeana* i *S. plumosa*), i ponovo tokom perioda od 20. do 25. minuta (za ekstrakte herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. plumosa*) (Slika 40a). Ukupan efekat je bio izraženiji u centralnoj ($F(4,32)=4,0474$, $p=0,009$) nego u perifernoj zoni ($F(4,32)=3,3209$, $p=0,022$) (Slika 41a). *Post hoc* test pokazuje da ekstrakti herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. beckeana* smanjuju lokomotornu aktivnost kako u centralnoj ($p=0,028$, $p=0,005$), tako i u perifernoj zoni ($p=0,042$, $p=0,049$), dok je efekat

ekstrakta herbe *S. plumosa* ograničen isključivo na centralnu zonu ($p=0,029$); ekstrakt herbe *S. anisochila* nije imao uticaja na lokomotornu aktivnost.

β -CCt (20 mg/kg) nije antagonizovao hipolokomotorni efekat ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* tokom 30 min posmatranja: primena 400 mg/kg ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* kao i primena iste doze ovog ekstrakta u kombinaciji sa β -CCt (20 mg/kg), dovele su do značajno drugačijeg ponašanja u odnosu na kontrolu ($F(2,19)=20,1092$, $p<0,001$) (Slika 39b). Kada se posmatraju petominutni intervali, efekat oba ova tretmana je bio međusobno sličan (Slika 40b). Uzimajući u obzir centralni i periferni pređeni put, dodatak β -CCt 20 mg/kg je samo delimično poništio smanjenje periferne aktivnosti do koga je dovela primena ekstrakta *S. alpina* subsp. *dinarica* u dozi od 400 mg/kg (Slika 41b).

Primena bCCt (20 mg/kg) nije značajno uticala na efekat ekstrakta herbe *S. plumosa* (400 mg/kg) na motornu aktivnost (Slike 39c, 40c i 41c).



Slika 41. Efekti a) ekstrakata herbi *S. anisochila* (SA), *S. alpina* subsp. *dinarica* (SAD), *S. beckeana* (SB) i *S. plumosa* (SP) (400 mg/kg); kombinacija b) SAD (400 mg/kg) i c) SP (400 mg/kg), i antagoniste β -CCt (20 mg/kg) na pređeni put u centralnoj zoni (tamnosivo) i perifernoj zoni (svetlosivo) tokom 30 min testiranja. *, ** i ***, $p<0,05$, 0,01 i 0,001, redom, vs. rastvarač (SOL ili SOL+SOL). # $p<0,05$ vs. SAD 400 + β -CCt 20.

10.3. Test jačine stiska

Ukupan uticaj primene ekstrakata na jačinu stiska nije bio značajan ($F(4,34) = 1,95$; $p=0,124$). Jačina stiska (srednja vrednost \pm SEM) pacova tretiranih rastvaračem (SOL), ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. alpina* subsp. *dinarica*, *S. beckeana* i *S. plumosa* (svi u dozi od 400 mg/kg) bila je $506,9 \pm 11,1$ g, $564,1 \pm 31,4$ g, $610,9 \pm 37,7$ g, $563,0 \pm 32,4$ g i $579,0 \pm 33,9$ g, redom.

Mnoge biljke roda *Stachys* tradicionalno se koriste kao anksiolitici i sedativi (Tabela 15). Jedna od najpoznatijih biljaka ovog roda, *S. officinalis*, smatrana je neprikosnovenim lekom za sve bolesti glave, u stanjima histerije, kod neuralgija i u svim neurotičnim stanjima povezanim sa anksioznošću i napetošću (Grieve, 1971; Čajkanović, 1994). U Iranu se *S. lavandulifolia* tradicionalno koristi za smirenje, a pokazano je i anksiolitičko delovanje ekstrakata ove biljke (Rabbani i sar., 2003, 2005). Anksiolitičku aktivnost ispoljava i etarsko ulje *S. tibetica*, biljke koja se u delovima Indije tradicionalno koristi kod različitih mentalnih stanja, fobija i groznice (Kumar i sar., 2012). Za *S. alpina* subsp. *dinarica* je u okviru terenskih istraživanja na Jahorini (Bosna i Hercegovina) zabeležena njena tradicionalna upotreba „za smirenje i kod nesаницe“.

Rezultati ispitivanja metanolnih ekstrakata herbi *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, pokazuju izostanak jasnog anksiolitičkog ili miorelaksantnog delovanja. Ipak, neki od ekstrakata pokazuju određenu bihevioralnu aktivnost: ekstrakt *S. beckeana* u dozi od 400 mg/kg ispoljava izvestan anksiogeni efekat u EPM testu, dok parametri vezani za aktivnost u istom testu ukazuju na sedativno delovanje ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*. Zato je dalje ispitivana moguća interakcija ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* sa mestom vezivanja benzodiazepina na GABA_A receptorima, korišćenjem β -CCt, antagonistu koji selektivno poništava benzodiazepinom indukovanu sedaciju (Savić i sar., 2009). Test lokomotorne aktivnosti (SLA), koji se rutinski koristi u cilju predviđanja eventualne sedativne aktivnosti (Bourin i Briley, 2004), potvrdio je sedativni potencijal ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*. Za razliku od njega, ekstrakt herbe *S. plumosa* je ispoljio tendenciju smanjenja aktivnosti samo u centralnom, ali ne i u perifernom delu, pa se stoga ne može smatrati da ekstrakt herbe *S. plumosa* izaziva čistu sedaciju. β -CCt, koji je inače kompletni antagonist sedacije posredovane aktivacijom benzodiazepinskog mesta vezivanja, bio je samo delimično aktivan kada je primenjen u kombinaciji sa ekstraktom herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, dok u kombinaciji sa ekstraktom herbe *S. plumosa* nije uopšte uticao na ponašanje tretiranih životinja.

Dobijeni rezultati ukazuju da ispoljena bihevioralna aktivnost ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* ne uključuje predominantno populaciju GABA_A

receptora sa α_1 -podjedinicom, koji su odgovorni za sedaciju izazvanu supstancama koje deluju kao benzodiazepini (Rudolph i sar., 1999; Savić i sar., 2009). Takođe, mala je verovatnoća da sastojci ova dva ekstrakta ispoljavaju značajnu aktivnost posredstvom druge dve, po svojoj brojnosti značajne, populacije GABA_A receptora, koji sadrže α_2/α_3 -podjedinice. U tom slučaju bi bili ispoljeni relaksacija mišića i anksiolitički efekat (Rudolph i Möhler, 2006), što se ovde nije desilo.

Promene u ponašanju eksperimentalnih životinja tretiranih različitim biljnim ekstraktima često se povezuju sa modulacijom GABA_A receptora koja je slična dejstvu benzodiazepina (Grundmann i sar., 2007; Benke i sar., 2009; Han i sar., 2009), a kao najznačajniji ligandi biljnog porekla proučavani su flavonoidi. U početku se pretpostavljalo da flavonoidi, a naročito flavoni, svoje depresorno delovanje na CNS ispoljavaju putem vezivanja za benzodiazepinsko mesto vezivanja na GABA_A receptoru. SAR^a analize i modelovanje molekula flavonoida su pokazali da oni imaju izvesnih strukturnih sličnosti sa molekulima benzodiazepina (Dekermendjian i sar., 1999; Marder i sar., 2001). Utvrđeno je da se određenim strukturnim izmenama molekula flavonoida njegov afinitet za mesto vezivanja benzodiazepina na GABA_A receptoru može znatno povećati: uvođenje supstituenata poput -CH₃, -NO₂ ili -Br u položaje 6 ili 3', odnosno OH grupe u položaj 2'. Tako su sintetisana jedinjenja visokog afiniteta vezivanja koja su ispoljavala i visoku *in vitro* i *in vivo* efikasnost. Ispostavilo se, međutim, da efikasnost ovih jedinjenja može biti i veoma različita (6-bromo-3'-nitroflavon i 6,3'-dinitroflavon su pozitivni modulatori, dok je 6-hloro-3'-nitroflavon inverzni agonist) (Ren i sar., 2011). Slično i 3-hidroksi-2'-metoksi-6-metilflavon ispoljava anksiolitičko, ali ne i sedativno i miorelaksantno delovanje. Sugerisani mehanizam delovanja ovog jedinjenja je alosterna modulacija $\alpha_2\beta_2/3\gamma_2L$ i direktna aktivacija $\alpha_4\beta_2/3\delta$ GABA_A receptora (Karim i sar., 2011).

Utvrđeno je da flavoni apigenin, hrizin, vogonin, bajkalein i bajkalin ispoljavaju bihejvioralne efekte na glodarima u EPM-u i Vogel-ovom konfliktnom testu (eng. Vogel conflict test). Pri tome deluju anksiolitički, ali ne dovode do sedacije. Osim toga, ova jedinjenja deluju i kao neuroprotektivni agensi (Zhang, 2004). Takođe je pokazano da ekstrakt lista biljke *Passiflora edulis* Sims (Passifloraceae) sa žutim plodovima (forma „flavicarpa“) ispoljava anksiolitičko i sedativno delovanje, a kao glavna

^a Structure-activity relationship

jedinjenja sadrži 6-C ili 8-C-heterozide flavona (lucenin-2, vicenin-2, izoorientin, izoviteksin, luteolin 6-C-hinovozid i luteolin 6-C-fukozid) (Li i sar., 2011). Osim flavonske strukture, za sva ova jedinjenja je specifično da su uglavnom supstituisana u položaju 6 i/ili 8, a neka od njih su bez supstitucije u prstenu B (hrizin, vogonin, bajkalein) (Zhang, 2004). Svi ovi rezultati su potvrdili da se neki flavonoidi vezuju sa visokim afinitetom za benzodiazepinska mesta vezivanja na GABA_A receptorima i da su izvesne strukturne karakteristike flavonoidnog molekula od značaja za njihovu efikasnost. Brojni eksperimenti su pokazali, međutim, da afinitet mnogih flavonoida za mesto vezivanja benzodiazepina na GABA_A receptoru nije visok, pa je pretpostavljeno da oni mogu da moduliraju aktivnost GABA vezivanjem za receptorna mesta nezavisna od mesta vezivanja benzodiazepina (njihovi efekti nisu blokirani primenom npr. flumazenila) (Karim i sar., 2011; Ren i sar., 2011). Takođe, moguće je da efekti flavonoida na CNS mogu biti ostvareni i drugim mehanizmima kao što su inhibicija NMDA ili 5-HT receptora (Julião i sar., 2010). Takođe, ne treba zanemariti i mogućnost da metaboliti flavonoida poseduju veći afinitet za mesto vezivanja benzodiazepina na GABA_A *in vivo* (Coleta i sar., 2008).

Najizraženija karakteristika ispitivanih metanolnih ekstrakata odabranih vrsta roda *Stachys* je prisustvo flavonskih heterozida, derivata izoskutelareina i hipolaetina, u ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, odnosno isključivo prisustvo heterozida hrizoeriola i apigenina u ekstraktu herbe *S. plumosa*. Svi ekstrakti sadrže hlorogensku kiselinu i akteozid, dok je nekoliko različitih feniletanskih heterozida zastupljeno u ekstraktima herbi *S. beckeana*, *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*. S obzirom na odsustvo aktivnosti u EPM testu ekstrakta herbe *S. anisochila*, koji sadrži najviše heterozida 8-hidroksiflavona u odnosu na ostale, može se zaključiti da ova jedinjenja nisu odgovorna za izvesnu aktivnost koju ispoljavaju ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, odnosno *S. plumosa*. U ovim ekstraktima je, osim akteozida, lavandulifoliozida i martinozida, prisutno još nekoliko različitih feniletanskih heterozida. Međutim, ako se uzme u obzir činjenica da depresorna aktivnost na CNS flavonoidnih heterozida, koji su u značajnoj meri prisutni u ispitivanim ekstraktima, ne uključuje GABA_A receptore koji su osetljivi na benzodiazepine, barem ne direktno (Fernández i sar., 2006), može se pretpostaviti da bi ove komponente mogle imati učešća u sedativnom delovanju kakvo ispoljavaju ekstrakti

herbi *S. anisochila* (koje je manje izraženo i izostaje ako se odvojeno analizira ponašanje u dvema virtuelnim zonama) i *S. beckeana* u SLA testu. Zapravo, ekstrakt herbe *S. beckeana* je ispoljio najizraženiju hipolokomotornu aktivnost u u poređenju sa ostalim ekstraktima.

Feniletanski heterozidi, prisutni u znatnom procentu u ekstraktima herbi *S. beckeana*, *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*, ostvaruju različite farmakološke efekte, između ostalog antioksidantno i neuroprotektivno (Fu i sar., 2008). Za akteozid, jedno od četiri glavna jedinjenja u ekstraktu herbe *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) koji ispoljava neurosedativno delovanje, utvrđeno je da se sa veoma niskim afinitetom vezuje za benzodiazepinsko mesto na GABA_A receptoru (IC₅₀=1,9 mM) (Hennebelle i sar., 2008). Ovakav rezultat je dobijen i nakon ispitivanja etilacetatnog ekstrakta lista *Lantana trifolia* L. (Verbenaceae) i glavnih jedinjenja izolovanih iz njega. Ispitivani ekstrakt je ispoljio intenzivni sedativni efekat kod miševa (1 mg/kg *p.o.*), dok je za flavonske i feniletanske heterozide (akteozid, betoniozid F) izolovane iz njega dokazan nizak afinitet vezivanja za benzodiazepinsko mesto na GABA_A receptoru. Afinitet betoniozida F bio je veći (IC₅₀=550 μM) nego afinitet akteozida, ali i dalje vrlo nizak. Autori zaključuju da akteozid ipak može biti jedan od aktivnih sastojaka ekstrakta, jer pokazuje izvesne efekte u testu otvorenog polja (eng. open field test), ali da se njegovi efekti, kao i efekti ostalih izolovanih jedinjenja ne ostvaruju putem direktne aktivacije mesta vezivanja benzodiazepina na GABA receptorima (Julião i sar., 2010). Feniletanski heterozidi akteozid, leukoskeptozid A, lavandulifoliozid i lavandulifoliozid B su identifikovani u ekstraktima nadzemnog dela *S. lavandulifolia* Vahl., za koje je utvrđeno da ispoljavaju anksiolitičko delovanje (Rabbani i sar., 2003, 2005).

Ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, koji ispoljava najizraženije sedativno delovanje, jedini sadrži feniletanoide leukoskeptozid A i betoniozid E, a osim toga samo u njemu su identifikovani heterozidi luteolina (Tabela 39). Za neke heterozide luteolina postoje podaci o izvesnim bihejvioralnim efektima (Li i sar., 2011; Hennebelle i sar., 2008). Prema nekim podacima luteolin ispoljava anksiolitičko delovanje, ali ne putem direktne modulacije GABA_A receptora (Coleta i sar., 2008). Efekti nekih heterozida luteolina, apigenina i akacetina se manifestuju kao sedacija, smanjena motorna aktivnost i relaksacija mišića kod eksperimentalnih životinja (Martínez-Vázquez i sar., 2012).

U ekstraktu herbe *S. plumosa* dominantni su heterozidi hrizoeriola i u manjoj meri heterozidi apigenina. Mogući bihevioralni efekti hrizoeriola do sad nisu opisani. *In vitro*, hrizoeriol 4'-O- α -D-glukopiranozid i hrizoeriol 7-O- α -D-glukopiranozid ispoljavaju dozno-zavisno neuroprotektivno delovanje, uz umerenu do značajnu antioksidantu aktivnost (Ma i sar., 2005). Apigenin je prvobitno bio opisan kao jedinjenje sa jasnim anksiolitičkim delovanjem u eksperimentima na miševima, bez efekta na opštu motornu aktivnost i mišićni tonus (Viola i sar., 1995). Dekermendjian i saradnici (1999) su kasnije pokazali da apigenin odgovara profilu antagoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja. Konačno, Avallone i saradnici (2000) su utvrdili da apigenin odgovara profilu inverznog agoniste benzodiazepinskog mesta vezivanja, pri čemu ispoljava sedativno i blago prokonvulzivno, ali ne i anksiolitičko delovanje kod pacova. Ta studija je pokazala da apigenin može da smanji GABA-aktivirane hloridne struje u kulturi granuliranih neurona malog mozga. Ova aktivnost se mogla blokirati flumazenilom i stoga uključuje klasičnu negativnu modulatornu ('inverzni agonist') aktivnost na GABA_A receptorima. S druge strane, inhibitorni efekat apigenina na lokomotornu aktivnost se ne može blokirati flumazenilom i stoga se ne može pripisati interakciji sa benzodiazepinskim mestom vezivanja GABA_A receptora (Avallone i sar., 2000). Takođe je utvrđeno da apigenin deluje kao GABA antagonist na $\alpha_1\beta_2$ GABA_A receptorima neosetljivim na flumazenil, i kao pozitivni modulator drugog reda GABA odgovora potenciranog diazepamom na rekombinantnim humanim $\alpha_1\beta_2\gamma_2L$ GABA_A receptorima (Campbell i sar., 2004), što ukazuje da bihevioralni efekti apigenina mogu da uključe različite komponente koje nisu osetljive na flumazenil.

HPLC analiza pokazuje prisustvo hlorogenske kiseline u svim ekstraktima. Uočeno je da ovo široko rasprostranjeno jedinjenje u dozi od 20 mg/kg ispoljava anksiolitički efekat u eksperimentima sa miševima u testovima izbora svetla i tame, EPM i slobodne eksploracije. Ovaj efekat je bio blokiran nakon primene flumazenila, što ukazuje da je anksioznost smanjena zbog aktivacije benzodiazepinskog mesta vezivanja (Bouayed i sar., 2007b). Takođe je utvrđeno da hlorogenska kiselina u dozi od čak 992 mg/kg (2,8 mmol/kg) značajno povećava spontanu lokomotornu aktivnost kod miševa (Ohnishi i sar., 2006). Ovakvi rezultati ne mogu, međutim, biti od značaja za naše eksperimente, naročito ako se uzme u obzir sadržaj ovog jedinjenja u pojedinim ispitivanim ekstraktima: najviše hlorogenske kiseline sadrži ekstrakt herbe *S. anisochila*, koji nije

ispoljio nikakvu aktivnost, a najmanje ekstrakti herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*, čiji su sedativni efekti evidentni.

Imajući u vidu gotovo sveopštu uključenost GABA neurotransmisije u centralnu aktivnost različitih prirodnih proizvoda (Johnston i sar., 2006), kao i velika razmimoilaženja u dosadašnjim rezultatima, naročito u slučaju apigenina, neophodno je dalje ispitivanje uključenosti GABA modulacije u ispoljene efekte ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys*. Indirektno, može se zaključiti da su za ispoljene bihevioralne efekte odgovorni i određeni mehanizmi koji ne uključuju GABA-ergičku neurotransmisiju. Kao primer kompleksnosti mehanizama centralnog delovanja biljnih ekstrakata, Yi i sar. (2008) su pokazali da apigenin, čiji su heterozidi u značajnoj meri prisutni u ekstraktu herbe *S. plumosa*, menja nivoe serotonina i dopamina u različitim delovima mozga pacova i ispoljava aktivnost u nekoliko animalnih modela depresije.

12. Antimikrobna aktivnost

Rezultati agar difuzionog testa su pokazali da etarsko ulje herbe *S. plumosa* je u obe testirane koncentracije ispoljava značajnu antimikrobnu aktivnost, dok etarsko ulje herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* nije dovelo do inhibicije rasta nijednog ispitivanog mikroorganizma.

Rezultati antimikrobnog delovanja etarskog ulja herbe *S. plumosa* dati su u Tabeli 53. Antimikrobno delovanje bilo je najizraženije u odnosu na *B. subtilis* i *P. aeruginosa*. Etarsko ulje je prema *B. subtilis* ispoljilo aktivnost koja dostiže 184,67, odnosno 171,33% aktivnosti ampicilina (10 µg/disk) u koncentracijama od 0,3 i 0,6 µl, redom. I prema ostalim bakterijama ispitivano ulje je ispoljilo značajnu antimikrobnu aktivnost. Najmanju osetljivost pokazao je soj *S. aureus* - aktivnost ispitivanog etarskog ulja bila je manja od 50% aktivnosti referentog antibiotika ampicilina (10 µg/disk).

Tabela 53. Antimikrobna aktivnost etarskog ulja herbe *S. plumosa* u agar difuzionom testu

Mikroorganizam	Zona inhibicije (mm)		
	0,3 µl*	0,6 µl*	kontrola
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	10,7	10,6	27,0 ^a
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	13,0	15,6	16,0 ^a
<i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)	27,7	25,7	15,0 ^a
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	28,5	26,0	26,0 ^b
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 29665)	14,2	13,5	17,0 ^a
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	15,3	16,7	18,0 ^a
<i>C. albicans</i> (ATCC 24433)	14,3	14,8	22,0 ^c

* količina etarskog ulja naneta na podlogu; ^a ampicilin (10 µg/disk); ^b amikacin (30 µg/disk); ^c nistatin (100 IJ/disk).

Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* agar difuzionim testom date su u Tabeli 54. Ekstrakti su ispoljili slabu do umerenu aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima. Izuzetak je bio ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*, koji nije inhibirao rast *E. faecalis* i *C. albicans*. Najveću aktivnost ispitivani ekstrakti su ispoljili u odnosu na sojeve *K. pneumoniae* (u obe koncentracije svi ispitivani ekstrakti su pokazali aktivnost koja odgovara 65-96% aktivnosti ampicilina), *E. coli* i *C. albicans*. Najaktivniji je bio ekstrakt herbe

S. anisochila prema bakteriji *K. pneumoniae* (95,88 i 94,12% aktivnosti ampicilina u koncentracijama od 600 i 300 µg/disk, redom). Ekstrakt herbe *S. plumosa* u koncentraciji od 600 µg/disk ispoljio je najveći efekat prema *E. coli* (79,44% aktivnosti ampicilina). Gram-(+) bakterije *E. faecalis* i *S. aureus*, kao i Gram(-) bakterija *P. aeruginosa* pokazale su veći stepen rezistencije. Aktivnost ispitivanih ekstrakata u ovim slučajevima bila je znatno manja u poređenju sa aktivnošću odgovarajućih referentnih antibiotika. Ekstrakt herbe *S. beckeana* u koncentraciji od 600 µg/disk ispoljio je najveću aktivnost prema *S. aureus* (44,44% aktivnosti ampicilina) i *P. aeruginosa* (36,54% aktivnosti amikacina). Ekstrakt herbe *S. plumosa* je bio najaktivniji prema *E. faecalis* u koncentraciji od 300 µg/disk (26,88% aktivnosti ampicilina).

Tabela 54. Antimikrobna aktivnost ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Stachys* u agar difuzionom testu

Ispitivani mikroorganizam	Zona inhibicije (mm)								kontrola
	SA		SB		SP		SAD		
	300 µg	600 µg	300 µg	600 µg	300 µg	600 µg	300 µg	600 µg	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	5,8	8,5	5,0	12,0	5,0	7,0	11,3	9,0	27,0 ^a
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	14,5	14,5	12,0	14,0	13,0	14,0	12,0	14,3	27,0 ^a
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	-	3,5	-	3,5	4,3	2,3	-	-	16,0 ^a
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	6,5	5,7	9,5	-	7,0	7,3	5,5	26,0 ^b
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 25922)	16,0	16,3	13,5	13,8	12,0	12,5	11,5	11,7	17,0 ^a
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	9,0	12,3	9,8	11,3	8,8	14,3	8,8	10,0	18,0 ^a
<i>C. albicans</i> (ATCC 24433)	13,3	14,3	10,8	14,5	12,8	14,5	-	-	22,0 ^c

^a Ampicilin (10 µg/disk); ^b amikacin (30 µg/disk); ^c nistatin (100 IJ/disk); SA – *S. anisochila*, SB – *S. beckeana*, SP – *S. plumosa*, SAD – *S. alpina* subsp. *dinarica*.

Za etarska ulja i različite ekstrakte mnogih vrsta roda *Stachys* ranije je pokazano da deluju protiv različitih mikroorganizama (Skaltsa i sar., 2003; Grujić-Jovanović i sar., 2004; Dulger i Gonuz, 2004; Tosun i sar., 2004; Saeedi i sar., 2008; Abichandani i sar., 2010; Lazarević i sar., 2010; Goren i sar., 2011).

Rezultati sprovedenih ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i metanolnih ekstrakata agar difuzionim testom jasno pokazuju da je etarsko ulje herbe *S. plumosa* najaktivnije, naročito prema baterijama *B. subtilis* i *P. aeruginosa* (aktivnost uporediva

ili znatno veća od aktivnosti ampicilina, odnosno amikacina). Interesantno je da i metanolni ekstrakti i ispitivano etarsko ulje pokazuju sličnu efikasnost prema bakteriji *K. pneumoniae* (zona inhibicije 11,5-16,3 mm).

Ovakvi rezultati su u skladu sa ranijim zapažanjima o značajnoj antimikrobnoj aktivnosti etarskih ulja. Etarska ulja su kompleksne mešavine lako isparljivih jedinjenja, različitih mono-, seskvi- i diterpena, fenilpropanskih i alifatičnih jedinjenja. Prema hemijskoj strukturi komponente etarskih ulja mogu biti ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, etri, estri, kiseline. Način na koji etarska ulja, odnosno njihove komponente ispoljavaju antimikrobno delovanje je veoma složen i još uvek nepotpuno razjašnjen. U načelu, delovanje zavisi od odnosa hidrofilnosti i lipofilnosti komponenata. Sa porastom lipofilnog karaktera etarskog ulja, raste i njegova antibakterijska aktivnost, kao posledica reakcije sa komponentama membrane. Ipak, smanjena rastvorljivost u vodi umanjuje mogućnost postizanja toksičnih koncentracija u ćelijskoj membrani (Kalemba i Kunicka, 2003).

Neke komponente etarskih ulja, poput timola i karvakrola dovode do razaranja spoljašnjeg sloja LPS i delimične razgradnje ćelijskog omotača (Kalemba i Kunicka, 2003). Ulje čajnog drveta (*Melaleuca alternifolia* Cheel, Myrtaceae) dovodi do denaturacije proteina u ćelijskom zidu bakterija i gljivica, usled čega membrana puca i dolazi do lize ćelije. Kod Gram-(+) bakterija i komponente etarskog ulja razaraju ćelijski zid bakterija i potom njihovu citoplazmatsku membranu (Cox i sar., 2000). Etarska ulja mogu da inhibišu sintezu DNK, RNK, proteina i polisaharida. Efekat etarskih ulja na gljivice je prema mehanizmu sličan delovanju antimikotika (Kalemba i Kunicka, 2003).

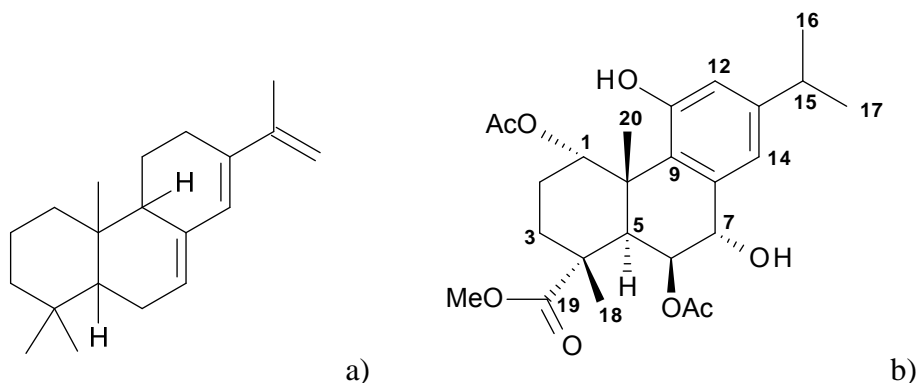
Skoro sva do sada ispitana etarska ulja ispoljavaju izvesno antimikrobno delovanje. Aktivnost zavisi od samog etarskog ulja, vrste testiranog mikroorganizma i primenjene metode, ali je uvek dozno zavisna i zavisi od sastava etarskog ulja. Aktivnosti komponenata etarskih ulja, u zavisnosti od hemijske strukture, je u opadajućem nizu: fenoli > aldehidi > ketoni > alkoholi > etri > ugljovodonici. Tačna korelacija između sastava i aktivnosti etarskog ulja još uvek nije ustanovljena. Izgleda da je odnos aktivnih komponenti, pre nego njihova pojedinačna zastupljenost bitna za ispoljavanje antimikrobnog delovanja (Kalemba i Kunicka, 2003).

Na antimikrobnu aktivnost etarskih ulja značajno utiče i sinergizam njegovih komponenti. Ovo nije toliko značajno u slučaju mešavine nekoliko različitih etarskih ulja, koliko u slučaju mešavine etarskog ulja i različitih aditiva koji se koriste u prehrambenoj industriji (npr. so, masne kiseline, vitamin C, BHA). Helirajuće supstance mogu da pojačaju antimikrobno delovanje etarskih ulja, iako *per se* ne ispoljavaju takvu aktivnost (npr. kombinacija etarskih ulja i EDTA) (Kalemba i Kunicka, 2003).

Na dejstvo etarskih ulja najosetljivije su Gram-(+) bakterije i gljivice. Najaktivniju frakciju etarskih ulja u odnosu na Gram-(+) bakterije čine seskviterpeni, estri aromatičnih kiselina i masne kiseline. Gljivice su najosetljivije na dejstvo estara aromatičnih kiselina, fenilpropane i fenole (Pauli, 2001).

Diterpeni, koji su nešto ređi sastojci etarskih ulja, takođe ispoljavaju značajnu antimikrobnu aktivnost. Za abietanske diterpene izolovane iz *Chamaecyparis pisifera* (Siebold & Zucc.) Endl. (Pinaceae) je dokazano da deluju antibakterijski na *S. aureus* i *B. subtilis* (Xiao i sar., 2001). Abietanski diterpeni izolovani iz *Plectranthus grandidentatus* Gürke i *P. hereroensis* Engl. (Lamiaceae) antibakterijski deluju na neke meticilin rezistentne sojeve *S. aureus* (MRSA) i vankomicin rezistentne *E. faecalis* (VRE) (Gaspar-Marques i sar., 2006). Novi abietanski molekul euroabietol, izolovan iz plodova *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae), ispoljava umereno delovanje prema širokom spektru mikroorganizama, a najizraženije delovanje ispoljava prema *B. subtilis* (Radulović i sar., 2010).

Ovi rezultati idu u prilog činjenici da etarsko ulje herbe *S. plumosa*, bogato abietanskim diterpenima (preko 63%), ispoljava značajno antimikrobno delovanje prema testiranim mikroorganizmima (naročito prema *B. subtilis* i *P. aeruginosa*), odnosno širok spektar antimikrobnog delovanja. Međutim, za razliku od navedenih primera, u ovom slučaju najveću rezistenciju je pokazala Gram-(+) bakterija *S. aureus*. Moguće objašnjenje leži u činjenici da je glavna komponenta ispitivanog etarskog ulja herbe *S. plumosa*, dehidroabietan po svojoj strukturi ugljovodonik (Slika 42a). Za razliku od njega u molekulima abietanskih diterpena, za koje je u ranijim istraživanjima pokazano da ispoljavaju snažno antimikrobno delovanje (Gaspar-Marques i sar., 2006; Radulović i sar., 2010), prisutna je hinonska ili aromatična struktura prstena C, kao i dve ili više funkcionalnih grupa sa kiseonikom (OH, OAc, OMe ili CO), naročito u prstenu B (Slika 42b).



Slika 42. Dehidrobietan (a) i euroabienol (b)

Ovakve strukturne karakteristike obezbeđuju amfifilnost molekula diterpena: ugljovodonični deo molekula se ugrađuje u lipofilni deo zida bakterijske ćelije, dok funkcionalne grupe sa kiseonikom obezbeđuju stvaranje vodoničnih veza sa strukturama ćelijske membrane i poboljšavaju antimikrobno delovanje. Takođe je utvrđeno da prisustvo izopropil grupe u položaju C-13 molekula diterpena uslovljava bolje antibakterijsko delovanje prema Gram-(+) bakterijama (Gaspar-Marques i sar., 2006; Urzúa i sar., 2008). Uporedno ispitivanje 15 diterpenskih jedinjenja je pokazalo da je bakterija *B. subtilis* generalno više osetljiva na njihovo delovanje u odnosu na *S. aureus* (Urzúa i sar., 2008), što je u skladu sa rezultatima naših ispitivanja.

Iako su diterpeni dominantni sastojci etarskog ulja herbe *S. plumosa*, sigurno je da i ostale prisutne komponente svojim sinergističkim delovanjem takođe doprinose njegovom antimikrobnom delovanju. Npr. uzorak etarskog ulja herbe *S. plumosa* koji su ispitivali Ristić i sar. (2008) sadržao je 50% diterpena, odnosno 45,5% *ar*-abietatriena, i 32,8% monoterpena (23,9% oksidovanih). Njegova aktivnost prema testiranim mikroorganizmima (naročito prema *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*) bila je uporediva sa aktivnošću referentnog antibiotika „Unipen“. Prema rezultatima istraživanja koje su sprovedli Grujić-Jovanović i sar. (2004) etarsko ulje *S. plumosa*, koje je sadržalo 73,15% ugljovodoničnih monoterpena i 5,23% diterpena, ispoljava umereno antimikrobno delovanje. Ovaj uzorak je naročito bio aktivan prema *E. coli*, dok nije ispoljio nikakvu antimikrobnu aktivnost prema *P. aeruginosa*.

Izostanak aktivnosti etarskog ulja herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* može se pripisati relativno niskom sadržaju oksidovanih terpenoida (22,5%). Za neke od njih, kao što su

linalool i α -terpineol (u ispitivanom uzorku zastupljeni sa 1,7 i 0,4%, redom) je dokazano da su dobri antimikrobni agensi (Ebrahimabadi i sar., 2010). Ugljovodonici generalno ispoljavaju slabo antimikrobno delovanje, najverovatnije kao posledica umanjene sposobnosti da grade vodonične veze i smanjene hidrofилnosti, ali su npr. α -pinen i β -kariofilen bili aktivniji u poređenju sa linalol-oksидom i kariofilen-oksидom (Goren i sar., 2011). Ketoni, aldehidi i alkoholi su takođe aktivna jedinjenja, ali ta aktivnost je veoma varijabilna, zavisi od funkcionalne grupe i u krajnjoj liniji od sposobnosti formiranja vodoničnih veza (Grujić-Jovanović i sar., 2004). Zabeleženo je i da etarsko ulje *S. inflata*, uprkos izuzetno visokom sadržaju aktivnih komponenti linalola (28,5%) i α -terpineola (9,4%), ne deluje antimikrobno, što se tumači antagonizmom sa ostalim sastojcima ulja (Ebrahimabadi i sar., 2010).

Kada se analiziraju rezultati antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys*, ne može se kao u slučaju etarskog ulja izvući jasan zaključak. Rezultati agar difuzionog testa ukazuju na slabu do umerenu antimikrobnu aktivnost. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije su u skladu sa ispitivanjima antimikrobne aktivnosti metanolnih ekstrakata herbi nekih vrsta roda *Stachys* iz Irana (*S. byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* i *S. laxa*) (Saeedi i sar., 2008). Izuzetno visoku antimikrobnu aktivnost pokazuje ekstrakt herbe *S. anisochila* prema *K. pneumoniae* (aktivnost vrlo slična aktivnosti ampicilina, 10 $\mu\text{g/ml}$) i prema *S. epidermidis*. U odnosu na ostale ekstrakte herbi, ovaj ekstrakt sadrži najviše flavonoida i hlorogenske kiseline. O antimikrobnoj aktivnosti nekih flavonoida postoje literaturni podaci. Oni se uglavnom odnose na flavonole, odnosno flavan-3-ole i njihove kondenzacione proizvode. Za hlorogensku kiselinu je utvrđeno da ne deluje na Gram-(+) bakterije (Daglia, 2012). Za neke fenolkarboksilne kiseline, kao što su kafena, hlorogenska, galna i hina kiselina je utvrđeno da deluju antivirusno (Ozçelik i sar., 2011). Aktivnost ekstrakta herbe *S. beckeana*, koji sadrži skoro upola manje flavonoida i hlorogenske kiseline, prema *K. pneumoniae* bila je nešto manja u odnosu na aktivnost ekstrakta herbe *S. anisochila*, ali takođe značajna. Ovaj ekstrakt sadrži najveću količinu feniletanskih heterozida, naročito akteozida. Za ovo jedinjenje je ranije pokazano da ispoljava umereno antimikrobno delovanje. Pretpostavlja se da akteozid inhibira preuzimanje leucina u bakterijsku ćeliju, zbog čega dolazi do inhibicije sinteze proteina. Takođe je utvrđeno da se akteozid i neki feniletanski heterozidi vezuju za membrane i

ugrađuju u lipidni dvosloj. Pri tome menjaju fizičke osobine membrane, što može da dovede i do promena i ćelijskoj signalizaciji ili funkciji mitohondrija. Ovim efektima na lipidnom dvosloju delimično se objašnjava antibakterijsko delovanje ovih jedinjenja, naročito prema Gram-(+) bakterijama. Naime, membrana Gram-(+) bakterija je bogata negativno naelektrisanim fosfolipidima (fosfatidilglicerol, lizil-fosfatidilglicerol, kardiolipin), a akteozid pokazuje visok afinitet za ugradnju u površinski deo lipidnog dvosloja. Pretpostavlja se da time dovodi do raslojavanja membrane i formiranja unilamelarnog sloja sa perforacijama, ili dovodi do povećanja dela membrane oko „glave“ fosfolipida, usled čega nastaje povećana zakrivljenost površine membrane (Funes i sar., 2010).

ZAKLJUČCI

1. U okviru doktorske disertacije izvršeno je hemijsko i farmakološko ispitivanje četiri taksona roda *Stachys* L.: *S. anisochila* Vis. et Pančić, *S. beckeana* Dörfler & Hayek, *S. plumosa* Griseb. i *S. alpina* subsp. *dinarica* Murb., endemičnih za Balkansko poluostrvo. Vrste *S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* [subsp. *alpina*] su do sada samo delimično hemijski i farmakološki ispitivane, dok podvrsta *S. alpina* subsp. *dinarica* do sada nije bila proučavana.
2. Osnovnim hemijskim ispitivanjima nadzemnih delova biljaka u cvetu utvrđeno je da se sadržaj vlage, pepela, u kiselini nerastvorljivog pepela i prinos ekstrakta nalaze u uobičajenim granicama koje propisuju farmakopeje i drugi stručni propisi za najveći broj biljnih lekovitih sirovina.
3. Preliminarnim hemijskim ispitivanjima u nadzemnim delovima biljaka u cvetu utvrđeno je prisustvo tanina, flavonoida, antocijana, fenolkarboksilnih kiselina i alkaloida i određen njihov sadržaj.
 - a. Sadržaj tanina određen je spektrofotometrijski i iznosio je od 1,75% u herbi *S. plumosa* do 5,72% u herbi *S. anisochila*.
 - b. Sadržaj flavonoida određen spektrofotometrijski bio je najmanji u herbi *S. beckeana* (0,27%, izraženo kao hiperozid), a najveći u herbi *S. anisochila* (0,65%). Antocijani su identifikovani samo u herbi *S. alpina* subsp. *dinarica*, a njihov sadržaj, određen spektrofotometrijski, iznosio je svega 0,075%.
 - c. Sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline određen spektrofotometrijski (izraženo kao hlorogenska kiselina, odnosno kao akteozid) bio je najmanji u herbi *S. plumosa* (1,42%, odnosno 1,45%), a najveći u herbi *S. beckeana* (3,10%, odnosno 3,16%).
 - d. Alkaloidi su identifikovani samo u herbi *S. anisochila* i *S. beckeana*. Njihov sadržaj, određen gravimetrijski, bio je veoma nizak (0,102 i 0,063%, redom).
4. Iz herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* destilacijom vodenom parom izolovana su etarska ulja. Količina etarskog ulja u herbi *S. plumosa* iznosila je

- 0,15% (V/m), a u herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* 0,03% (m/m). Hemijska sastav izolovanih etarskih ulja ispitan je metodama GC-FID i GC-MS.
- a. Etarsko ulje herbe *S. plumosa* karakteriše visok sadržaj diterpena (74,3%), dok su monoterpeni i seskviterpeni prisutni u znatno manjoj količini (8,7 i 3,2%, redom). Glavna komponenta etarskog ulja je diterpen dehidroabietan ($\equiv ar$ -abietatrien) (61,2%).
 - b. U etarskom ulju herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* dominantni sastojci su seskviterpeni (60,5%) i to pretežno ugljovodonici (41,0%). Glavni seskviterpeni (*E*)-kariofilen i germakren D su ujedno i glavne komponente etarskog ulja (13,4 i 12,3%, redom). Ispitivano ulje karakteriše i visok sadržaj alifatičnih jedinjenja (19,4%), od kojih je najzastupljeniji aldehid *n*-nonanal (5,3%).
5. Tehnikama hromatografije na koloni i tankom sloju silikagela iz metanolnog ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* izolovana su tri flavonska heterozida: 4'-*O*-metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **1**), 3'-hidroksi-4'-*O*-metilizoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **2**) i izoskutelarein 7-*O*-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid (jedinjenje **3**). Struktura izolovanih flavonoida utvrđena je na osnovu analize njihovih UV, MS, ¹H NMR i ¹³C NMR spektralnih podataka. Prisustvo ovih flavonskih heterozida utvrđeno je ranije u nekim drugim vrstama roda *Stachys*, ali su oni u okviru ove doktorske disertacije prvi put identifikovani u *S. alpina* subsp. *dinarica*.
6. Preliminarnom TLC analizom suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* utvrđeno je da sadrže flavonoidne heterozide i fenolkarboksilne kiseline. TLC profil ekstrakta herbe *S. plumosa* bio je značajno različit od profila preostala tri ekstrakta.
7. HPLC-UV i HPLC-MS analizama je pokazano da su u suvim metanolnim ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Stachys* prisutni flavonski i feniletanski heterozidi i fenolkarboksilne kiseline.

- a. U okviru ove doktorske disertacije, u ekstraktu herbe *S. anisochila*, pored sedam prethodno identifikovanih 7-O-heterozida izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata, identifikovana su još dva: hipolaetin 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid i izoskutelarein 7-O-[alozil(1→2)]-glukopiranozid. Takođe, po prvi put su u ovoj vrsti identifikovani feniletanski heterozidi - akteozid i lavandulifoliozid, i hlorogenska kiselina, i detektovana jedna dikafeoilhina kiselina.
- b. U ekstraktu herbe *S. beckeana* od 11 detektovanih biozida izoskutelareina i hipolaetina, 9 jedinjenja identifikovano je u ovoj vrsti po prvi put. Takođe, po prvi put u ovoj vrsti utvrđeno je prisustvo hlorogenske kiseline, kao i feniletanskih heterozida akteozida, izoakteozida, lavandulifoliozida i martinozida.
- c. U ekstraktu herbe *S. plumosa* utvrđeno je prisustvo tri 7-O-biozida hrizoeriola. Identifikovani su hrizoeriol 7-O-[6"-acetilalozil-(1→2)]-glukopiranozid (stahispinozid), koji je ujedno i glavni flavonoid u ekstraktu (10,74%), i njegov dezacetil analog. U ekstraktu je takođe detektovano pet monozida apigenina, čija je šećerna komponenta esterifikovana. Dominiraju *p*-E-kumaroil derivati; od 4 detektovana jedinjenja, identifikovana su dva: apigenin 7-O-(6"-*p*-E-kumaroil)-glukopiranozid i apigenin 7-O-(3"-*p*-E-kumaroil)-glukopiranozid. Takođe, detektovan je i jedan acetilheksozid apigenina, ali njegova tačna struktura nije utvrđena. Uz po prvi put u ovoj vrsti identifikovanu hlorogensku kiselinu, u ekstraktu herbe *S. plumosa* detektovano je i 8 feniletanskih heterozida, od kojih su identifikovani akteozid, martinozid, i po prvi put u ovoj vrsti izoakteozid i lavandulifoliozid.
- d. U okviru ove doktorske disertacije podvrsta *S. alpina* subsp. *dinarica* je prvi put bila predmet hemijskog ispitivanja. U ekstraktu herbe detektovano je 14 flavonoidnih heterozida. Devet identifikovanih flavonoida čine ujedno i glavnu frakciju (preko 9,6%) i svi su 7-O-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata: alozilglukozidi, acetil- i diacetilalozilglukozidi. U ekstraktu su detektovana i dva 7-O-diheksozida luteolina, od kojih je šećerna komponenta jednog acetilovana. Od fenolkarboksilnih kiselina, osim hlorogenske, detektovan je i jedan derivat ferula kiseline. Detektovano je 7 feniletanskih

- heterozida, od kojih su identifikovani akteozid, betoniozid E, lavandulifoliozid, leukoskeptoizid A i martinozid.
- e. U ekstraktima herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* prisutni su 7-O-biozidi izoskutelareina i hipolaetina i njihovih 4'-metil derivata, pri čemu dominantnu frakciju čine njihovi alozil-, acetalozil- i diacetalozilglukozidi. Distribucija flavonoida ovog tipa u ispitivanim taksonima u skladu je sa njihovom taksonomskom pripadnošću. S obzirom da *S. anisochila* i *S. beckeana* pripadaju istoj sekciji (*S. sect. Olesia*) i istoj grupi *S. recta*, sasvim je razumljiva i velika sličnost hemijskog sastava flavonoidnih frakcija njihovih metanolnih ekstrakata. Ove vrste su u pogledu kompozicije flavonoidnih sastojaka sličnije *S. alpina* (*S. sect. Eriostomum*), nego *S. plumosa* (*S. sect. Swainsoniana*). Na osnovu ovoga može se pretpostaviti i da između sekcija *S. sect. Olesia* i *S. sect. Eriostomum* postoji veći nivo srodnosti, ali ovu hipotezu nije moguće proveriti jer molekularna filogenija roda *Stachys* još uvek nije poznata.
8. U suvim metanolnim ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Stachys* utvrđen je sadržaj ukupnih polifenola (iznosio je od 65,63 µg katehin/mg suvog ekstrakta *S. plumosa* do 192,16 µg katehin/mg suvog ekstrakta *S. anisochila*).
9. Antioksidantna aktivnost suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* određena je korišćenjem nekoliko *in vitro* testova: FRAP test (ukupna antioksidantna aktivnost), DPPH i TLC-DPPH test (neutralizacija DPPH radikala), 2-dezoksiriboza test (neutralizacija OH radikala) i TBA test (inhibicija indukovane lipidne peroksidacije).
- a. FRAP vrednosti pokazuju da je ukupna antioksidantna aktivnost metanolnih ekstrakata oko pet puta manja od aktivnosti vitamina C. Najaktivniji je bio ekstrakt herbe *S. anisochila*, a najslabiju aktivnost pokazao je ekstrakt herbe *S. plumosa*. Ova aktivnost bila je visoko korelisana sa sadržajem ukupnih polifenola ($r=0,999$).
- b. Svi ekstrakti su koncentraciono zavisno neutralisali DPPH radikal. Rezultati spektrofotometrijskog testa su bili u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih

polifenola ($r=-0,948$) i ukazuju na visoku reaktivnost ekstrakata herbi *S. anisochila*, *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* ($SC_{50}<50$ $\mu\text{g/ml}$). Anti-DPPH aktivnost ekstrakta herbe *S. plumosa* bila je slaba (101,61 $\mu\text{g/ml}$). Rezultati TLC-DPPH testa su pokazali da su glavni nosioci ove aktivnosti flavonoidni heterozidi.

- c. U 2-dezoksiriboza testu, svi ekstrakti su u primenjenim koncentracijama koncentraciono zavisno neutralisali OH radikal. U opsegu koncentracija 6,25-50 $\mu\text{g/ml}$, svi ekstrakti inhibirali su degradaciju 2-dezoksiriboze preko 40%.
- d. Inhibicija lipidne peroksidacije (LP) takođe je bila koncentraciono zavisna. Najveću aktivnost su ispoljili ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. alpina* subsp. *dinarica* ($IC_{50}=25,07$ i $49,00$ $\mu\text{g/ml}$, redom), dok ekstrakti herbi *S. anisochila* i *S. plumosa* u primenjenim koncentracijama nisu dostigli 50% inhibicije LP.

10. Antiinflamatorna aktivnost suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* ispitana je na modelu karageninom izazvanog edema šapice pacova. Svi ispitivani ekstrakti ispoljili su dozno zavisno antiinflamatorno delovanje, a maksimalni efekti postignuti su u najvećoj primenjenoj dozi od 200 mg/kg. U toj dozi ekstrakti herbi *S. beckeana* i *S. anisochila* suprimirali su inflamatorni odgovor za 54,04 i 53,30%, redom. Nešto nižu aktivnost ispoljio je ekstrakt herbe *S. plumosa* (46,52%), a najslabiju ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* (37,17%).

11. Za ispitivanje hepatoprotektivne aktivnosti suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* korišćen je model ugljen-tetrahloridom indukovano oštećenja jetre pacova. Ugljen-tetrahlorid je primenjivan pre ispitivanih ekstrakata što je omogućilo procenu njihovog reparativnog (terapijskog) efekta. Na osnovu uticaja na nivo enzima jetre (AST, ALT i AP) u serumu, kao i na osnovu uticaja na patohistološke promene u tkivu jetre, utvrđeno je da je najbolji i dozno zavistan efekat ispoljio ekstrakt herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*: u dozi od 200 mg/kg oštećenje jetre je smanjeno za oko 50%. Hepatoprotektivni efekat ostalih ekstrakata je takođe uočljiv, ali između primenjenih doza (200 i 100 mg/kg) nema statistički značajnih razlika. Efekti ekstrakata herbi *S. anisochila* i *S. beckeana* međusobno su bili slični i bolji u odnosu na efekte ekstrakta herbe *S. plumosa*.

12. Ispoljeno antiinflamatorno i hepatoprotektivno delovanje su u značajnoj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima, kao i sa njihovom antioksidantnom i antiradikalnom aktivnošću. Može se pretpostaviti da su ovi sastojci najvećim delom odgovorni za ispoljeno delovanje i da su antioksidantna i antiradikalna aktivnost delom uključene u mehanizme antiinflamatornog i hepatoprotektivnog delovanja.
13. Delovanje suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* na aktivnost mikrozomalne MAO praćeno je *in vitro* preko stepena razgrađivanja ¹⁴C-serotonina (supstrat za MAO-A) i ¹⁴C-fenil-etil-amina (supstrat za MAO-B). Rezultati ukazuju na odsustvo MAO-inhibitorne aktivnosti ispitivanih ekstrakata.
14. Bihejvioralna karakterizacija suvih metanolnih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Stachys* sprovedena je korišćenjem standardnih testova: ponašanje u uzdignutom plus lavirintu (EPM test), test spontane lokomotorne aktivnosti (SLA test) i test jačine stiska. Rezultati ispitivanja pokazuju izostanak jasnog anksiolitičkog ili miorelaksantnog delovanja. Ipak, neki od ekstrakata pokazuju određenu bihejvioralnu aktivnost: ekstrakt herbe *S. beckeana* u dozi od 400 mg/kg ispoljava izvestan anksiogeni efekat u EPM testu, dok parametri vezani za aktivnost u istom testu ukazuju na sedativno delovanje ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa*. U testu spontane lokomotorne aktivnosti potvrđen je sedativni potencijal ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica*. Dobijeni rezultati pokazuju da ispoljena bihejvioralna aktivnost ekstrakata herbi *S. alpina* subsp. *dinarica* i *S. plumosa* ne uključuje predominantno populaciju GABA_A receptora sa α_1 -podjedinicom. Indirektno, može se zaključiti da su za ispoljene bihejvioralne efekte odgovorni i određeni mehanizmi koji ne uključuju GABA-ergičku neurotransmisiju.
15. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja herbi *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*, kao i suvih metanolnih ekstrakata herbi sva četiri odabrana taksona roda *Stachys* ispitana je agar difuzionim testom. Korišćeni su standardni ATCC sojevi četiri Gram-(+) i tri Gram-(-) bakterije i jedan soj gljivice *Candida albicans*. Etarsko ulje

herbe *S. plumosa* pokazalo je aktivnost prema svim testiranim mikroorganizmima. Ovo etarsko ulje bilo je najaktivnije prema *Bacillus subtilis* i *Pseudomonas aeruginosa*, dostižući aktivnost veću od aktivnosti referentnih antibiotika (ampicilina, odnosno amikacina). Nasuprot tome, etarsko ulje herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* nije dovelo do inhibicije rasta nijednog od ispitivanih mikroorganizama. Suvi metanolni ekstrakti herbi svih odabranih taksona roda *Stachys* inhibirali su rast većine testiranih mikroorganizmima, osim ekstrakta herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* koji nije uticao na rast *Enterococcus faecalis* i *Candida albicans*. U slučaju *Klebsiella pneumoniae* aktivnost ekstrakata bila je najveća i uporediva sa aktivnošću ampicilina.

16. Generalno se može se zaključiti da doktorska disertacija daje značajan doprinos poznavanju sekundarnih metabolita u nadzemnim delovima u cvetu četiri endemična taksona roda *Stachys* (*S. anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica*) i da ovi rezultati imaju i taksonomski značaj. Uvid u antioksidantni, antiinflamatorni, hepatoprotektivni, psihotropni i antimikrobni potencijal hemijski okarakterisanih metanolnih ekstrakata herbi, kao i antimikrobni potencijal izolovanih etarskih ulja definisanog sastava omogućava procenu mogućnosti njihove primene kao potencijalno novih prirodnih lekovitih sirovina. Takođe, primena herbe *S. alpina* subsp. *dinarica* u narodnoj medicini „za smirenje i kod nesаницe“ dobila je svoju potvrdu u činjenici da metanolni ekstrakt ove biljke ispoljava izvestan sedativni efekat.

LITERATURA

1. Abdel-Mogib M, Al-Zahrani HSM. Aromatic constituents of *Stachys* sp. aff. *schimperii*. JKAU: Sci. 2005;17:77-82.
2. Abichandani M, Nahar L, Singh P, Chitnis R, Nazemiyeh H, Delazar A, Sarker SD. Antibacterial and free-radical-scavenging properties of *Stachys schtschegleevii* (Lamiaceae). Arch Biol Sci. 2010;62:941-945.
3. Acar JF, Goldstein FW. Disc susceptibility test. U: Lorian V, urednik. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1996. p. 1-51.
4. Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy. IL: Allured, Carol Stream; 2001.
5. Adinolfi M, Barone G, Lanzetta R, Laonigro G, Mangoni L, Parrilli M. Diterpenes from *Stachys recta*. J Nat Prod. 1984;47:541-543.
6. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochem Pharmacol. 1989;38:1763-1769.
7. Ahvazi M, Khalighi-Sigaroodi F, Charkhchian MM, Mojab F, Mozaffarian V-A, Zakeri H. Introduction of medicinal plants species with the most traditional usage in Alamut region. Iran J Pharm Res. 2012;11:185-194.
8. Albach DC, Grayer RJ, Jensen SR, Ozgökce F, Veitch NC. Acylated flavone glycosides from *Veronica*. Phytochemistry 2003;64:1295-1301.
9. Ali NA, Marongiu B, Piras A, Porcedda S, Falconieri D, Molicotti P, Zanetti S. Essential oil composition of leaves of *Stachys yemenensis* obtained by supercritical CO₂. Nat Prod Res. 2010;24:1823-1829.
10. Aligiannis N, Mitaku S, Tsitsa-Tsardis E, Harvala C, Tsaknis I, Lalas S, Haroutounian S. Methanolic Extract of *Verbascum macrurum* as a Source of Natural Preservatives against Oxidative Rancidity. J Agric Food Chem. 2003;51,7308-7312.
11. Allayarov K, Khamidkhodzhaev SA, Korotkova EE. Alkaloids-containing plants of Turkmenian S.S.R. Izvestiya Akademii Nauk Turkmenskoi SSR, Seriya Biologicheskikh Nauk 1965;(4):62-5.
12. Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of East Anatolia, Turkey. Procedia Soc Behav Sci. 2011;19:756-777.
13. Amirghofran Z. Medicinal plants as immunosuppressive agents in traditional Iranian medicine. Iran J Immunol. 2010;7:65-73.
14. Aronova BN, Litvinenko VI. Chemical composition of *Stachys betonicaeflora* (*Betonica foliosa*). USSR Fiziol Aktiv Soedin Rast Kirg. 1970;80-88.
15. Aronova BN. *Stachys betonicaeflora* as a raw material for preparing galenicals. Rastitel'nye Resursy 1969;5(3):422-433.

16. Arora A, Nair MG, Strasburg GM. Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Rad Biol Med.* 1998;24:1355-1363.
17. Asnaashari S, Delazar A, Alipour SS, Nahar L, Williams AS, Pasdaran A, Mojarab M, Azad FF, Sarker D. Chemical composition, free-radical-scavenging and insecticidal activities of the aerial parts of *Stachys byzantina*. *Arch Biol Sci.* 2010;62:653-662.
18. 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;59:1387-1394.
19. Awaad AS, Maitland DJ, Soliman GA. Hepatoprotective activity of *Schouwia thebica* Webb. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16:4624-4628.
20. Ball PW. *Stachys* L. U: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, urednici. *Flora Europaea*, Vol. IV. Cambridge: University Press; 1972. str. 151-157.
21. Ballabh B, Chaurasia OP. Traditional medicinal plants of cold desert Ladakh used in treatment of cold, cough and fever. *J Ethnopharmacol.* 2007;112:341-349.
22. Baltisberger M, Lenherr A. Neue Chromosomenzahlen aus der Gruppe der *Stachys recta* L. und anderen, verwandten Artengruppen. *Berichte des Geobotanischen Institutes der ETH, Stiftung Rübel* 1984;51:39-62.
23. Bankova V, Koeva-Todorovska J, Stambolijaska T, Ignatova-Groceva M-D, Todorova D, Popov S. Polyphenols in *Stachys* and *Betonica* species (Lamiaceae). *Z Naturforsch C.* 1999;54:876-880.
24. Basaran AA, Calis I, Anklin C, Nishibe S, Sticher O. Lavandulifolioside: A new phenylpropanoid glycoside from *Stachys lavandulifolia*. *Helv Chim Acta.* 1988;71:1483-1490.
25. Basaran AA, Yu TW, Plewa MJ, Anderson D. An investigation of some Turkish herbal medicines in *Salmonella typhimurium* and in the COMET assay in human lymphocytes. *Teratog Carcinog Mutagen.* 1996;16:125-138.
26. Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, Schubiger M, Vogt KE, Rudolph U, Möhler H. GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerianic acid, a major constituent of valerian root extracts. *Neuropharmacology* 2009;56:174-181.
27. Bermejo Benito P, Díaz Lanza AM, Silván Sen AM, De Santos Galindez J, Fernandez Matellano L, Sanz Gómez A, Abad Martínez MJ. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med.* 2000;66:324-328.
28. Bhattacharjee R. Taxonomic studies in *Stachys*: II. A new infrageneric classification of *Stachys* L. *Notes Roy Bot Gard Edinburgh.* 1980;38:65-96.
29. Bilušić Vundać V, Brantner AH, Plazibat M. Content of polyphenolic constituents and antioxidant activity of some *Stachys* taxa. *Food Chem.* 2007;104:1277-1281.

30. Bilušić Vundać V, Maleš Ž, Plazibat M, Golja P, Cetina-Čižmek B. HPTLC determination of flavonoids and phenolic acids in some Croatian *Stachys* taxa. J Plan Chromatogr - Mod TLC. 2005;18:269-273.
31. Bilušić Vundać V, Pfeifhofer HW, Brantner AH, Maleš Ž, Plazibat M. Essential oils of seven *Stachys* taxa from Croatia. Biochem Syst Ecol. 2006;34:875-881.
32. Bisht DS, Padalia RC, Joshi SC, Singh KK, Mathela CS. Sesquiterpene hydrocarbons rich essential oil of *Stachys sericea* Wall. J Essent Oil-Bear Pl. 2008;11(6):586-590.
33. Bjelčić Z. *Stachys* L. U: Beck G, Malý K, Bjelčić Z, urednici. Flora Bosnae et Hercegovinae, Vol. 4(3). Sarajevo: Zemaljski muzej BiH; 1974. str. 12-21.
34. Bonet MA, Parada M, Selga A, Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). J Ethnopharmacol. 1999;68:145-68.
35. Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C, Soulimani R. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. Food Chem. 2007a;104:364-368.
36. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. J Neurol Sci. 2007b;262:77-84.
37. Bourin M, Briley M. Sedation, an unpleasant, undesirable and potentially dangerous side-effect of many psychotropic drugs. Hum Psychopharmacol. 2004;19:135-139.
38. Buchwald W, Czapska A. Tannins and phenolic acids content in herb of domestic species of *Betonica* L. and *Stachys* L. genera. Herba Pol. 1995;41:198-202.
39. Cabré M, Camps J, Paternáin JL, Ferré N, Joven J. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000;27:694-699.
40. Çakir A, Duru ME, Harmandar M, Izumi S, Hirata T. The Volatile Constituents of *Stachys recta* L. and *Stachys balansae* L. from Turkey. Flavour Fragr J. 1997;12:215-218.
41. Çalis I, Başaran AA, Saracoğlu I, Sticher O. Iridoid and phenylpropanoid glycosides from *Stachys macrantha*. Phytochemistry 1992;31:167-169.
42. Campbell EL, Chebib M, Johnston GA. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA(A) receptors. Biochem Pharmacol. 2004;68:1631-1638.
43. Chalchat J-C, Petrović SD, Maksimović ZA, Gorunović MS. Essential oil of *Stachys officinalis* (L.) Trevis., Lamiaceae from Montenegro. J Essent Oil Res. 2001;13:286-287.
44. Chandan BK, Saxena AK, Shukla S, Sharma N, Gupta DK, Suri KA, Suri J, Bhadauria M, Singh B. Hepatoprotective potential of *Aloe barbadensis* Mill.

- against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *J Ethnopharmacol.* 2007;22;111(3):560-566.
45. Chari VM, Grayer-Barkmeijer RJ, Harborne JB, Österdahl B-G. An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filiformis*. *Phytochemistry* 1981;20:1977-1979.
46. Chen JH, Ho C-T. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J Agric Food Chem.* 1997;45:2374-2378.
47. Chrtěk J. jun. Taxonomical remarks on the *Stachys recta* group. *Folia geobotanica et phytotaxonomica.* 1992;27:177-183.
48. Cincinelli R, Scaglioni L, Arnold NA, Dallavalle S. Structure and absolute configuration of new acidic metabolites from *Stachys ehrenbergii*. *Tetrahedron Lett.* 2011;52:5972-5975.
49. Coleta M, Campos MG, Cotrim MD, Lima TC, Cunha AP. Assessment of luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) neuropharmacological activity. *Behav Brain Res.* 2008;189:75-82.
50. Conforti F, Menichini F, Formisano C, Rigano D, Senatore F, Apostolides Arnold N, Piozzi F. Comparative chemical composition, free radical-scavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. *Food Chem.* 2009;116:898-905.
51. Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti MG. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J Ethnopharmacol.* 2009;125:16-30.
52. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:564-582.
53. Cox E, Hagen T, McKernan R, Cook JM. Bz1 receptor subtype specific ligands. Synthesis and biological properties of β CCt, a Bz1 receptor subtype specific antagonist. *Med Chem Res.* 1995;5:710-718.
54. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *J Appl Microbiol.* 2000;88:170-175.
55. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta.* 1997;80:1144-1152.
56. Czige S, Háznagy-Radnai E, Tóth J, Máthé I, Grančai D. Rosmarinic acid in the genus *Stachys* L. *Rev Med Farm.* 2007;53:343-346.
57. Čajkanović V. Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama. Đurić V. (rukopis priredio i dopunio). Beograd: Srpska književa zadruga, BIGZ, Prosveta, Partenon; 1994.
58. Čavar S, Maksimović M, Vidić D, Šolić ME. Chemical composition of the essential oil of *Stachys menthifolia* Vis. *Pharm biol.* 2010;48:170-176.
59. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 2012;23:174-181.

60. Deepak M, Umashankar DC, Handa SS. Verbascoside-A promising phenylpropanoid. *Indian Drugs* 1999;36:336-345.
61. Dekermendjian K, Kahnberg P, Witt MR, Sterner O, Nielsen M, Liljefors T. Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA(A) receptor complex. *J Med Chem.* 1999;42:4343-4350.
62. Delazar A, Celik S, Gokturk RS, Unal O, Nahar L, Sarker SD. Two acylated flavonoid glycosides from *Stachys bombycina*, and their free radical scavenging activity. *Pharmazie* 2005a;60:878-880.
63. Delazar A, Gibbons S, Kumarasamy Y, Nahar L, Shoeb M, Sarker SD. Antioxidant phenylethanoid glycosides from the rhizomes of *Eremostachys glabra* (Lamiaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2005b;33:87-90.
64. Delazar A, Sabzevari A, Mojarrab M, Nazemiyeh H, Esnaashari S, Nahar L, Razavi SM, Sarker SD. Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *J Nat Med.* 2008;62:464-466.
65. Delazar A, Delnavazi MR, Nahar L, Moghadam SB, Mojarab M, Gupta A, Williams AS, Mukhlesur Rahman M, Sarker SD. Lavandulifolioside B: a new phenylethanoid glycoside from the aerial parts of *Stachys lavandulifolia* Vahl. *Nat Prod Res.* 2011;25:8-16.
66. Derkach AI, Komissarenko NF, Gordienko VG, Sheremet IP, Kovalev IP, Pakaln DA. Flavonoids of *Stachys spectabilis*. *Chem Nat Comp.* 1980;16:128-130.
67. de Souza GC, Haas AP, von Poser GL, Schapoval EE, Elisabetsky E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2004;90:135-43.
68. di Giorgio C, Delmas F, Tueni M, Cheble E, Khalil T, Balansard G. Alternative and complementary antileishmanial treatments: Assesment of the antileishmanial activity of 27 Lebanese plants, including 11 endemic species. *J Altern Complement Med.* 2008;14:157-162.
69. di Rosa M, Giround JP, Willoughby DA. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 1971;104:15-29.
70. di Rosa M, Willoughby DA. Screen for anti-inflammatory drugs. *J Pharm Pharmacol.* 1971;23:297-298.
71. Diaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Silvan AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: *in vitro* anti-inflammatory activity. *Life Sci.* 2004;74:2515-2526.
72. Diklić N. *Stachys* L. U: Josifović M, urednik. Flora SR Srbije, Vol. 6. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1974. str. 408-432.
73. dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, de Souza GE. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(11):2236-2240.

74. Duarte MCT, Figuera GM, Sartoratto A, Rehder VLG, Delarmelina C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:305-311.
75. Dulger B, Gonuz A. Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Salvia* and *Stachys* species. *Pharm Biol.* 2004;42:301-304.
76. Dulger B, Ugurlu E, Aki C, Suerdem TB, Camdeviren A, Tazeler G. Antimicrobial activity of some endemic *Verbascum*, *Sideritis*, and *Stachys* species. *Pharm Biol.* 2005;43:270-274.
77. Dulger B, Aki C. Antimicrobial activity of leaves of endemic *Stachys pseudopinardii* in Turkey. *Trop J Pharm Res.* 2009;8:371-375.
78. Duman H, Kartal M, Altun L, Demirci B, Hüsnü Can Baser K. The essential oil of *Stachys laetivirens* Kotschy & Boiss. ex Rech. fil., endemic in Turkey. *Flavour Fragr J.* 2005;20:48-50.
79. Dumortier BC. *Florula belgica. Staminacia, Tornaci Nerviorum*: J. Custerman; 1827, str. 44-45.
80. Đukić MM. Reaktivne henijske vrste i oksidativni stres. U: Đukić MM, urednik. *Oksidativni stres: slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi.* Beograd, Mono i Manjana; 2008.
81. Ebrahimabadi AH, Ebrahimabadi EH, Djafari-Bidgoli Z, Jookar Kashi F, Mazoochi A, Batooli H. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oils and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. *Food Chem.* 2010;119:452-458.
82. El-Ansari MA, Barron D, Abdalla MF, Saleh NAM, Le Quere JL. Flavonoid constituents of *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry* 1991;30:1169-1173.
83. El-Ansari MA, Nawwar MA, Saleh NAM. Stachysetin, a diapigenin-7-glucoside-*p,p'*-dihydroxy-truxinate from *Stachys aegyptiaca*. *Phytochemistry* 1995;40:1543-1548.
84. Fakir H, Yasar S., Erbas S. Essential oil composition of *Stachys antalyensis* Y. Ayasligil and P.H. Davis described endemic species from Turkey. *Asian J Chem.* 2010;22:527-530.
85. Fazio C, Passannanti S, Paternostro MP, Piozzi F. Neo-clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry* 1992;31:3147-3149.
86. Fazio C, Passannanti S, Paternostro MP, Arnold NA. Diterpenoids from *Stachys mucronata*. *Planta Med.* 1994a;60:499.
87. Fazio C, Paternostro MP, Passannanti S, Piozzi F. Further neo-clerodane diterpenoids from *Stachys rosea*. *Phytochemistry* 1994b;37:501-503.
88. Feizbakhsh A, Tehrani MS, Rustaiyan A, Masoudi S. Composition of the essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl. from Iran. *J Essent Oil Res.* 2003;15:72-73.
89. Ferrándiz ML, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. *Agents Actions.* 1991;32:283-288.

90. Fernández SP, Wasowski C, Loscalzo LM, Granger RE, Johnston GA, Paladini AC, Marder M. Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *Eur J Pharmacol.* 2006;539:168-176.
91. Fu G, Pang H, Wong YH. Naturally Occurring Phenylethanoid Glycosides: Potential Leads for New Therapeutics. *Curr Med Chem.* 2008;15:2592-2613.
92. Funes L, Laporta O, Cerdán-Calero M, Micol V. Effects of verbascoside, a phenylpropanoid glycoside from lemon verbena, on phospholipid model membranes. *Chem Phys Lipids.* 2010;163:190-199.
93. Gabrieli CN, Kefalas PG, Kokkalou EL. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis raeseri*. *J Ethnopharmacol.* 2005;96:423-428.
94. Garjani A, Maleki N, Nazemiyeh H. Effects of hydroalcoholic extract from aerial parts of the sterile stems of *Stachys inflata* on myocardial infarct size in rats. *Iranian J Pharm Res.* 2004;3:165-170.
95. Garnier G, Bezanger-Beaquesne L, Debraux G. Ressources medicinales de la Flore française, Tome II. Paris: Vigot Freres Editeurs; 1961.
96. Gaspar-Marques C, Rijo P, Simões MF, Duarte MA, Rodriguez B. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. *Phytomedicine* 2006;13:267-271.
97. Ghannadi AR, Alemdoost G. Composition of the essential oil of *Stachys lavandulifolia*. 44th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Prague, 3-7 September, 1996. p. 206.
98. Ghasemzadeh A, Ghasemzadeh N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *J Med Plant Res.* 2011;5: 6697-6703.
99. Ghorbani A. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Turkmen Sahra, north of Iran (Part 1): general results. *J Ethnopharmacol.* 2005;102:58-68.
100. Giuliani C, Maleci Bini L. Insight into the structure and chemistry of glandular trichomes of Labiatae, with emphasis on subfamily Lamioideae. *Plant Syst Evol.* 2008;276:199-208.
101. Goren AC, Piozzi F, Akcicek E, Kılıç T, Çarıkçı S, Mozioglu E, Setzer WN. Essential oil composition of twenty-two *Stachys* species (mountain tea) and their biological activities. *Phytochem Lett.* 2011;4:448-453.
102. Grayer RJ, De Kok RPJ. Flavonoids and verbascoside as chemotaxonomic characters in the genera *Oxera* and *Faradaya* (Labiatae). *Biochem Syst Ecol.* 1998;26:729-741.
103. Grayer RJ, Eckert MR, Veitch NC, Kite GC, Marin PD, Kokubun T, Simmonds MSJ, Paton AJ. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae. *Phytochemistry* 2003;64:519-528.
104. Greuter W, Burdet HM, Long G, urednici. Med-Checklist 3. Genève: Conservatoire et Jardin botaniques de la Ville de Genève, Med-Checklist Trust of OPTIMA; 1986.
105. Grieve M. A Modern Herbal. New York: Dover Publications, Inc.; 1971.

106. Grlić Lj. Samoniklo jestivo bilje. Zagreb: Prosvjeta; 1980. str. 252.
107. Gruenwald J, Brendler T, Jaenicke C, urednici. PDR for herbal medicines. Montvale, New Jersey, USA: Thompson PDR; 2004.
108. Grujić-Jovanović S, Ristić MS, Perović SS, Petrović SD, Marin PD, Petković B. Essential oil of *Stachys plumosa* Griseb. (Lamiaceae). *Lek Sirov.* 2001;20:13-19.
109. Grujić-Jovanović S, Skaltsa HD, Marin P, Soković M. Composition and antibacterial activity of the essential oil of six *Stachys* species from Serbia. *Flavour Fragr J.* 2004;19:139-144.
110. Grujić-Jovanović S, Marin P, Džamić A, Ristić M. Composition of the essential oil of *Stachys germanica* from Serbia. *Chem Nat Comp.* 2008;44:670-672.
111. Grujić-Jovanović S. Anatomska, mikromorfološka i fitohemijska analiza odabranih vrsta roda *Stachys* L. (Lamiaceae) iz Srbije i Crne Gore. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2009.
112. Grujić-Jovanović S, Džamić AM, Ristić MS, Marin PD. Essential oil composition of *Stachys anisochila*. *Chem Nat Comp.* 2011;47:823-825.
113. Grundmann O, Nakajima J, Seo S, Butterweck V. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus maze test. *J Ethnopharmacol.* 2007;110:406-411.
114. Gstirner F, Schiemenz E. Polyphenols in *Herba betonicae*. *Sci Pharmac.* 1969;37:40-47.
115. Gursky, Z. Zlatna knjiga ljekovitog bilja. Zagreb: Nakladni zavod Matice Hrvatske; 1978. str. 96-98.
116. Güvenç A, Okada Y, Akkol EK, Duman H, Okuyama T, Çaliş I. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chem.* 2010;118:686-692.
117. Han XH, Hong SS, Hwang JS, Lee MK, Hwang BY, Ro JS. Monoamine oxidase inhibitory components from *Cayratia japonica*. *Arch Pharm Res.* 2007;30:13-17.
118. Han H, Ma Y, Eun JS, Li R, Hong JT, Lee MK, Oh KW. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from *Zizyphi Spinosi Semen*: possible involvement of GABAergic transmission. *Pharmacol Biochem Behav.* 2009;92:206-213.
119. Harley RM, Atkins S, Budantsev AL, Cantino, PD, Conn BJ, Grayer R, Harley MM, de Kok R, Krestovskaja T, Morales R, Paton AJ, Ryding O, Upson T. *Labiatae*. U: Kubitzki K, urednik. The families and genera of vascular plants, Vol. VII. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag; 2004. str. 167-191.
120. Harmandar M, Duru ME, Çakir A, Hirata T, Izumi S. Volatile Constituents of *Stachys obliqua* L. (Lamiaceae) from Turkey. *Flavour Fragr J.* 1997;12:211-213.
121. Harput US, Genc Y, Saracoglu I. Cytotoxic and antioxidative activities of *Plantago lagopus* L. and characterization of its bioactive compounds. *Food Chem Toxicol.* 2012;50:1554-1559.

122. Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G. *In vivo* treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Clin Exp Immunol.* 2007;148:373-381.
123. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Yagita H, Suzuki Y. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* Miq., may be a promising antinephritic agent (3): Effect of acteoside on expression of intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells. *Jpn J Pharmacol.* 1996;70:157-168.
124. Hayek, A. Beitrag zur kenntnis der Flora des albanisch-montenegrinischen Grenzgebietes. *Kaiserl. Akad. Wiss., Wien, Math.-Naturwiss. Kl., Denkschr.* 1918;94:127-210.
125. Háznagy-Radnai E, Czige S, Zupkó I, Falkay G, Máthe I. Comparison of antioxidant activity in enzyme-independent system of six *Stachys* species. *Fitoterapia.* 2006a;77:521-524.
126. Háznagy-Radnai, E., Czige, S., Janicsák, G., Máthé, I. Iridoids of *Stachys* species growing in Hungary. *J Planar Chromatogr - Mod TLC.* 2006b;19:187-190.
127. Háznagy-Radnai E, Czige S, Máthé I. TLC and GC analysis of the essential oils of *Stachys* species growing in Hungary. *J Planar Chromatogr - Mod TLC.* 2007;20:189-196.
128. Háznagy-Radnai E, Réthy B, Czige S, Zupkó I, Wéber E, Martinek T, Falkay G, Máthé I. Cytotoxic activities of *Stachys* species. *Fitoterapia* 2008;79:595-797.
129. Háznagy-Radnai E, Balogh A, Czige S, Máthé I, Hohmann J, Blazsó G. Antiinflammatory activities of Hungarian *Stachys* species and their iridoids. *Phytother Res.* 2011;26:505-509.
130. Hegnauer R. *Chemotaxonomie der pflanzen.* Band 4: Dicotyledoneae: *Daphniphyllaceae-Lythraceae.* Basel: Birkhause Verlag Basel; 1966, str. 334.
131. Heinrich M. *Economic botany of American Labiatae.* U: Harley RM, Reynolds T, urednici. *Advances in Labiatae Science.* Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanic Garden Kew; 1992. str. 475-488.
132. Hennebelle T, Sahpaz S, Gressier B, Joseph H, Bailleul F. Antioxidant and neurosedative properties of polyphenols and iridoids from *Lippia alba*. *Phytother Res.* 2008;22:256-258.
133. *Hilandarski medicinski kodeks, N. 517, Prevod.* Beograd: Narodna biblioteka Srbije; 1989.
134. Holt A, Sharman DF, Baker GB, Palcic MM. A continuous spectrophotometric assay for monoamine oxidase and related enzymes in tissue homogenates. *Anal Biochem.* 1997;244:384-392.
135. Hoppe H. *Drogekunde.* Hamburg, Germany: Gram de Gruyter and Co.; 1958.
136. Ikeda T, Miyase T, Ueno A. Phenylethanoid glycosides from *Stachys riederi*. *Nat Med (Tokyo).* 1994;48:32-38.

137. Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Sacchetti P, Modesti A, Galvano F, Bei R. The effects of dietary flavonoids on the regulation of redox inflammatory networks. *Front Biosci.* 2012;17:2396-2418.
138. Jäger AK, Saaby L. Flavonoids and the CNS. *Molecules.* 2011;16:1471-1485.
139. Janicsák G, Máthé I, Miklóssy-Vári V, Blunden G. Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochem Syst Ecol.* 1999;27:733-738.
140. Javidnia K, Miri R, Azarpira A, Tabaei SMH. Composition of the essential oil of *Stachys setifera* C. A. Mey ssp. *iranica* growing in Iran. *Flavour Fragr J.* 2003;18:299-300.
141. Javidnia K, Miri R, Soltani M, Khorsavi AR. Essential oil composition of two endemic species of *Stachys* L. from Iran. *Chem Nat Comp.* 2008;44:109-110.
142. Javidnia K, Mojab F, Mojahedi SA. Chemical constituents of the essential oil of *Stachys lavandulifolia* Vahl from Iran. *Iran J Pharm Res.* 2004;3:61-63.
143. Jeker M, Sticher O, Calis I, Rüedi P. Allobetonicoside and 6-O-acetylmiosporoside: Two new iridoid glycosides from *Betonica officinalis* L. *Helv Chim Acta* 1989;72:1787-1791.
144. Johnston GAR. GABA_A receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des.* 2005;11:1867-1885.
145. Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol.* 2006;54:285-316.
146. Julião Lde S, Leitão SG, Lotti C, Picinelli AL, Rastrelli L, Fernandes PD, Noël F, Thibaut JP, Leitão GG. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. *Phytochemistry* 2010;71:294-300.
147. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.* 2003;10:813-829.
148. Karakaya S, Kavas A. Antimutagenic activities of some foods. *J Sci Food Agric.* 1999;79:237-242.
149. Karim N, Gavande N, Wellendorph P, Johnston GA, Hanrahan JR, Chebib M. 3-Hydroxy-2'-methoxy-6-methylflavone: a potent anxiolytic with a unique selectivity profile at GABA(A) receptor subtypes. *Biochem Pharmacol.* 2011;82:1971-1983.
150. Karioti A, Bolognesi L, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis of the constituents of aqueous preparations of *Stachys recta* by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53:15-23.
151. Kaya A, Demirci B, Baser KHC. The Composition of the Essential Oil of *Stachys iberica* subsp. *stenostachya* growing in Turkey. *Chem Nat Comp.* 2001;37:326-328.
152. Khanavi M, Hadjiakhoondi A, Amin G, Amanzadeh Y, Rustaiyan A, Shafiee A. Comparison of the volatile composition of *Stachys persica* Gmel. and *Stachys*

- byzantina* C. Koch. oils obtained by hydrodistillation and steam distillation. *Z Naturforsch C*. 2004;59:463-467.
153. Khanavi M, Sharifzadeh M, Hadjiakhoondi A, Shafiee A. Phytochemical investigation and anti-inflammatory activity of aerial parts of *Stachys byzanthina* C. Koch. *J Ethnopharmacol*. 2005;97:463-468.
154. Khanavi M, Hajimahmoodi M, Cheraghi-Niroomand M, Kargar Z, Ajani Y, Hadjiakhoondi A, Oveisi MR. Comparison of the antioxidant activity and total phenolic contents in some *Stachys* species. *Afr J Biotechnol*. 2009;8:1143-1147.
155. Khanavi M, Manayi A, Lotf M, Abbasi R, Majdzadeh M, Ostad SN. Investigation of Cytotoxic Activity in Four *Stachys* Species from Iran. *Iran J Pharm Res*. 2012;11:589-593.
156. Kim H, Song MJ. Analysis and recordings of orally transmitted knowledge about medicinal plants in the southern mountainous region of Korea. *J Ethnopharmacol*. 2011;134:676-696.
157. Kobzar AY. Phytochemical study of *Beonica officinalis*. II. Acids from the epigeal part of *Betonica*. *Chem Nat Comp*. 1986;22:224-225.
158. Kobzar AY, Nikonov GK. Flavonoids from the epigeal part of *Betonica officinalis*. *Chem Nat Comp*. 1986;22:600-601.
159. Koeva, Ī. *Stachys* L. U: Jordanov D, Velčev V, Kuzmanov B, urednici. *Flora na Narodna Republika Bălgarija*, vol. 9. Sofija: Bălgarskata Akademija na Naukite; 1989. str. 388-410.
160. Komissarenko NF, Derkach AI, Sheremet IP, Kovalev IP, Gordienko VG, Pakaln DA. Flavonoids from *Stachys inflata*. *Chem Nat Comp*. 1979;14(4):445-446.
161. Komissarenko NF, Sheremet IP, Derkach AI, Pakaln DA. Stachyflaside from *Stachys inflata* and *St. atherocalyx*. *Chem Nat Comp*. 1976;12:88.
162. Kostyuchenko OI, Komissarenko NF, Kovalev IP, Derkach AI, Gordienko VG. Acetylspectabiflaside from *Stachys atherocalyx*. *Chem Nat Comp*. 1982;18:170-172.
163. Kostyuchenko OI. *Stachys atherocalyx* components. *Farm Zh (Kiev)*. 1972;27:66-67.
164. Kostyuchenko OI. Phenolcarboxylic acids of *Stachys atherocalyx*. *Biofarm Issled Lek Prep*. 1975;80-84.
165. Kotsos M, Aligiannis N, Mitaku S, Skaltsounis A-L, Charvala C. Chemistry of plants from Crete: stachyspinoside, a new flavonoid glycoside and iridoids from *Stachys spinosa*. *Nat Prod Res*. 2001;15:377-386.
166. Kovačević N. *Osnovi farmakognozije*. Beograd: Srpska školska knjiga; 2000.
167. Kucukbay FZ, Ozgul O, Kucukbay H, Akcicek E. Composition of the essential oil of *Stachys bombycina* from Turkey. *Chem Nat Comp*. 2011;46:982-984.
168. Kültür S, Sami SN. Medicinal plants used in Isparih (Razgrad-Bulgaria) district. *Turk J Pharm Sci*. 2009;6:107-124.

169. Kumar D, Bhat ZA, Kumar V, Khan NA, Chashoo IA, Zargar MI, Shah MY. Effects of *Stachys tibetica* essential oil in anxiety. *Eur J Integr Med.* 2012;4:169-176.
170. Küpeli E, Şahin FP, Yeşilada E, Çalış I, Ezer N. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Z Naturforsch C.* 2007a;62:519-525.
171. Küpeli E, Şahin FP, Çalış I, Yeşilada E, Ezer N. Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. *J Ethnopharmacol.* 2007b;112:356-360.
172. Laggoune S, Brouard I, Leon F, Calliste CA, Duroux JL, Bermejo J, Kabouche Z, Kabouche A. Lignans and an abundant flavone glycoside with free-radical scavenging activity from the roots of the endemic species *Stachys mialhesi* de Noe. *Rec Nat. Prod.* 2011a;5:238-241.
173. Laggoune S, Zeghib A, Kabouche A, Kabouche Z, Maklad YA, Leon F, Brouard I, Bermejo J, Calliste CA, Duroux JL. Components and antioxidant, anti-inflammatory, anti-ulcer and antinociceptive activities of the endemic species *Stachys mialhesi* de Noé. *Arab J Chem.* 2011b, in press.
174. Lakhal H, Boudiar T, Kabouche A, Laggoune S, Kabouche Z, Topcu G. Antioxidant activity and flavonoids of *Stachys ocymastrum*. *Chem Nat Comp.* 2011;46:964-965.
175. Lazarević JS, Palić RM, Radulović NS, Ristić NR, Stojanović GS. Chemical composition and screening of the antimicrobial and antioxidative activity of extracts of *Stachys* species. *J Serb Chem Soc.* 2010;75:1347-1359.
176. Lee JC, Lim KT. Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid levels. *Food Sci Biotechnol.* 2000;9:83-88.
177. Lee KJ, Woo ER, Choi CY, Shin DW, Lee DG, You HJ, Jeong HG. Protective Effect of Acteoside on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity. *Life Sci.* 2004;74:1051-1064.
178. Lenherr A. Biosystematische und chemotaxonomische Untersuchungen in der Artengruppe *Stachys recta* L. Doktorska disertacija. Ciriš, Eidgenössische technische Hochschule; 1983.
179. Lenherr A, Meier B, Sticher O. Modern HPLC as a tool for chemotaxonomical investigations: Iridoid glucosides and acetylated flavonoids in the group of *Stachys recta*. *Planta Med.* 1984a;50:403-409.
180. Lenherr A, Lahloub M, Sticher O. Three flavonoid glycosides containing acetylated allose from *Stachys recta*. *Phytochemistry* 1984b;23:2343-2345.
181. Lenherr A, Mabry TJ. Acetylated allose-containing flavonoid glucosides from *Stachys anisochila*. *Phytochemistry* 1987;26:1185-1188.
182. Leporatti ML, Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol.* 2003;87:123-142.

183. Li H, Zhou P, Yang Q, Shen Y, Deng J, Li L, Zhao D. Comparative studies on anxiolytic activities and flavonoid compositions of *Passiflora edulis* 'edulis' and *Passiflora edulis* 'flavicarpa'. *J Ethnopharmacol.* 2011;133:1085-1090.
184. Liang S, Tian JM, Feng Y, Liu XH, Xiong Z, Zhang WD. Flavonoids from *Daphne aurantiaca* and their inhibitory activities against nitric oxide production. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011;59:653-656.
185. Litchfield JT Jr, Wilcoxon F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther.* 1949;96:99-113.
186. Litvinenko VI, Aronova BN. Phenolic compounds of *Betonica foliosa*. *Chem Nat Comp.* 1968;4:270.
187. Loi MC, Poli F, Sacchetti G, Seleno MB, Ballero M. Ethnopharmacology of ogliastra (Villagrande Strisaili, Sardinia, Italy). *Fitoterapia.* 2004;75:277-95.
188. Lovašen-Eberhardt Ž. *Stachys* L. U: Nikolić T, urednik. *Flora Croatica. Index Florae Croaticae 3.* *Natura Croatica.* 2000;9:24-25.
189. Luczaj LJ, Svanberg I, Köhler P. Marsh woundwort, *Stachys palustris* L. (Lamiaceae): an overlooked food plant. *Genet Resour Crop Evol.* 2011;58:783-793.
190. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA, Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem.* 2002;50:5042-5047.
191. Ma C, Wang W, Chen Y-Y, Liu R-N, Wang R-F, Du L-J. Neuroprotective and antioxidant activity of compounds from the aerial parts of *Dioscorea opposita*. *J Nat Prod.* 2005;68:1259-1261.
192. Ma L, Gan D, Wang M, Zhang Z, Jiang C, Zeng X. Optimization of extraction, preliminary characterization and hepatoprotective effects of polysaccharides from *Stachys floridana* Schuttl. ex Benth. *Carbohydr Polym.* 2011;87:1390-1398.
193. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The Systematic Identification of flavonoids.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag; 1970.
194. Macía MJ, García E, Vidaurre PJ. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. *J Ethnopharmacol.* 2005;97:337-350.
195. Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhar Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* on rats. *J Ethnopharmacol.* 2001;75:213-218.
196. Maleki-Dizaji N, Nazemiyeh H, Maddah N, Mehmani F, Garjani A. Screening of extracts and fractions from aerial parts of *Stachys schtschegleevii* Sosn. for anti-inflammatory activities. *Pak J Pharm Sci.* 2008;21:338-343.
197. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2007;25:185-209.

198. Marder M, Estiú G, Blanch LB, Viola H, Wasowski C, Medina JH, Paladini AC. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor complex. *Bioorg Med Chem.* 2001;9:323-335.
199. Marin PD. *Biohemijaska i molekularna sistematika biljaka*. Beograd: NNK Internacional; 2003.
200. Marin PD, Grayer RJ, Grujić-Jovanović S, Kite GC, Veitch NC. Glycosides of tricetin methyl ethers as chemosystematic markers in *Stachys* subgenus *Betonica*. *Phytochemistry* 2004;65:1247-1253.
201. Mariotti JP, Costa J, Bianchini A, Bernardini AF, Casanova J. Composition and Variability of the Essential Oil of *Stachys glutinosa* L. from Corsica (France). *Flavour Fragr J.* 1997;12:205-209.
202. Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Martínez-Laurrabaquio A, López-Rubalcava C, Heinze G. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* 2012;141:908-917.
203. Masoudi S, Jamzad M., Attari L, Rustaiyan A. Volatile constituents of *Stachys pilifera* Benth. and *Stachys acerosa* Boiss. from Iran. *J Essent Oil Res.* 2003;15:189-190.
204. Melek FR, Radwan AS, El-Ansari MA, El-Gindi OD, Hilal SH, Genenah AA. Diterpenes from *Stachys aegyptiaca*. *Fitoterapia* 1992;63:276.
205. Menegazzi M, Di Paola R, Mazzon E, Muià C, Genovese T, Crisafulli C, Suzuki H, Cuzzocrea S. *Hypericum perforatum* attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. *Free Rad Biol Med.* 2006;40:740-753.
206. Meremeti A, Karioti A, Skaltsa H, Heilmann J, Sticher O. Secondary metabolites from *Stachys ionica*. *Biochem Syst Ecol.* 2004;32:139-151.
207. Meshkatsadat MH, Sajjadi E, Amiri H. Chemical constituents of the essential oils of different stages of the growth of *Stachys lavandulifolia* Vahl. from Iran. *Pak J Biol Sci.* 2007;10:2784-2786.
208. Miyase T, Ueno A, Kitani T, Kobayashi H, Kawahara Y, Yamahara J. Studies on *Stachys sieboldii* Miq. I. Isolation and structures of new glycosides. *Yakugaku Zasshi* 1990;110:652-657.
209. Miyase T, Yamamoto R, Ueno A. Phenylethanoid glycosides from *Stachys officinalis*. *Phytochemistry* 1996a;43:475-479.
210. Miyase T, Yamamoto R, Ueno A. Betonicosides A-D and betonicolide, diterpenoids from the roots of *Stachys officinalis*. *Chem Pharm Bull.* 1996b;44:1610-1613.
211. Morikawa T, Pan Y, Ninomiya K, Imura, K, Matsuda H, Yoshikawa M, Yuan D, Muraoka O. Acylated phenylethanoid oligoglycosides with hepatoprotective activity from the desert plant *Cistanche tubulosa*. *Bioorgan Med Chem.* 2010;18:1882-1890.

212. Morteza-Semnani K, Akbarzadeh M, Changizi S. Essential oil composition of *Stachys byzantina*, *S. inflata*, *S. lavandulifolia* and *S. laxa* from Iran. *Flavour Fragr J.* 2006;21:300-303.
213. Murata T, Endo Y, Miyase T, Yoshizaki F. Iridoid glycoside constituents of *Stachys lanata*. *J Nat Prod.* 2008;71:1768-1770.
214. Mustafa B, Hajdari A, Pajazita Q, Syla B, Quave CL, Pieroni A. An ethnobotanical survey of the Gollak region, Kosovo. *Genet Resour Crop Evol.* 2011;59:739-754.
215. Nabavizadeh F, Alizadeh AM, Adeli S, Golestan M, Moloudian H, Kamalinejad M. Gastroprotective effects of *Stachys lavandulifolia* extract on experimental gastric ulcer. *Afr J Pharm Pharmacol.* 2011;5:155-159.
216. Naghibi F, Ghorbani A, Mohammadi Motamed A, Mosaddegh M. Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iran J Pharm Res.* 2005;4:63-79.
217. Naseri MKG, Adibpour N, Namjooyan F, Rezaee S, Shahbazi Z. Spasmolytic effect of *Stachys lavandulifolia* Vahl. crude methanolic extract and fractions on rat ileum. *Iran J Pharm Res.* 2011;10:307-312.
218. Nazemiyeh H, Shoeb M, Movahhedineh N, Kumarasamy Y, Talebpour AH, Delazar A, Nahar L, Sarker SD. Phenolic compounds and their glycosides from *Stachys schtscheglevii* (Lamiaceae). *Biochem Syst Ecol.* 2006;34:721-723.
219. Nazemiyeh H, Maleki N, Mehmani F, Kumarasamy Y, Shoeb M, Garjani A, Sarker SD. Assessment of anti-inflammatory properties of ethyl acetate extract of *Stachys schtscheglevii* Sosn. *DARU.* 2007;15:174-182.
220. Niki E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Rad Biol Med.* 2010;49:503-515.
221. Nishimura H, Sasaki H, Inagaki N, Chin M, Mitsuhashi H. Nine phenethyl alcohol glycosides from *Stachys sieboldii*. *Phytochemistry* 1991;30:965-969.
222. Norouzi-Arasi H, Yavari I, Alibabaeii M. Chemical constituents of the essential oil of *Stachys schtscheglevii* Sosn. *J Essent Oil Res.* 2004;16:231-232.
223. Norouzi-Arasi H, Yavari I, Kia-Rostami V, Jabbari R, Ghasvari-Jahromi M. Volatile constituents of *Stachys inflata* Benth. in Iran. *Flavour Fragr J.* 2006;21:262-264.
224. Ohnishi R, Ito H, Iguchi A, Shinomiya K, Kamei C, Hatano T, Yoshida T. Effects of chlorogenic acid and its metabolites on spontaneous locomotor activity in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006;70:2560-2563.
225. Omidbaigi R, Omidbaigi MA, Bastan MR. The essential oil content and composition of *Stachys inflata* Benth from Iran. *J Ess Oil-Bear Plants* 2006;9:60-64.
226. Orgiyan TM, Popa DP. Diterpenoids from *Stachys annua*. *Chem Nat Comp.* 1969;5:5-6.
227. Orgiyan TM. Structure of the by-product diterpenoids of hedge-nettle betony. *Aktual Probl Izuch Efirnomaslich Rast Efirn Masel.* 1970:160-161.

228. Oyanagui Y, Sato S. Inhibition by nilvadipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as of superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. *Arzneimittelforschung/Drug Res.* 1991;41:469-474.
229. Özçelik B, Kartal M, Orhan I. Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharm Biol.* 2011;49:396-402.
230. Ozkan G, Gokturk RS, Unal O, Celik S. Determination of volatile constituents and total phenolic contents in some endemic *Stachys* taxa from Turkey. *Chem Nat Comp.* 2006;42:172-174.
231. Öztürk M, Emin Duru M, Aydoğmuş-Öztürk F, Harmandar M, Mahlçl M, Kolak U, Ulubelen A. GS-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. *Nat Prod Res.* 2009;4:109-114.
232. Özüdoğru B, Akaydın G, Erik S, Yesilada E. Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2011;137:85-98.
233. Palić R, Lazarević J, Stojanović G. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Stachys milanii* Petrović. *J Essent Oil Res.* 2006;18:290-292.
234. Paternostro KP, Maggio AM, Piozzi F, Servettaz O. Labdane diterpenes from *Stachys plumosa*. *J Nat Prod.* 2000;63:1166-1167.
235. Pauli A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. *Int J Aromather.* 2001;11:126-133.
236. Pedersen JA. Distribution and taxonomic implications of some phenolics in the family *Lamiaceae* determined by ESR spectroscopy. *Biochem Syst Ecol.* 2000;28:229-253.
237. Penido C, Costa KA, Futuro DO, Paiva SR, Kaplan MAC, Figueiredo MR, Henriques MGMO. Anti-inflammatory and anti-ulcerogenic properties of *Stachytarpheta cayennensis* (L.C. Rich) Vahl. *J Ethnopharmacol.* 2006;104:225-233.
238. Petreska J, Stefova M, Ferreres F, Moreno DA, Tomás-Barberán FA, Stefkov G, Kulevanova S, Gil-Izquierdo A. Dietary burden of phenolics per serving of "mountain tea" (Sideritis) from Macedonia and correlation to antioxidant activity. *Nat. Prod. Comm.* 2011;6:1305-1314.
239. Petrović S. Uporedno farmakognoksijsko ispitivanje vrsta roda *Hieracium* L., Asteraceae. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 1999.
240. Petrović SD, Maksimović ZA, Kundaković TD. Analiza sastojaka biljnih droga. Beograd: Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu; 2009.
241. Ph. Eur. 6.0. *European Pharmacopoeia*, 6th edition, Strasbourg: Council of Europe (COE) - European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM); 2007.
242. Ph. Jug. II. Farmakopeja FNRJ, Pharmacopoea Jugoslavica editio secunda. Beograd: Medicinska knjiga; 1951.

243. Ph. Jug. IV. Farmakopeja SFRJ, Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta, Vol. 1. Beograd: Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu; 1984.
244. Ph. Jug. V. Jugoslovenska farmakopeja 2000, Pharmacopoea Jugoslavica 2000, editio quinta, Vol. 3. Beograd: Savezni zavod za zaštitu i unapređenje zdravlja, Savremena administracija; 2001.
245. Pieroni A, Dibra B, Grishaj G, Grishaj I, Gjon Maçai S. Traditional phytotherapy of the Albanians of Lepushe, Northern Albanian Alps. *Fitoterapia* 2005;76:379-399.
246. Pietta P-G. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63:1035-1042.
247. Pintore G, Chessa M, Manconi P, Zanetti S, Deriu A, Tirillini B. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil *Stachys glutinosa* L. from Sardinia. *Nat Prod Commun.* 2006;1:1133-1136.
248. Piozzi F, Savona G, Hanson JR. Kaurenoid diterpenes from *Stachys lanata*. *Phytochemistry* 1980;19:1237-1238.
249. Piozzi F, Paternostro KP, Servettaz O, Arnold NA. Occurrence of (+)-6-desoxyandalusol in *Stachys ionica* and *Stachys distans*. *Biochem Syst Ecol.* 2002;30:887-889.
250. Piozzi F, Bruno M. Diterpenoids in the essential oils from the genus *Stachys*. *Rec Nat Prod.* 2009;3:120-125.
251. Piozzi F, Bruno M. Diterpenoids from roots and aerial parts of the genus *Stachys*. *Rec Nat Prod.* 2011;5:1-11.
252. Pirablouti AG, Koohpyeh A. Wound healing effects of extracts of *Malva sylvestris* and *Stachys lavandulifolia*. *Int J Biol.* 2011;3:174-179.
253. Pisani L, Catto M, Leonetti F, Nicolotti O, Stefanachi A, Campagna F, Carotti A. Targeting monoamine oxidases with multipotent ligands: an emerging strategy in the search of new drugs against neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem.* 2011;18:4568-4587.
254. Polat R, Satil F. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir - Turkey). *J Ethnopharmacol.* 2012;139:626-641.
255. Popa DP, Pasechnik GS. Structure of stachysic acid, a new diterpenoid of the kaurane series. *Chem Nat Comp.* 1974;10:447-451.
256. Pradeep K, Mohan CVR, Gobianand K, Karthikeyan S. Silymarin: An Effective Hepatoprotective Agent Against Diethylnitrosamine-Induced Hepatotoxicity in Rats. *Pharm. Biol.* 2007;45(9):707-714.
257. Pulatova TP. Presence of alkaloids in some plants of the family Labiatae. *Khim Prir Soed* 1969;5:62-63.
258. Rabbani M, Sajjadi SE, Zarei HR. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *J Ethnopharmacol.* 2003;89:271-276.

259. Rabbani M, Sajjadi SE, Jalali A. Hydroalcohol extract and fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. *Phytother Res.* 2005;19:854-858.
260. Radulović N, Lazarević J, Ristić N, Palić R. Chemotaxonomic significance of the volatiles in the genus *Stachys* (Lamiaceae): Essential oil composition of four Balkan *Stachys* species. *Biochem Syst Ecol.* 2007;35:196-208.
261. Radulović N, Denić M, Stojanović-Radić Z. Antimicrobial phenolic abietane diterpene from *Lycopus europaeus* L. (Lamiaceae). *Bioorg Med Chem Lett.* 2010;20:4988-4991.
262. Ramadori G, Saile B. Hepatocytes. U: Dufour J-F, Clavien P-A, urednici. *Signaling Pathways in Liver Diseases*, second edition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005. str. 3-16.
263. Ren L, Chan WM, Wang F, Xu Z, Zhao C, Mat WK, Chai Y, Wong JT, Tsang SY, Xue H. Effects of flavone 6-substitutions on GABAA receptors efficacy. *Eur J Pharmacol.* 2011;670:121-9.
264. Rencuzogullari E, Yildiz AM, Buyukleyla M. The genotoxic and anti-genotoxic effects of *Stachys petrokosmos* leaf extract in human lymphocytes using microsomal fractions. *Cytotechnology.* 2012;64:83-94.
265. Rezazadeh S, Kebryaezadeh A, Pirali-Hamedani M, Shafiee A, Isfahani SG. Anti-inflammatory and analgesic activity of methanolic extracts of aerial parts of *Stachys schtschegleevii* Sosn. and *Stachys balansae* Boiss. and Kotschy ex Boiss in rats. *DARU.* 2005;13:165-169.
266. Rezazadeh S, Pirali Hamedani M, Dowlatabadi R, Yazdani D, Shafiee A. Chemical composition of the essential oils of *Stachys schtschegleevii* Sosn. and *Stachys balansae* Boiss & Kotschy from Iran. *Flavour Fragr J.* 2006;21:290-293.
267. Rezazadeh S, Pirali-Hamedani M, Hadjiakhondi A, Ajani Y, Yarigar-Ravesh M, Shafiee A. Chemical composition of the essential oils of *Stachys atherocalyx* and *S. sylvatica* from Iran. *Chem Nat Comp.* 2009a;45:742-744.
268. Rezazadeh SH, Zaringhalam J, Manaheji H, Kebryaezadeh A. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities of *Stachys athorecalyx* extracts on CFA-induced inflammation. *J Med Plant Res.* 2009b;3:368-376.
269. Ristić N, Lazarević J, Radulović N, Palić R. Antimicrobial activity of the essential oils of selected *Stachys* species. *Chem Nat Comp.* 2008;44:522-525.
270. Rodríguez-Lyon ML, Díaz-Lanza AM, Bernabé M, Villaescusa-Castillo L. Flavone glycosides containing acetylated sugars from *Sideritis hyssopifolia*. *Magn Reson Chem.* 2000;38:684-687.
271. Rohlena J. *Conspectus Florae Montenegrinae.* *Preslia* 1942;20-21:1-506.
272. Ross SA, Zinchenko TV. Phenolic compounds of *Stachys palustris*. *Farm Zh (Kiev).* 1975;30:91-92.
273. Rowlett JK, Cook JM, Duke AN, Platt DM. Selective antagonism of GABA_A receptor subtypes: an in vivo approach to exploring the therapeutic and side effects of benzodiazepine-type drugs. *CNS Spectr.* 2005;10:40-8.

274. Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brunig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature* 1999;401:796–800.
275. Rudolph U, Möhler H. GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6:18-23.
276. Rustaiyan A, Masoudi S, Ameri N, Samiee K, Monfared A. Volatile constituents of *Ballota aucheri* Boiss., *Stachys benthamiana* Boiss. and *Petrovskia abrotanoides* Karel. Growing wild in Iran. *J Essent Oil Res.* 2006;18:218-221.
277. Sadakane C, Hattori T, Koseki J, Inagaki Y, Hasegawa Y, Shindo S, Takeda S, Takeda H. TJN-259 improves mesangial lesions in experimental immunoglobulin A nephropathy in ddY mice. *Biol Pharm Bull.* 2009;32:1728-33.
278. Sadhu SK, Okuyama E, Fujimoto H, Ishibashi M. Separation of *Leucas aspera*, a medicinal plant of Bangladesh, guided by prostaglandin inhibitory and antioxidant activities. *Chem Pharm Bull.* 2003;51:595-598.
279. Sadik CD, Sies H, Schewe T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. *Biochem Pharmacol.* 2003;65:773-781.
280. Saeedi, M., Morteza-Semnani, K., Mahdavi, M., Rahimi, F. Antimicrobial studies on extracts of four species of *Stachys*. *Ind J Pharm Sci.* 2008;70:403-406.
281. Sahpaz S, Garbacki N, Tits M, Bailleul F. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. *J Ethnopharmacol.* 2002;79:389-392.
282. Sajjadi SE, Mehregan I. Composition of the Essential Oil of *Stachys laxa* Boiss. & Buhse. *Iran J Pharm Res.* 2003;2:57-58.
283. Sala A, Recio MC, Schinella GR, Mániz S, Giner RM, Cerdá-Nicolás M, Ríos JL. Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *Eur J Pharmacol.* 2003;461:53-61.
284. Salehi P, Sonboli A, Asghari B. Chemical composition of the essential oil of *Stachys acerosa* and its antibacterial and antioxidant activities. *Chem Nat Comp.* 2007;43:339-341.
285. Salmaki Y, Zarre S, Lindqvist C, Heubl G, Bräuchler C. Comparative leaf anatomy of *Stachys* (Lamiaceae: Lamioideae) in Iran with a discussion on its subgeneric classification. *Plant Syst Evol.* 2011;294:109-25.
286. Saracoglu I, Varel M, Harput US, Nagatsu A. Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Phytochemistry* 2004;65:2379-2385.
287. Savić MM, Milinković MM, Rallapalli S, Clayton T, Joksimović S, Van Linn M, Cook JM. The differential role of alpha₁- and alpha₅-containing GABA_A receptors in mediating diazepam effects on spontaneous locomotor activity and water-maze learning and memory in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2009;12:1179-1193.
288. Schauenberg P, Paris F. *Guide des plantes Medicinales.* Neuchatel, Switzerland: Delachaux & Niestle S.A.; 1969.

289. Schulze E, Trier G. Stachydrine and some other bases contained in the bulbs of stachys and in orange leaves. *Z Physiol Chem.* 1911;67:59-96.
290. Sefidkon F, Naderi Nik A, Bagaii P, Javidtash I. Analysis of the essential oil of *Stachys ixoides* Boiss & Hausskn. ex Boiss. from Iran. *Flavour Fragr J.* 2003;18:301-302.
291. Sefidkon F, Shaabani A. The essential oil of *Stachys pilifera* Benth. from Iran. *J Essent Oil Res.* 2004;16:229-230.
292. Senatore F, Formisano C, Rigano C, Piozzi F, Rosselli S. Chemical composition of the essential oil from aerial parts of *Stachys palustris* L. (Lamiaceae) growing wild in Southern Italy. *Croatica Chem Acta* 2007;80:135-139.
293. Şerbetçi T, Demirci B, Güzel CB, Kültür S, Ergüven M, Başer KH. Essential oil composition, antimicrobial and cytotoxic activities of two endemic *Stachys cretica* subspecies (Lamiaceae) from Turkey. *Nat Prod Commun.* 2010;5:1369-1374.
294. Serrilli AM, Ramunno A, Piccioni F, Serafini M, Ballero M. Flavonoids and iridoids from *Stachys corsica*. *Nat Prod Res.* 2005;19:561-565.
295. Serrilli AM, Ramunno A, Piccioni F, Serafini M, Ballero M, Bianco A. Monoterpenoids from *Stachys glutinosa* L. *Nat Prod Res.* 2006;20:648-652.
296. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol.* 2009;9:1042-1048.
297. Sharaf M. Isoscutellarein 8-*O*-(6''-*trans-p*-coumaroyl)- β -D-glucoside from *Stachys aegyptiaca*. *Fitoterapia* 1998;69:355-357.
298. Sharifzadeh M, Sharifzadeh K, Khanavi M, Hadjiakhoondi A, Shafiee A. Anti-inflammatory activities of methanolic extracts of *Stachys persica* and *Stachys setifera* on rats and mice. *Int J Pharmacol.* 2005;1:132-137.
299. Sheremet IP, Komissarenko NF. Stachyflaside - a flavone glycoside of *Stachys annua*. *Chem Nat Comp.* 1971a;7:700-701.
300. Sheremet IP, Komissarenko NF. Stachannoaciside from *Stachys annua*. *Chem Nat Comp.* 1971b;7:829.
301. Sheremet IP, Komissarenko NF. Flavonoids of *Stachys annua*. *Chem Nat Comp.* 1972;8:615-616.
302. Shin T-Y. *Stachys riederi* inhibits mast cell-mediated acute and chronic allergic reactions. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2004;26:621-630.
303. Simonović D. Botanički rečnik, imena biljaka. Beograd: Naučno delo; 1959.
304. Skaltsa H, Lazari DM, Chinou IB, Loukis AE. Composition and antibacterial activity of the essential oils of *Stachys candida* and *S. chrysantha* from Southern Greece. *Planta Med.* 1999;65:255-256.
305. Skaltsa H, Bermejo P, Lazari D, Silvan AM, Skaltsounis AL, Sanz A, Abad MJ. Inhibition of prostaglandin E₂ and leukotriene C₄ in mouse peritoneal

- macrophages and thromboxane B₂ production in human platelets by flavonoids from *Stachys chrysantha* and *Stachys candida*. Biol Pharm Bull. 2000;23:47-53.
306. Skaltsa HD, Mavrommati A, Constantinidis T. Chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. Swainsonianae (Labiatae). Phytochemistry 2001;57:235-244.
307. Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D, Soković M. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. Phytochemistry 2003;64:743-752.
308. Skaltsa H, Georgakopoulos P, Lazari D, Karioti A, Heilmann J, Sticher O, Constantinidis Th. Flavonoids as chemotaxonomic markers in the polymorphic *Stachys swainsonii* (Lamiaceae). Biochem Syst Ecol. 2007;35:317-320.
309. Sonboli A, Salehi P, Nejad Ebrahimi S. Essential oil composition and antimicrobial activity of the leaves of *Stachys schtschegleevii* from Iran. Chem Nat Comp. 2005;41:171-174.
310. Stafford GI, Pedersen ME, van Staden J, Jäger AK. Review on plants with CNS-effects used in traditional South African medicine against mental diseases. J Ethnopharmacol. 2008;119:513-37.
311. Stamatis G, Kyriazopoulos P, Golegou S, Basayiannis A, Skaltsas S, Skaltsa H. In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of Greek herbal medicines. J Ethnopharmacol. 2003;88:175-179.
312. Šarić-Kundalić B, Dobes C, Klätte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. J Ethnopharmacol. 2010;131:33-55.
313. Takeda Y, Fujita T, Satoh T, Kakegawa H. On the glycosidic constituents of *Stachys sieboldi* Miq. and their effects on hyaluronidase activity. Yakugaku Zasshi 1985;105:955-959.
314. Tatli II, Akdemir ZS, Yesilada E, Küpeli E. Anti-inflammatory and antinociceptive potential of major phenolics from *Verbascum salviifolium* Boiss. Z Naturforsch C. 2008;63:196-202.
315. Tepe B, Degerli S, Arslan S, Malatyali E, Sarikurkcü C. Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. Fitoterapia 2011;82:237-246.
316. Thoms H. The handbook of Pharmacy, Vol. 5, 2nd half. Berlin: Urban & Swarzenberg; 1931.
317. Tkachev VV, Nikonov GK, Atovmyan LO, Kobzar AY, Zinchenko TV. Chemical and X-ray investigation of the new diterpene lactone betolide. Chem Nat Comp. 1987;23:672-678.
318. Tomás-Barberán FA, Gil MI. Chemistry and natural distribution of flavonoids in the Labiatae. U: Harley RM, Reynolds T, urednici. *Advanced in Labiatae science*. Richmond, Surrey, UK: The Royal Botanic Garden Kew; 1992. str. 299-305.

319. Tomás-Barberán FA, Grayer-Barkmeijer RJ, Gil MI, Harborne JB. Distribution of 6-hydroxy-, 6-methoxy- and 8-hydroxyflavone glycosides in the Labiatae, the Scrophulariaceae and related families. *Phytochemistry* 1988;27:2631-2645.
320. Tomić M, Tovilović G, Butorović B, Krstić D, Janković T, Aljancić I, Menković N. Neuropharmacological evaluation of diethylether extract and xanthones of *Gentiana kochiana*. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005;81:535-542.
321. Tosun F, Akyüz Kızılay Ç, Şener B, Vural M, Palittapongarnpim P. Antimycobacterial screening of some Turkish plants. *J Ethnopharmacol.* 2004;95:273-275.
322. Tucakov J. Lečenje biljem. Beograd: Rad; 1971.
323. Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor-alpha production. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004;68:119-25.
324. Uncini Manganelli RE, Camangi F, Tomei PE. Curing animals with plants: traditional usage in Tuscany (Italy). *J Ethnopharmacol.* 2001;78:171-91.
325. Ünsal Ç, Vural H, Sariyar G, Özbek B, Ötük. Traditional medicine in Bilecik province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. *Turk J Pharm.* 2010;7:139-150.
326. Uriarte-Pueyo I, Calvo MI. Structure-activity relationships of acetylated flavone glycosides from *Galeopsis ladanum* L. (Lamiaceae). *Food Chem.* 2010;20:679-683.
327. Urzúa A, Rezende MC, Mascayano C, Vásquez L. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules* 2008;13:882-891.
328. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998;46:4113-4117.
329. Vestri-Alvarenga SA, Gastmans JP, do Vale Rodrigues G, Moreno PRH, de Paulo Emerenciano V. A computer-assisted approach for chemotaxonomic studies – diterpenes in Lamiaceae. *Phytochemistry* 2001;56:583-595.
330. Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol.* 2003;89:221-244.
331. Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ. Anti-inflammatory and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glucoside, a novel plant flavonoid. *J Pharm Pharmacol.* 1984;36:820-823.
332. Villar A, Gascó MA, Alcaraz MJ, Máñez S, Cortes D. Hypolaetin-8-O-glucoside, an anti-inflammatory flavonoid from *Sideritis mugronensis*. *Planta Med.* 1985;51:70.
333. Viola H, Wasowski C, Levi de Stein M, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Paladini AC. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* 1995;61:213-216.

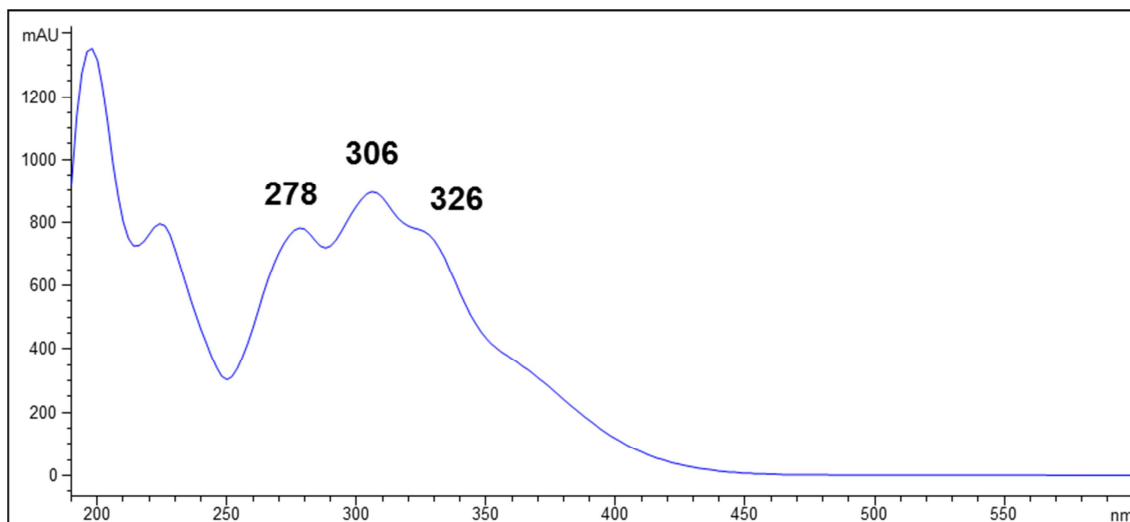
334. Wagner H, Bladt S. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas, 2nd ed. Berlin-Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1996.
335. Wang H, Helliwell K. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. *Food Res Int.* 2001;34:223-227.
336. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33:105-136.
337. Weinreb O, Mandel S, Bar-Am O, Yogev-Falach M, Avramovich-Tirosh Y, Amit T, Youdim MB. Multifunctional neuroprotective derivatives of rasagiline as anti-Alzheimer's disease drugs. *Neurotherapeutics.* 2009;6:163-174.
338. Willfort R. Ljekovito bilje i njegova upotreba. Zagreb: Izdavačko knjižarsko preduzeće „Mladost“; 1978. str. 97-98.
339. Wollenweber E, Jay M. Flavones and flavonols. U: Harborne JB, urednik. *The Flavonoids, Advances in Research since 1980.* London, UK: Chapman & Hall; 1988. str. 233-302.
340. Xiao D, Kuroyanagi M, Itani T, Matsuura H, Udayama M, Murakami M, Umehara K, Kawahara N. Studies on constituents from *Chamaecyparis pisifera* and antibacterial activity of diterpenes. *Chem Pharm Bull.* 2001;49:1479-1481.
341. Xiong Q, Hase K, Tezuka Y, Namba T, Kadota S. Acteoside inhibits apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury. *Life Sci.* 1999; 65:421-430.
342. Xu Y, Chen J, Yu X, Tao W, Jiang F, Yin Z, Liu C. Protective effects of chlorogenic acid on acute hepatotoxicity induced by lipopolysaccharide in mice. *Inflamm Res.* 2010;59:871-877.
343. Yamahara J, Kitani T, Kobayashi H, Kawahara Y. Studies on *Stachys sieboldii* Miq. II. Antianoxic activity and active constituents. *Yakugaku Zasshi* 1990;110:932-935.
344. Yang H, Protiva P, Cui B, Ma C, Baggett S, Hequet V, Mori S, Weinstein IB, Kennelly EJ. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* ("Cupuaçu"). *J Nat Prod.* 2003;66:1501-1504.
345. Yeşil Y, Akalin E. Folk medicinal plants in Kürecik area (Akçadağ/Malatya-Turkey). *Turk J Pharm Sci.* 2009;6:207-220.
346. 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;82:741-751.
347. Yu PH, Hertz L. Differential expression of type A and type B monoamine oxidase of mouse astrocytes in primary cultures. *J Neurochem.* 1982;39:1492-1495.
348. Yun N, Kang JW, Lee SM. Protective effects of chlorogenic acid against ischemia/reperfusion injury in rat liver: molecular evidence of its antioxidant and anti-inflammatory properties. *J Nutr Biochem.* 2012;23(10):1249-1255.

349. Zhang ZJ. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. *Life Sci.* 2004;75:1659-1699.
350. Zheng YN, Zhang J, Han LK, Sekiya K, Kimura Y, Okuda H. Effects of compounds in leaves of *Salix matsudana* on arachidonic acid metabolism. *Yakugaku Zasshi* 2005;125:1005-1008.
351. Zinchenko TV. Flavonoids of *Stachys neglecta*. *Farm Zh (Kiev)*. 1969;24:78-79.
352. Zinchenko TV, Voitenko GN, Lipkan GN. Anti-inflammatory, antitoxic, and hypoazotemic effect of a *Stachys recta* preparation, stachyrene. *Farmakol Toksikol.* 1981;44:191-194.

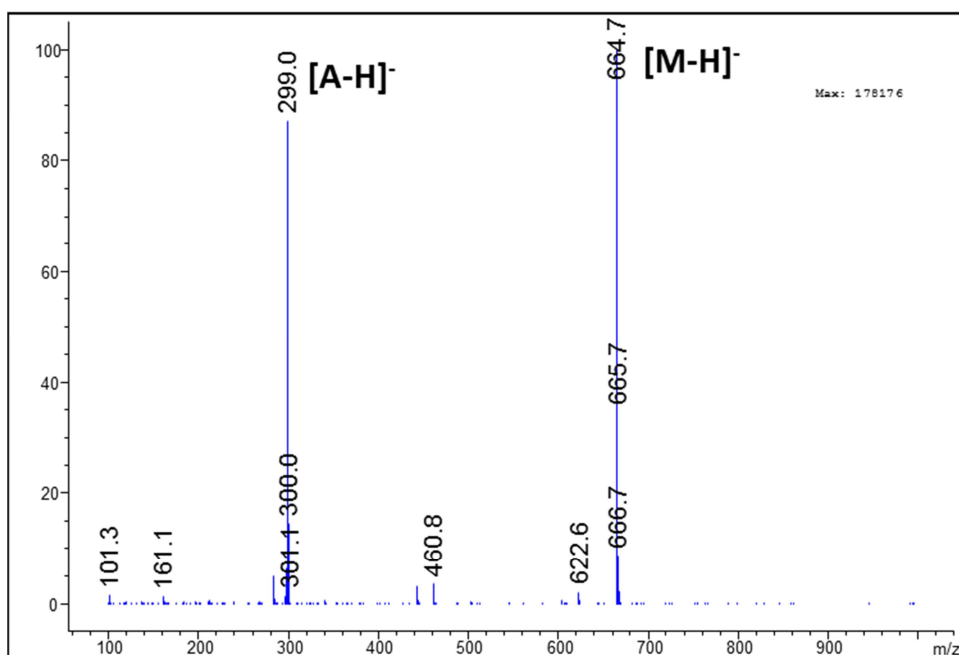
Prilog

**UV, MS i NMR spektri jedinjenja 1-3 izolovanih iz ekstrakta herbe
S. alpina subsp. *dinarica***

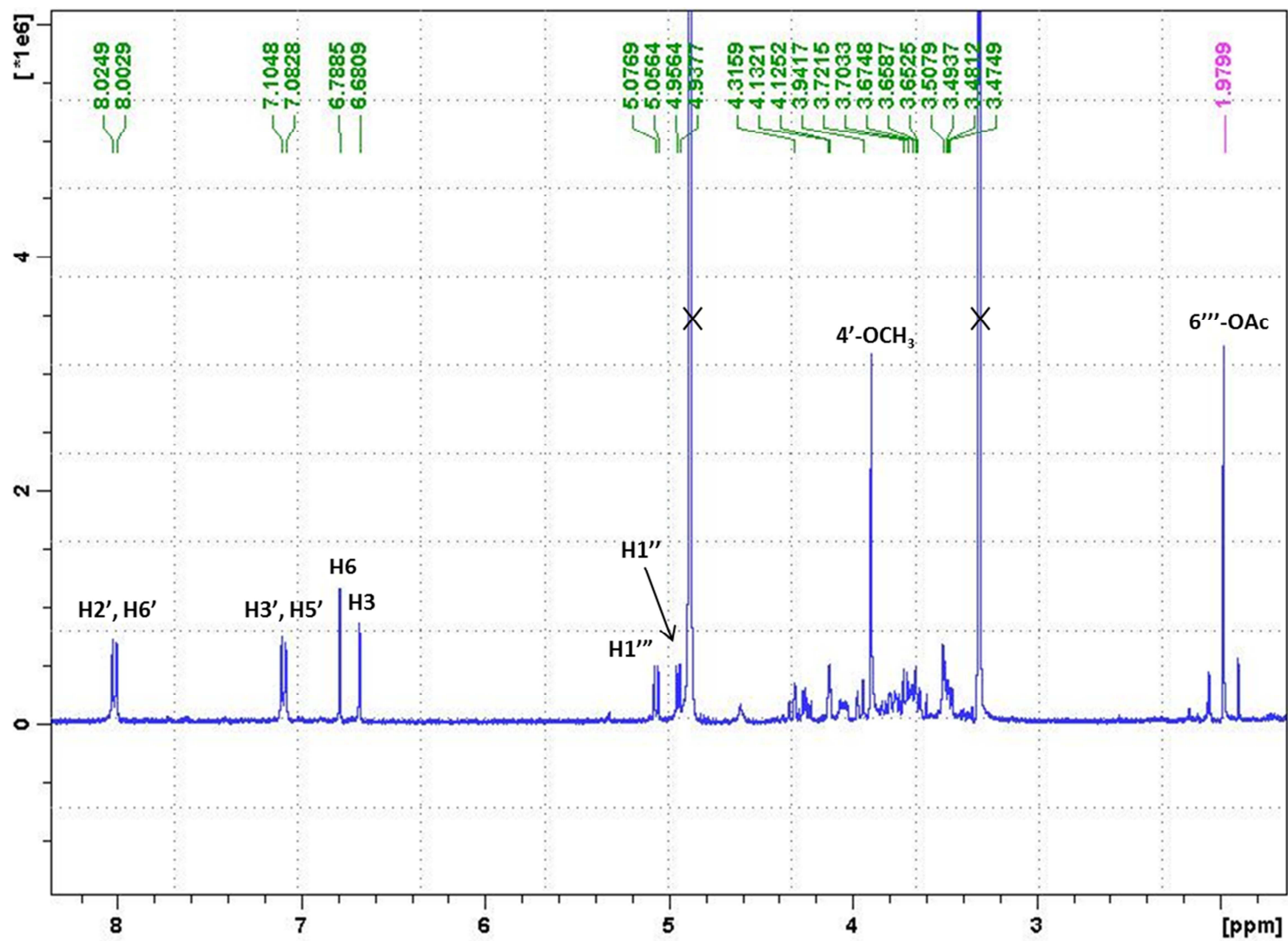
Jedinjenje **1** - 4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

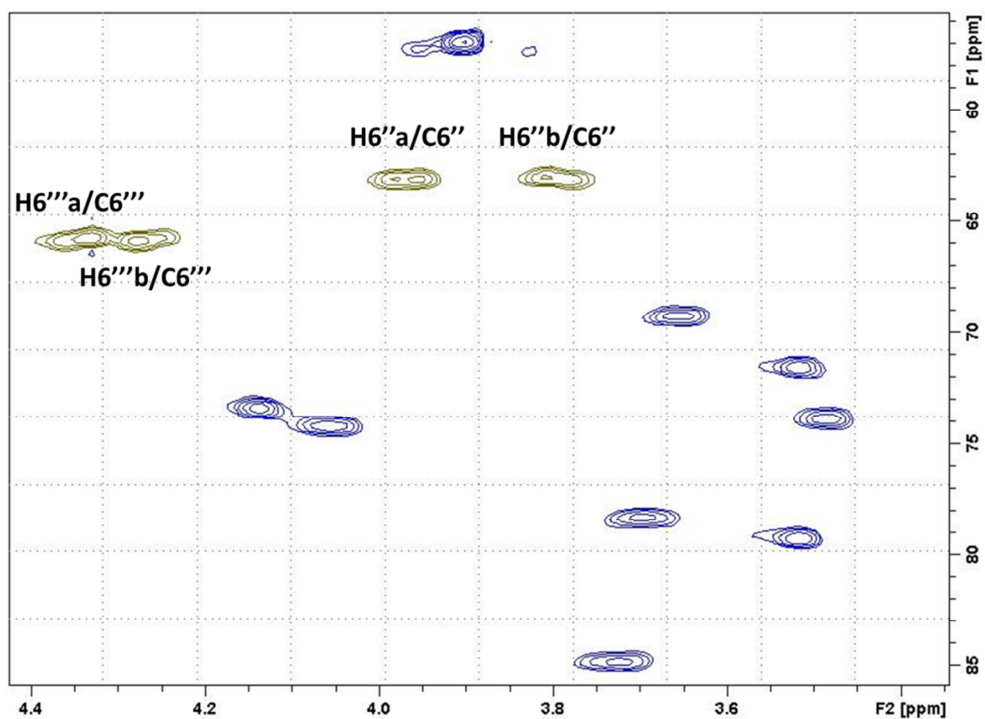


Slika 1. UV spektar jedinjenja **1** (u metanolu)

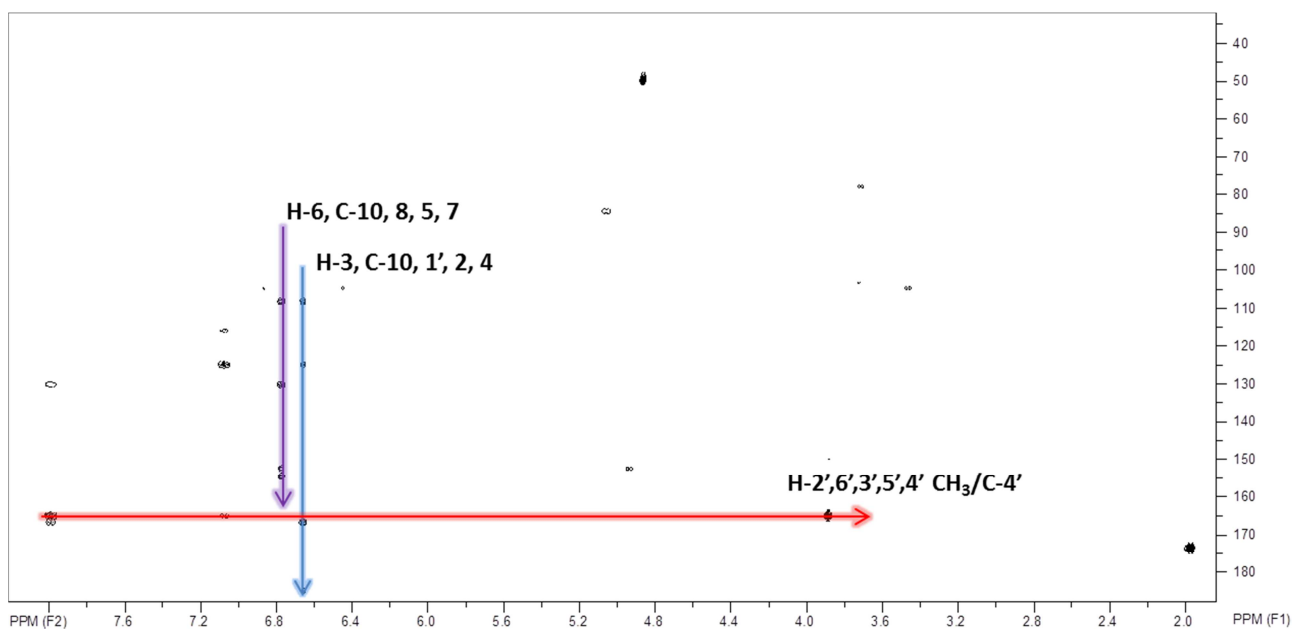


Slika 2. Maseni spektar jedinjenja **1**

Slika 3. ¹H NMR (400 MHz) spektar jedinjenja **1** u CD₃OD

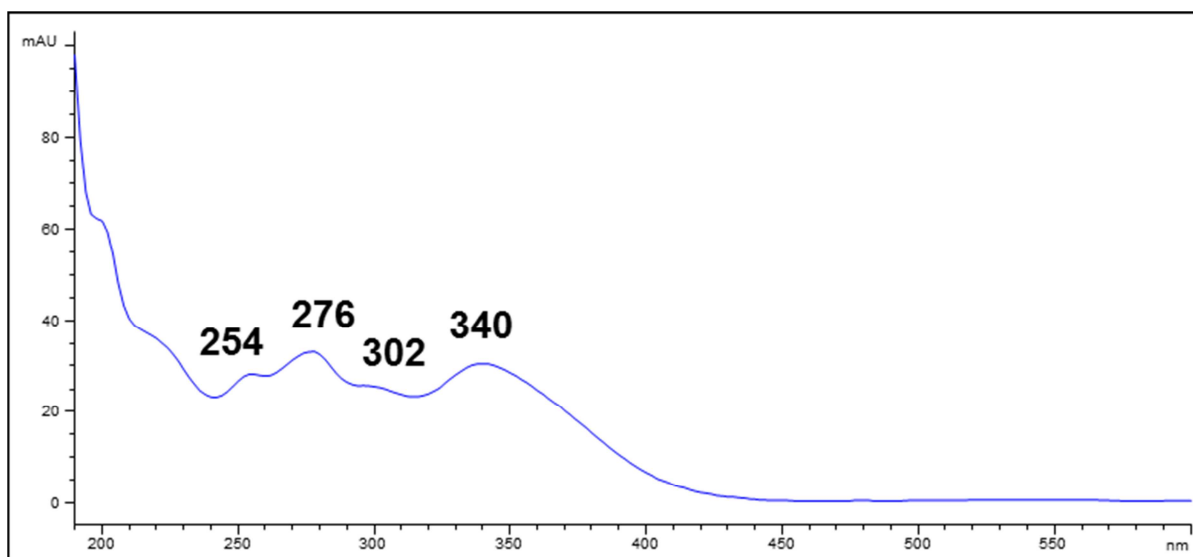


Slika 4. Detalj HSQC spektra jedinjenja 1

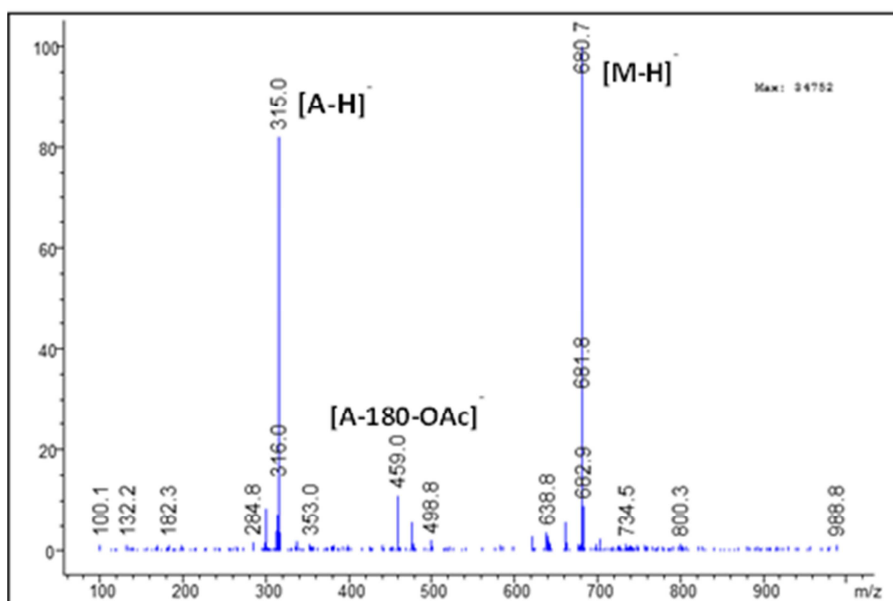


Slika 5. HMBC spektar jedinjenja 1

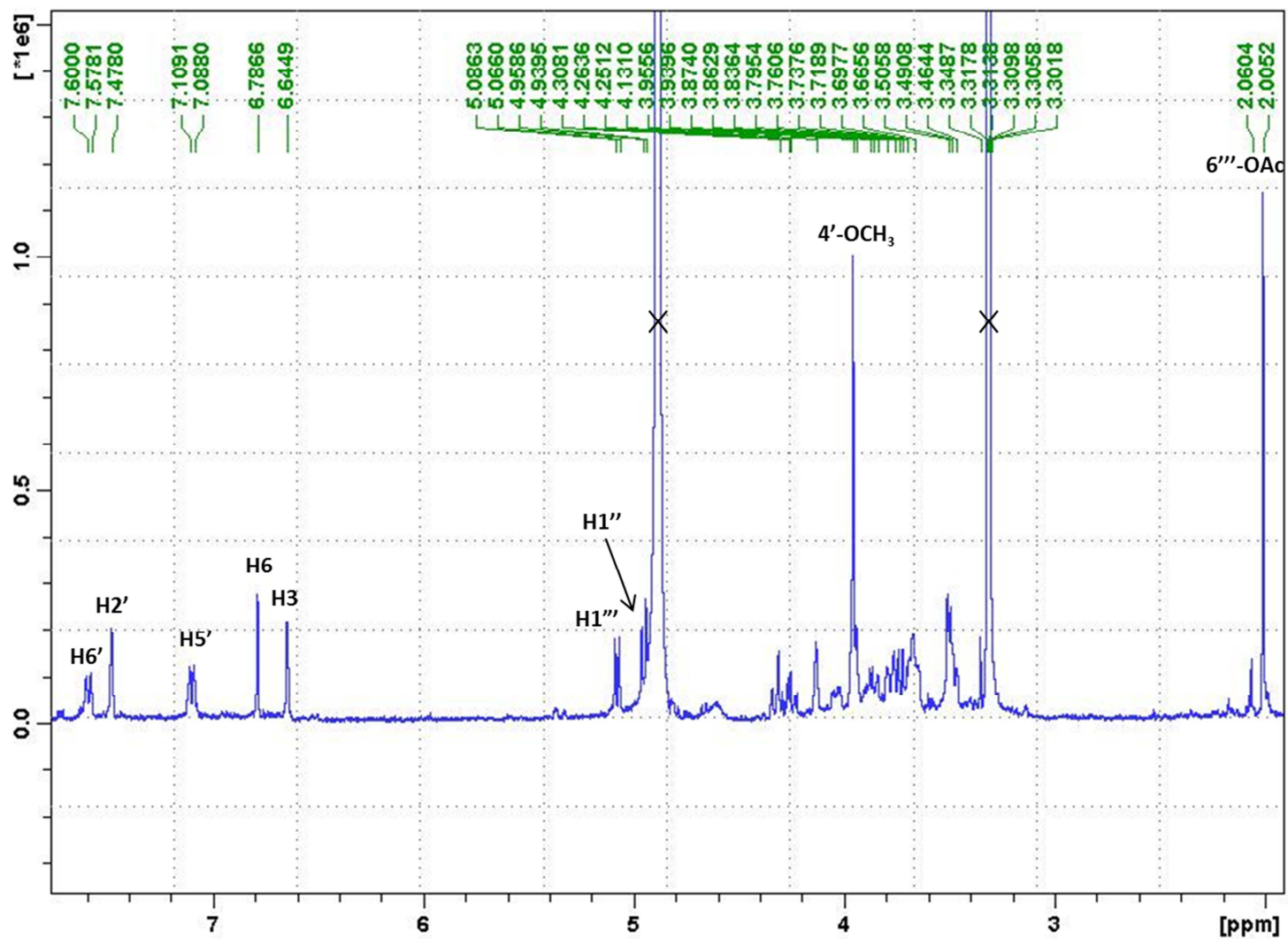
Jedinjenje 2 - 3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein 7-O-[6'''-acetyl- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

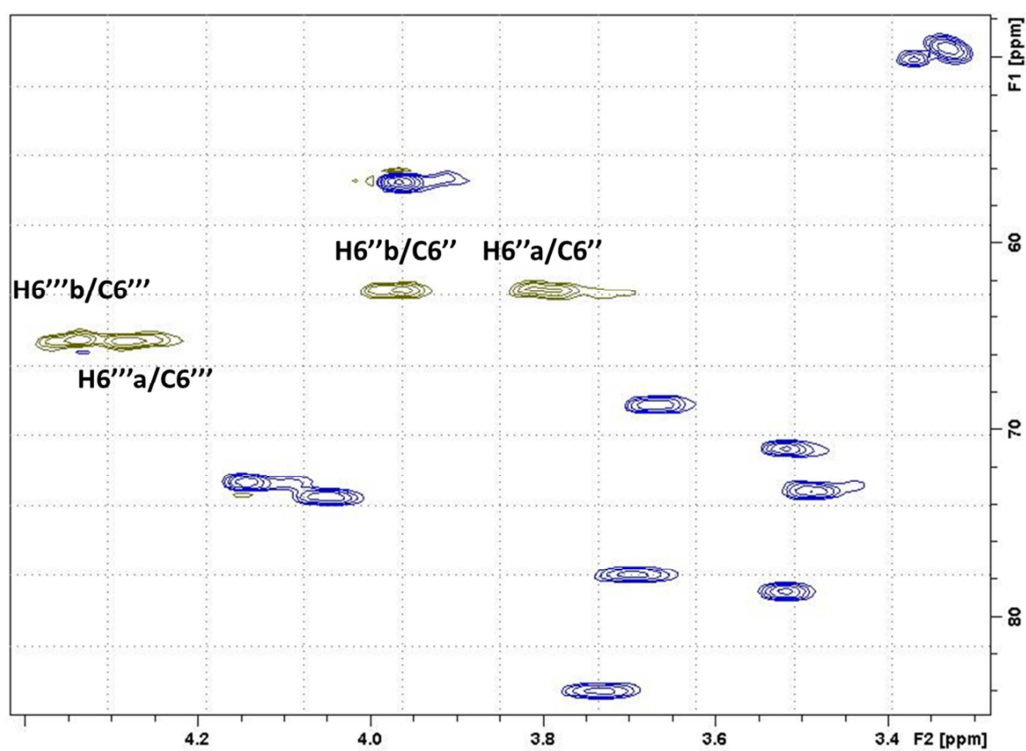


Slika 6. UV spektar jedinjenja 2 (u metanolu)

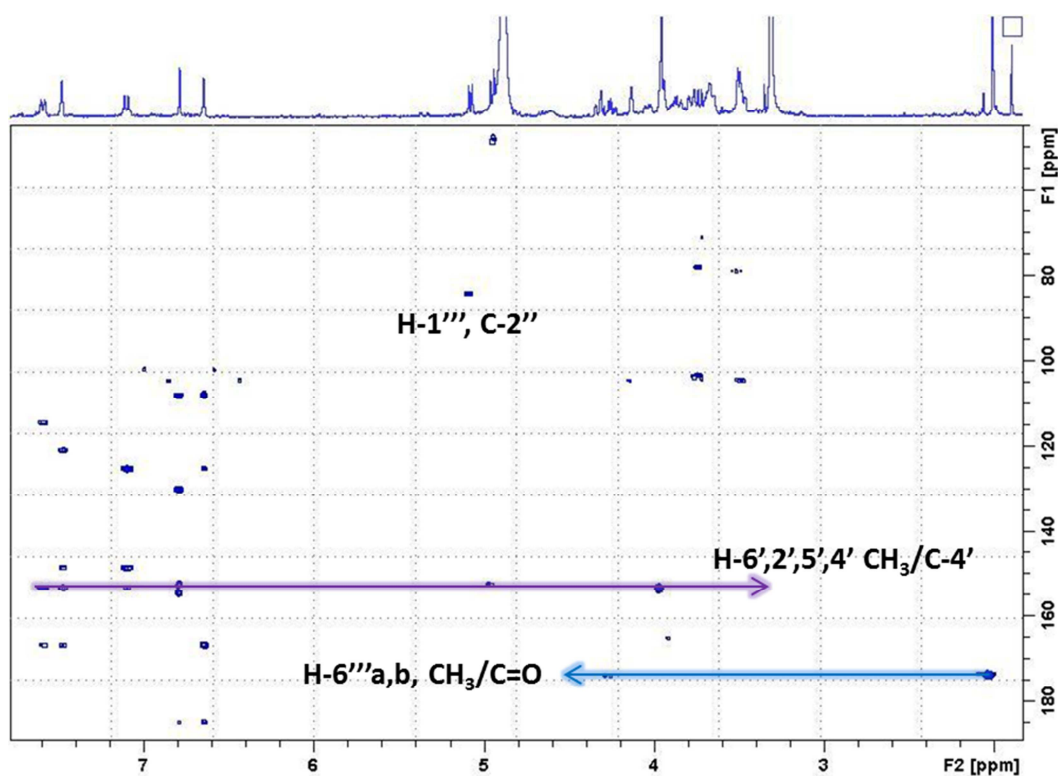


Slika 7. Maseni spektar jedinjenja 2

Slika 8. ¹H NMR (400 MHz) spektar jedinjenja 2 u CD₃OD

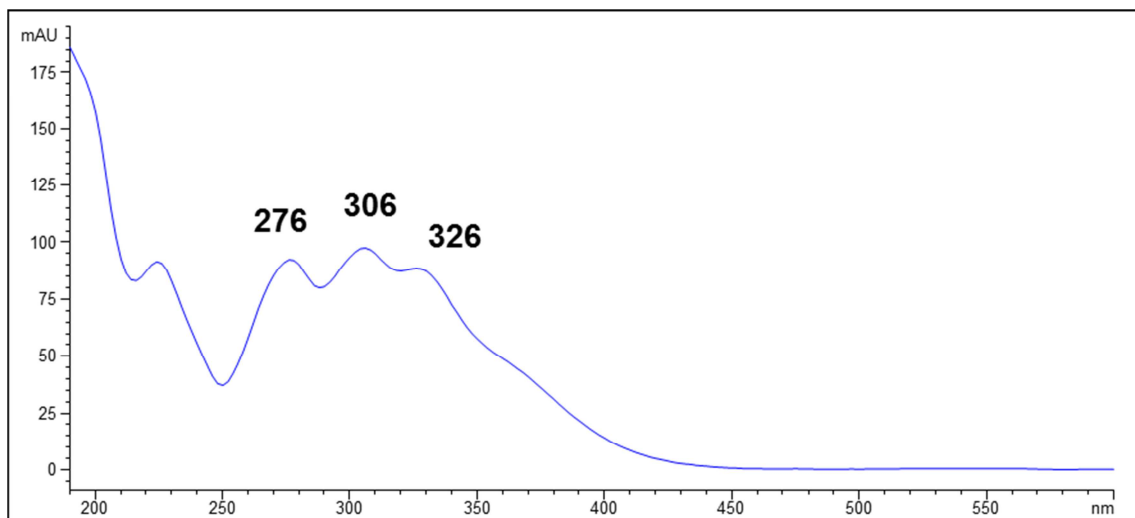


Slika 9. Detalj HSQC spektra jedinjenja 2

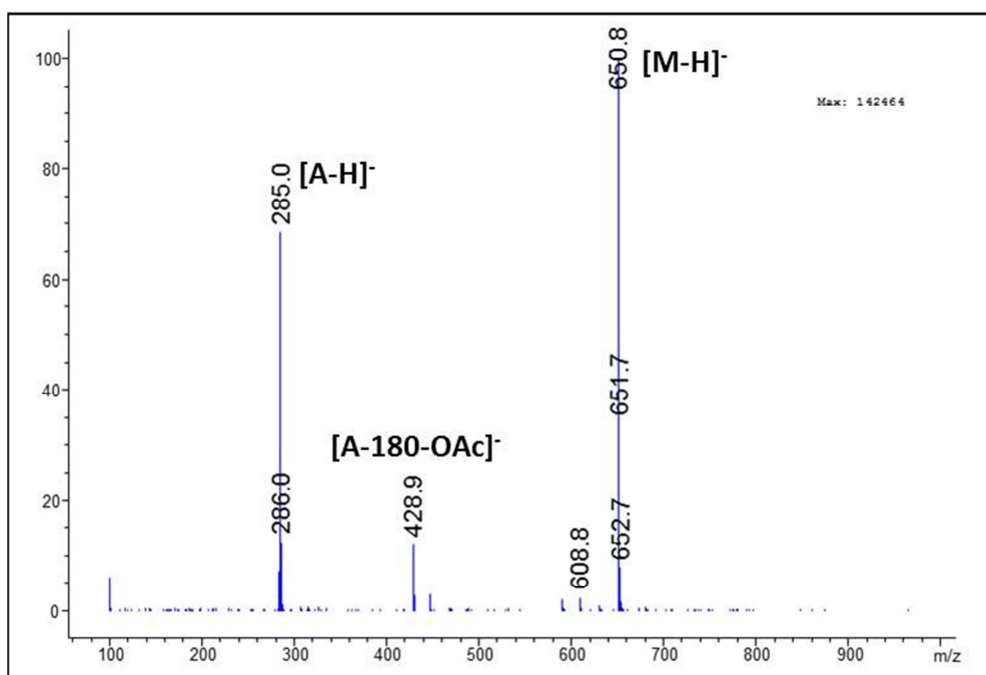


Slika 10. Detalj HMBC spektra jedinjenja 2

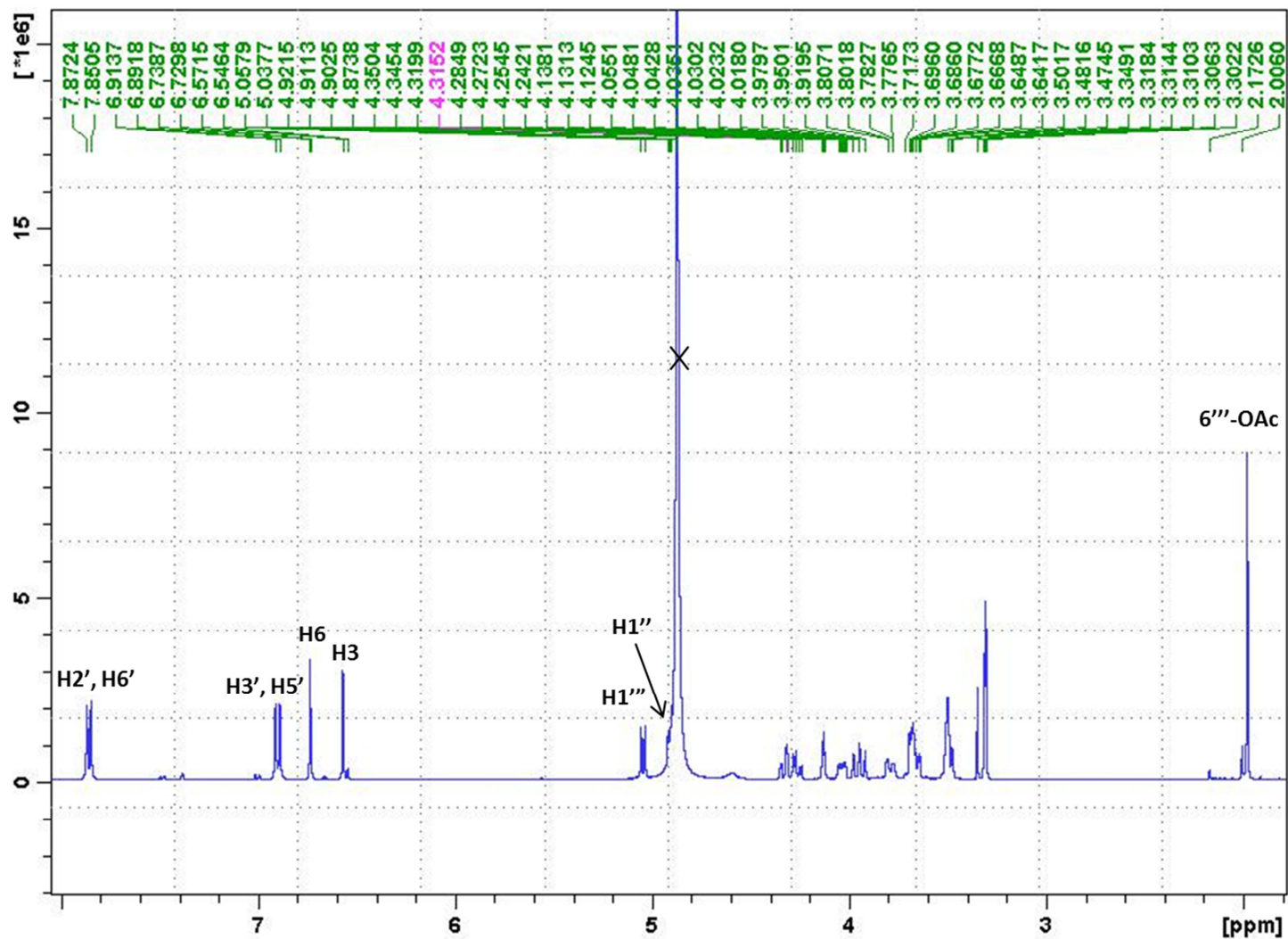
Jedinjenje **3** - izoskutelarein 7-O-[6'''-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozid

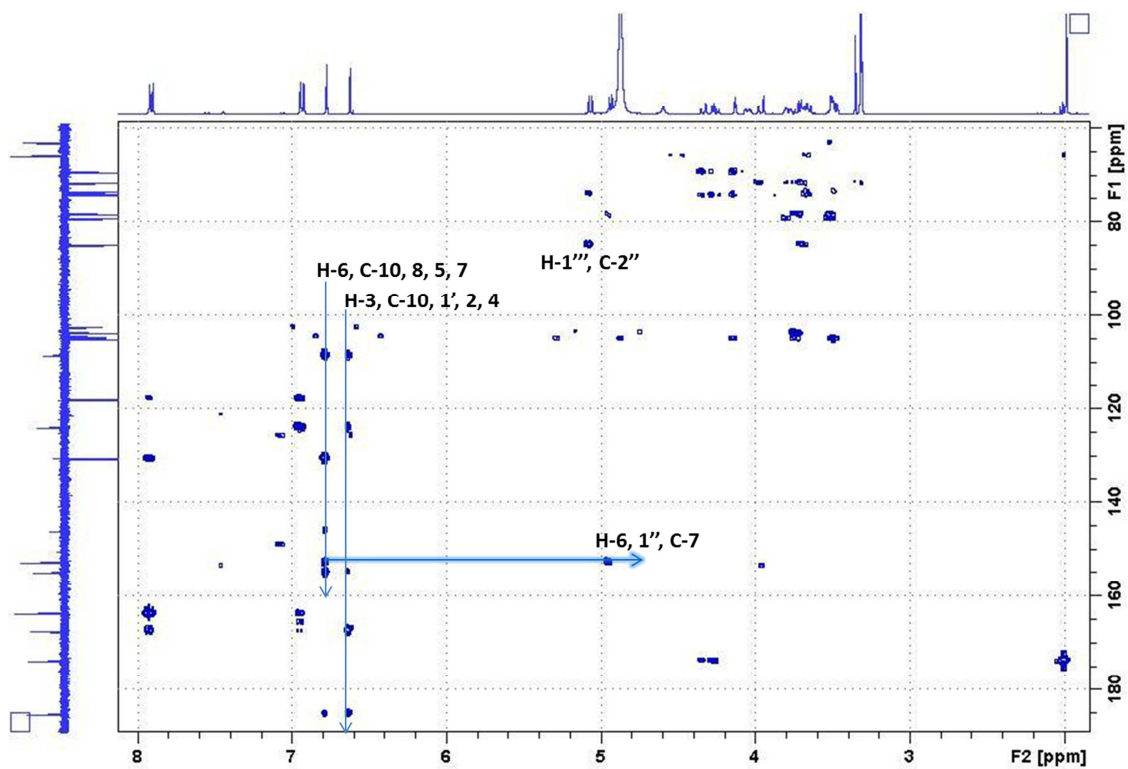


Slika 11. UV spektar jedinjenja **3** (u metanolu)



Slika 12. Maseni spektar jedinjenja **3**

Slika 13. ^1H NMR (400 MHz) spektar jedinjenja 3 u CD_3OD



Slika 14. HMBC spektar jedinjenja 3

Objavljeni i saopšteni rezultati koji čine deo doktorske disertacije

Spisak radova publikovanih u međunarodnim časopisima:

1. Petrović S, Ristić M, Milenković M, **Kukić J**, Antić-Stanković J, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys plumosa* Griseb. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 250-252, 2006.
2. **Kukić J**, Petrović S, Pavlović M, Couladis O, Tzakou O, Niketić M. Composition of essential oil of *Stachys alpina* L. ssp. *dinarica* Murb. *Flavour and Fragrance Journal*, 21: 539-542, 2006.
3. **Kukić J**, Petrović S, Niketić M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 725-729, 2006.
4. **Kukić J**, Dobrić S, Petrović S. Influence of some *Stachys* taxa on carrageenan-induced paw edema in rats. *Pharmaceutical Biology*, 45(7): 560-563, 2007.
5. Savić MM, **Kukić JM**, Grayer RJ, Milinković MM, Marin PD, Divljaković J, Van Linn M, Cook JM, Petrović SD. Behavioral characterization of four endemic *Stachys* taxa. *Phytotherapy Research*, 24(9): 1309-1316, 2010.
6. **Kukić-Marković J**, Dobrić S, Jačević V, Topić A, Petrović S, Marin P. Influence of selected *Stachys* extracts on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *Digest journal of nanomaterials and biostructures*, 6(3):1035-1041, 2011.

Radovi saopšteni na skupovima međunarodnog značaja štampani u izvodima:

1. Petrović S, Ristić M, **Kukić J**, Milenković M, Antić-Stanković J, Niketić M. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys plumosa* Griseb. 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Kiel, Germany, 31.8.-4.9. 2003. Book of Abstracts, pp. 116, P 067.
 2. Petrović S, **Kukić J**, Maksimović Z, Niketić M. Antioxidant activity of *Stachys beckeana* Dörfler & Hayek. 51st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Kiel, Germany, 31.8.-4.9. 2003. Book of Abstracts, pp. 161, P 157.
 3. Tovilović G, Butorović B, **Kukić J**, Petrović S, Tomić M. Interaction of extracts of three *Stachys* species with rat liver MAO systems. 3rd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeast European Countries, Nitra, Slovakia, 5-8 September, 2004. Book of Abstracts, pp. 91, P 090.
 4. **Kukić J**, Petrović S, Niketić M. Investigation of antioxidant activity of *Stachys anisochila* Vis. Et Pančić (Labiatae). IX OPTIMA Meeting, Belgrade, Serbia and Montenegro, 5-11 September, 2004. Book of Abstracts, pp. 140, P-67 (PS-2).
 5. **Kukić J**, Petrović S, Niketić M. Radical scavenging activity of two endemic *Stachys* species: *S. plumosa* Griseb. and *S. beckeana* Dörfler & Hayek. IX OPTIMA Meeting, Belgrade, Serbia and Montenegro, 5-11 September, 2004. Book of Abstracts, pp. 142, P-73 (PS-2).
 6. **Kukić J**, Petrović S, Tovilović G, Tomić M, Niketić M. Investigation on Antioxidant properties and Inhibition of MAO Activity of *Stachys alpina* L. subsp.
-

-
- dinarica* Murb. 53st Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, Florence, Italy, August 2005. Book of Abstracts, pp. 229, P-237.
7. **Kukić J**, Petrović S, Pavlović M, Couladis M, Tzakou O, Niketić M. Composition of the Essential oil of *Stachys alpina* L. subsp. *dinarica* Murb. 36th International Symposium on Essential Oils, Budapest, Hungary, 2005. Book of Abstracts, pp. 87, P-40.
 8. **Kukić J**, Savić M, Gavrilović I, Grayer R, Marin P, Tomić M, Petrović S. Behavioral characterisation of MeOH extracts of two *Stachys* taxa. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, Graz, Austria, 2-6 September, 2007. *Planta Medica*, 73: 998, PP-563, 2007.
 9. **Kukić-Marković J**, Dobrić S, Jačević V, Topić A, Marin P, Petrović S. Hepatoprotective activity of *Stachys* extracts against CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. 57th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. Geneva, Switzerland, 16-20 August 2009. *Planta Medica*, 75: 1039, PJ37, 2009.
 10. Karioti A, **Kukić-Marković J**, Petrović S, Niketić M, Bilia A. HPLC-DAD/ESI-MS identification and quantification of polar constituents in six *Stachys* taxa from Balkan peninsula. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research. Antalya, Turkey, 04-09. September, 2011. *Planta Medica*, 77(12): 1270-1270.

Radovi saopšteni na skupovima nacionalnog značaja štampani u izvodu:

1. **Kukić J**, Petrović S, Niketić M. Antioxidant activity of *Stachys plumosa* Griseb. 3rd Congress of Pharmacy of Macedonia with International Participation, Ohrid, Macedonia, October 2003. *Macedonian Pharmaceutical Bulletin*, 49 (1,2): 170, 2003.
 2. **Kukić J**, Petrović S, Dobrić S, Milenković M, Vučićević D. Antiinflamatorna i antimikrobna aktivnost ekstrakata nekih *Stachys* vrsta. IV Kongres farmaceuta Srbije sa međunarodnim učešćem, Beograd, 28.11.-2.12. 2006. PP194. *Arhiv za farmaciju*, 56: 896-897, 2006.
-

BIOGRAFIJA

Dipl. farm. Jelena Kukić-Marković rođena je 3. juna 1977. godine u Šapcu. Srednju medicinsku školu u Šapcu završila je kao nosilac Vukove diplome. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1996/97. godine. Diplomirala je na Farmaceutskom fakultetu 2002. godine sa prosečnom ocenom 9,35 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Stručni ispit za diplomirane farmaceute položila je novembra 2004. Poslediplomske studije za magisterijum iz farmakognozije upisala je školske 2002/03. godine, a na doktorske akademske studije iz farmakognozije prebacila se školske 2006/07. godine. Na Katedri za farmakognoziiju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu u periodu 2002-2007. godine bila je zaposlena kao saradnik, a od 2007 god. birana je u zvanje asistenta. Dobitnik je nagrade Farmaceutskog fakulteta za najboljeg studenta IV godine na smeru diplomirani farmaceut. Školske 2001/02. godine bila je stipendista Vlade Kraljevine Norveške i stipendista Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka Ministarstva za prosvetu i sport Republike Srbije. U periodu 2003-2005. godine bila je stipendista Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije. Kao stipendista Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine u periodu 2003-2005. godine bila je angažovana na projektu: „Ispitivanje lekovitog potencijala samoniklih biljaka: Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija“ (1568). Od 2007. godine angažovana je na projektima Ministarstva za nauku (143012, 173021 i 175045). Autor je i koautor 16 radova u časopisima međunarodnog značaja i 2 rada u u časopisu nacionalnog značaja. Član je Međunarodnog društva za proučavanje lekovitog bilja (Gessellschaft für Arzneipflanzenforschung, GA) i Sekcije za lekovito bilje Saveza farmaceutskih udruženja Srbije (SFUS). Govori engleski, a služi se nemačkim jezikom.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Потписана Јелена Кукић-Марковић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Хемијска и фармаколошка карактеризација *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* и *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)“

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јелена Кукић-Марковић

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКОГ РАДА**

Име и презиме аутора: Јелена Кукић-Марковић

Број уписа: _____

Студијски програм: _____

Наслов рада: „Хемијска и фармаколошка карактеризација *Stachys anisochila*,
S. beckiana, *S. plumosa* и *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)“

Ментор: проф. др Силвана Петровић

Потписана Јелена Кукић-Марковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Хемијска и фармаколошка карактеризација *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* и *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae)“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

Јелена Кукит-Марковић
