



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Марија Т. Поповић - Миленковић

Испитивање биолошких ефеката екстракта плода *Crataegus
nigra* Wald. et Kit

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014.

Најискреније се захваљујем свом ментору **проф. др. Слободану Јанковићу** који је омогућио реализацију овог рада, а својим саветима и искуством ме усмеравао и подржавао током свих фаза његове израде.

Посебну захвалност упућујем **асист. Снежани Бранковић** са Природно-математичког факултета у Крагујевцу која ми је својим знањем, искуством и несебичним залагањем помогла у проналажењу, прикупљању и идентификацији испитиване биљке.

Овим путем се захваљујем свима који су на било који начин допринели изради ове докторске дисертације.

Неизмерну захвалност упућујем својој сестри **др Марини Томовић** која је своје знање, време, енергију и истрајност уградила у сваки корак мога пута, тешке ствари чинила лакшим, невидљиве опипљивим, безнадежне тренутке претварала у успех а далеки и неухватљив циљ у реалан и близак.

Мом супругу **Мирку** и деци **Дамјану** и **Михаилу** захваљујем на огромном стрпљењу, љубави и подршци јер они свему овоме дају посебан смисао и посебну вредност.

Ову дисертацију посвећујем својим родитељима оцу **Томиславу** и мајци **Гордани** који су цео свој живот безрезервно посветили мени.

САДРЖАЈ

1. Увод.....	8
1.1. Гајење, берба, сушење и чување лековитог биља.....	9
1.2. Ботаничке карактеристике рода <i>Crataegus</i>	12
1.3. Род <i>Crataegus</i> L.	15
1.4. Врста <i>Crataegus nigra</i> Wald. et Kit.....	15
1.5. Употреба глога у народној медицини	16
1.6. Фармаколошка активност рода <i>Crataegus</i>	17
1.6.1. Хипотензивна активност	18
1.6.2. Антиаритмијска активност	18
1.6.3. Инфаркт миокарда	18
1.6.4. Ишемија миокарда	19
1.6.5. Конгестивна срчана инсуфицијенција	19
1.6.6. Антихиперлипидемијска активност	19
1.6.7. Антиоксидативна активност.....	20
1.6.8. Утицај на катаракту ока.....	20
1.6.9. Антиинфламаторна, гастропротективна, антибактеријска и антигљивична активност.....	21
1.6.10. Антивирусна активност.....	21
1.6.11. <i>Crataegus</i> и репродуктивни систем.....	22
1.6.12. Радиопротективна активност	22
1.6.13. Имуностимулаторна активност	22
1.6.14. Анксиолитички потенцијал.....	22
1.6.15. Хипогликемијска активност.....	23
1.6.16. Хепатопротективна активност	23

1.6.17.	Цитотоксична активност.....	23
1.7.	Фитохемијски састав биљака из рода <i>Crataegus</i>	24
1.7.1.	Флавоноиди.....	26
1.7.1.1.	Синтеза биофлавоноида	27
1.7.2.	Олигомерни проантоцијанидини.....	28
1.7.3.	Остала једињења	28
2.	Циљеви и хипотезе.....	29
2.1.	Циљеви	29
2.2.	Хипотезе.....	29
3.	Материјал и методе.....	32
3.1.	Припрема узорка.....	32
3.1.1.	Биљни материјал.....	32
3.1.2.	Методе екстракције.....	32
3.1.3.	Добијање сувог екстракта.....	35
3.2.	Хемијска анализа екстракта <i>C. nigra</i>	36
3.2.1.	Одређивање укупних фенола	36
3.2.1.1.	Раствори и реагенси.....	36
3.2.1.2.	Поступак.....	37
3.2.2.	Одређивање садржаја укупних флавоноида	38
3.2.2.1.	Раствори и реагенси.....	38
3.2.2.2.	Поступак.....	39
3.2.3.	Одређивање садржаја кондензованих танина (проантоцијанидина)	40
3.2.3.1.	Раствори и реагенси.....	40
3.2.3.2.	Поступак.....	41
3.2.4.	Квалитативно и квантитативно одређивање фенола	42

3.2.5.	Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом.....	45
3.2.5.1.	Раствори и реагенси.....	46
3.2.5.2.	Поступак.....	47
3.3.	Испитивање анксиолитичке и хипнотичке активности <i>C. nigra</i>	48
3.3.1.	Методe испитивања анксиолитичке активности.....	48
3.3.1.1.	Раствори и реагенси.....	51
3.3.1.2.	Експерименталне животиње.....	52
3.3.1.3.	Поступак испитивања анксиолитичке активности - подигнути крстасти лавиринт 52	
3.3.1.4.	Поступак испитивања хипнотичког деловања екстракта - време спавања индуковано кетамином.....	53
3.3.2.	Статистика.....	54
3.4.	Антимикробна активност екстракта.....	54
3.4.1.	Сојеви микроорганизама.....	54
3.4.2.	Стандардне супстанце и испитивани ратвори.....	54
3.4.3.	Подлоге.....	54
3.4.4.	Поступак.....	55
3.4.5.	Статистичка анализа антимикробне активности.....	55
4.	Резултати.....	56
4.1.	Хемијски састав екстракта <i>C. nigra</i>	56
4.2.	Квантитативни и квалитативни резултати.....	58
4.3.	Антиоксидативна активност.....	65
4.4.	Анксиолитички и хипнотички ефекат екстракта <i>C. nigra</i>	67
4.4.1.	Анксиолитички ефекат екстракта <i>C. nigra</i>	67
4.4.2.	Хипнотички ефекат екстракта <i>C. nigra</i>	70
4.5.	Антимикробна активност.....	72

5. Дискусија.....	76
6. Закључци	98
7. Литература	100
8. ПРИЛОГ	115



Crataegus nigra Wald. et Kit., *Rosaceae* – црни глог. Село Сусек код Новод Сада.

1. Увод

Лековите биљке су биле најприступачнији лек још од најранијих времена па до данас. Оне представљају основ традиционалне медицине и фармације. Коришћене су у народној медицини древних цивилизација Кине, Индије, Египта, античке Грчке... Данас свака култура има „народне лекаре“, који своју терапију заснивају искључиво на лековитом биљу. У данашње време савремене медицине, где смо сведоци њеног и успеха и неуспеха, снажних позитивних ефеката лекова и исто тако њихових озбиљних нежељених ефеката, све више се осврћемо ка природи и биљкама. Иако је заступљено мишљење да су природни и биљни препарати потпуно безбедни и без нежељених ефеката то није тако. Од најранијих времена су постојали тачно дефинисани начини коришћења лековитих биљних препарата. Њихова употреба је скопчана са савршеним познавањем биљака, њихових ефеката и доза у којима се користе. Пажљиво и балансирано коришћење је посебно битно у даншњем савременом добу, где се комбинују лекови савремене медицине и биљни препарати. Упознавање биљака на један свремени начин представља изазов, где се доказивањем хемијске структуре као и фармаколошким испитивањем ефеката биљака утврђује оправданост њиховог коришћења у традиционалној медицини.

У прошлости су травари, видари... сакупљали самоникло лековито биље по ливадама, шумама, планинама... Данас, се лековито биље углавном узгаја на одговарајуће начине како би принос и биљке и лековитих, активних састојака у њој био највећи. Током историје ова знања и искуства о налажењу, сакупљању и употреби лековитих биљака су се чувала и преносила углавном у оквиру породице. Са аспекта научног истраживања данас се лековите биљке проучавају у смислу хемијске карактеризације као и потврде фармаколошких особина, у светлу оправданости њиховог коришћења у народној медицини.

Вештина лечења лековитим биљем се развијала код свих народа и до данас се сачувала негде више негде мање, као традиционална односно народна медицина. Поједине биљке које су се у народној медицини врло успешно употребљавале данас представљају важну лековиту сировину у савременој *materii medici* (нпр. *Digitalis*, ражена главница...). Историја је пуна доказа о активном коришћењу лековитог биља у терапијске сврхе.

У далекој прошлости су то били цртежи а касније и писани документи. Један од најстаријих писаних докумената који садржи доста података о лековитом биљу и њиховој употреби пре и на почетку нове ере је *De materia medica*. Написао га је Диоскорид (I век н.е.). У средњем веку доминирала је улога манастира у чувању вештине лечења, израде лекова и гајењу лековитог биља. У новом веку има доста познатих европских стручњака – писаца, од којих су неки били лекари и апотекари. Научна фармација почиње да се развија тек након француске револуције (1799) а са њом и развој науке о лековитом биљу. Немачки апотекар (Сертирнер) 1806 године изолује морфин из опијума и тада започиње ера алкалоида и научне фармакогнозије на хемијској основи.

Од писаних дела којима се сведочи употреба лековитог биља у српском народу појављује се *ХОДОШКИ КОДЕКС* из 14 века. Сматра се најстаријим записом српске световне медицине. *ХИЛАНДАРСКИ МЕДИЦИНСКИ КОДЕКС* из 15 или 16 века откривен је 1951. године у библиотеци манастира Хиландар. Из доба под Турцима остале су нам сачуване разне *лекаруше* и *траваруше*. У другој половини 19. века Јосиф Панчић издаје своју *Ботанику* (1868) где износи разне податке о медицинској и другој корисној употреби биљака. Војни лекар, ученик Јосифа Панчића, Сава Петровић објављује књигу *Лековито биље у Србији* (1883), др Владан Ђорђевић *Народна медицина у Срба* (1872)... Свакако, у периоду после II св. рата, највећи допринос у проучавању и коришћењу лековитих биљака дао је академик професор др Јован Туцаков. Његова књига *Лечење биљем* и данас је веома популарна и у народу и у стручној јавности (1).

1.1. Гајење, берба, сушење и чување лековитог биља

Доминантни извор биљака у традиционалној медицини је још увек самоникло биље, које се користи за справљање различитих препарата. Међутим, када је реч о фармацеутској индустрији, где се биљне дроге користе за екстракцију лековитих састојака (алкалоиди, гликозиди...) или када се говори о другим гранама прерађивачке индустрије (ароматичне дроге, зачини, етарска уља...) користи се углавном гајено лековито и ароматично биље. Са напретком и развојем науке и технике гајење лековитог и ароматичног биља је постало веома уносно и рентабилно. Адекватним и правилним узгојем лековитог биља постижу се добри резултати у погледу количине активних састојака као и приноса биљне масе по јединици обрадиве површине. У складу са овим,

све је већи број самониклих биљака, којих иначе у природи има у великим количинама а које са данас успешно гаје. Показало се да је њихово узгајање врло рентабилно и исплативо (такве су велебиље, дигиталис, бели слез, камилица...). Данас се чак за добијање појединих биљних дрога и не користе више дивље, самоникле биљке, већ само висококвалитетне гајене врсте и сорте (нап. плод аниса, кима, морача, главице бухача...).

Биљне сировине данас представљају веома важану ставку у међународној трговини. Многе биљке се веома успешно узгајају у земљама, чак и на сасвим другим континентима, који уопште нису њихова постојбина. На пример, далматински бухач, (из цвета ове биљке се изолује пиретрин, инсектицид на који је осетљиво 75% познатих инсеката), природно станиште је југ Хрватске а данас је највећи узгајивач и извозник Кенија, која даје преко 50% светске производње инсектицидне дроге (*Pyrethri flos*, цвет бухача). Слично овоме, највећи произвођач сунцокрета нису САД, као његова постојбина, већ Русија (2).

Гајење биља има многе предности у односу на сакупљање самониклог, дивљег биља, а све то у циљу добијања квалитетне, чисте сировине. Да би се овај циљ остварио набављају се најбоље биљне сорте, врши се адекватан одабир земљишта, припрема земљишта, сетва у одговарајуће време, сузбијање биљних штеточина, берба у оптималној фази развоја биљке и на крају прописно паковање и чување биљне дроге. Добиање биљне врсте са најбољим карактеристикама је сложен процес и представља синтезу науке и праксе. Експлоатација самониклог, дивљег биља, које се користи у медицини је контролисана, пошто се поједине биљне дроге могу добити само на овај начин (корен од линцуре, лишће од планике, плод боровнице...) (1).

Квалитет сваке биљне дроге у многоне зависи од тренутка бербе и начина сушења. У зависности који орган биљке се употребљава као дрога, зависи и време бербе. Период брања се поклапа са периодом када је у биљци, односно делу биљке који се бере, присутан највећи садржај активних принципа. Најчепће време брања је: цвет (*flos*) – чим почне да се отвара; лист (*folium*) – кад биљка почне да цвета; плод (*fructus*) – сув, пре него што потпуно сазри или зрео, сочан и меснат – кад сазри; семе (*semen*) – потпуно зреоло; кора (*cortex*) – пре олиставања биљке, у рано пролеће, ређе касно у јесен, кад опадне лист; подземни органи вишегодишњих биљака: ризом (*rhizoma*), корен (*radix*), кртола (*tuber*) или луковица (*bulbus*) ваде се у јесен када опадне лишће или рано у пролеће. Биљке се беру по лепом и сувом времену, одстрањују се све примесе које умањују квалитет дроге.

Убрране биљке се стављају у корпе, кутије или неку другу погодну амбалажу и транспортују на сушење. Када се као биљна дрога узимају подземни органи биљака одмах се након вађења из земље очисте од натрулих делова, добро се оперу у текућој води и разастру у танком слоју како би се вода оцедила и они просушили (2).

Сходно томе да је влага најчешћи узрок кварења биљака, односно биљних дрога, сушење представља најбољи и најлакши начин њиховог конзервирања. Од начина сушења у многоме зависи квалитет крајњег производа. Уколико сушење није добро урађено може доћи до буђања дроге услед вишка влаге или уколико је сушење било неадекватно на сувише високим температурама и слично, дрога може променити изглед, изгубити активне принципе, што значајно умањује лековите вредности биљке.

Сушење може бити природно и вештачко. Код природног сушења биљни материјал се распоређује у танком растреситом слоју у хладовини на промајном месту. Обично се за то користе асуре, даске, хартије и слично. Нежни делови биљака (цвет, пупољак, лист, херба) се не излажу директној сунчевој светлости. На овај начин се мењају хлорофил, антоцијани ... што доводи до промене боје биљног материјала и умањења његове лековите вредности. Код сушења биљног материјала чија структура није тако нежна (кора, плод, семе, подземни органи) користи се директна сунчева светлост, с тим де се материјал поставља у танком слоју уз чешће превртање и мешање. Дебели, меснати подземни органи се секу на мање комаде, уздуж ради лакшег и бржег сушења. У зависности који је период године, природно сушење може трајати дуже или краће (током лета је брже у пролеће и у јесен краће). Вештачко сушење, не зависи од годишњег доба нити од временских услова, кише и слично. Оно се обавља у термичким сушарама на одређеној температури зависно од делова биљке који се суше као и од активних принципа у њој. Код сушења ароматичног биља температура не би требала да пређе 35°C. Код осталих температура може ићи и до 50°C с тим да се стално контролише квалитет и изглед материјала, како би се у току сушења што више очувала природна боја, мирис, и друга првобитна својства биљне дроге. Према Ph. Jug. IV највећа дозвољена количина влаге у прописно осушеној биљној дроги износи од 12-15%. (2)

Да би биљне дроге задржале своје лековите и/или ароматичне особине веома је важно паковање и њихово чување. Амбалажа мора да штити дрогу од неповољних спољшњих утицаја (продора инсеката, влаге, сунчеве светлости и сл). У зависности од

количине и врсте дроге разликује се и одабир амбалаже. Амбалажа могу бити: сандуци, кутије (картонске, дрвене...), вреће или кесе од дебеле хартије, платна или јуте, стаклене тегле са широким грлом... Добро запакована дрога се чува на сувом месту у просторији која се може проветравати. Чување и паковање дрога је условљено и посебним прописима у складу са стандардима за поједине дроге или у складу са стандардима земаља у које се дроге извозе. Код нас је чување, паковање и разврставање биљних дрога прописано Ph. Jug. IV, као и бројним правилницима (3).

1.2. Ботаничке карактеристике рода *Crataegus*

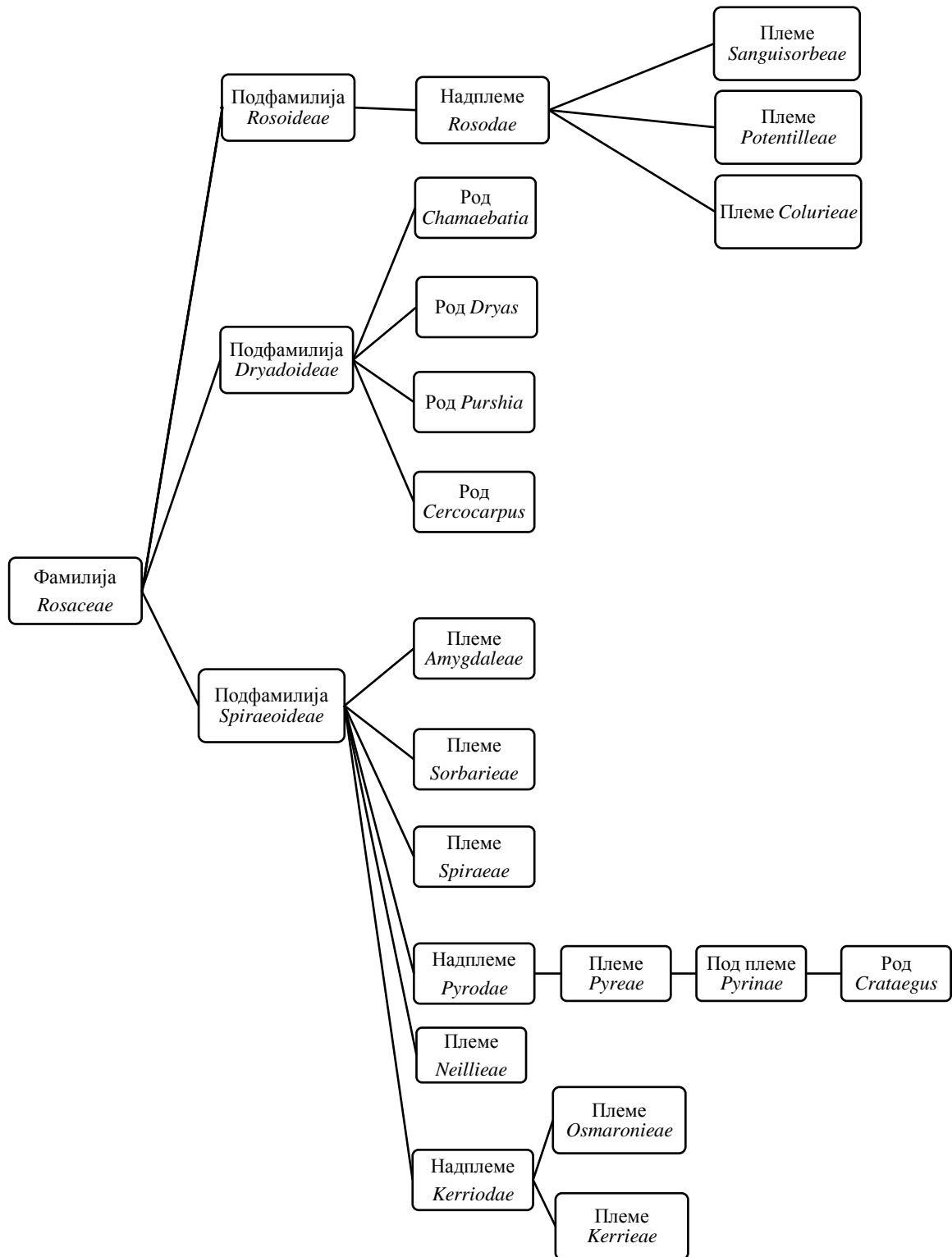
Фмилија *Rosaceae* (фамилија ружа), је јако распрострањена фамилија. Налази се скоро у свим деловима света, али посебно је распрострањена на Северној хемисфери Земље. Биљке из ове фамилије се једино не налазе у пустињама и тропским шумама (4). Њој припада око 90 родова и око 3000 врста.

Положај фамилије *Rosaceae* је током времена варирао у односу на друге ангиосперм фамилије. Тако је по ранијим класификацијама ред *Rosales* укључивао поред осталих и фамилије *Saxifragaceae*, *Crassulaceae*, *Cunoniaceae*. Међутим, ни за једну од њих се у каснијим молекулско филогенетским студијама нису нашли докази који би показали њихову повезаност са фамилијом *Rosaceae*. Садашње представљање реда *Rosales* укључује фамилије *Barbeyaceae*, *Cannabaceae*, *Dirachmaceae*, *Elaeagnaceae*, *Moraceae*, *Rhamnaceae*, *Rosaceae*, *Ulmaceae* и *Urticaceae*. Молекулски докази указују на то да је фамилија *Rosaceae* „сестра“ са преосталим фамилијама у реду.

Током задњих 60 година у зависности од начина класификације у оквиру ове фамилије су се укључивали и искључивали други таксони. Најшире усвојена класификација заснивала се на структури и типу плода. По овој традиционалној подели фамилија се састоји од четири подфамилије: *Rosoideae*, *Spiraeoideae*, *Maloideae* и *Amygdaloideae*. Даље се подфамилије деле на племена и подплемена. По неким другим класификацијама, фамилија се одмах дели на племена док подфамилија и нема. Такхтајан је први у класификацију уврстио и резултате првих молекулских филогенетских студија. По његовој класификацији *Amygdaloideae* и *Maloideae* су проширене а *Rosoideae* и *Spiraeoideae* су подељене. По Калкману 2004 у оквиру фамилије *Rosaceae* постоје само племена. Мада је он сугерисао на могуће постојање две подфамилије. Једна је обухватала

класичне *Rosoideae* и *Prunoideae* а друга *Maloideae* и *Spiraeoideae*. Калкманова класификација укључује свеобухватнији преглед вегетативне и репродуктивне морфологије, кариологије, екологије, фитохемије.

Данас се на основу молекулских испитивања хлоропласта и броја хромозома праве класификације – кладе. На основу овога фамилија *Rosaceae* садржи три подфамилије: *Rosoideae* (обухвата три племена), *Dryadoideae* (обухвата четири рода) и *Spiraeoideae* (обухвата седам племена). Сви родови који су у ранијим класификацијама били додељени *Amygdaloideae* и *Maloideae*, сада су укључени у *Spiraeoideae* (Слика 1.) (5,6).



Слика 1: Таксономска класификација рода *Crataegus*

1.3. Род *Crataegus* L.

Овај род је врло богат врстама. Број врста у многоме зависи од таксономске интерпретације. Тако по подацима из Флоре Србије 1976 род *Crataegus* обухвата око 1250 врста (7). По новијим интерпретацијама сматра се да има око 200 врста (8). Овај број није крајњи пошто се сматра да још велики број синонима није разјашњен. Углавном је распрострањен у умереним и субтропским крајевима Северне хемисфере. У Србији се налази седам аутохтоних и више страних, унетих врста (7). Овај род карактерише листопадно, обично трновито жбуње или ниско дрвеће 5-15m висине. Животни век глога може бити и преко 200 година. Лишће, код биљака овог рода је наизменично, режњевито до перасто сечено, просто или двоструко тестерасто а може бити и са целим ободом. Цветови су ситни, и формирају богате гроње. Чашичних листића има пет, кратки су и мање више троугласти, опадају или остају на плоду. Круничних листића има пет, округласти су и дужи од чашичних. Обично су бели, ређе ружичасти. Цветови се развијају у време када листови нису достигли нормалну величину. Они су често непријатног мириса али су медоносни. Плодови могу бити црвени, црни или наранџасти, са 1-5 коштица.

1.4. Врста *Crataegus nigra* Wald. et Kit.

Crataegus nigra, црни глог, може бити жбун или ниско дрво. Гране су релативно кратке, па крошња има округласти облик. Гранчице су у младости врло густе, беличасто длакаве а касније оголе. Боја им се креће од црвенкасто смеђе до љубичасто црвене. Трнови су доста чести али кратки до 1cm. Лишће је троугласто или јајасто дугачко 5-8 cm. Лишће је перасто усечено и садржи 7-11 режњева који су оштро назубљени. Лице листа је мање више длакаво док се на наличју налазе густе сиве длачице. Цветање је у мају и јуну месецу. Плодови су у току сазревања црвенкасти а зрели добијају сјајну црну боју, сочни су и меки. Округли су и дуги око 8 mm. Садрже 3-5 коштица (7).

Ова врста глога је еколошки битно различита од осталих врста. У знатној мери је хигрофилна. Налази се на плавним, алувијалним теренима крај већих река. Припада панонско-балканском флорном елементу. Природна станишта су му у Мађарској, Србији, Хрватској, Румунији. У Србији је распрострањен крај Дунава и Саве, где је местимично врло чест и бројан.

1.5. Употреба глога у народној медицини

Сматра се да назив рода *Crataegus* потиче од грчке речи *kratos*, што значи „тврдоћа дрвета“ (9).

Данас се користи више од 20 врста глога а неке од њих се налазе и у фармакопејама многих земаља (10). Табела 1.

Фармакопеја	Врста	Део биљке који се користи као дрога
American Herbal Pharmacopoeia (2011)	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Лишће и цветови
British Pharmacopoeia (2000)	<i>C. oxyacantha</i> L., <i>C. monogyna</i> Jacq.	Плодови, лисстови и цветови
Chinese Pharmacopoeia (English ed., 1997)	<i>C. pinnatifida</i> Bge., <i>C. pinnatifida</i> Bge. var. <i>major</i> N.E. Br.	Плодови
France Pharmacopoeia (1998)	<i>C. oxyacantha</i> L. <i>C. monogyna</i> Jacq.	Листови и цветови
European Pharmacopoeia (2000)	<i>C. oxyacantha</i> L. <i>C. monogyna</i> Jacq.	Листови и цветови

Табела 1. Светске фармакопеје у којима се налазе различите врсте глога.

Биљну дрогу чине лист, цвет и плод. Цветови се беру рано у пролеће пре него што се потпуно развију а суше се у танком слоју у хладовини на промајном месту. Лишће се бере лети, када је сасвим развијено, а плодови када сазре, касно у јесен. Плодови се суше цели у танком слоју на сунцу или у сушници (11).

У народној медицини се глог врло успешно користи у терапији срчаних обољења. Уочено је да појачава снагу, умањује број срчаних откуцаја у минути као и отоке (12). Иако глог не садржи гликозиде дигиталиса он има врло благотворно деловање у стањима срчане инсуфицијенције (нарочито у почетном стадијуму), код хипертоничара, као и код ангине пекторис, умереног поремећаја срчаног ритма, атеросклерозе. Такође, се глогу приписују и успешно диуретично, адстригентно и антимикубно деловање (10).

Препоручује се у менопаузи, у терапији анксиозности, лупања срца, несанице. Иако се дуго користио у традиционалној медицини за наведена обољења тек су у скорије време и потврђена ова фармаколошка дејства (13).

Crataegus aronia се код Арабљана користи код кардиоваскуларних обољења, код ангине пекторис, хипертензије, аритмија и конгестивне срчане инсуфицијенције (14). У Палестини се ова врста глога, између осталог користи код неких облика канцера (15). Код неких народа се поједине врсте рода *Crataegus* користе у третману дигестивних проблема, диспнеје, камена у бубрегу (16). Док се у кинеској традиционалној медицини *Crataegus pinnatifida*, *Crataegus cuneata* користе и за регулацију нивоа липида у плазми (17, 18). Такође се у кинеској традиционалној медицини *Crataegus pubescens* користи у превенцији развоја дијабета (19,20). *Crataegus pinnatifida* се заједно са другим биљкама у Кини користи и у третману неки туморских обољења, док се у ветеринарској медицини корисри у лечењу дијареја и других гастроентералних поремећаја (21, 22).

Данас, на тржишту, постоји велики број препарата глога. То су таблете, капи, или тинктуре. Ови препарати су најчешће монокомпонентни, какве су обично тинктуре, а могу бити и биљне мешавине, попут многих таблета које поред глога садрже бели лук када се односе преваходно на срчана обољења, или хмељ, валериану... када су намењени код проблема несанице, напетости или нервозе. У сваком случају ови препарати су стандардизовани на одређени садржај процијанидина и флавоноида којима се приписују лековита својства глога. Ови прпарати се користе у превентивне сврхе, као комплементарна терапија са синтетичким лековима или када је реч о блажим формама обољења као самостална терапија.

1.6. Фармаколошка активност рода *Crataegus*

Род *Crataegus* је широко распрострањен у свету. Практично га има на свим насељеним површинама Земље. Због овога је сасвим разумљива његова употреба још од најранијих времена у народној медицини. Међутим, научно, фармаколошки и хемијски је испитано тек неколико врста, оних најраспрострањенијих и највише коришћених. Хемијски састав и фармаколошка ефикасност се прилично разликују између врста глога али и у оквиру исте врсте у зависности од локалитета и поднебља. Зато су потребна опсежна испитивања како хемијска тако и фармаколошка. Уопштено гледано род

Crataegus повољно утиче на коронарни артеријски проток, контракцију срчаног мишића, па се у складу са овим јако користи у третману срчаних аритмија, инфаркта миокарда, конгестивне срчане инсуфицијенције (23, 24, 25, 26). Доказано је да екстракти разних врста рода *Crataegus* повољно утичу на ниво укупног холестерола, триглицерида, LDL (low-density lipoprotein) и VLDL (very low-density lipoprotein) фракције, као и на ниво шећера у крви (27, 28). Поједина истраживања су показала да *Crataegus* делује и као антиинфламаторни, гастропротективни, антимикробни агенс па чак да има и извесно хепатопротективно деловање (29, 30).

1.6.1. Хипотензивна активност

Водени екстракт *Crataegus tanacetifolia*, посебно његова хиперозидна фракција, је у експерименталном моделу на пацовима довела до превенције високог крвног притиска који је изазиван под дејством L-NAME (N-nitro-L-arginine methyl ester). Такође је на истом моделу показано да овај екстракт има врло повољне ефекте на кардиоваскуларни систем у смислу смањења нивоа укупног холестерола, триглицерида и LDL холестерола у плазми (31). У студији изведеној на 24 пацијента са ортостатском хипотензијом је показано да комбинација камфор - *crataegus* у облику орално примењених капи смањује овај облик хипотензије (32).

1.6.2. Антиаритмијска активност

Код *Crataegus oxyacantha* је испитивана антиаритмијска активност и упоређивана је са кардиолошким лековима као што су оубаин, епинефрин, пропранолол. Показало се да је екстракт способан да изазове ритмичност на култури мишјих кардиомиоцита, односно да поседује антиаритмијску активност. Овај екстракт показује негативни хронотропни ефекат али не доводи до блокаде β адренергичних рецептора. Комерцијални препарати глога такође показују сличну хронотропну активност (33, 23).

1.6.3. Инфаркт миокарда

Екстракт глога поседује позитивни инотропни ефекат амина као што су фенетиламин, О-метоксифенетиламин и тирамин. У *in vitro* испитивањима је показано да су ови амини одговорни за активност *Crataegus* екстракта и на папиларним мишићима заморчића (9). Такође је утврђено да повећава ниво интрацелуларног калцијума, што је у складу са његовом позитивном инотропном активношћу (31, 9). У експерименталној

студији где је изазиван инфаркт срца код пацова, алкохолни екстракт *Crataegus oxyacantha* је довео до очувања антиоксидативне митохондријалне способности и показао значајну превенцију митохондријалне пероксидативне деградације (25, 34).

1.6.4. Ишемија миокарда

Хидроалкохолни екстракт *Crataegus meyeri* у експерименталном моделу доводи до значајног смањења укупног броја коморских ектопичких откуцаја и то углавном редукцијом коморских тахикардија. Хлороформни екстракт *Crataegus meyeri* такође доводи до смањења укупног броја коморских ектопичких откуцаја, при чему ово смањење настаје као последица смањења појединачних екстрасистола. Током инфузије ових екстракта није било значајних промена у крвном притиску пацова. Међутим болус инјекција ових екстракта је довела до значајног смањења крвног притиска. Из свега овога се закључује да *Crataegus meyeri* поседује активне принципе који имају хипотензивни и антиаритмички потенцијал на исхемијски миокард при чему интензитет ових ефеката у многоме зависи од начина апликације екстракта (26).

1.6.5. Конгестивна срчана инсуфицијенција

Стандардизовани екстракт свежих бобица *Crataegus oxyacantha* L. и *Crataegus monogyna* Jacq. (*Crataegisan*[®]), је показао снажан ефекат код пацијената са срчаном инсуфицијенцијом NYHA класе II. Пацијенти су осам недеља примали три пута дневно 30 капи екстракта или плацеба. Резултати су показали значајно побољшање срчане инсуфицијенције током дужег терапијског периода са стандардизованим екстрактом свежих бобица *Crataegus*-а (24). У другој студији је испитиван утицај екстракта *Crataegus* WS 1442 на хиперплазију интимае у каротидној артерији пацова. Хиперплазија је изазвана повредом интимае услед дилатације балон катетера. Резултати су показали да екстракт *Crataegus* WS 1442 доводи до инхибиције хиперплазије интимае крвног суда и то директном интеракцијом са PDGFR рецепторима (platelet derived growth factor receptor, фактор раста, одговоран за раст и деобу ћелија посебно крвних судова у процесу ангиогенезе). Сматра се да су за ову активност одговорни полифеноли из екстракта. (35).

1.6.6. Антихиперлипидемијска активност

У кинеској традиционалној медицини се плодови *Crataegus pinnatifida* користе за снижавање липида у крви. Утврђено је да екстракт глога инхибира активност ацил

коензим А холестерол ацилтрансферазе (АСАТ) у Сасо-2 ћелијама (линија хуманих интестиналних ћелија). Сматра се да су за ову активност глога одговорне тритерпенске киселине, олеанолна и урсолна. Такође је потврђено да биљни стероли у комбинацији са тритерпенским киселинама повећавају овај ефекат (18). Друга експериментална студија на животињама је испитивала хиполипидемијско деловање воденог екстракта *Crataegus aronica*. Резултати су показали да је дошло до инхибиције активности интестиналне ацил коензим А холестерол ацилтрансферазе, без додатног деловања на хепатичну 3-хидрокси-3-метил глутарил коензим А редуктазу (HMG-CoA-R) или на холестерол 7 α -хидроксилазе, што указује на хиполипидемијски потенцијал самог глога (36, 37).

1.6.7. Антиоксидативна активност

Посматрано је како промене услова спољашње средине могу да утичу на ниво антиоксидативне активности код *Crataegus laevigata* и *Crataegus monogyna*. Десет дана су биљке боравиле на собној температури (25°C) и сваки дан су биле заливане. Након тога су биле изложене „стресу“. У наредних десет дана нису примале воду а температура је смањена на 4°C. Након овако изведеног „стреса“, са биљака су узети листови и после сушења направљен је екстракт који је даље испитиван. Резултати су показали да је услед овога дошло до повећања нивоа епикатехина и хиперозида код обе врсте као и до повећања укупног антиоксидативног капацитета (38). Услови спољашње средине у којима живе биљке доводе до повећања активних принципа и антиоксидативне активности. И друге студије су испитивале антиоксидативну активност различитих *Crataegus* врста и добијени резултати су показали значајни антиоксидативни капацитет код *Crataegus aronia*, *Crataegus pentaegyna* и других врста (39,40).

1.6.8. Утицај на катаракту ока

Катаракта је водећи узрок слепила у свету. Сматра се да између осталог настаје као последица оксидативног стреса под утицајем слободних радикала. Испитиван је утицај екстракта *Crataegus pinnatifida* на катаракту ока у *in vitro* и *in vivo* условима. У *in vitro* условима је екстракт лишћа *Crataegus pinnatifida* показао значајну антиоксидативну активност у смислу инхибиције продукције NO (азот оксида), инхибицију алдоза редуктазе и O₂⁻ радикал хватачка активност. За *in vivo* испитивања припремљен је екстракт лишћа *Crataegus pinnatifida* у облику капи за очи као 0,1%-тни раствор хидроксипропил

метил целулозе. Капи су примењиване три пута дневно (укапане су у зеницу ока пацова). Оксидативни стрес, односно развој катаракте је индукован селенимом. Ово је довело до повећања серумских нивоа супер оксид димутаза и каталаза као и смањење нивоа малонилалдехида у поређењу са контролном групом. Појачана активност ових (антиоксидативних) ензима у сочиву се објашњава антиоксидативним потенцијалом екстракта, што му уједно описује улогу у супресији развоја катаракте ока (41).

1.6.9. Антиинфламаторна, гастропротективна, антибактеријска и антигљивична активност

На врстама *Crataegus monogyna*, *Crataegus oxycantha* и *Crataegus laevigata* је показана антиинфламаторна, гастропротективна, антибактеријска и антигљивична активност. Антиинфламаторна активност је показана на моделу едема шапице мишева. Едем је изазван под утицајем карагинена. Показано је да постоји дозна зависност између дозе апликованог екстракта и величине едема. Екстракт је показао и дозно зависну гастропротективну активност у моделу акутног стрес улкуса изазваног етанолом код пацова. Екстракт је такође показао и извесни антибактеријски и антигљивични потенцијал против грам позитивних бактерија *Micrococcus flavus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, односно гљивице *Candida albicans* (30) док је екстракт *Crataegus tanacetifolia* показао бактерицидно дејство (42).

1.6.10. Антивирусна активност

Антивирусна активност је испитивана на екстракту лишћа и плодова три *Crataegus* врсте, *Crataegus aronia*, *Crataegus monogyna* и *Crataegus pseudoheterophylla* у експерименталном моделу на микропловама. Том приликом екстракти су испитивани и на укупну количину флавоноида и укупни садржај прцијанидина. Резултати су показали да су екстракти, који садрже ове активне састојке, имали велику ефикасност у третману *Herpes simplex* вируса (43). Флавоноиди и процијанидини изоловани из *Crataegus sinica* су у експерименталном моделу показали извесну антивирусну активност (у односу на ХИВ вирус). Хиперозид, витексин, епикатехин, 2"-О-рамносилвитексин, (4"-О-ацетил)-2"-О-рамносилвитексин, (+)-таксифолин, 3-О- β -ксилопираносил-(+) таксифолин, свој антивирусни ефекат остварују везивањем за протеине вирусног омотача или инхибицијом реверзне транскриптазе (44).

1.6.11. *Crataegus* и репродуктивни систем

Испитиван је утицај *Crataegus cuneata* на репродуктивни систем. У ове сврхе је коришћен серум направљен из корена биљке. Овај серум је у *in vitro* условима довео до побољшања покретљивости сперматозоида код пацијената са астеноспермијом. Код шеснаест пацијената је узорак сперме инкубиран са овим медицинским серумом па је процењивана покретљивост сперматозоида одговарајућом компјутерском методом. У поређењу са контролном групом медицински серум је довео до значајног повећања мотилитета сперматозоида (45).

1.6.12. Радиопротективна активност

Екстракт плода *Crataegus microphylla* припремљен у дозама 25, 50, 100 и 200 mg/kg даван је интраперитонеално 1 сат пре примене гама зрачења. За време пролиферације, матичне ћелије (костне сржи и слезине) се деле и веома су осетљиве на генотоксичне утицаје којима се узрокују оштећења хромозома. У *in vivo* експерименталном моделу је показано да су испитиване дозе екстракта довеле до смањења учестаности појаве незрелих еритроцита који немају језгро али су у цитоплазми видљиви микронуклеуси, који представљају показатељ индукованог оштећења хромозома. Овако је показано да екстракт глога смањује генотоксичност изазвану гама зрачењем ћелија коштане сржи мишева. Фитохемијска студија је показала да *Crataegus microphylla* садржи велику количину фенолних једињења, хлорогенске киселине, хиперозида и епикатехина који могу бити одговорни за овај радиопротективни потенцијал (46).

1.6.13. Имуностимулаторна активност

Субфракције полисахарида изолованог из полена *Crataegus pinnatifida* Vge. показале су извесну имуностимулаторну активност. Наиме, на експерименталном моделу је утврђено да обадве фракције полисахарида индукују макрофагну фагоцитозу. Такође су довеле до значајног повећања стимулације пролиферације ћелија слезине пацова и до активације природних ћелија убица. Ово указује на извесни имуностимулаторни потенцијал *Crataegus* врста и захтева додатна истраживања на овом пољу (47).

1.6.14. Анксиолитички потенцијал

У рандомизованој клиничкој студији је утврђено да комбинација *Crataegus oxyacantha*, *Eschscholzia californica* (калифорнијски мак) и магнезијума показује много

већу ефикасност него плацебо у смањењу анксиозности код 264 особа са генерализованим анксиозним поремећајем (48). Друга студија је испитивала ефекте комбинације сувих екстраката *Crataegus oxyacantha*, *Passiflora incarnata* и *Valeriana officinalis*. Испитивање анксиолитичког ефекта овог екстракта се вршило на пацовима у ЕПМ моделу (подигнути крстасти лавиринт). Резултати су показали да ова комбинација има анксиолитички ефекат који се уочио као повећање броја улазака пацова у отворене краке ЕПМ. У истим дозама екстракт је показао и тенденцију ка хипнотичком ефекту али знатно мању у односу на диазепам (49).

1.6.15. Хипогликемијска активност

Diabetes mellitus је болест врло широко распрострањена у свету. У Мекску се екстракт различитих врста глога често користи у лечењу шећерне болести, а нарочито је ефикасан и успешан у раним фазама дијабета. *Crataegus mexicana* Мос и *Crataegus pubescens* испољавају антидијабетични ефеката а сматра се да је то услед присуства активних састојака као што су танини и флавоноиди (28). У једној експерименталној студији је испитиван утицај декокта лишћа и плодова *Crataegus aronia* код пацова где је дијабетес изазван стрептозоцином. Посматран је утицај декокта на ниво оксидативног стреса у плазми и ткивима и на ниво глукозе у крви. Закључци студије су да декокт лишћа и плодова *Crataegus aronia* нормализује нивое липид - пероксидазе у плазми и смањује ниво глукозе у крви код дијабетичних пацова (27).

1.6.16. Хепатопротективна активност

Аутори једне студије су на експерименталном моделу, на пацовима, показали извесни хепатопротективни ефекат плодова *Crataegus pinnatifida* (29).

1.6.17. Цитотоксична активност

Из *Crataegus pinnatifida* су изоловани цитотоксични тритерпеноиди урсанског типа и то су били уваол, урсолна киселина и 3-оксо-урсолна киселина. Цитотоксична активност ових једињења је испитивана у *in vitro* условима на мурин и неколико канцерских линија хуманих ћелија. Уваол и урсолна киселина су показале умерену цитотоксичну активност на мурин и слабу активност на хуманим ћелијским линијама канцера. 3-оксо-урсолна је показала снажну цитотоксичну активност и на мурин и на ћелијским линијама канцера (50). У циљу појашњавања могућих антитуморских особина глога урађена је студија која

је вршила анализу утицаја сакупљене полифенолне фракције *C. pinnatifida* на туморе коже код мишева изазване бензо[α]пиреном (B[α]P) и 12-О-тетрадеканолфорбол-13-ацетатом (ТРА). Екстракција је вршена топлем водом сувих плодова *C. pinnatifida*. Кожа мишева је три недеље била третирана са овим канцерогеним агенсима. Овако третирани мишеви су сви развили тумор на крају 15-те недеље, при чему се први јавио након 6-те недеље апликације. У групи која је третирана са екстрактом 5 минута пре апликације ТРА три пута недељно појава првог тумора је пролонгирана на 8-10 недеља а и број развијених тумора по мишу је био значајно мањи. Дакле, екстракт је довео до инхибиције формирања тумора коже под утицајем канцерогених агенаса али и до смањења инциденце тумора. Ови резултати указују да екстракт поседује изванредан потенцијал у инхибицији развоја тумора (51).

1.7. Фитохемијски састав биљака из рода *Crataegus*

Лишће, цвасти и плодови глога су веома богати разним биофлавоноидним комплексима. Сматра се да су они одговорни за кардиотонични ефекат ове биљке. Од биофлавоноида детектованих у глогу јављају се олигомерни процијанидини (ОПЦ), витексин, кверцетин и хиперозид. Управо ова једињења испољавају деловања на кардиоваскуларни систем. Од осталих хемијских једињења присутних у различитим врстама глога јављају се витамин Ц, сапонини, танини, кардиотонични амини, холин и ацетилхолин, пурински деривати, тритерпенске киселине (52, 9). Хемијски састав појединих врста из рода *Crataegus* је приказан у табели 2.

Врста	Хемијско једињење	Назив једињења
<i>C. monogyna</i> (43,53)	полифенолна једињења, ди- Ц-гликозиди	проантоцијанидин, витексин -2-О- рамнозид, хиперозид, антоцијанидин, хлорогенска киселина, епикатехин, апигенин- 6,8-ди-Ц-гликозид

Врста	Хемијско једињење	Назив једињења
<i>C. aronia</i> (43)	феноли	олигомерни проантоцијанидин, флавоноиди (витексин-2-О-рамнозид, хиперозид)
<i>C. pseudoheterophylla</i> (43)	феноли	олигомерни проантоцијанидин, флавоноиди (витексин-2-О-рамнозид, хиперозид)
<i>C. pinnatifida</i> (54,55,47,56)	флавоноидни гликозиди, фуранофлавоноиди, тритерпенске киселине, бифенил гликозиди	пинатифин Ц, пинатифин Д, олеанолска киселина, урсолна киселина, диметокси-бифенил-4-ол-3-О-β-Д-глукозид
<i>C. laevigata</i> (57)	олигомерни процијанидини	епикатехин-4- (4β→8)- епикатехин- (4β→6)-епикатехин,
<i>C. microphylla</i> (58)	флавоноиди	хесперетин, апигенин, витексин, витексин-4'-О-рамнозид
<i>Crataegi folium</i> (59)	феноли	катехин, нарингенин, гална киселина, кафена киселина
<i>C. scabrifolia</i> (60)	карбохидрати	шећери, киселине, шећерни алкохоли
<i>C. davisii</i> (61)	флавоноиди	хиперозид, витексин-2-О-рамнозид, витексин-4'-О-рамнозид, рутин, кверцетин
<i>C. macrocarpa</i> (62)	флавоноиди	ериодиктол-7-глукуронид, лутеолин-7-О-глукуронид
<i>C. pentaegyua</i> (40)	феноли	флавоноиди
<i>C. opaca</i> , (63) <i>C. aestivalis</i> , <i>C. rufula</i>	различита једињења	хексанал, бутил хексаноат, пентил хексаноат, метил хексаноат

Врста	Хемијско једињење	Назив једињења
<i>C. oxyacantha</i> (9, 64)	флавоноиди, олигомерни процијанидини, кардиотонични амини, тритерпени, пурински деривати	хептахидроксифлаван гликозид, флаван, кверцетин, хиперозид, рутин, витексин -4'-рамнозид, еоикатехол, тирамин, изобутиламин, урсолна киселина, олеанолна киселина, кратеголна киселина, аденозин, аденин, гуанин, кафена киселина,
<i>C. azarolus</i> var. <i>euazarolus</i> , <i>C. aronia</i> (65)	полифеноли	хлорогрнска киселина, хиперозид, кверцетин, рутин, епикатехин
<i>C. sinaica</i> (66)	полифеноли	антоцијанин
<i>Crataegi folium cum Flore</i> (67)	флавоноиди	флавонол-8-метоксикемферол 3- <i>O</i> - 6"-малонил-бета глюкопиранозид
<i>C. cuneata</i> (68)	тритерпеноиди	кунеатол
<i>C. macrocarpa</i> (62)	флавоноиди	витексин, изовитексин, рутин, хиперозид, изокверцитин,
<i>C. pubescens</i> (69)	полимери шећерних киселина	пектин-метил-естеразе
<i>C. maximowiczii</i>	флавоноиди	Витексин, хиперозид, кверцитин

Табела 2. Хемијски састав различитих врста глога.

1.7.1. Флавоноиди

Флавоноиди, односно биофлавоноиди представљају класу биљних секундарних метаболита (2). Одавно су познати, а велики број је још у првој половини 19-ог века изолован. Данас је познато више од 4000 једињења из ове групе. Многе биљке их садрже слободне или гликозидно везане, као „жуте ћелијске пигменте“ (лат. *flavus* што значи жут), те отуда и овај назив.

На основу IUPAC номенклатуре, флавоноиди се деле у три подгрупе: флавоне, изофлавоноиде и неофлавоноиде.

Флавони су деривати 2-фенил структуре, изофлавоноиди су деривати 3-фенил структуре, неофлавоноиди су деривати 4-фенил структуре. Све три класе флавоноида садрже кетонске групе.

Секундарни метаболити који спадају у полифенолна једињења а нису кетони, односно немају кетонску групу, називају се флаваноиди, флаван-3-оли. За ову групу једињења је данас овај назив много карактеристичнији него назив флавоноиди.

Биофлавоноидима се приписују бројна лековита својства. Испољавају повољно деловање на капиларе, доводе до смањења пропусности односно пермеабилности капилара (због ове особине су се до 60-тих година прошлог века убрајали у групу витамина П - Permeability Vitamin). Ова њихова особина да повољно утичу на капиларна оштећења успешно се примењивала и код лечења скорбута у комбинацији са витамином Ц (2). Данас се зна да поједина једињења из ове групе имају антимикуробна својства, снажна антиоксидативна (на овој особини се заснивају објашњења практично свих фармаколошких активности ове групе једињења), повољно делују код алергијских стања, вирусних обољења. У *in vitro* студијама је и доказана њихова антиалергијска, антиинфламаторна, антимикуробна, антитуморска, антидијареична активност (70, 71, 72).

У биљкама имају различите улоге. Својом бојом привлаче инсекте који учествују у опрашивању биљака, пружају заштиту од штетног УВ зрачења, катализатори су у процесу фотосинтезе, неутралишу супероксид анјоне и хидрокси радикале који и у биљном и у животињском свету представљају узроке разарања ткива и ћелијских мембрана (2).

1.7.1.1. Синтеза биофлавоноида

Флавоноиди се синтетишу преко фенилпропаноид метаболског пута. Овде се аминокиселина фенилаланин користи за синтезу 4-кумарол-СоА. У присуству малонил-СоА долази до формирања костура флавоноидне структуре. Ова група једињења се називају халкони и садрже два фенил прстена. Коњугацијом и затварањем прстена халкона настаје позната структура флавоноида. Даље се метаболски пут наставља серијом хемијских реакција стимулираних различитим ензимима, па тако настају флаванони, дихидрофлавоноли, антоцијанидини. Током овог метаболског пута настају бројни секундарни метаболити флавоноли, флаван-3-оли, проантоцијанидини (танини) (73).

1.7.2. Олигомерни проантоцијанидини

Олигомерни проантоцијанидини су по својој хемијској структури кондензавани флавани. У ствари овде долази до полимеризације 2 до 50 па и више флаван-3-ол јединица формирањем угљеничних веза. Везе су прилично чврсте и не подлежу хидролизи. Ова једињења у себи садрже молекуле катехина и епикатехина а везе које се формирају између њих могу бити линеарне (то је 4→8 веза) или разгранате (то је 4→6 веза).

Проантоцијанидини имају снажну антиоксидативну активност а управо овој њиховој особини се приписују бројни фармаколошки ефекти. То су антибактериско, антивирусно, антиинфламаторно, антиалергијско, вазодилататорно деловање (74). Такође су поједине експерименталне студије показале да проантоцијанидини доводе до инхибиције пероксидације липида и агрегације тромбоцита. Смањују пермеабилност капилара чиме се повећава јачина капилара, васкуларна функција и периферна циркулација.

1.7.3. Остала једињења

Описана једињења су присутна у неким врстама глога више у неким мање. Чак и у оквиру исте врсте садржај активних компоненти значајно варира у зависности од поднебља. Осим до сада наведених у роду *Crataegus* се могу наћи и:

- a) кардиотонични амини: фенилетиламин, тирамин, изобутиламин;
- b) холин и ацетилхолин;
- c) деривати пурина: аденозин, аденин, гуанин, кафена киселина;
- d) амигдалин;
- e) тритерпенске киселине: урсолна, кратеголна и олеонска киелина (9).

2. Циљеви и хипотезе

2.1. Циљеви

Примарни циљеви студије:

1. Утврдити да ли постоји анксиолитичко дејство плодова етанолног екстракта *Crataegus nigra* на мишевима. Варијабле за потврђивање овог циља су време проведено у отвореним крацима и број улазака у отворене краке подигнутог крстастог лавиринта (Elevated plus-maze, *EPM*). Као поредбена супстанција са доказаним анксиолитичким деловањем коришћен је бензодиазепин - диазепам.
2. Утврдити да ли постоји антимикубно дејство етанолног екстракта *Crataegus nigra* у *in vitro* условима. Варијабла за потврђивање овог циља је одређивање зоне инхибиције раста микроорганизама засејаних на одговарајућим подлогама у Петри шољама. Као поредбени антимикубни агенси коришћени су антибиотик цефтриаксон и антимикутик нистатин.

Секундарни циљеви студије:

1. Утврдити да ли постоји интеракција екстракта *Crataegus nigra* са депресорима ЦНС-а (кетамин). Варијабла за потврђивање овог циља је временски интервал од тренутка када миш изгуби способност да стане на ноге до повратка ове способности.
2. Одредити хемијски састав етанолног екстракта добијеног из плодова *Crataegus nigra*.

2.2. Хипотезе

- Постоје значајне разлике у времену проведеном у отвореним крацима лавиринта, као и у броју улазака у отворене краке, између групе мишева изложене екстракту црног глога и контролне групе мишева.
- Постоје значајне разлике у величини зоне инхибиције раста патогених микроорганизама при коришћењу екстракта црног глога и негативне контроле.

- Постоје значајне разлике у дужини спавања између група мишева изложених и не изложених екстракту црног глога.
- Фенолна једињења представљају главне састојке екастраката плодова црног глога.



Crataegus nigra Wald. Et Kit., *Rosaceae* – црни глог. Село Сусек код Новод Сада.

3. Материјал и методе

3.1. Припрема узорка

3.1.1. Биљни материјал

Плодови *Crataegus nigra* су сакупљани у јесен, септембар 2010 године, као зрели, црни плодови. Станиште са кога је узет материјал је село Сусек у близини Беочина, место поред Новог Сада. На станишту поред црног глога биле су и друге биљне врсте, тополе и врбе. Плод црног глога је сушен на промајном месту заштићеном од директне сунчеве светлости, 10 дана. До израде екстракта чуван је у фрижидеру на температури 6-8⁰С. Непосредно пред израду екстракта је самлевен, и тако осушен и самлевен коришћен за израду екстракта.

3.1.2. Методе екстракције

Да би из неког материјала, биљног, животињског или пак минералног порекла добили корисне материје неопходно их је на одговарајући начин изоловати односно извући из основног материјала. Такође је важно да се у што већој количини изолују активне материје и лековити принципи а да се при томе издвоји што мање баластих материја. У ове сврхе нам служи екстракција.

Екстракција је операција у току које се активни принципи процесом дифузије изолују из неког чврстог материјала или течности помоћу одговарајућег растварача. Циљ екстракције је да се активна компонента помоћу растварача повуче из материјала у коме се налази а потом одстрањивањем растварача активна компонента добије у чистом стању. Екстракција компоненте коју желимо да изолујемо заснива се на њеној дифузији из унутрашњости материјала (биљног, животињског...) у растватрач. Растварач је у сталном додиру са честицама материјала из кога се врши екстракција и треба да буде селективан према активном принципу који се изолује. Процес траје докле год постоји разлика у концентрационом градијенту супстанце коју желимо да изолујемо из материјала (из кога се врши екстракција) и растварача којим се екстракција врши. У тренутку започињања екстркције, највећа концентрација активног принципа је у материјалу из кога се врши екстракција док је у растварачу, којим се врши екстракција, концентрација једнака нули. Већ након кратког времена започиње процес дифузије. Активни принцип из подручја веће

концентрације, прелази у подручје ниже концентрације (растварач) на основу концентрационог градијента. Све док постоји ова разлика у концентрацији активног принципа, активна компонента ће кроз гранични слој дифундовати из материјала у растварач. У тренутку када се изједначе концентрације жељене супстанце у растварачу и материјалу из кога се изолује, процес дифузије стаје (75).

На брзину екстракције утичу:

- Величина граничне, односно додирне површине растварача и честица материјала
- Дебљина граничног слоја око честица
- Температура система

Брзину екстракције можемо представити математичким изразом:

$$m/t = \beta_t \times A (c_m - c_0)$$

(где је m/t количник масе изоловане супстанце у јединици времена, односно брзина екстракције;

β_t коефицијент преноса супстанце кроз гранични слој;

A додирна површина; c_m максимална концентрација супстанце у честицама материјала у тренутку додира са растварачем;

c_0 концентрација супстанце у растварачу у тренутку додира

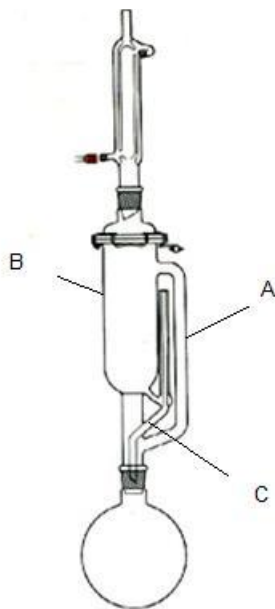
Брзина екстракције је утолико већа уколико је температура екстракције већа (долази до веће покретљивости честица). Такође, брзина се повећава са повећањем додирне површине (додирна површина значајно је већа код уситњеног материјала него код исте количине материјала у једном комаду) и наравно, што је већа разлика у концентрацијама већа је и брзина дифузије. Управо због овога је и ефикасност екстракције већа уколико се поступак понови више пута, односно уколико се екстракција спроведе више пута са мањом количином растварача него једанпут са већом. Такође су врло битни мућкање, мешање и слично како би се додирна површина повећала а гранични слој који се најпре засити измешао са остатком растварача (3).

Екстракција активних супстанци из чврсте фазе може се изводити на собној температури, када говоримо о мацерацији и перколацији, или на повишеној температури. На повишеној температури може се извести загревањем са растварачем у апаратури са

повратном воденом паром (рефлукс) а затим се још врућ раствор декантира или филтрира. Друга метода екстракције при повишеној температури је континуирана и вишекратна и изводи се у Сокслет апарату.

Екстракција у Сокслет апарату се изводи на следећи начин.

У фишек од филтер-папира се стави уситњени материјал из кога ће се вршити екстракција. Фишек се постави у унутрашњи простор екстрактора и затвори ватом. Паре растварача, које се загревавају у балону, пролазе кроз бочну цев екстрактора и кондензују се у хладњаку. Кондензовани растварач пада на фишек са уситњеним материјалом, постепено се пуни унутрашњи простор Сокслет апарата и истовремено се екстрахује активна(е) компонента(е) из материјала. Екстракт услед овога постаје све јаче обојен. Када се простор В и цевчица С напуне до највише тачке, екстракт се по принципу спојених судова прелива у тиквицу (балон). Поступак се понавља док активни принципи из материјала нису потпуно екстраховани, односно до безбојног екстракта у простору В. С друге стране у тиквици се повећава концентрација екстраховане супстанце што се види по све јачој обојености екстракта (75).



Слика 2. Слика сокслетовог апарата.

Приликом одабира растварача који се користи за екстракцију активних принципа било из течне или чврсте фазе мора се водити рачуна о неколико захтева које он мора да

испуни. Најпре растварач мора да буде селективан према активном принципу који желимо да извучемо, а да се што мање нежељених компоненти из материјала повуче са активним принципом (баласте материје). Растварач би требало да има ниску температуру кључања, како би се активни принципи заштитили од високих температура и могуће разградње код упаравања растварача. Да је неагресиван за(на) апаратуру и да не буде токсичан. Као растварачи се углавном користе вода, етанол, бензол, ацетон...

3.1.3. Добијање сувог екстракта

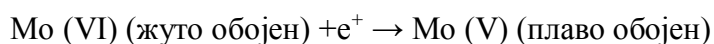
Ранија фармаколошка и фитохемијска испитивања екстракта других врста глога су показала да флавоноиди спадају у важну групу природних једињења која представљају носиоце фармаколошке активности. Флавоноиди су добро растворљиви у поларним растварачима и обично се из биљног материјала екстрахују помоћу метанола, етанола или ацетона у различитим степенима разблажења (76). Ми смо користили етанол као растварач за екстракцију пошто се у фармацеутској индустрији за припремање биљних препарата најчешће користи етанол. Етанол је могуће користити у различитим степенима разблажења од 40-96%. Квантитативно одрживање садржаја флавоноида: рутина, витексина, хиперозида и хлорогене киселине су показала да је најбоље користити 70% етанол као растварач. Међутим, како је у већини истраживања, где су испитивана фармаколошка својства различитих врста глога, коришћен 80% етанол и како је квантитативни садржај флавоноида врло близак из 70% и 80% водено-етанолног екстракта, и овде је екстракција вршена са 80% етанолом (77). Сходно томе да флавоноиди представљају термо стабилна једињења, до 100°C, екстракција је вршена на 80°C, ради бржег и бољег дифундовања активних принципа из биљног материјала у растварач.

Екстракција је обављена на Сокслетовом уређају. За екстракцију је коришћено 90g осушене и уситњене биљке и 500ml 80% етанола. Екстракција се вршила 12h на 80°C. Након тога екстракт је остављен на мрачном месту 24h, како би се исталожиле баласте материје. Потом је вршена филтрација кроз филтер папир. Овако добијен екстракт је упараван на ротационом вакуум упаривачу на 40°C.

3.2. Хемијска анализа екстракта *C. nigra*

3.2.1. Одређивање укупних фенола

Садржај укупних фенола је одређиван стандардном методом модификованој за рад на микропловама уз употребу галне киселине као референтног стандарда (78,79). Одређивање се заснива на примени Folin-Ciocalteu реагенса (FC). Овај реагенс представља смешу натријум молибдата и натријум волфрамата који у присуству фосфорне киселине и осталих компоненти реакције прелазе у смешу фосфоволфрамове и фосфомолибденске киселине. У присуству фенолних једињења долази до редукције овог реагенса до смеше волфрам-оксида и молибден-оксида, при чему се фенолна једињења оксидишу. Услед настанка (фенол- $\text{MoW}_{11}\text{O}_{40}$)⁴⁻ јона долази до промене боје (FC) реагенса из жуте у плаву.



Настала плава боја је стабилна и њен интензитет је сразмеран количини фенолних једињења. Интензитет боје је одређиван спектрофотометријски на таласној дужини од 760 nm.

3.2.1.1. Раствори и реагенси

1. FC реагенс (Fisher Scientific, UK) 0,1M раствор.
2. Раствор натријум карбоната (Analytika, Чешка република) концентрације 75 g/l.
3. Гална киселина (Sigma Aldrich, Немачка) концентрације 1 mg/ml.
4. Екстракт плодова црног глога је припремљен у четири различите концентрације 0,5; 0,25; 0,125; и 0,0625 mg/ml.

За потребе овог истраживања Folin-Ciocalteu реагенс је припремљен одмеравањем 1,25 ml 2 M FC реагенса у одмерни суд од 25 ml и потом допуњен дестилованом водом. Раствор натријум карбоната је припремљен растварањем 1,875 g анхидрованог Na_2CO_3 у 25 ml дестиловане воде уз загревање док се целокупна количина соли није растворила. Потребна концентрација галне киселине, која је коришћена у студији је добијена одмеравањем 25 mg галне киселине у нормални суд од 25 ml и потом је суд допуњен дестилованом водом. Потребне концентрације екстракта плодова црног глога су добијене одмеравањем 5 mg сувог екстракта у нормални суд од 10 ml допуњен дестилованом

водом. На овај начин је добијен раствор концентрације 0,5 mg/ml. Од овог раствора је узето 5 ml пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено дестилованом водом. Овако је добијена концентрација од 0,25 mg/ml. На исти начин су добијена и остала потребна разблажења.

3.2.1.2. Поступак

Калибрациона крива. У циљу конструкције калибрационе криве направљено је једанаест разблажења стандардног раствора галне киселине. Апсорбанца добијених раствора је мерена на 760 nm таласне дужине. График зависности апсорбанце од масене концентрације галне киселине који представља калибрациону криву, конструисан је на основу добијених вредности апсорбанци. Од предходно направљеног стандардног раствора концентрације 1 mg/ml одмерен је 1 ml и пренешен у нормални суд од 10 ml потом је суд допуњен дестилованом водом. Овако је добијен раствор концентрације 0,1 mg/ml. Од овог раствора је узето једанаест оговарајућих запремина (10,0; 8,0; 6,0; 5,0; 4,0; 3,0; 2,0; 1,0; 0,02; 0,012; 0,06 ml) како би се добила потребна разблажења за конструкцију калибрационе криве. Ове запремине галне киселине су одмерене у нормалним судовима од 10 ml и сваком нормалном суду су додати FC реагенс (0,25 ml) и натријум карбонат (1 ml). На крају је нормални суд допуњен дестилованом водом до црте.

Радна проба. У циљу добијања радне пробе одмерено је 30 μ l екстракта и 150 μ l FC реагенса у рзервоаре микроплоча. Након 6 минута инкубације додато је 120 μ l натријум карбоната.

Корекција. Корекција је рађена као би се елиминисао утицај боје на резултате мерења. У рзервоаре микроплоча одмерено је 30 μ l екстракта и 150 μ l дестиловане воде. Након инкубације од 6 минута додато је 120 μ l натријум карбоната.

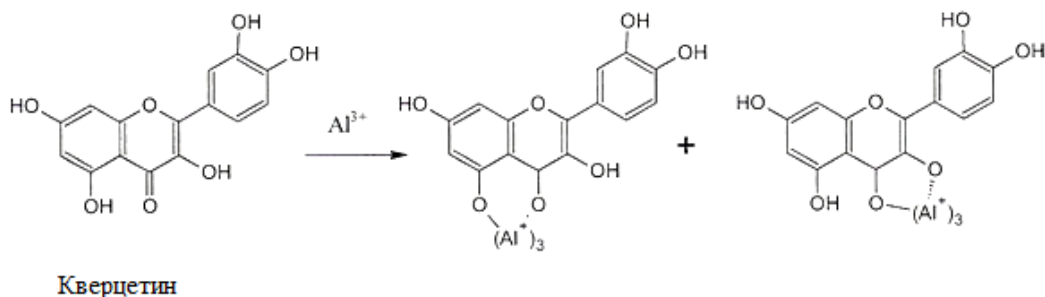
Слепа проба. У рзервоаре микроплоче одмерено је 30 μ l дестиловане воде и 150 μ l FC реагенса. Након 6 минута инкубације додато је 120 μ l натријум карбоната. Након 2 сата, колико је потребно да се развије боја мерене су апсорбанце на спектрофотометру Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) на таласној дужини 760 nm. За сваку концентрацију одређивање се вршило у три понављања.

Калибрациона крива је конструисана на основу измерених вредности апсорбанци разблажења стандардног раствора галне киселине. Свака вредност је приказана као средња вредност три мерења коригована за вредности апсорбанце слепе пробе и

корекције. Уз помоћ калибрационе криве израчуната је масена концентрација ($\mu\text{g/ml}$) полифенолних једињења коришћењем једначине праве $A = 0,065c_{\text{концентрација галне киселине}} (\mu\text{g/ml}) + 0,025$, $n = 7$, $R = 0,998$. Садржај полифенолних једињења је изражен као еквивалент галне киселине, док садржај укупних фенола се изражава као милиграми еквивалената галне киселине по 1g сувог екстракта.

3.2.2. Одређивање садржаја укупних флавоноида

Садржај укупних флавоноида одређиван је стандардном колориметријском методом адаптираном за рад на микропловама (79, 80, 81). Флавоноиди и флавоноидни гликозиди имају особину да са јонима метала, као што је Al^{3+} јон дају одговарајуће метало-комплексе, услед чега долази до апсорпције различитих таласних дужина светлости, што се манифестује променом боје раствора и преласка из жуте у жутозелену. Слика 3.



Слика 3. Настајање обојеног комплекса Al^{3+} јона и флавоноида

За извођење експеримента коришћен је AlCl_3 као реагенс, а интензитет боје је одређиван спектрофотометријски на таласној дужини од 415 nm. Количина укупних флавоноида у испитиваном екстракту је одређена на основу калибрационе криве израђене уз помоћ серије разблажења раствора кверцетина и изражена у mg еквивалента кверцетина по 1 g сувог екстракта.

3.2.2.1. Раствори и реагенси

1. AlCl_3 (Centrophem, Србија) концентрације 0,75 mol/l.
2. CH_3COONa (Centrophem, Србија) концентрације 1 mol/l CH_3COONa .

3. Кверцетин (Sigma-Aldrich, Немачка) концентрације 0,5 mg/ml.
4. Екстракт плодова црног глога припремљен је у пет различитих концентрација 10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml и 0,625 mg/ml.
5. Диметилсулфоксид (DMSO) чистоће $\geq 99,9\%$ (Sigma Aldrich, Немачка)

За потребе овог истраживања раствор AlCl_3 је припремљен растварањем 4,5 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ у 25 ml дестиловане воде. Стандардни раствор кверцетина је добијен одмеравањем 12,9 mg кверцетин-хидрата у нормални суд од 25 ml и његовим допуњавањем метанолом. Добијени раствор је концентрације 0,5 mg/ml кверцетин хидрата, односно 0,464 mg/ml безводног кверцетина. Из овог раствора се припремају остала разблажења помоћу којих је конструисана калибрациона крива. Испитиване концентрације екстракта су добијене растварањем 100 mg сувог екстракта дестилованом водом у нормалном суду од 10 ml. Овако добијен раствор је концентрације од 10 mg/ml. Потом је 5 ml овог раствора пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено водом. На овај начин је добијена концентрација од 5 mg/ml. На исти начин су добијена и остала потребна разблажења.

3.2.2.2. Поступак

Калибрациона крива. У циљу конструкције калибрационе криве коришћено је једанаест разблажења стандардног раствора кверцетина. Апсорбанца раствора је мерена на 415 nm таласне дужине. График зависности апсорбанце од масене концентрације кверцетина који представља калибрациону криву, конструисан је на основу добијених вредности апсорбанци. Од предходно направљеног стандардног раствора концентрације 0,5 mg/ml одмерене су одговарајуће запремине (1,38; 1,15; 0,92; 0,74; 0,55; 0,46; 0,37; 0,28; 0,18; 0,09; 0,009 ml) и пренешене у нормалне судове од 5 ml. Уз додатак метанола нормални судови су допуњени до црте. Потом је 1 ml раствора кверцетина одговарајуће концентрације пренешен у нормални суд од 10 ml а затим су додати раствори DMSO-а, алуминијум хлорида и натријум ацетата. Нормални суд је потом допуњен до црте дестилованом водом.

Радна проба. Радна проба је припремљена одмеравањем 30 μl екстракта одговарајуће концентрације, 90 μl метанола и 30 μl DMSO. Потом је овај садржај измешан и остављен 6 минута након чега је додат раствор 6 μl $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 μl CH_3COONa и 140 μl воде.

Корекција. Ради елиминисања утицаја боје ради се корекција. Раствори се припремају исто као за радну пробу само се уместо 6 μl $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ додаје 6 μl воде.

Слепа проба. За слепу пробу направљен је раствор од 30 μl DMSO, 90 μl метанола, 6 μl $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 μl CH_3COONa и 170 μl воде.

На спектрофотометру Multiskan Spectrum (Thermo Corporation) на таласној дужини од 415 nm је мерена апсорбанца припремљених проба. За сваку концентрацију мерење се вршило три пута.

Калибрациона крива је конструисана на основу измерених вредности апсорбанци разблажења стандардног раствора кверцетина. Свака вредност је приказана као средња вредност три мерења коригована за вредности апсорбанце слепе пробе и корекције. Уз помоћ калибрационе криве израчуната је масена концентрација ($\mu\text{g}/\text{ml}$) укупних флавоноида коришћењем једначине праве $A = 0,045c_{\text{кверцетина}} (\mu\text{g}/\text{ml}) - 0,024$, $n = 11$, $R = 0,998$. Садржај укупних флавоноида је изражен као милиграми еквивалената кверцетина по 1g сувог екстракта.

3.2.3. Одређивање садржаја кондензованих танина (проантоцијанидина)

Кондензовани танини или проантоцијанидини су полимери који се састоје од мономерних јединица флаван-3-ол, као што су катехин или епикатехин. За одређивање садржаја кондензованих танина коришћена је стандардна метода (82). Ова метода се базира на киселој хидролизаци полимерних молекула процијанидина са хлороводоничном киселином, при чему настају цијанидини. Ова реакција је праћена појавом црвеног обојења чији се интензитет мери спектрофотометријски на таласној дужини од 550 nm (Cecil CE 2021). Додатак јона Fe^{3+} побољшава поновљивост и осетљивост методе.

3.2.3.1. Раствори и реагенси

1. Ацетон (JT Baker, USA) 70% раствор.
2. Butanol-HCl реагенс.
3. Fe^{3+} регенс.
4. Цијанидин хлорид (Carl Roth).
5. Екстракт је припремљен у четири радне концентрације 0,5; 0,25; 0,125 и 0,0625 mg/ml.

Раствор 70% ацетона је добијен одмеравањем 70 ml ацетона у одмерни суд од 100 ml и његовим допуњавањем дестилованом водом. Butanol-HCl реагенс је добијен одмеравањем 95 ml n-битанола (Poch) у нормалном суду од 100 ml који је допуњен са 5 ml HCl (Lach Ner). Fe^{3+} реагенс је добијен одмеравањем 4,15 ml HCl у нормалном суду од 25,0 ml и суд је допуњен дестилованом водом. Овако је добијена концентрација HCl од 2 mol/dm^3 . Након овога је одмерено и у припремљеном раствору HCl растворено 0,25 g гвожђе(III)-амонијум-сулфата (Merck-Alkaloid). Добијени реагенс је чуван у тамној боци. Стандардни раствор цијанидин хлорида је припремљен растварањем 10 mg цијанидин хлорида у 1 ml 50% метанола (J.T.Baker, USA). За припрему радних концентрација екстракта растворено је 100 mg сувог екстракта у 10 ml 70% ацетона. Овако је добијена концентрација од 10 mg/ml. Од ове концентрације су даље добијене и све остале радне концентрације екстракта.

3.2.3.2. Поступак

Калибрациона крива. Калибрациона крива, односно график зависности апсорбанце од масене концентрације цијанидин хлорида је конструисана на основу добијених вредности апсорбанције седам разблажења стандардног раствора цијанидин хлорида. У нормални суд од 200 ml је одмерен 1 ml стандардног раствора цијанидин хлорида концентрације 10 mg/ml и суд је допуњен 70% ацетоном до црте. Концентрација овако добијеног раствора је 50 $\mu\text{g/ml}$. Од овог раствора је одмерено 5 ml и пренето у нормални суд од 10 ml. Потом је суд допуњен до црте 70% ацетоном. На исти начин су урађена и остала разблажења. Добијени раствори имају следеће концентрације: 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78 $\mu\text{g/ml}$. Од сваког раствора је узето 0,5 ml, а потом додато 3,0 ml бутанол хлорида и 0,2 ml гвожђе амонијум сулфата. Након мешања раствора мерена је апсорбанца на 550 nm.

Радна проба. Радна проба је припремљена мешањем 0,5 ml екстракта, 3,0 ml бутанол хлорида и 0,2 ml гвожђе амонијум сулфата.

Корекција. Корекција је урађена на исти начин као и радна проба с тим што је уместо реагенса бутанол хлорида додато 3,0 ml 70 % ацетона.

Слепа проба. Слепа проба је припремљена на исти начин као и радна проба само што је уместо екстракта коришћено 0,5 ml 70 % ацетона.

Радне и слепе пробе су инкубирани у воденом купатилу на 95°C 40 min, након чега су извађене и охлађене 5 min у хладној води. Корекције су инкубирани 40 min. на собној температури. Абсорбанција свих узорка је читана на 550 nm а све пробе су рађене у три понављања.

На основу измерених апсорбанци са калибрационе криве цијанидина одређена је масена концентрација ($\mu\text{g/ml}$) кондензованих танина коришћењем једначине праве $A = 0,1089c_{\text{цијанидин}} - 0,0021$; $n = 7$; $R = 0,999$ а затим је садржај танина изражен као еквивалент цијанидина. Кондензовани танини су представљени као милиграми еквивалента цијанидина по граму сувог екстракта.

3.2.4. Квалитативно и квантитативно одређивање фенола

Квалитативан и квантитативан садржај фенолних једињења у испитиваном етанолном екстракту црног глога одређиван је техником течне хроматографије високе резолуције (ХПЛЦ) на апарату Agilent Technologies 1200 серије, USA. Коришћена је колона Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm, 1.8 μm). Детекција раздвојених пикова је извршена помоћу масеног спектрометра (LC-MS-MS) са електроспреј јонским извором (ESI) (Agilent Technologies 6410A TripleQuad, USA). Као мобилна фаза коришћен је систем растварача А = 0,05 % HCOOH и Б = MeOH, чији је проток 1 ml/мин. Раздвајање компоненти је изведено применом следећег линеарног градијента: 0-6 мин 30 % Б, 6 мин 70 % Б, 9-12 мин 100 % Б, задњих 3 мин 30% Б. Ињектовано је 5 μl раствора узорка (екстракта, односно раствора стандарда). Колона је термостатирана на 50°C. За ХПЛЦ одређивања су коришћени раствори екстракта масених концентрација од 20 mg/ml и 2 mg/ml, припремљени растварањем у смеси метанола и 0,05% мравље киселине у односу 1:1. За идентификацију супстанци у екстракту коришћени су референтни стандарди 45 супстанци (Fluka chemie AG, Швајцарска), који су примењени је у опсегу концентрација од 1,5 ng/mL до 25 $\mu\text{g/ml}$. Добијени резултати анализирани су употребом софтвера (MassHunter Workstation Software - Qualitative Analysis (B.03.01)).

Фенолне компоненте присутне у екстракту црног глога су идентификоване поређењем њихових ретенционих времена и спектра са ретенционим временом и спектром стандарда за сваку компоненту. Коришћени стандарди, као и њихова ретенциона времена су приказани у табели 3. За квантификацију једињења у узорцима коришћене су калибрационе криве. За сваки појединачни стандард је конструисана калибрациона крива

на основу добијених површина пикова у зависности од масене концентрације стандарда. Из добијене једначине линеарне зависности одговарајућег стандарда израчунате су масене концентрације компоненти у узорку.

Табела 3. Стандарди коришћени у квалитативној анализи екстракта црног глога

<i>Једињење</i>	<i>M_w</i>	<i>t_R</i> <i>[min]</i>	<i>V_f</i> <i>[V]</i>	<i>m/z</i> <i>prekurso</i> <i>ra</i>	<i>m/z</i> <i>produkta [V]</i>	<i>V_{col}</i>
<i>Хинска киселина</i>	<i>192</i>	<i>0,52</i>	<i>150</i>	<i>191</i>	<i>85</i>	<i>20</i>
<i>Гална киселина</i>	<i>170</i>	<i>0,58</i>	<i>90</i>	<i>169</i>	<i>125</i>	<i>10</i>
<i>Катехин</i>	<i>290</i>	<i>0,74</i>	<i>150</i>	<i>289</i>	<i>245</i>	<i>10</i>
<i>Протокатехинска киселина</i>	<i>154</i>	<i>0,79</i>	<i>105</i>	<i>153</i>	<i>109</i>	<i>9</i>
<i>5-О-кафеоилхинска киселина</i>	<i>354</i>	<i>0,8</i>	<i>100</i>	<i>353</i>	<i>191</i>	<i>10</i>
<i>Епигалокатехин галат</i>	<i>458</i>	<i>0,81</i>	<i>165</i>	<i>457</i>	<i>169</i>	<i>16</i>
<i>Епикатехин</i>	<i>290</i>	<i>0,95</i>	<i>150</i>	<i>289</i>	<i>245</i>	<i>10</i>
<i>Гентизинска киселина</i>	<i>154</i>	<i>1,03</i>	<i>100</i>	<i>153</i>	<i>109</i>	<i>9</i>
<i>n-хидроксибензоева киселина</i>	<i>138</i>	<i>1,08</i>	<i>80</i>	<i>137</i>	<i>93</i>	<i>10</i>
<i>Ескулетин</i>	<i>178</i>	<i>1,13</i>	<i>105</i>	<i>177</i>	<i>133</i>	<i>15</i>
<i>Кафена киселина</i>	<i>180</i>	<i>1,18</i>	<i>100</i>	<i>179</i>	<i>135</i>	<i>10</i>
<i>Ванилинска киселина</i>	<i>168</i>	<i>1,24</i>	<i>100</i>	<i>167</i>	<i>108</i>	<i>15</i>
<i>Сирингинска киселина</i>	<i>198</i>	<i>1,31</i>	<i>90</i>	<i>197</i>	<i>182</i>	<i>7</i>

<i>p</i> -кумаринска киселина	164	1,69	90	163	119	9
Умбелиферон	162	1,73	120	161	133	19
Скополетин	192	1,77	80	191	176	8
Ферулна киселина	194	1,9	90	193	134	11
Витескин	432	1,9	200	431	311	22
Синапинска киселина	224	1,92	100	223	193	17
Цинарозид	448	2,13	230	447	285	30
Хиперозид	464	2,16	200	463	300	30
Изокверцетин	464	2,25	210	463	300	30
Рутин	610	2,33	135	609	300	42
Апигин	564	2,6	250	563	269	36
o-кумаринска киселина	164	2,62	100	163	119	5
Мирицетин	318	2,67	150	317	179	20
Кверцетин	448	2,75	190	447	300	27
Астрагалин	448	2,8	190	447	284	30
Косметин	432	2,81	135	431	268	41
Секоизоларицирезинол	362	2,9	130	361	165	26
3,4-диметоксициметна киселина	208	2,99	110	207	103	7
Бајкалин	446	3,4	140	445	269	22
Даидзеин	254	3,43	145	253	208	31

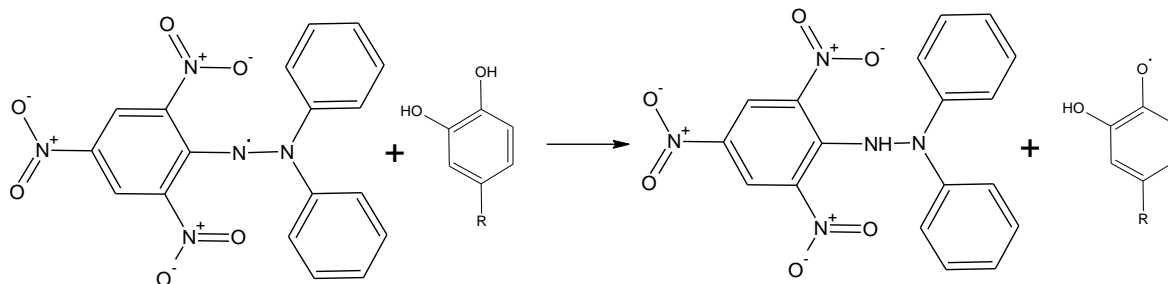
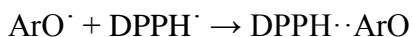
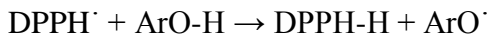
<i>Матаирезинол</i>	358	3,66	130	357	122	24
<i>Кверцетин</i>	302	3,74	130	301	151	15
<i>Нарингенин</i>	272	3,87	130	271	151	16
<i>Циметна киселина</i>	148	3,91	100	147	103	5
<i>Лутеолин</i>	286	4,03	135	285	133	25
<i>Генистеин</i>	270	4,12	145	269	133	32
<i>Кемферол</i>	286	4,55	130	285	285	0
<i>Апигенин</i>	270	4,71	130	269	117	25
<i>Изорамнетин</i>	316	4,79	160	315	300	21
<i>Кризоериол</i>	300	4,82	125	299	284	20
<i>Бајкалеин</i>	270	5,15	165	269	269	0
<i>Аментофлавон</i>	538	5,78	220	537	375	35

M_w – молекулска маса једињења; t_R – ретенционо време; V_f – напон фрагментора [V];

V_{col} – колизионни напон

3.2.5. Одређивање антиоксидативне активности DPPH методом

Ово је спектрофотометријска метода. Антирадикалско деловање испитиваног екстракта праћено је мерењем његове способности да неутралише стабилни 1,1-дифенил-2-пикрилхидразил (DPPH[•]) радикал (83). Применом DPPH теста праћена је способност екстракта да делује као дозор атома Н или електрона стабилним DPPH[•] радикалима. Том приликом љубичасто обојени раствор DPPH[•] слободног радикала је преведен у његову редуковану (DPPH-H) форму жуте боје. Фенолна једињења из екстракта представљају дозоре атома Н, тако да редукују DPPH[•] радикал и преводе га у DPPH-H облик. Овом приликом настаје и арилокси радикал који може да реагује са још једним DPPH[•] радикалом при чему долази до кондензације и ствара се неутралан молекул. Слика 4.



Слика 4. Механизам хватања DPPH^\cdot радикала помоћу фенолних једињења.

Интензитет жутог обојења се мери спектрофотометријски на таласној дужини од 515 nm (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific).

3.2.5.1. Раствори и реагенси

1. DPPH реагенси:

- Основни раствор DPPH, 3 mM ($c=1,18 \mu\text{mol/ml}$).
- Радни DPPH реагенс 67,2 μM ($c=26,4 \mu\text{g/ml}$).

2. Раствори стандардних једињења:

- 2010 $\mu\text{g/ml}$ бутилованог хидрокси толуола (Alfa Aesar) (BHT)
- 500 $\mu\text{g/ml}$ бутилованог хидрокси анизола Ph Eur, NF, E 320 (Merck) (BHA)
- 461 $\mu\text{g/ml}$ кверцетина (Aldrich)
- 470,3 $\mu\text{g/ml}$ рутина (Fluka)
- 552 $\mu\text{g/ml}$ пропил-галат (Alfa Aesar) (PG)

3. Испитивани екстракт је припремљени у седам различитих концентрација 5,0; 2,5; 1,25; 0,625; 0,313; 0,156; 0,078 mg/ml.

Основни раствор DPPH, припремљен је одмеравањем 11,8 mg DPPH реагенса (Fluka, Швајцарска) у нормалном суду од 10 ml. Након тога је суд допуњен апсолутним етанолом (Зоркафарма, Србија) до црте. Овај реагенс је стабилан две недеље и чува се у мраку. Радни DPPH реагенс је припремљен на дан мерења разблаживањем основног

раствора. У нормални суд од 25 ml је пренето 560 μ l основног DPPH реагенса а потом је суд допуњен метанолом (J.T. Baker, USA). Разблажења стандардних једињења за потребе DPPH теста, припремљена су у диметилсулфоксиду (Sigma Aldrich, Немачка). Почетне концентрације испитиваног екстракта су направљене на следћи начин: одмерено је 50 mg сувог екстракта и потом је нормални суд од 10 ml допуњен са DMSO. Овако је добијен раствор концентрације 5 mg/ml. Даље је од овог раствора узето 5 ml, пренето у нормални суд од 10 ml и допуњено водом до црте. Тако је добијена концентрација од 2,5 mg/ml. На овј начин су добијена и остала разблажења.

3.2.5.2. Поступак

За одређивање антиоксидативне активности поступак испитивања је следећи:

Радна проба. Радна проба представља смешу 100 μ l радног раствора DPPH, 10 μ l екстракта, 190 μ l метанола.

Корекција. Корекцију представља смеша 10 μ l екстракта и 290 μ l метанола. Апсорбанца овог раствора се користи за корекцију боје екстракта.

Контрола. Контрола је смеша 100 μ l радног раствора DPPH, 10 μ l DMSO и 190 μ l метанола.

Све припремљене смеше су одстајале 60 мин на собној температури. Апсорбанца добијених раствора је мерена на спектрофотометру (Multiskan Spectrum, Thermo Scientific) на 515 nm. Све пробе су рађене у три понављања.

За сваку концентрацију екстракта израчунат је капацитет хватања DPPH радикала (RSC% - Radical Scavenging Capacity) према формули:

$$RSC\% = 100 \cdot (1 - (\bar{A}_{\text{проба}} - A_{\text{корекција}}) / \bar{A}_{\text{контрола}})$$

где је:

RSC% - способност хватања радикала (процент неутралисаних DPPH радикала)

$\bar{A}_{\text{проба}}$ - средња вредност апсорбанце радних проба за дату концентрацију

$A_{\text{корекција}}$ - апсорбанца корекције за дату концентрацију

$\bar{A}_{\text{контрола}}$ - средња вредност апсорбанце контролних проба

За сваки испитани узорак графички је представљена зависност процента неутралисаних DPPH радикала од радне концентрације екстракта. Радна концентрација

екстракта је концентрација екстракта у резервоару микроплоче, а однос почетне и радне концентрације види се из следеће формуле:

$$C_{\text{радна}} = 1000 \cdot C_{\text{почетна}} \cdot V_{\text{ек}} / V_{\text{ук}} = 33,33 \cdot C_{\text{почетна}}$$

где је:

$C_{\text{радна}}$ - концентрација екстракта у резервоару микроплоче ($\mu\text{g/ml}$)

$C_{\text{почетна}}$ - концентрација разблаженог екстракта која је одмерена у резервоару (mg/ml)

$V_{\text{ек}}$ - запремина екстракта у резервоару

$V_{\text{ук}}$ - запремина реакционе смеше у резервоару, 300 μl

1000- фактор конверзије mg/ml у $\mu\text{g/ml}$.

Методом најмањих квадрата је одређена једначина праволинијске зависности RSC% од концентрације ($\mu\text{g/ml}$). Антиоксидативна активност је изражена преко IC_{50} што представља концентрацију екстракта ($\mu\text{g/ml}$) / стандарда потребну за неутралисање 50% DPPH радикала у *in vitro* условима. Што је вредност IC_{50} мања то је антиоксидативна активност екстракта већа.

Једначина праволинијске зависности се одређује за сваки узорак. Вредности IC_{50} се добијају преко одговарајуће једначине праве или читавањем директно са графика.

Коришћени стандарди: ВНТ-а, ВНА, кверцетин, рутин и РГ су испитивани на исти начин као и узорци. Испитивања су рађена у седам различитих концентрација, а из добијених једначина праве су очитане одговарајуће IC_{50} вредности.

3.3. Испитивање анксиолитичке и хипнотичке активности *C. nigra*

3.3.1. Методе испитивања анксиолитичке активности

Испитивања на експерименталним животињским моделима представљају основ предклиничких истраживања психијатријских поремећаја. Они се користе не само у циљу испитивања нових терапијских агенаса већ и као симулације за дефинисање основних механизма. Постоји преко тридесет модела анксиозности. Међутим најчешће се користе бихејвиорални модели. Код ових модела страх код животиње може бити повезан са неким раније увежбаним рефлексом или пак то може бити спонтана реакција на дати стимулус (стање које изазива страх) (84, 85).

Валидност ових модела је потврђена код коришћења бензодиазепина (најпре диазепама). Он представља „златни стандард“. Дакле све супстанце које делују преко GABA_A рецептора као и бензодиазепини, могу се успешно анализирати на овим моделима. Код људи се анксиозност најпре манифестује променом понашања (несаница, бежање, избегавање, не вербална комуникација...) (86); међутим и животиње показују слично понашање у анксиозним стањима, тако да се може рећи да су људске и животињске реакције аналогне, чиме се обезбеђује неопходна валидност за животињски модел (87,88). Животиње карактерише врло опрезан приступ делу где је боравио или борави предатор (извор опасности). Ово понашање обухвата испитивање области одакле долази опасност и то из дела где се животиња осећа сигурно (отвор тунела); протезање у пљоснатом положају усмерено ка делу где је опасност или протезање у пљоснатом положају и кретање ка поновном уласку у опасно подручје (89)...

Постоји више врста модела за испитивање анксиозности:

Отворено поље, животиња се ставља у непознату средину оивичену зидовима. Повећање анксиозности доводи до смањења односа број улазака животиње у центар квадранта наспрам броја улазака на периферију квадранта (90).

Светлост/тама, овде мишеви слободно истражују два међусобно повезана простора који се међусобно разликују по површини (2:1), боји (бело : црно) и осветљењу (јако : загушено) (91).

Тест четири – плоче, животиња прелази преко пода (састоји се од четири тањира) кроз који се пропушта блага струја. Ово доводи до супресије истраживачког понашања мишева (92).

Изненадно реаговање животиње изазвано страхом, заснива на Павловљевом рефлексу код мишева (93).

Подигнути крстасти лавиринт

Један од најкоришћенијих тестова за испитивање анксиозности код животиња је подигнути крстасти лавиринт (94). Данас се најчешће у овом моделу користе мишеви као експерименталне животиње. Овај модел је у почетку најпре развијен за испитивање анксиозности код пацова, да би се касније стандардизовао и за друге врсте, заморце, волухарице, хрчке. Развијено је неколико облика ЕПМ (подигнути крстасти лавиринт). То су подигнути Т лавиринт, zero лавиринт, unstable elevated exposed plus maze (UEEPM),

који је скорије утврђен као модел за испитивање екстремне анксиозности код пацова, има четири крака која осцилирају у хоризонталној равни (95).

ЕПМ у форми „плус“ лавиринта се састоји од два отворена, подигнута крака постављена један наспрам другог а раздвојена централним квадратастим пољем и два крака истих димензија али затворених зидовима. Лавиринт је подигнут од земље, тако да је извор анксиозности на отвореним крацима комбинација неколико елемената непознатог, отвореног и подигнутог простора. Овај модел за испитивање анксиозности се код глодара заснива на природном страху и тенденцији избегавања отвореног простора, користи се унутрашња борба између жеље за истраживањем и аверзије од отвореног, подигнутог простора.

Експериментални мишеви до извођења експеримента бораве у кавезима. Тако да је природно понашање да избегавају отворени простор и показују јаку жељу да се нађу у затвореним крацима. У скалду са кретањем мишева, простор у лавиринту се може поделити у неколико делова. Мишеви највећу тенденцију имају да се нађу у затвореном простору, па у центру и на крају у отвореним крацима. Овакво понашање је у складу са њиховим доживљајем сигурне средине, односно сигурности простора у коме се крећу. Под дејством анксиолитика, је овај тренд (затворени простор, центар и на крају отворени простор) смањен, док се под дејством анксиогених супстанци повећава. Као мера анксиозности узима се број улазака у отворене краке, број улазака у отворене краке изражен у процентима у односу на укупан број улазака и време проведено у отвореним крацима. Поједини аутори посматрају још неке параметре у циљу добијања свеобухватнијег профила понашања мишева у лавиринту. Ова мерења укључују узгој, присуство САП положаја (stretched attend posture, положај у коме је миш истегнут, то је заправо истраживачки положај у коме се миш истеже напред и увлачи у свој првобитни положај), повратак у затворени простор (излазак из затвореног крака са две шапице и повратак у исти), спуштање, нагињање главе (истраживачки покрети главом или раменима преко отворених крака).

Поједини аутори (94) су показали да параметри којима се испитује понашање мишева у лавиринту омогућавају мерење два независна фактора, анксиозност и моторну активност. Процент улазака у отворене краке и време проведено у отвореним крацима су изузетно добре мере анксиозности у овом тесту. Насупрот томе, укупан број улазака у

краке, као првобитно предложена мера активности, се данас не сматра поузданим параметром. Сматра се да је број улазака у затворене краке боље мерило моторне активности, мада још увек није постигнут договор који би то био јасан индикатор локомоторне активности у ЕПМ.

Од свих тестова коришћених за испитивање анксиозности код животиња највише се користи ЕПМ тест. Њиме се обезбеђује брзо праћење анксиолитичког односно анксиогеног деловања лекова, животиње се овде не лишавају хране и воде нити излажу шоку као видовима извора анксиозности. Међутим, на резултате теста у многоме утичу услови у којима се изводи експеримент. Ово је често и разлог неслагања резултата у различитим лабораторијама. Услови тестирања обухватају широки спектар карактеристика експерименталних животиња које се користе (године, пол, сој), процедуре (услови боравка, време тестирања, раније извођени бихејвиорални тестови), осветљење, начин прикупљања резултата, пут апликације лека (84, 95, 96, 97).

3.3.1.1. Раствори и реагенси

1. Диазепам (Бенседин 10 mg/2ml, Галеника, Србија). За потребе експеримента је корисћена доза од 1mg/kg. За сваку експерименталну животињу се у складу са њеном тежином користила одговарајућа количина овог раствора допуњена физиолошким раствором до 1 ml. Доза је апликована интраперитонеално 1 ml.
2. Кетамин (кетамин 500 mg/10ml, Laboratorio Sanderson, Chile). За потребе експеримента користила се доза од 100 mg/kg. За сваку експерименталну животињу се у складу са њеном тежином узмала одговарајућа количина овог раствора допуњена физиолошким раствором до 1 ml. Доза је апликована интраперитонеално 1 ml.
3. Екстракт је апликован у четири различите дозе 10 mg/kg, 100 mg/kg, 300 mg/kg, 600 mg/kg. Суви екстракт 500 mg је растворен у 1 ml физиолошког раствора. Из овог разблажења је за сваког експерименталног миша понаособ (у складу са њиховом тежином) узимана одговарајућа количина раствора допуњена до 1 ml физиолошким раствором и тако апликована интраперитонеално.
4. Физиолошки раствор (Хемофарм, Србија). Апликован је интраперитонеално 1 ml.

3.3.1.2. Експерименталне животиње

За извођење експерименталног дела на експерименталним животињама коришћени су мушки и женски BALB/c мишеви. Старост мишева је била 5-6 недеља, а тежина 20-22g (набављени су са Војно Медицинске Академије у Београду). Мишеви су боравили у средини са контролисаним условима, температура 22°C, са циклусом од 12 h дан – ноћ и имали су стандардну храну и воду. Мишеви су боравили у металним кавезима по двоје у сваком кавезу. Пре извођења експеримента мишеви су се седам дана прилагођавали, односно боравили у простору где ће експеримент бити изведен. Сви експерименти су били извођени у временском периоду од 9h до 13h. Сваки миш је примио појединачну интраперитонеалну инјекцију лека (диазепам 1mg/kg, Бенседин^P Галеника, Србија; кетамин 100mg/kg, Laboratorio Sanderson, Chile), биљног екстракта (у различитим дозама) или физиолошког раствора. Свака испитивана група је имала по 8 мишева, 4 мушког, 4 женског пола. Све процедуре којима су животиње биле изложене су одобрене од стране Етичког комитета Медицинског факултета у Крагујевцу, што је у сагласности са интернационалним принципима за коришћење и чување лабораторијских животиња (смернице за хумано поступање са лабораторијским животињама Националног института за здравље).

3.3.1.3. Поступак испитивања анксиолитичке активности - подигнути крстасти лавиринт

Анксиолитичка активност екстракта *C. nigra* је испитивана методом подигнутог крастастог лавиринта. Ова апаратура се састоји од два отворена крака 30 cm x 5 cm и два затворена крака 30 cm x 5 cm x 15 cm. Део где се секу ова четири крака је центар апаратуре и он је квадратног облика 5 cm x 5 cm. Отворени краци немају зидове и беле су боје, затворени краци имају зидове висине 15 cm и црне су боје и краци и зидови. Апаратура је подигнута на висину од 60 cm од пода (94). Тест је изведен у просторији са затамљеним светлом и звучном изолацијом. Мишеви су примали појединачне интраперитонеалне дозе екстракта *C. nigra* у одређеним концентрацијама тридесет минута пре стављања у лавиринт. На почетку теста мишеви су спуштани на отворени крак окренути ка центру лавиринта. Сматра се да је животиња ушла у неки простор када све четири шапице пређу линију која означава тај простор. Тест је трајао пет минута и за то време је посматран број улазака у отворене и затворене просторе, као и време које

животиња проведе у отвореним и у затвореним крацима. За сваку животињу је израчунат проценат уласка у отворени простор (100 X отворени/укупним уласцима). Између сваког постављања животиња у лавиринт, апаратура је чишћена влажним сунђером и брисана папирним убрусима.

Животиње су подељене у шест група са по осам мишева у свакој групи. У свакој групи су биле животиње оба пола, пола – пола. Четири групе су примале различите концентрације испитиваног етанолног екстракта *C. nigra* (10, 100, 300, 600 mg/kg). Две групе су коришћене као контрола. Једна је примала физиолошки раствор, а друга диазепам као стандардну супстанцу. Све супстанце, испитивани екстракт у различитим концентрацијама, физиолошки раствор и диазепам су животињама апликовани интраперитонеално. Извор анксиозности је у овом тесту била непозната средина и висина апаратуре.

3.3.1.4. Поступак испитивања хипнотичког деловања екстракта - време спавања индуковано кетаминим

У овом делу истраживања је утврђивано колико ће мишеви који су примили екстракт *C. nigra* дуже спавати од групе која је примила само физиолошки раствор (98). Коришћен је диазепам (Хемофарм, Србија) као стандардни лек, физиолошки раствор (Хемофарм, Србија) и кетамин (Laboratorio Sanderson, Chile). Животиње су подељене у четири групе. У свакој је било по четири животиње мушког и четири животиње женског пола. Две групе су примале две различите концентрације етанолног екстракта *C. nigra* (300, 600 mg/kg). Друге две групе су биле контролне. Једна је примала физиолошки раствор, друга диазепам у дози од 1mg/kg. Тридесет минута после апликације диазепама, физиолошког раствора или дозе екстракта *C. nigra* свака група је примила кетамин у дози од 100mg/kg. Као почетак спавања узима се тренутак од када животиња изгуби способност ослањања на све четири шапице. А моменат буђења је тренутак када се животињи врати рефлекс и када је опет у стању да се ослони на све четири шапице. Хипнотички ефекат се приказује као разлика у дужини спавања и пореди се између група (99).

3.3.2. Статистика

Резултати су приказани као средње вредности са стандардном грешком. Резултати имају нормалну дистрибуцију. Коришћена је АНОВА тест (one-way analysis of variance) а потом Бонферони тест за поређење по групама. Узето је да вероватноћа нулте хипотезе мања од 0.05 ($p < 0.05$) представља статистички значајну разлику између експерименталних група. Сви прорачуни су изведени у СПСС 18, софтверу за статистичку обраду података. Код статистичке обраде процената уласка у отворени простор је у *post hoc* анализи коришћен Dunnett T3 тест.

3.4. Антимикробна активност екстракта

У циљу утврђивања могуће антимикробне активности у *in vitro* условима тестирани су етанолни екстракти *C. nigra* на једну гљивицу и два стандардна АТСС бактеријска соја коришћењем агар-дифузионе методе (100).

3.4.1. Сојеви микроорганизама

Стандардни бактеријски сојеви коришћени у тесту су: *Staphylococcus aureus* АТСС 25923 и *Escherichia coli* АТСС 25922, као и гљивица *Candida albicans* АТСС 10231.

3.4.2. Стандардне супстанце и испитивани ратвори

1. Цефтриаксон (30 μg /диск) и нистатин (100 IU/диск) су коришћени као позитивна контрола, а као негативна дестилована вода.
2. Екстракт је припреман у различитим концентрацијама. Суви екстракт, 100 mg се раствори у 1 ml дестиловане воде при чему се добија концентрација од 100 mg/ml. Разблаживањем ове концентрације десет пута дестиливаном водом добија се 10 mg/ml. На исти начин се добијају и друга разблажења од 1 mg/ml, 100 μg /ml, и 10 μg /ml. Накнадно су припремљене на исти начин и концентрације од 50 mg/ml, 75 mg/ml и 150 mg/ml.

3.4.3. Подлоге

За испитивање осетљивости бактерија коришћена је Милер-Хинтон агар (HiMedia Laboratories, Индија, LOT 0000099844), а за гљивицу Sabouraud агар (Институт за имунологију и вирусологију „Торлак“, Београд).

3.4.4. Поступак

Концентрација бактеријских бујона је разблажена (10^2 организма/ml) и од сваког бујона је коришћен 0,1 ml, која је нанесена на плоче агара и равномерно распрострајена по површини. На плочи се налазило око 10^4 бактерија. Потом је подлога са одговарајућим сојем разливана у стерилне Петријеве шоље промера 90 mm, тако да је дебљина агара након очвршћавања била око 4 mm. Резервоари пречника од 12 mm направљени су у агару и у њих је инјектовано 150 μ l биљних екстраката. Позитиван резултат је детектован при дозама већим од 10 mg/ml, тако да су даља испитивања настављена при већим концентрацијама. Као позитивна контрола коришћен је цефтриаксон (30 μ g/диск) и нистатин (100 IU/диск), а као негативна контрола стерилан физиолошки раствор.

Овако припремљене агар плоче су инкубиране на 37⁰C, 24 h. Дијаметри зоне инхибиције биљних екстраката су мерене, и упоређиване са вредностима стандардних супстанци. Зона инхибиције се одређивала мерењем пречника у милиметрима, а у случајевима када је пречник инхибиторне зоне био мањи или једнак 12 mm, испитивани узорак се сматрао неактивним (100).

3.4.5. Статистичка анализа антимицробне активности

Вредности зона инхибиције за сваки диск су приказане дијаграмом расипања, а регресионе праве су рачунате методом најмањих квадрата.

4. Резултати

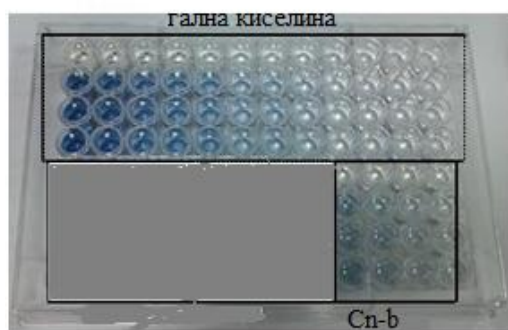
4.1. Хемијски састав екстракта *C. nigra*

Фитохемијском анализом екстракта *C. nigra* утврђено је присуство неколико важних група једињења. Такође је одређен и садржај ових једињења у екстаркту. Садржај укупних фенола је изражен као mg галне киселине у једном граму екстракта. Одређен је садржај флавоноида и изражен као mg кверцетина у једном граму екстракта. Садржај процијанидина је изражен као mg цијанидин хлорида у једном граму екстракта. Резултати су приказани у табели 4. На слици 5., слици 6., слици 7., и слици 8. је приказан изглед микроплоча у тестовима одређивања укупних фенола и флавоноида.

Табела 4. Квантитативна фитохемијска анализа етанолног екстракта *C. nigra* (Cn-b), (средња вредност \pm SD три мерења)

Групе једињења	Cn-b
Укупни феноли (mg GA ^a /g)	72,7 \pm 16
Укупни флавоноиди (mg Q ^b /g)	1,88 \pm 1
Садржај процијанидина (mg C ^c /g)	5,6 \pm 0,76

^aGA-гална киселина, ^bQ- кверцетин, ^cC- цианидин-хлорид

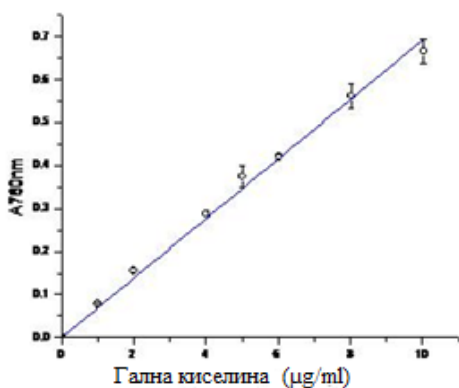


Слика 5. Изглед микроплоче након развијања боје у тесту одређивања укупних фенола.

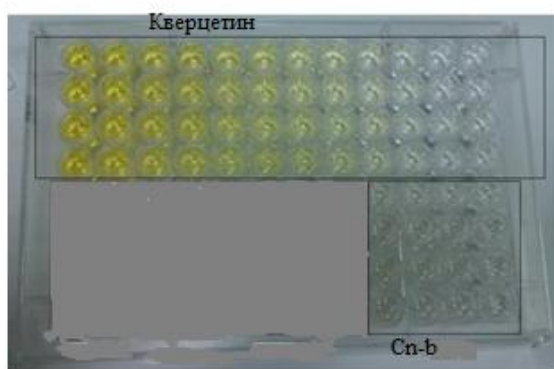
Део слике који представља галну киселину приказује једанаест разблажења раствора галне киселине у дестилованој води. Дванаести део је слепа проба, односно дестилована вода. Након мерења апсорбанција ових раствора, конструисан је график

зависности апсорбанце од масене концентрације галне киселине. Овај график представља калибрациону криву.

Део слике који се односи на екстракт биљке представља четири припремљене концентрације екстракта. Након читавања апсорбанције ових раствора екстракта из калибрационе криве су очитане вредности садржаја еквивалента галне киселине у посмареаној концентрацији екстракта. Резултати су изражени као милиграми еквивалента галне киселине по једном граму сувог екстракта.



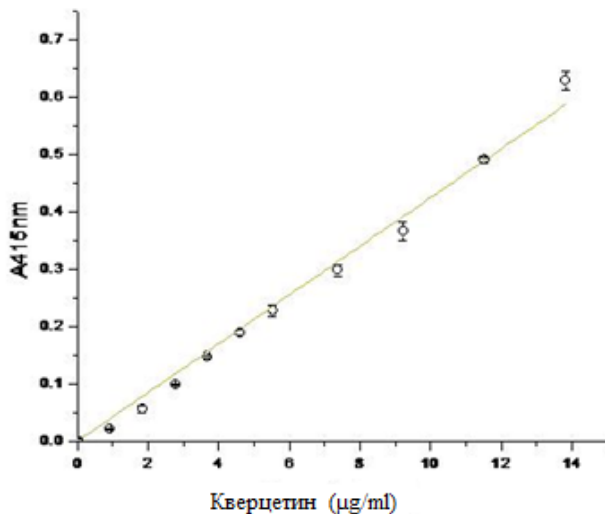
Слика 6. Калибрациона крива стандарда раствора галне киселине.



Слика 7. Изглед микроплоче након развијања боје у тесту одређивања укупних флавоноида.

Део слике који се односи на кверцетин, представља серију од једанаест разблажења стандардног раствора кверцетина и дванаесте следе пробе. Измерена апсорбанца је

послужила за конструисање калибрационе криве, која представља однос апсорбанце од масене концентрације кверцетина. Са калибрационе криве су потом очитане вредности еквивалента кверцетина присутних у испитиваним екстрактима.



Слика 8. Калибрациона крива стандардног раствора кверцетина.

4.2. Квантитативни и квалитативни резултати

Квалитативна анализа хемијског састава етанолног екстракта *Crataegus nigra*. вршена је техником течне хроматографије високе резолуције.

Квантитативна и квалитативна анализа појединих једињења нађених у екстракту плодова *Crataegus nigra* приказана је у табели 5., табели 6., слика 9. Као и ретенциона времена стандардних супстанци и узорка у табели 7.

Табела 5. Квантитативна анализа деривата фенола у екстракту *Crataegus nigra*

Једињење	Сп-б *
П-хидроксибензоева киселина	6,87
Циметна киселина	Нд
Протокатехинска киселина	358

Једињење	Cn-b *
2,5-дихидроксибензоева киселина	Нд
П-кумаринска киселина	1,20
О-кумаринска киселина	Нд
Ванилинска киселина	5,10
Гална киселина	Нд
Кафена киселина	2,96
Хинска иселина	475
Ферулна киселина	1,05
3,4-диметоксициметна киселина	Нд
Сиригинска	11,9
5-О-кафеоилхинска киселина	172

* mg једињења по kg сувог екстракта

Нд – није детектовано

Табела 6. Квантитативна анализа флавоноида и флавоноидних хетерозида *Crataegus nigra*

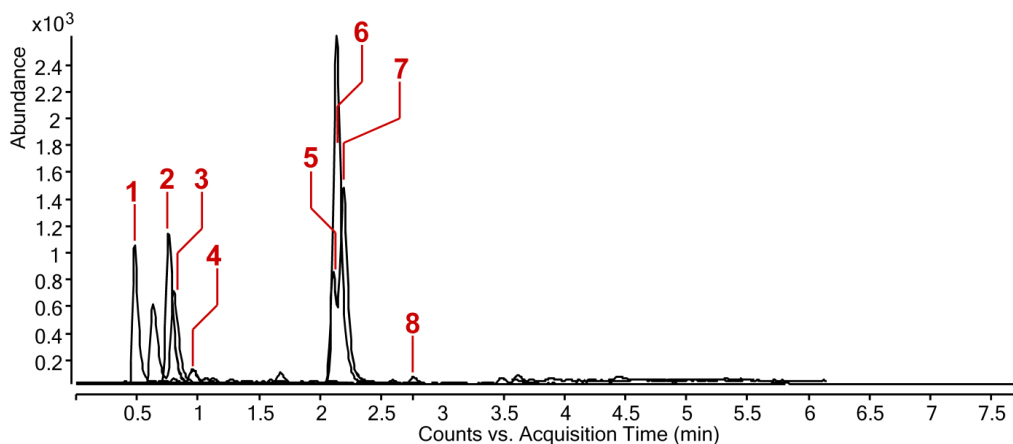
Једињења	Cn-b *
Ескулетин	Нд
Кемферол	0,800
Катехин	Нд
Епикатехин	105
Кверцетин	8,45
Изорамнетин	Нд
Апигенин-8-Ц-глукозид (витексин)	Нд
Апигенин-7-О-глукозид (косметин)	Нд
Бајкалеин-7-О-глукуронозид (бајкалин)	Нд
Лутеолин-7-О-глукозид (цинарозид)	1,15
Кверцетин-3-О-рамнозид (кверцитрин)	2,43
Кемферол-3-О-глукозид (астрагалин)	5,10
Кверцетин-3-О-галактозид (хиперозид)	164

Једињења	Cn-b *
Кверцетин-3-О-глукозид (изокверцитрин)	408
Аментофлафон	0,468
Апиин	Нд
Кверцетин-3-О-рутинозид (рутин)	868

* mg једињења по kg сувог екстракта

Нд – није детектовано

Најзаступљенија једињења су: кверцетин-3-О-рутинозид (рутин); хинска киселина; протокатехинска киселина; епикатехин; кверцетин-3-О-глукозид (изокверцитрин); кверцетин-3-О-галактозид (хиперозид); 5-О-кафеоилхинска киселина; кемферол; и друга једињења.



Слика 9. HPLC хроматограм етанолног екстракта плодова *C. nigra* : 1- хинска киселина, 2 – протокатехинска киселина, 3 – 5-О-кафеоилхинска киселина, 4 - епикатехин, 5 – хиперозид, 6 – рутин, 7 - кверцетин-3-О-глукозид, 8 - кемферол-3-О-глукозид

Табела 7. Ретанциона времена узорка и стандардних супстанци (1,6 µg/mL)

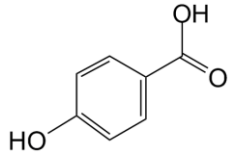
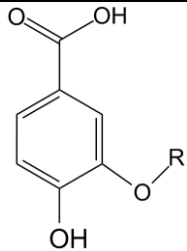
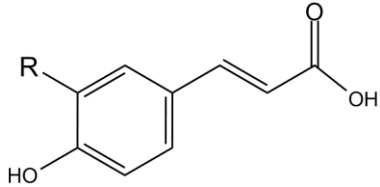
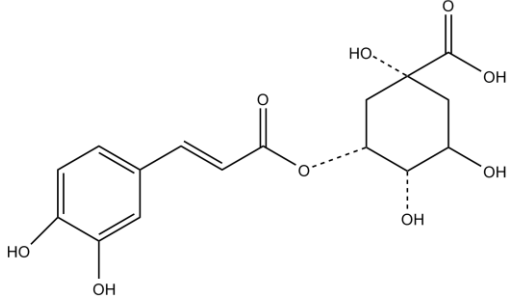
	T_p (минути)	
	стандард	Сп-в
П-хидроксибензоева киселина	1,07	1,02
Циметна киселина	3,88	
Протокатехинска киселина	0,76	0,72
2,5-дихидроксибензоева киселина	1,00	
П-кумаринска киселина	1,64	1,59
О-кумаринска киселина	2,60	
Ванилинска киселина	1,22	1,18
Гална киселина	0,57	
Кафена киселина	1,13	1,08
Хинска иселина	0,48	0,44
Ферулна киселина	1,85	1,83
Сиригинска	1,28	1,22
3,4-диметоксициметна киселина	2,97	
Кемферол	4,49	4,42
Катехин	0,74	
Епикатехин	0,97	0,92
Кверцетин	3,65	3,59

	стандард	Сп-в
Изорамнетин	4,76	
5-О-кафеоилхинска киселина	0,80	0,76
Витексин	1,87	
Апигенин-7-О-глукозид	2,67	
Бајкалин	3,34	
Лутеолин-7-О-глукозид	2,12	2,08
Кверцитрин	2,75	2,69
Кемферол-3-О-глукозид	2,80	2,72
Епигалокатехин галат	0,77	
Хиперозид	2,14	2,07
Кверцетин-3-О-глукозид	2,22	2,15
Аментофлафон	5,78	5,71
Апиин	2,57	
Рутин	2,17	2,10

T_p – ретенционо време изражено у минутима

Хемијска структура свих идентификованих једињења је приказана на слици 10.

Слика 10. Идентификована једињења у екстракту плодова *C. nigra*

Фенолна једињења	Хемијска структура
<p>П-хидроксibenзојева киселина</p>	
<p>Протокатехинска киселина R=H Ванилинска киселина R=CH₃</p>	
<p>П-кумаринска киселина R=H Кафена киселина R=OH Ферулна киселина R=OCH₃</p>	
<p>5-О-кафеоилхинска киселина</p>	

Флавоноиди и флавоноидни гликозиди

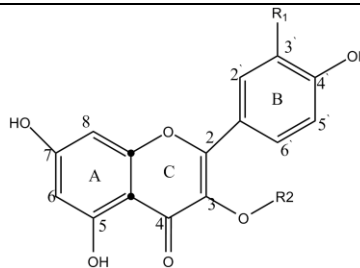
Хемијска структура

Кемферол $R_1=H$; $R_2=H$

Кверцетин $R_1=OH$; $R_2=H$

Хиперозид $R_1=OH$; $R_2=$ галактозид

Изокверцитрин $R_1=OH$; $R_2=$ глукозид



Кверцитрин $R_1=H$; $R_2=$ рамнозид; $R_3=OH$;

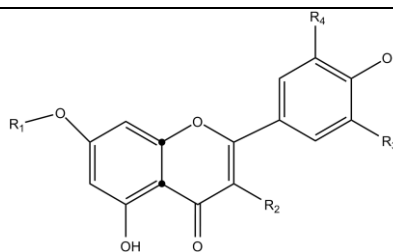
$R_4=H$

Астрагалин $R_1=H$; $R_2=O$ -глукозид; $R_3=H$;

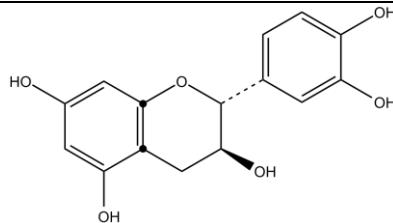
$R_4=H$

Рутин $R_1=H$; $R_2=$ дисахарид рутиноза;

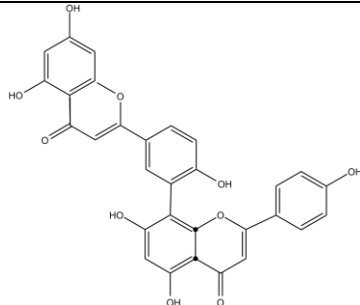
$R_3=OH$; $R_4=H$



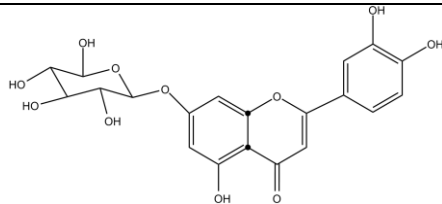
Епикатехин



Аментофлафон



Цинарозид



4.3. Антиоксидативна активност

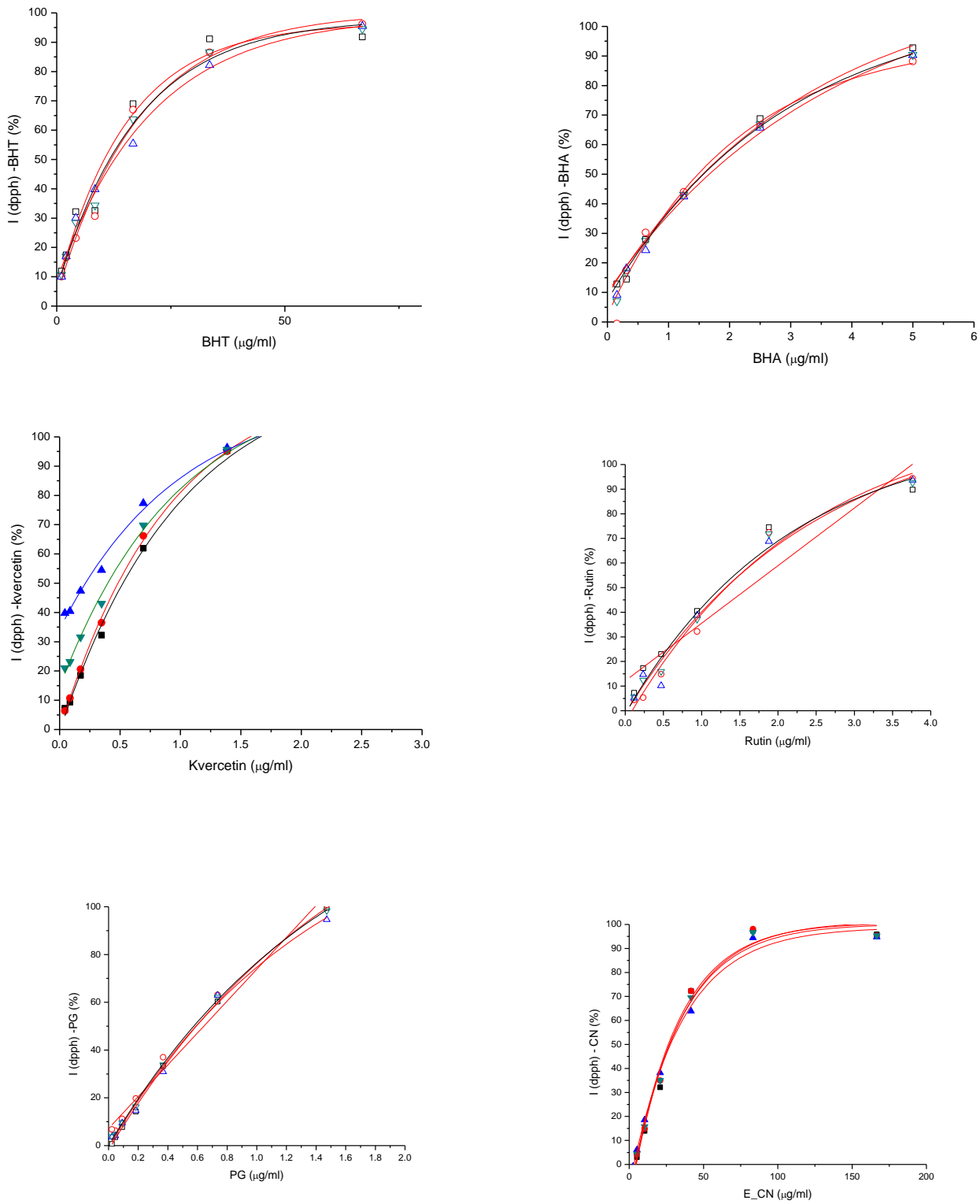
Екстракт *Crataegus nigra* је показао да поседују значајну антиоксидативну активност DPPH - тестом. Када је екстракт плодова *Crataegus nigra* примењен у концентрацији од 166.7 – 2,6 $\mu\text{g/mL}$, DPPH (free-radical-scavenging) активност се кретала од 95,3 – 3,0 % (IC_{50} вредност је $27,33 \pm 0,369 \mu\text{g/mL}$). Испитивани екстракт је показао да има слабију активност у поређењу са стандардима. Резултати DPPH теста екстраката *Crataegus nigra* приказани су у табели 8. Начини добијања IC_{50} вредности приказани су на слици 11.

Табела 8. DPPH тест екстраката плодова *C. nigra*

Узорци	IC_{50}^a ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. nigra</i>	$27,33 \pm 0,369$
ВНТ	$11,65 \pm 1,144$
ВНА	$1,57 \pm 0,093$
Кверцетин	$0,41 \pm 0,169$
Рутин	$1,42 \pm 0,173$
РГ	$0,61 \pm 0,030$

^a средња вредност \pm SD три мерења, ВНТ – бурил хидрокси толуол, ВНА – бутил хидрокси анизол, РГ – пропил галат.

Слика 11. Антиоксидатвна активност екстракта и стандардних супстанци.



4.4. Анксиолитички и хипнотички ефекат екстракта *C. nigra*

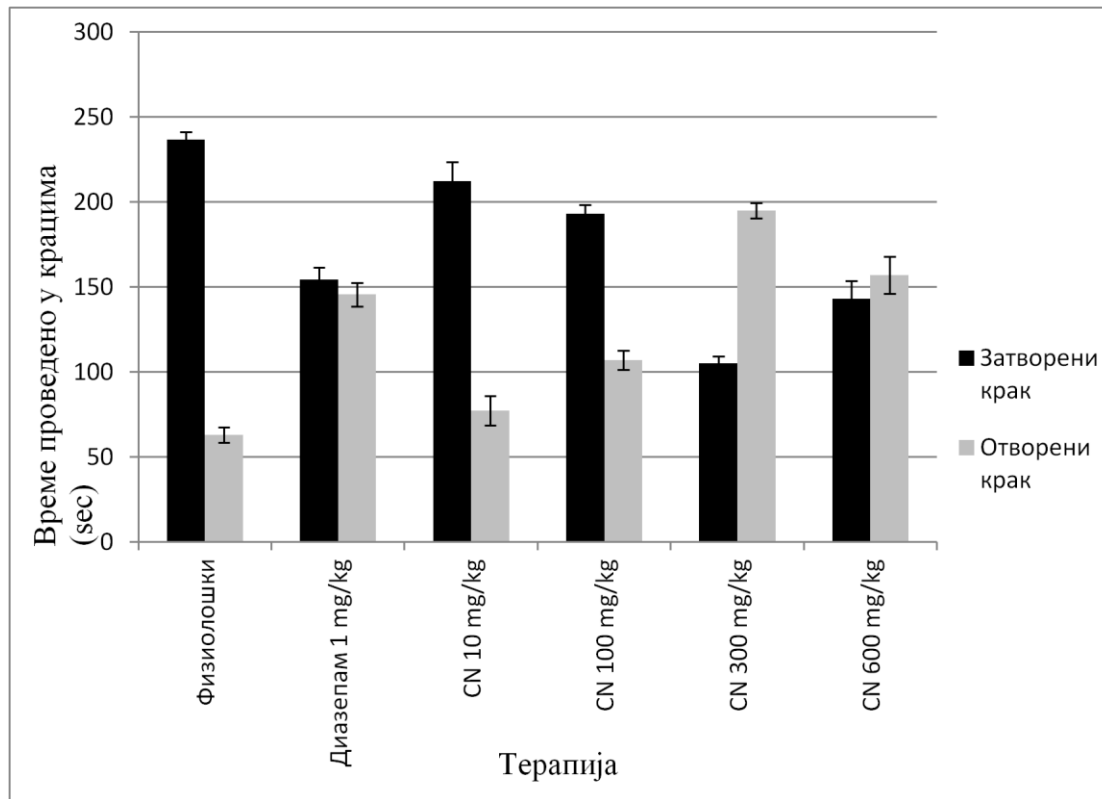
4.4.1. Анксиолитички ефекат екстракта *C. nigra*

Водено етанолни екстракт црног глога је довео до статистички значајног повећања укупног времена проведеног у отвореним крацима у односу на контролну групу. Ова статистичка значајност се јавила код доза од 300 и 600 mg/kg. Најуочљивији ефекат је изазвала доза од 300 mg/kg. У овом случају време проведено у отвореним крацима је било $3,25 \pm 0,15$ мин. (195 ± 8.83 сек.) односно 65 % укупног времена, а време проведено у отвореним крацима код контролне групе је било $1,05 \pm 0,15$ мин. ($63,12 \pm 9,15$ сек.) односно 21 %. У групи која је примила диазепам је анксиолитички ефекат, односно време проведено у отвореним крацима било статистички значајно веће у односу на контролну групу (групу која је примала физиолошки раствор). Иако је доза екстракта од 300 mg/kg показала највећи ефекат у односу на друге испитиване дозе, иако је сигнификантно њен ефекат већи у односу на групу која је примала физиолошки раствор, ова доза није показала и сигнификантно већи ефекат у односу на диазепамску групу. Резултати су приказани у табели 9. и слици 12. Такође је и проценат уласка животиња у отворене краке за дозе 300 и 600 mg/kg екстракта статистички значајно већи у односу на групу која је примала физиолошки раствор. Слика 13.

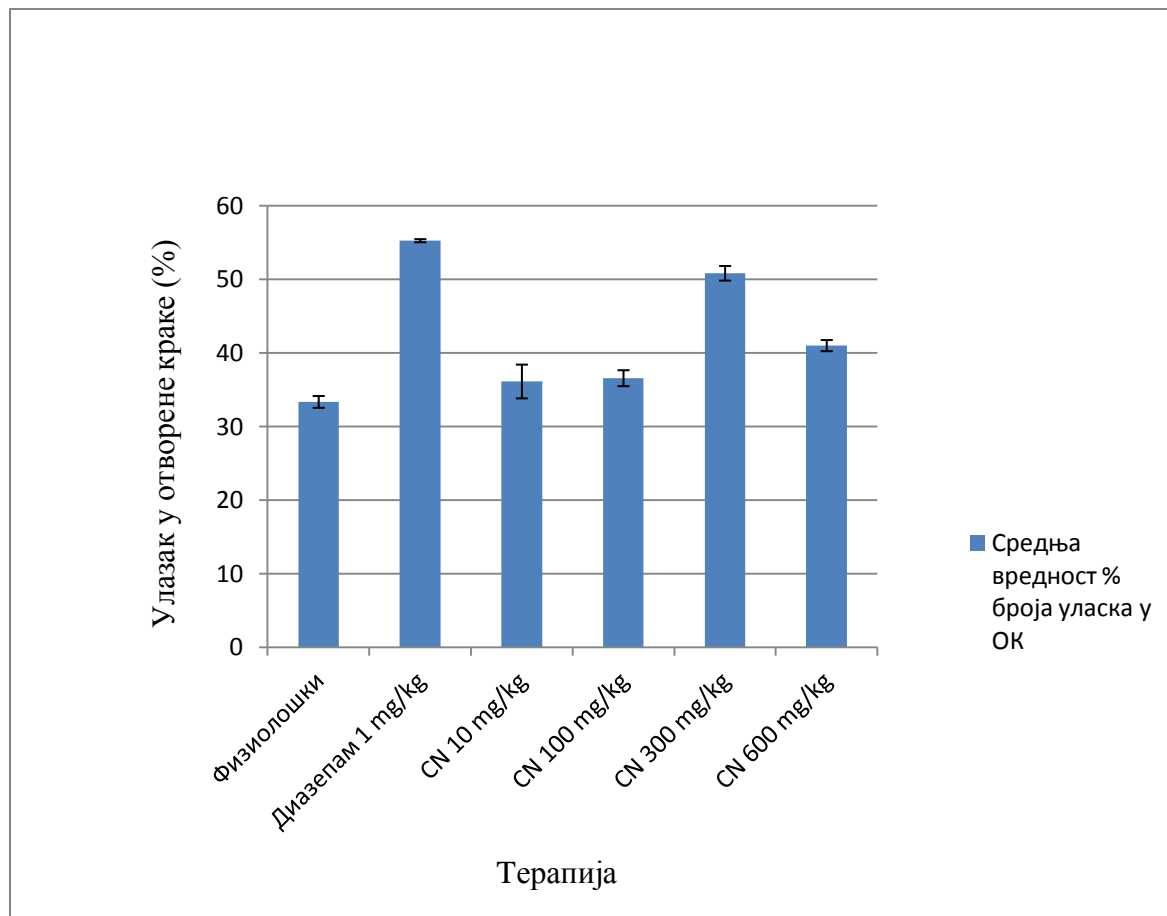
Табела 9. Анксиолитички ефекат екстракта плода *C. nigra*

	Време (секунде)	Време (секунде)
	Отворени краци *	Затворени краци *
Контрола	63,125 ± 9,15	236,875 ± 8,56
Диазепам 1 mg/kg	145,62 ± 14,24	154,37 ± 14,24
Екстракт <i>C. nigra</i> 10 mg/kg	77,25 ± 17,35	212,25 ± 22,44
Екстракт <i>C. nigra</i> 100 mg/kg	107 ± 11,04	193 ± 11,04
Екстракт <i>C. nigra</i> 300 mg/kg	195 ± 8,83	105 ± 8,83
Екстракт <i>C. nigra</i> 600 mg/kg	157 ± 21,68	143 ± 21,68

Бројеви представљају средње вредности ± S.E.M. групе ($n = 8$). * $p < 0.05$ АНОВА тест и Бонферони тест за поређење по групама.



Слика 12. Време проведено у отвореним / затвореним крацима. Физиолошки раствор, диазепам и различите дозе биљног екстракта. Вредности су дате као средње вредности \pm S.E.M. за сваку групу од 8 мишева. * $p < 0.05$ у поређењу са групом која је примала физиолошки раствор и са групом која је примала диазепам.



Слика 13. Број уласака у отворене краке изражен у процентима. Физиолошки раствор, диазепам и различите дозе биљног екстракта. Вредности су дате као средње вредности \pm S.E.M. за сваку групу од 8 мишева. * $p < 0.05$ у поређењу са групом која је примала физиолошки раствор и са групом која је примала диазепам.

4.4.2. Хипнотички ефекат екстракта *C. nigra*

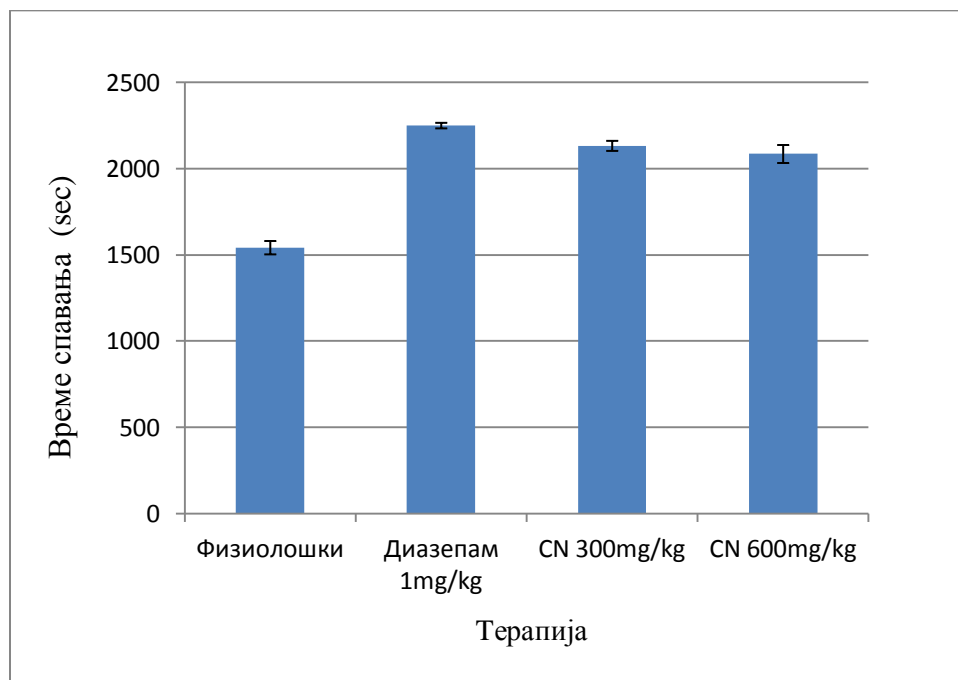
У контролној групи која је примала физиолошки раствор, укупно време спавања је било 1542 ± 78 s. Група која је примала диазепам имала је укупно време спавања $2250,62 \pm 32,17$ s; што је 146% у односу на групу са физиолошким раствором. Диазепам група је показала значајно веће продужење времена спавања од групе која је примала физиолошки раствор. Такође, и екстракт *C. nigra* у дозама од 300 и 600 mg/kg је довео до статистички значајног повећања времена спавања у односу на групу са физиолошким раствором и то 138% и 135% за сваку дозу. Међутим није било статистички значајне разлике између

група које су примале диазепам и група које су примале екстракт. Резултати су приказани у табели 10. и слици 14.

Табела 10. Хипнотички ефекат плодова *C. nigra* код мишевима изазван кетамином

	Време спавања (s)*
Контрола	1542,5 ± 77,75
Диазепам 1 mg/kg	2250,62 ± 32,17
Екстракт <i>C. nigra</i> 300 mg/kg	2133 ± 58,38
Екстракт <i>C. nigra</i> 600 mg/kg	2086 ± 104,55

Бројеви приказују средње вредности ± S.E.M. у групама ($n = 8$). * $p < 0.05$ поређено са физиолошким раствором (АНОВА, након тога Бонферијева тест).



Слика 14. Време спавања мишева по групама. Физиолошки раствор, диазепам и различите дозе биљног екстракта. Вредности су дате као средње вредности ± S.E.M. за сваку групу од 8 мишева. * $p < 0.05$ у поређењу са групом која је примала физиолошки раствор.

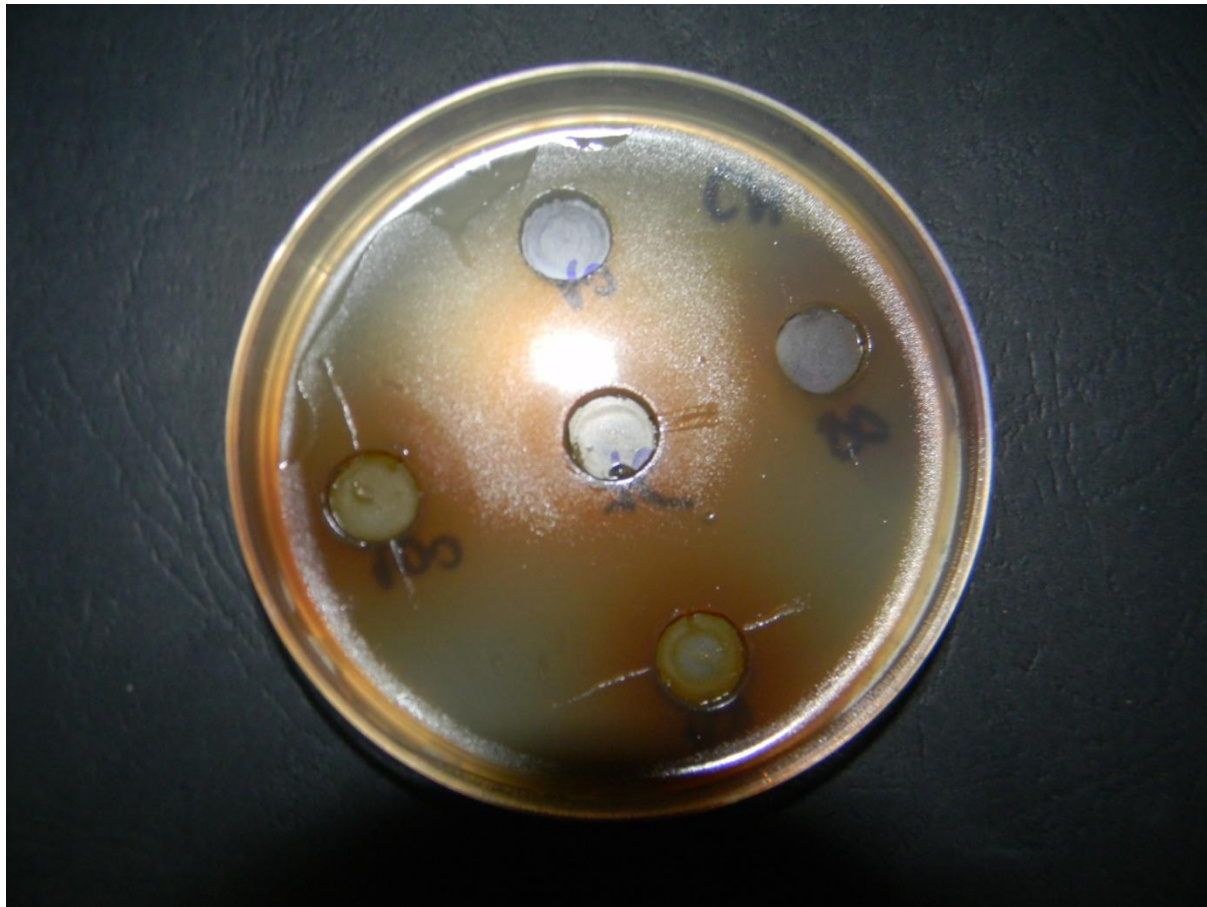
4.5. Антимикробна активност

Резултати агар дифузног теста су показали да етанолни екстракт *C. nigra* у концентрацијама од 50 - 150 mg/ml испољава антимикробну активност према испитиваном соју *Escherichia coli*. Док према испитиваном соју *Staphylococcus aureus* антимикробну активност показују дозе од 100 и 150 mg/ml. Антимикробно деловање је било најизраженије при највећим испитиваним дозама и то чак 114,28% активности цефтриаксона (30 µg/диск) за *Escherichia-y coli* и 59,37% за *Staphylococcus aureus*. Посматрани сој *Candida albicans* је показао потпуну резистентност на било коју примењену дозу етанолног екстракта *C. nigra*. Резултати антимикробног деловања су дати у табели 11.

Табела 11. Дијаметри зона инхибиције испитиваног екстракта и стандарда.

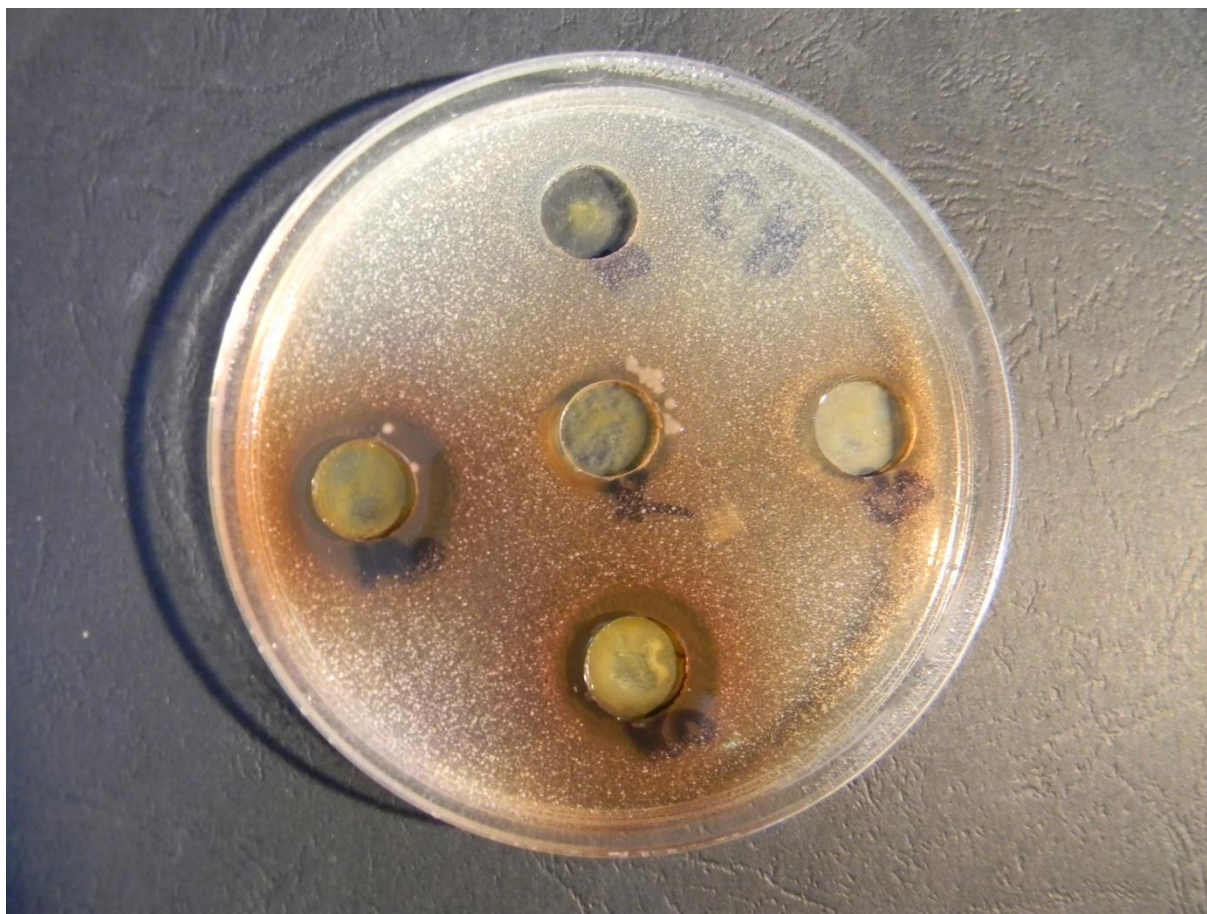
Материјал	Дијаметар зоне инхибиције (mm)		
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Crataegus nigra</i> плодови	10 mg/ml	0	0
	50 mg/ml	17	0
	75 mg/ml	20	0
	100 mg/ml	22	18
	150 mg/ml	24	19
Цефтриаксон 30µg/диск	21	32	-
Нистатин 100иј/диск	-	-	34

Утицај екстраката плодова *Crataegus nigra* у концентрацијама од 10 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 150 mg/ml на раст стандардних сојева бактерија и гљивице приказан је на слици 15.



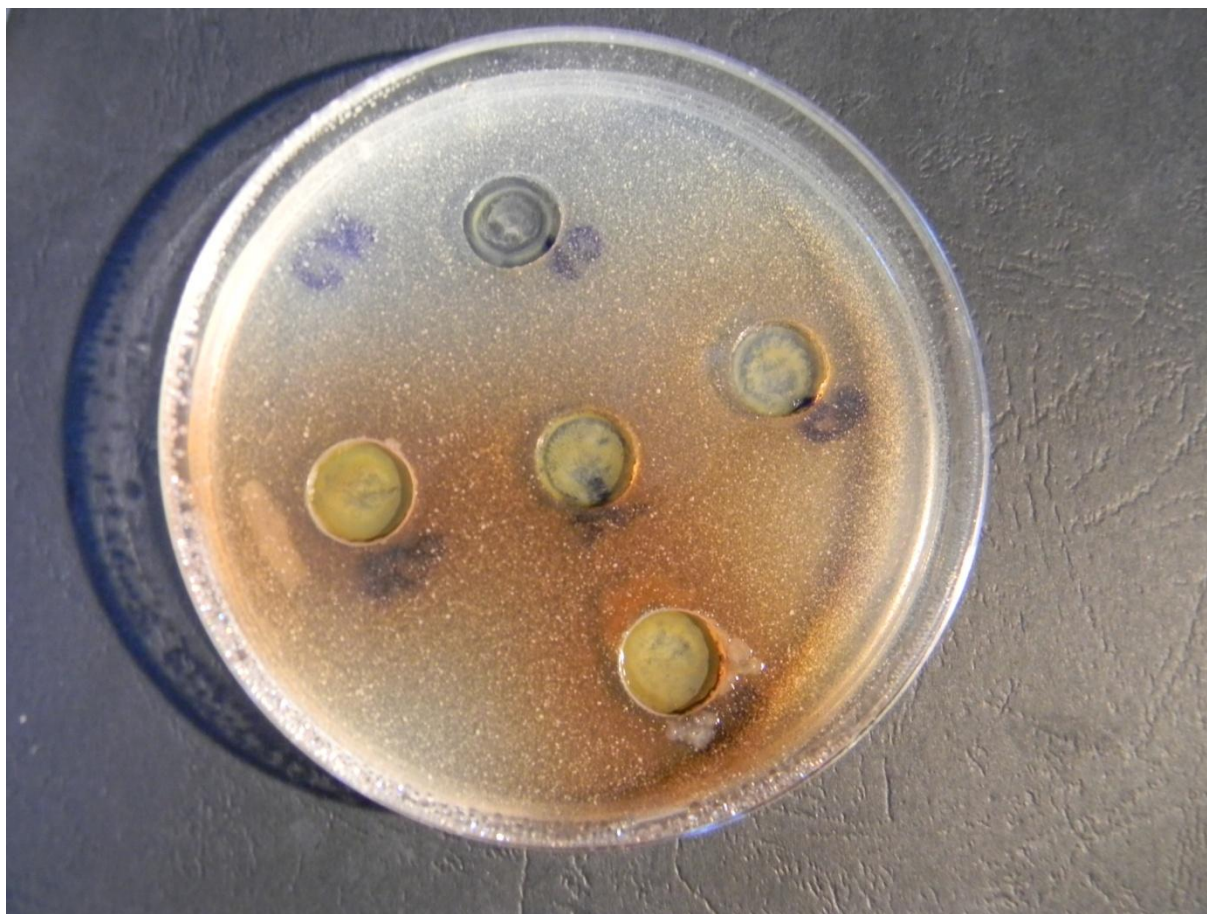
C. nigra плод; бактерија- *E. coli*

Слика 15. Ефекти екстраката плодова *Crataegus nigra* на раст стандардних сојева патогена.



C. nigra плод; бактерија- *S. aureus*

Слика 15. Ефекти екстраката плодова *Crataegus nigra* на раст стандардних сојева патогена.



C. nigra плод; гљивица- *C. albicans*

Слика 15. Ефекти екстракта плодова *Crataegus nigra* на раст стандардних сојева патогена.

5. Дискусија

Род *Crataegus* има дугу традицију и веома широку употребу у традиционалној медицини многих народа. Управо због тога су спроведена бројна истраживања, у којима је вршена фитохемијска карактеризација, као и повезивање фармаколошких својстава рода са присутним секундарним метаболитима у биљкама. Доминантни секундарни метаболити овог рода су: феноли, флавоноиди, олигомерни процијанидини, кардиотонични амини, тритерпени... (52)

У Србији има више врста рода *Crataegus*. Свакако су најраспрострањенији *Crataegus oxyacantha* и *Crataegus monogyna*, црвени и бели глог. Често су чајеви и тинктуре који се могу наћи на тржишту, у ствари мешавине ове две врсте глога. Међутим у Србији, у плавним подручјима Војводине, око великих река, Саве и Дунава, се налази станиште *Crataegus nigra*, црниог глога. То је ендемска врста панонске низије и може се наћи у овом подручју Србије, Хрватске и Мађарске. У традиционалној медицини се од црног глога користе плодови, цветови и лишће, за припрему чајева или тинктура. Фитохемијска карактеризација ове врсте глога, као и његова фармаколошка активност до сада нису истраживани. Међутим у народној медицини се овај глог користи у исте сврхе као и остале врсте овог рода. Род *Crataegus* је у традиционалној медицини познат по својим кардиопротективним ефектима. Врло је успешан у третману и високог и ниског крвног притиска, успешно се користи и код поремећаја срчаног ритма. Разне студије су на различитим врстама рода *Crataegus* доказале и антиинфламаторни, гастропротективни, антимикробни, антиоксидативни ефекат.

Сваки род и специфичније, свака биљна врста се карактеришу присуством одређених секундарних метаболита. Ови секундарни метаболити, у ствари дефинишу фармаколошку активност биљке. На пример, флавоноиди су велика група секундарних биљних метаболита чија је улога да штите биљку од различитих спољних штетних утицаја (стреса), штетних радикала (РОС) и разних биљних штеточина. Многе студије, које су се бавиле опсежним проучавањем флавоноида, показеле су да флавоноиди имају и снажан антиканцерогени ефекат. Чак су поједини аутори уврстили ова једињења као додаток антитуморским протоколима који се данас користе.

У различитим студијама су коришћене различите методе екстракције са различитим растварачима. Наравно, коришћене биљке су у оквиру различитих радова

прикупљане са различитих поднебља, што све може да утиче и утиче да су добијени фитохемијски резултати у оквиру исте врсте различити. Самим тим и степен фармаколошке активности. До сада је *Crataegus nigra* испитивана и проучавана само са ботаничког аспекта. Иако је уско подручје његове распрострањености, што би могло (али не мора да буде тако) да значи да је биљка приближно истог хемијског састава на целом подручју, ми резултате нашег испитивања не можемо поредити са сличним истраживањима, пошто их нема. Зато можемо вршити поређења са осталим врстама овог рода и врстама биљака других родова која показују испитиване ефекте. И у том неком општем миљеу покушати да неђемо место црном глогу.

Добијање екстракта биљке је један од првих корака у истраживњу њених хемијских и фармаколошких особина. Од избора растварача и метода екстракције зависи принос одговарајућих једињења а потом и фармаколошки ефекти екстракта који се испитује. Циљ је да се у највећој мери из биљних делова извуку оне хемијске супстанце које ће показати испитиване фармаколошке ефекте. Сматра се да су за многе фармаколошке ефекте различитих врста рода *Crataegus* одговорни феноли, флавоноиди, процијанидини... Управо из ових разлога било је неопходно утврдити који је то растварач најефикаснији и који метод најбољи за добијање највећег приноса ових једињења у екстракту.

Као поларна једињења феноли, флавоноиди... се лако и брзо екстрахују у поларним растварачима. То може бити вода, алкохол, етанол у различитим степенима разблажења са водом, метанол... Поједине студије су испитивале који од ових растварача дају највеће приносе. На основу података из ових студија имамо да је 80% метанол, као поларни растварач дао највеће приносе, међутим екстракт није садржао и највеће количине фенола и флавоноида. Највеће количине ових секундарних метаболита имао је екстракт добијен са 80% етанолом. Поред овога, добијени екстракт је показао и највећи антиоксидативни потенцијал (101).

Као што смо раније споменули ефикасност и брзина екстракције зависе и од температуре на којој се она изводи. Сходно томе да су активне компоненте код *Crataegus* врста термо стабилне, овде можемо изводити екстракцију и на повишеним температурама. Урађена су поређења максималних приноса флавоноида добијених различитим методама екстракције: екстракција на собној температури, Сокслетовим апаратом, екстракција помоћу топлотног рефлука, ултразвучна и микроталасна екстракција. Резултати су

показали да је највећи принос флавоноида добијен путем Сокслетове екстракције (102, 103).

Сходно овоме, код нас је екстракција рађена 80% етанолом на 80°C методом по Сокслету.

Квантитативном анализом екстракта утврђен је висок садржај фенолних једињења. А даљом ХПЛЦ анализом је утврђено да је главно једињење флавоноид рутин. Друга идентификована једињења су изокверцитрин, хиперозид, хлорогенска киселина, епикатехин... Литературни подаци хемијске анализе *C. nigra* не постоје али у поређењу са хемијским садржајем других врста глога у нашем екстракту нису идентификована једињења која су присутна код неких других врста, на пример витексин и цианидин хлорид. Сходно томе да су *C. monogyna* и *C. oxycantha* јако распрострањене врсте и у нашим крајевима и ван наше земље, не чуди чињеница да је њихова мешавина у односу 1:1 и једна од најчешћих мешавина глога. Уједно ова мешавина представља и најчешћу комбинацију чајева, тинктура или већ готових таблета од глога. Добијени ХПЛЦ хроматограм нашег екстракта је сличан ХПЛЦ хроматограму екстракта мешавине *C. monogyna* и *C. oxycantha* (1:1) у компонентама које су идентификоване и у једном и у другом екстракту. У екстракту *C. nigra*, постоје једињења која су овде идентификована а нису присутна у екстракту ове мешавине. Међутим, сва испитивана једињења идентификована у нашем екстракту су присутна у некој од многобројних врста глога.

Рутин је у нашем екстракту присутан у највећој количини у односу на све друге идентификоване компоненте. Хемијски је кверцетин-3-О-рутинозид, и представља гликозид између флавонола кверцетина и дисахарида рутинозе. Дакле, рутин је фенолно једињење које је својим особинама одговорно за антибактеријске и антиоксидативне особине биљака у којима се налази (104, 105). Рутин, као и **кверцитрин**, су гликозиди флавоноида кверцетина. Како је њихова хемијска структура веома слична, разлика је у једној хидроксилној групи, они показују и сличне фармаколошке ефекте. У многим земљама се користе као медикаменти за заштиту крвних судова али и као састојци бројних мултивитаминских препарата и биљних лекова (106, 107). Фармаколошки ефекти ових супстанци су углавном испитивани на животињама (мишеви, пацови, зечеви...) или у *in vitro* условима, док клиничке студије којима би се потврдили значајни позитивни ефекти рутина као дијететског суплемента на људима не постоје.

Рутин доводи до инхибиције агрегације тромбоцита, повећава пермеабилност капилара и поправља циркулацију (108). На основу овога рутин би могао да помогне у превенцији формирања крвних угрушака, тако да би могао имати извесну улогу у код пацијаната који су у ризику од срчаног удара или шлога. Ова његова активност на нивоу капилара и крвних судова би могла имати повољне ефеке у терапији хемороида и варикоза. Такође је на *in vitro* моделима показан и антиинфламаторни ефекат рутина (109). На *in vivo* моделу, индукован колитис код пацова, кверцитин је показао значајни антиинфламаторни ефекат. Овај ефекат се остварује ослобађањем кверцетина и његовом инхибицијом NF-κB пута (110).

Астрагалин је флавоноид присутан у многим биљкама. За њега је на експерименталном моделу, доказано антиинфламаторно деловање а механизам којим остварује ово дејство је повезан са инхибицијом тумор некрозис фактора α (TNF-α), интерлеукина 1 (IL-1) и интерлеукина 6 (IL-6) и то инактивацијом NF-κB (111). Друга студија, која је испитивала утицај астрагалина на развој атопијског дерматитиса код мишева, показала је да под утицајем астрагалина долази до смањења ослобађања хистамина и развоја пасивне кутане реакције и дерматитиса (112).

Хиперозид је флавоноид, такође присутан у многим биљним врстама. За овај флавоноид је доказана врло потентна антиоксидативна активност. Посматрана је способност хиперозида да заштити PC12 ћелије од цитотоксичне активности водоник пероксида. Утврђено је да хиперозид не само што показује значајан антиоксидативни ефекат већ у дозама одговорним за смањење цитотоксичне активности водоник пероксида није штетан за PC12 ћелије (113).

Кверцетин је агликон великог броја флавоноидних гликозида, као што су рутин, кверцитрин, хиперозид... Њему се приписују бројне фармаколошке активности доказане углавном у *in vitro* условима. Кверцетин се у експерименталном моделу показао као ефикасан бронходилататор, довео је до смањења ослобађања хистамина, а и показао је да поседује значајну антиинфламаторну активност услед директне инхибиције неколико почетних процеса инфламације (114). Такође је показано у мултиетничкој кохортној студији да је имао удела у смањењу ризика развоја канцера панкреаса код пушача (115), као и да је на експерименталном моделу повећао осетљивост резистентних колоректаних туморских ћелија на 5-флуороурацил (116). У *in vivo* изведеним студијама на

хипертензивним пацијентима је показано да је кверцетин довео до смањења крвног притиска и смањења нивоа ЛДЛ холестерола (117, 118).

Аменофлавон је бифлавоноид. У *in vitro* испитивањима је показао афинитет за опиоидне рецепторе, сматра се да је за ово одговорна хемијске структура аменофлавона (119).

Хлорогенска киселина је естар кафење и хинске киселине. Поједини радови указују на њено антихипертензивно деловање.

Цинарозид је флавоноид. Бројна истраживања, спроведена на експерименталним моделима су показала да је цинарозид имао значајну антиоксидативну способност. Цинарозид је значајно смањив степен апоптозе изазване водоник пероксидом. Сматра се да је механизам деловања повећање ендogene антиоксидативне активности супероксид дизмутазе, глутатион пероксидазе и каталазе. На овај начин се инхибира формирање интрацелуларних реактивних кисеоничних врста (РОС) (120).

Епикатехин је цис конфигурација катехина. Антиоксидативни ефекат епикатехина је сасвим упоредив са антиоксидативним ефектом кверцетина. На експерименталном моделу је показано да је епикатехин имао врло снажан антиоксидативни ефекат у процесу липидне пероксидације, подједнако као и кверцетин (121).

Кемферол. Поједине епидемиолошке студије су показале да кемферол може утицати на смањење ризика од развоја болести попут тумора и кардиоваскуларних обољења. Бројне предклиничке студије указују да кемферол и неки његови гликозиди имају широки спектар фармаколошких активности. Указују на антиоксидативно, антиинфламаторно, антимикробно деловање. Потом, антиканцерогено, кардиопротективно, антидијабетично, анксиолитично, аналгетично деловање... (122). Антидепресивно деловање је показано у тесту на животињама (123), а антиканцерогено је показано у смислу смањења ризика од развоја канцера пнкреаса (115) и плућа код пушача (124).

П-кумаринска киселина је антиоксиданс. На експерименталном моделу је показано да п-кумаринска киселина може да смањи ризик од развоја канцера стомака тако што доводи до смањивања формирања канцерогених нитрозоамина (125, 126).

Протокатехинска киселина налази се у многим биљкама, пре свега у зеленом чају. У *in vivo* моделу на пацовима је показано да је имала антиоксидативни и

атиинфламаторни ефекат (127). Међутим, протокатехинска киселина у *in vivo* моделу на мишевима је показала мешовите ефекте на туморским ћелијама коже. У зависности од количине и времена апликације протокатехинска киселина је довела до редукције или повећања раста туморских ћелија (128).

П-хидроксибензоева киселина се често користи као антиоксидант. Има веома ниску токсичност. Код мишева је ЛД₅₀ 2200 mg/kg.

Сва наведена једињења су у одређеној количини присутна у екстракту *C. nigra* и управо та мешавина даје специфичне фармаколошке особине екстракта. Као што је горе наведено за поједине компоненте је и доказана специфична фармаколошка активност. На пример кемферол се повезује са антимикуробним деловањем, анксиолитичко деловање се приписује присиству кемферола и кверцетина а антиоксидативни ефекат са присуством протокатехинске киселине, кемферола, цинарозидида... (129, 130, 131, 132). Међутим многи аутори сматрају да је коначни фармаколошки видљиви ефекат резултат не само присуства ових једињења за које је поуздано утврђено деловање, већ резултат мешавине свих компоненти у одрђеном међусобном односу. Садржај једињења присутних у екстракту биљака рода *Crataegus* може значајно варирати од врсте до врсте као и од поднебља у коме је биљка расла.

Тако садржај компоненти екстракт *C. nigra* добијен ХПЛЦ анализом у поређењу са садржајем екстракта других врста глога се донекле разликује. У екстракту *C. nigra* није утврђено присуство витексина, који је на пример у траговима присутан у мешавини *C. monogyna* и *C. oxyachanta* (30). Док је у овој мешавини изостало присуство кафење киселине и епикатехина присутних у екстракту *C. nigra*. С друге стране ни код једног од ова два наведена екстракта није утврђено присуство витексин-2"-О-рамнозида и цианидин хлорида за које постоје литературни подаци да су присутни у *Crataegus* врстама (13). Међутим уколико упоредимо ХПЛЦ профил мешавине *C. monogyna* и *C. oxyachanta* (30) са ХПЛЦ сликом екстракта плодова *C. nigra* добијамо сличан образац ХПЛЦ хроматограма са хиперозидом и изокверцитином као једним од главних компонената у флавоноидној групи једињења слика 9.

Хемијски састав глога је проучаван и добро познат. Међутим, у неким врстама поједина једињења нису присутна док у другима представљају „главно“ једињење. Тако имамо да деривати апигенина изоловани у различитим врстама глога се налазе у

различитим концентрацијама између врста као и у оквиру једне исте врсте. У екстракту *C. nigra* није идентификован ни један дериват апигенина док је у другим врстама присутан у различитим количинама и у различитим деловима биљке или га пак ни ту нема (133). Према литературним подацима код *C. monogyna* у плодовима је нађено од 0-0,148 mg/g сувог екстракта; у цветовима у траговима до 3,076 mg/g; а у лишћу ништа. Код *C. pentagyna* у плодовима и лишћу није утврђивано присуство апигенина, док је у цветовима у концентрацији од 0,6 до 1,5 mg/g. *C. pinnatifida* у плодовима садржи од 0,028 до 1,30 mg/g; у цветовима није детектовано присуство а у лишћу је распон од 0,22 до 9,53 mg/g. Код врсте *C. laevigata* у плодовима и лишћу није утврђивано присуство апигенина док је у цветовима у дозама од 1,9 до 12,8 mg/g; *C. microphylla* апигенин се налази у лишћу у концентрацијама до 0,01 mg/g, док у плодовима није утврђивано његово присуство а у цветовима на основу до садашњих истраживања није детектовано присуство овог флавоноида. *C. sanguinea* у плодовима садржи око 0,38 mg/g, а код лишћа и цветова нису рађене анализе на присуство апигенина. Дакле у појединим врстама као што су *C. pentagyna*, *C. laevigata*, *C. microphylla* где нису рађене анализе на присуство апигенина у плодовима доказано је његово присуство или у лишћу или у цветовима. До сада не постоје никакви литературни подаци о хемијском саставу *C. nigra*, тако да би даља истраживања свакако требало спровести.

Слична варијабилност у оквиру исте и између различитих врста је присутна скоро код свих хемијских једињења изолованих у глогу. Деривати кверцетина изоловани у *C. nigra* у плодовима износе 1,45 mg/g, у цветовима и лишћу није рађена квантификација. *C. azarolus var. aronia* у цветовима је концентрација кверцетина од 0,03 до 0,248 mg/g, док у плодовима и лишћу није утврђивано његово присуство. Код *C. microphylla* у плодовима није одређивана концентрација кверцетина док у цветовима има 0,063 а у лишћу 0,077 mg/g. *C. monogyna* у плодовима се креће од 0 до 3,45 mg/g, у цветовима од 0,06868 до 11,97 mg/g а у лишћу од 0,7733 до 25,05 mg/g. *C. pinnatifida* у плодовима од 0,134 до 0,25 mg/g, у цветовима није утврђивано присуство а у лишћу од 0,089 до 4,27 mg/g. *C. laevigata* у плодовима и лишћу нису квантификовани деривати кверцетина док их у цветовима има од 0 до 10,5 mg/g. *C. pentagyna* као и предходна врста има квантификоване деривате кверцетина само у цветовима од 0,5 до 2,5 mg/g. *C. scabrifolia* у цветовима ове врсте није утврђивано присуство деривата кверцетина док се у плодовима крећу од 0 до 0,69 mg/g и у

лишћу од 0,3351 до 3,537 mg/g. *C. aronia var. aronia* у плодовима је 0,61 mg/g, у лишћу 8,72 mg/g док у цветовима нису рађене анализе.

Дакле, деривати кверцетина изоловани у екстракту плодова *C. nigra* су присутни у високој количини у односу на већину других врста, мада су приказане вредности ових деривата код појединих врста *C. monogyna* скоро дупло већа од вредности код *C. nigra*. Ово је уочено само у појединим резултатима везаним за *C. monogyna* док код свих осталих врста па чак већине резултата код *C. monogyna* су вредности приметно ниже или пак нису ни идентификовани. У екстракту *C. nigra* главни, у највећој концентрацији присутан, дериват кверцетина је рутин, док је код већине других врста глога то хиперозид. И овде треба уочити да је количина присутних деривата кверцетина, код врста где је испитиван увек нешто већа у цветовима и лишћу него у плодовима.

Деривати кемферола су такође карактеристични за врсте рода *Crataegus*. Међутим и овде су количине врло варијабилне као и код предходних деривата. У екстракту *C. nigra* су присутни у врло ниским концентрацијам, 0,006 mg/g, тако да би њихово присуство овде могли дефинисати као присуство у траговима. Литературни подаци који указују на концентрацију кемферола у различитим врстама глога се односе на цветове и лишће. Код *C. microphylla* у цветовима је концентрација од 0,025 до 0,03 mg/g, док је само у једној студији уочено и представљено присуство кемферола за ову врсту у лишћу од 0,01 mg/g, у осталим или није детектован или није ни испитивано његово присуство. Код *C. laevigata* у цветовима није детектовано присуство кемферола а у листовима није ни испитивано, *C. macrocarpa* само у цветовима од 1,3 до 3,7 mg/g; *C. pentagyna* такође само у цветовима од 0 до 4,7 mg/g. Код *C. monogyna* у цветовима је у већини студија показано да нема присуства кемферола осим у јеном раду где је концентрација ишла од 5,9–7,2 mg/g. Дакле ни у једној од посматраних врста глога, осим у једном случају *C. microphylla*, није утврђена концентрација кемферола у листовима, а код појединих ни у листовима ни у цветовима. И утврђене концентрације су прилично ниске у поређењу са присуством других флавоноида или присуством кемферола у другим биљкама.

Као и предходна једињења тако и укупни феноли и укупни флавоноиди се по свом садржају у екстрактима разликују између врста, као и у оквиру исте врсте. Код *C. nigra* садржај укупних флавоноида у плодовима је 1,88 mg/g. Код *C. aronia var. aronia* је у листовима утврђен садржај укупних флавоноида 9,13 mg/g, док у прегледаним

литературним подацима није било оваквих података за плодове и цветове. Код *C. azarolus* се у плодовима укупни флавоноиди крећу од 0 до 0,81 mg/g, у лишћу од 1,10 до 1,50 mg/g, док у цветовима није рађено; *C. laevigata* у цветовима од 9,9 до 19,4 mg/g, док за лишће и плодове нема литературних података; *C. microphylla* у плодовима није рађено, у цветовима се вредности крећу од 6,2 до 12,8 mg/g, а у лишћу од 7,2 до 20,4 mg/g; *C. pentagyna* плодови 23,68 mg/g, у цветовима од 4,1 до 18,4 mg/g, а у лишћу није рађено; *C. macrocarpa* у цветовима од 9,4 до 15,8 mg/g, док за плодове и лишће нема литературних података. И овде можемо уочити да су укупни флавоноиди у већој количини присутни у цветовима и лишћу него у плодовима.

Укупни феноли у плодовима *C. nigra* су одређени у количини од 72,7 mg/g. *C. azarolus* у плодовима има од 1,85 до 23,0 mg/g, док у лишћу и цветовима није одређивано. *C. monogyna* у плодовима од 16,426 до 57,07 mg/g, у цветовима од 9,7 до 98,89 mg/g, а у лишћу није утврђивано. *C. pentagyna* у плодовима 92,12 mg/g, а за лишће и цветове у прегледаној литератури нису нађени подаци. Слично је и код *C. pinnatifida*. Такође у литератури не постоје подаци за лишће и цветове, док су укупни феноли у плодовима у концентрацији 19,44 mg/g. *C. scabrifolia*, подаци за плодове и цветове нису нађени али у лишћу су присутни од 7,0 до 8,7 mg/g. Из ових података можемо видети да су укупни феноли у много већој количини присутни у плодовима него у осталим деловима биљке. Поређењем укупних фенола *C. nigra* са осталим врстама рода *Crataegus* видимо да су укупни феноли у плодовима црног глога присутни у великим количинама и у главном је то више него код других врста.

Која врста флавоноида ће бити присутна у различитим биљним врстама зависи од бројних фактора. То су генетски фактори, утицај средине као и у ком делу биљке се једињења формирају. Флавоноиди нису од суштинског значаја за развој и живот биљке, међутим они имају бројне улоге у самој биљци. Учествују у формирању боје биљке, доприносе у заштити од реактивних кисеоничних врста, а имају улогу и у одбрани биљке од разних паразита и биљних штеточина (134). Код сисара испољавају бројне ефекте везане за превенцију здравља као и лечење насталих стања. Тако делују као антибиотици, стимулишу продукцију антитела, снижавају високи крвни притисак а због антиоксидативног ефекта показују и антитуморску активност (135). Главни флавоноиди у *Crataegus* врстама су флавонол-О-гликозиди, најпре хиперозид. Међутим код *C. nigra* иако

је хиперозид присутан у значајној количини, у много већој је присутан рутин, тако да он чини главни флавоноид у овом екстракту. На основу литературних података, гликозиди су у главном сконцентрисани у цветовима (136), док лишће садржи углавном флавоон деривате (витексин) и полимере (епикатехин) (136). Плодови глога имају хемијски профил сличан осталим деловима биљке мада садрже више хиперозида него цветови а мање витексина него лишће. На основу свега приказаног у вези хемијске структуре глога, можемо закључити да постоји велика квалитативна и квантитативна варијабилност присутних једињења између различитих врста глога али и унутар исте врсте. Ова варијабилност је свакако последица генетске предиспозиције биљака, средине у којој се развијају али често на различитост добијених података утичу различите методе добијања резултата. Тако да је генерализовање резултата често тешко а некада и немогуће. Код *S. nigra* је рађено само хемијско испитивање плода. На основу података за друге врсте глога где се јасно уочава велика хемијска, квалитативна и квантитативна, разноликост између плодова, лишћа и цветова, и за ову врсту, *S. nigra*, би требало урадити додатне хемијске анализе лишћа и цветова.

Садржај процианидина код *S. nigra* износи 5,6 mg/g. Овај податак се односи на плодове црног глога, док за лишће и цветове није рађено. Код *S. aronia var. aronia* у плодовима није детектовано присуство процианидина, а за плодове и лишће нису нађени литературни подаци. Код *S. monogyna* у плодовима је од 1,058 до 22,2 mg/g, у цветовима од 1,356 до 17,946 mg/g, док у листовима није рађено; *S. laevigata* у плодовима није рађено, у цветовима 1 mg/g, а у лишћу 1,2 mg/g; *S. pinnatifida* у плодовима од 0,232 до 3,38 mg/g, у цветовима 0,05 mg/g а у лишћу није детектовано. Код *S. scabrifolia* подаци за лишће и цветове нису пронађени у литератури док је у плодовима присуство процианидина било 6,03 mg/g.

Из ових података видимо да је у процијанидинима најбогатија врста *S. monogyna*, међутим и за ову врсту постоје подаци о садржају процијанидина нижи него у случају *S. nigra*. Такође, на основу података из литературе везаних за друге врсте глога, можемо закључити да би евентуално већи садржај процијанидина био у цветовима. Многи аутори сматрају да концентрација процијанидина не варира толико између врста глога колико зависи од локације, односно средине из које је сакупљан биљни материјал као и од времена вегетације када се одговарајући биљни делови сакупљају. Поједини аутори, који

су проучавали садржај процијанидина и флавоноида у различитим деловима биљке прикупљаним у различитом вегетационом добу дошли су до закључака да се концентрација ових једињења прогресивно смањује од зелених ка црвеним плодовима. И код цветова је слична ситуација. Наиме, највећа концентрација је нађена код зрелих листова са цветним пупољцима а најниже концентрације су биле код зрелих листова са зрелим плодовима (53). У биљним препаратима се често стандардизује количина процијанидина, пошто се сматра да су они заједно са флавоноидима, носиоци фармаколошке активности једне биљке. За процијанидине је доказано да доводе до повећања протока крви, нормализују контрактилности срца, као и број срчаних откуцаја и доводе до пада крвног притиска (137).

Молекулски кисеоник је неопходан за опстанак већине организама (аеробни организиами) на Земљи. Он је неопходна компонента у процесу ћелијског дисања. Овде се хемијске везе из органских молекула богатих енергијом, као што је глукоза, претварају у енергију потребну за животне процесе. Односно, енергија ускладиштена у молекулима глукозе се претвара у хемијску енергију у облику АТП-а (138).

Оксидација глукозе у овом процесу изгледа овако:



Процес ћелијског дисања се код људи одвија на целуларном нивоу, у митохондријама. Започиње процесом гликолизе (метаболички процес присутан у свим живим организмима и за њега није потребно присуство кисеоника) а наставља се Кребсовим циклусом и оксидативном фосфорилацијом. Током ових процеса електрони се преносе са донора електрона на акцепторе електрона као што је кисеоник, у редокс реакцијама. Редокс реакције ослобађају енергију која се користи за формирање АТП-а. Ове редокс реакције се изводе посредством протеинских комплекса који се називају ланци транспорта електрона. Енергија која се ослободи протоком електрона кроз ланац транспорта електрона се користи од стране АТП синтетазе за формирање АТП-а из аденозин ди фосфата (АДП) реакцијом фосфорилације. Иако оксидативна фосфорилација представља витални део метаболизма, у току ове реакције долази до формирања реактивних облика кисеоника (РОС), што даље доводи до стварања слободних радикала који оштећују ћелију на различите начине и на различитим нивоима и на крају доводи до развоја болести и старења (139).

Дакле РОС се непрекидно ствара у току ћелијске респирације и то углавном у току преноса електрона у митохондријама. У активним митохондријама се око 1%-4% удахнутог кисеоника претвара у реактивна једињења кисеоника. И то су:

Супер оксид или *супероксидни радикал* настаје у процесу преноса електрона, када се кисеоник редукује једним електроном и постаје реактивни супер оксид. $O_2 + e^- \rightarrow O_2^-$

Такође, ћелије имуног система продукују супер оксид. Оне специфичним ензимским комплексом који се налази у мембрани ћелија, НАДПХ оксидазе, редукују кисеоник када настају веће количине овог ањона. У физиолошким условима овај радикал не изазива токсичне ефекте пошто га супероксид-дизмутаза (СОД) трансформише у мање активан водоник пероксид. Међутим у реакцији са азот-моноксидом настаје врло токсичан перокси-нитритни ањон (140). Овај производ има веома важну улогу у процесу уништења бактерија. Ово деловање испољава индукцијом липидне пероксидације и оштећењем ћелијске мембране.

Водоник пероксид, настаје у ћелији редукцијом молекула кисеоника са два електрона. За њега не можемо рећи да је прави слободни радикал пошто нема неспарених електрона и он представља најстабилнији интермедијерни продукт редукције кисеоника. Међутим и он показује бројне токсичне ефекте, као што је поремећај депонована калцијума у митохондријама што има утицаја код оксидативног стреса.

Хидроксил радикал је најреактивнији интермедијерни продукт делимичне редукције кисеоника. Уколико каталаза не уклони водоник пероксид он може да реагује са феро јонима и да формира хидроксилни радикал. Овај радикал доводи до иреверзибилног оштећења ћелије. То подразумева оштећење мембране митохондрија, оштећење молекуле ДНК, оштећење мембране ћелије и поремећј липидне пероксидације (141).

Дакле, видимо да се реактивне врсте кисеоника непрекидно стварају у свим живим ћелијама и представљају нормалан нус производ метаболизма кисеоника. Узрок формирања РОС-а могу бити и спољни фактори као што су дувански дим, употреба лекова, начин исхране, зрачења из околне средине или терапијска зрачења, хипероксије па и повећана физичка активност (142). Под утицајем и спољашњих и унутрашњих фактора у организму долази до формирања РОС-а и када се њихово присуство довољно повећа и доведе до оштећења ћелија онда кажемо да је дошло до развоја оксидативног стреса (142).

Нормално у организму постоје механизми који штите ћелије од штетног деловања РОС врста и то је антиоксидативни одбрамбени систем који се састоји од више нивоа. Овај систем поседује сопствени редокс потенцијал за уклањање реактивних кисеоничних врста али има и способност „поправке“ већ насталих оксидативних оштећења. Исцрпљивање или неспособност овог система у одбрани има за последицу развој оксидативног стреса у организму што води појави озбиљних оштећења и развоју патолошких стања. Одбрамбени механизам од деловања РОС врста се огледа у смањивању стварања у уклањању већ насталих слободних радикал, регенерацији и поправљању насталих оштећења. У ове механизме спадају ћелијски ензими и антиоксиданси. Најважнији ћелијски ензими су супероксид дизмутаза, која супероксид трансформише до кисеоника и мање токсичног водоник – пероксида и каталаза која водоник – пероксид трансформише у воду и кисеоник. Антиоксиданси уклањају већ створене слободне радикале, представљају „хватаче“ слободних радикала, доноре електрона а неки од њих инхибирају ензимске системе који продукују РОС врсте. Најзначајнији природни антиоксиданси су аскорбинска киселина, каротеноиди, убихинон...

Утврђено је да прекомерно присуство РОС врста, које надвлада постојеће одбрамбене механизме, доводи до трајних оштећења ћелија што даље води развоју бројних поремећаја и болести. РОС врсте променама које изазивају на нивоу ДНК доводе до мутације гена који контролишу размножавање. Као последицу овога имамо неконтролисано и убрзано размножавање ћелија и развој **тумора** (143). Услед оксидације ЛДЛ-липопротеина и повећаног стварања водоник-пероксида долази до оштећења епитела артерија и развоја **атеросклерозе**. У оштећеном епителу могуће је и формирање тромба који даље може изазвати зачепљење неког од крвних судова срца, мозга или других органа и последично томе изазвати **инфаркт** срца, мозга ... (144). Многи аутори сматрају да је последица нагомилавања РОС врста и развој бројних **неуродегенеративних** обољења, Даунов синдром, због промене на хромозомима, Алцхајмерова болест услед непосредне везе између пероксидације и формирања амилоид липида. **Реуматоидни** артритис се развија као последица деловања РОС-а на зглобове, а многи повезују и развој **дијабетеса** са присуством РОС врста. У случају **хипоксије** може доћи до реверзибилних или иреверзибилних оштећења. То је последица (не)могућности поновног успостављања нормалне функције митохондрија и/или оштећење на нивоу ћелијске мембране. Међутим

у сваком случају главне промене у условима хипоксије се одвијају на нивоу мембране где долази до њеног оштећења услед деловања неке од РОС врста (145).

Сматра се да је способност биљних екстраката да покажу антиоксидативну активност, односно способност „хватања“ слободних радикала у ствари последица присуства флавоноида и фенола (146).

Фенолна једињења свакако спадају у једне од најзначајнијих секундарних биљних метаболита. Њих карактерише најмање један ароматични прстен (са 6 Ц атома) са једном или више хидроксилних група. Феноли су подељени у неколико група у зависности од хемијске структуре. Па тако имамо једноставне феноле са основним фенолним скелетом, бензоеву киселину, флавоноиде. Феноли су у стању да утичу на кинетику пероксидације, стабилизацијом ћелијске мембране и то смањивањем њене пропустљивости чиме се спречава ширење слободних радикала и тако се ограничава пероксидативна реакција. Сматра се да интерагују са мембранским фосфолипидима, односно везују се за поларне групе фосфолипида водоничним везама и на тај начин се акумулирају на обе стране мембране. Њихова антиоксидативна активност лежи у хемијској структури. У стању су да донирају електрон или водоноков атом и тако „ухвате“ слободне радикале. Полифеноли поседују идеалну хемијску структуру за ову активност, а поједини аутори су показали да ова једињења могу бити чак и ефикаснија од витамина Ц и Е у *in vitro* условима (146).

Још увек није у потпуности разјашњена веза између хемијске структуре флавоноида и ове активности, међутим сматра се да антиоксидативну способност испољавају захваљујући извесним карактеристикама у структури. То је присуство орто хидроксилних група на Б прстену флавоноидне структуре, потом број слободних хидроксилних група, присуство двоструке везе између Ц2 и Ц3 позиције у Ц прстену и присуство хидроксилне групе у положају 3 (146).

У студији где је поређена антиоксидативна активност синтетичких антиоксиданаса, токоферола и флавоноида утврђено је да су највећу активност показали синтетички антиоксиданси и токоферол. Нешто мања, али и даље висока активност је показана код флавонола као што су кемферол, кверцетин... Дакле ово су једињења са слободном хидроксилном групом у положају Ц3 и сматра се да је управо она одговорна за антиоксидативну моћ хетерогених система. Такође је рађено и поређење антиоксидативне активности флавонол агликона са њиховим гликозидима или метил дериватима. Показало

се да блокада Ц3 хидроксилне групе резултира губитком антиоксидативне способности док се блокадом других флавонол хидроксилних група не производи овај ефекат. С друге стране у биолошким системима гликозиди нормално подлежу ензимској хидролизи што води формирању активних флавонол агликона. На пример рутин, који се код нас налази у највећој мери, а иначе се може наћи у биљкама, хидролизом даје кверцетин, који је веома антиоксидативно потентан агликон.

Утврђено је да флавоноиди са једноструком везом између Ц2-Ц3, који имају само једну хидроксилну групу у положају Ц4 у Б прстену имају веома ниску антирадикалску активност. Док флавоноиди са супституисаном хидроксилном групом у положају Ц3 који имају само једну хидроксилну групу на Ц4 у Б прстену и двоструку везу између Ц2-Ц3, имају јасно већу активност, што указује на значајност двоструке везе на положају Ц2-Ц3. Такође постоји и јака антирадикалска активност флавонола и флавоноида са хидроксилним групама у орто положају Ц3 и Ц4 у Б прстену. Иако је хидроксилна група у положају Ц3 супституисана сматра се да група на Ц3 у Б прстену појачава активност хидроксилне групе на положају Ц4 у Б прстену (147).

Сходно томе да је у екстракту *C. nigra* показано значајно присуство и фенолних једињења и специфично флавонола и флавоноида, не изненађује и резултат доказане антиоксидативне активности екстракта. Дакле, једињења која имају антиоксидативне карактеристике у стању су да редукују ДППХ радикал и донацијом водониковог атома преведу овај облик у неутралну ДППХ форму. Екстракт *C. nigra* је показао способност „хватања“ слободних радикала са ЕЦ50 од 27,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Ова активност екстракта је мања него активност БХА, чији је ЕЦ50 1,57 $\mu\text{g}/\text{mL}$; мања од БХТ ЕЦ50 је 11,65 $\mu\text{g}/\text{mL}$; мања од стандарда кверцетина ЕЦ50 је 0,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$ и мања од стандарда рутина ЕЦ50 је 1,42 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Нека ранија истраживања су показала да сва једињења која ЕЦ50 показују при концентрацији мањој од 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ се сматрају активним антиоксидансима. У складу са тим и екстракт *C. nigra* поседује значајну антиоксидативну активност (148).

За поједине врсте глога је потврђена антиоксидативна активност и у поређењу са тим подацима *C. nigra* у односу не неке од њих показује и већи антиоксидативни ефекат. Мешавина *C. monogina* и *C. oxyacantha* активност од ЕЦ50 показује при концентрацији од 52,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (30). *C. pinnatifida* при концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ показује ЕЦ84 (149). Такође према овој студији поједине биљке које су познати антиоксиданси показују мању

ДППХ активност од екстракта *C. nigra*. Такве су *Camellia sinensis* L. (зелени чај) у концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ показује ЕЦ84; *Rosemarynus officinalis* L. у концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ показује ЕЦ85,4; *Foeniculum vulgare* у истој концентрацији ЕЦ70,1; *Lavendula angustifolia* ЕЦ64,2; *Mentha piperita* L. ЕЦ63,7 при концентрацији од 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. По резултатима добијеним за *C. nigra* видимо да при концентрацији од 83,33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ЕЦ је 96,6%. Наравно, постоји велики број биљних врста које су потентнији антиоксиданси од *C. nigra*. Као што је раније показано антиоксидативна активност у многоме зависи од саме хемијске структуре биљних екстраката. Поједини аутори су показали редослед потентности код појединих фенола и флавоноида. Па је код *C. monogyna* потврђено да потенцијал фенола иде следећим редоследом: кверцетин > Б2 процијанидин > епикатехи, док су два флавонол гликозида нешто мање ефикасна. Генерално, закључак је да су епикатехин и Б2 процијанидин наејфикаснији а за њима следе хиперозид и рутин (150).

Подигнути крстасти лавиринт је једна од најчешће коришћених метода за процену анксиолитичких својстава неке супстанце или једињења. У овом моделу се као извор анксиозности користе природни стимулуси као што су страх од новог, отвореног простора и страх од балансирања на релативно узаној платформи (отворени крак) (94). Животиња се природно плаши новог и отвореног простора, а такође јој је у природи да истражује непознато. Утврђено је да висина продубљује и интензивира страх код животиња. Тако да је однос приступа и избегавања отвореном простору много израженији када је овај простор издигнут на одређену висину него када није (94). Основни индекс анксиозности у овом моделу је време које животиња проведе у отвореним крацима као и учесталост уласка у отворене краке (94,95). Овај модел, подигнути крстасти лавиринт, је осетљив на супстанце које своје деловање испољавају преко ГАБА_A рецепторног комплекса. Ово је и разлог за коришћење диазепама као позитивне контроле. Као што је и очекивано, а у складу је са раније објављиваним резултатима да диазепам и други бензодиазепини, доводи до снажног анксиолитичког ефекта код различитих модела за испитивање анксиозности као што су модел конфликта, подигнути крстасти лавиринт, као и други модели који нису засновани на казни (151, 152). Након апликације хидроалкохолног екстракта *C. nigra*, у дозама од 300 и 600 mg/kg дошло је до значајног повећања времена проведеног у отвореним крацима и смањења времена проведеног у затвореним крацима лавиринта. Дакле дошло је до смањења избегавања отворених крака у поређењу са

контролном групом, што указује на анксиолитичку активност екстракта. Међутим ни једна од ове две дозе није показала статистички значајну разлику у односу на диазепам иако су животиње дуже времена проводиле у отвореним крацима при дози од 300 mg/kg него животиње које су примале диазепам. До сада није било систематских студија које су испитивале анксиолитичко деловање глога, листова, цветова или плодова. Једина студија која се тиме бавила је доказала анксиолитичко деловање екстракта листова *Crataegus oxycantha*. Интересантно је да је и у овој студији доказан анксиолитички ефекат у дозама од 300 и 600 mg/kg (153).

Многи биљни екстракти код којих постоји анксиолитичка активност истовремено показују и хипнотичка својства (129, 130, 131, 132). Апликацијом екстракта плодова *C. nigra* у дозама 300 и 600 mg/kg дошло је до продужетка времена спавања. Диазепам, као позитивна контрола, такође је показао продужење овог времена. За диазепам као и остале бензодиазепине је утврђено постојање седативног ефекта. Ово продужење времена спавања при апликацији екстракта *C. nigra* има статистичку значајност у односу на контролну групу која је примала физиолошки раствор. Међутим, ово време је било краће у односу на време које је продужила апликација диазепама, што указује на мања седативна својства *C. nigra* у односу на диазепам. Ова слабија седативна својства глога у ствари представљају на изванредан начин позитивну особину биљке. За многе кориснике анксиолитика битно је само умирујуће деловање препарата, док хипнотичко деловање представља нежељени ефекат лека. Као што смо видели, многи анксиолитици, било да се ради о бензодиазепинима или природним биљним препаратима, су и седативи. Уколико је ово деловање слабије изражено то значи да ће оно само олакшати увођење у сан а да ће пре свега деловати умирујуће. У случају да се у будућим истраживањима установи одсуство резидуалног седативног ефекта, црни глог би могао да буде погодна алтернатива дугоделујућим бензодиазепинима као што је диазепам.

Бензодиазепини, као и многи други лекови, своју активност остварују преко ГАБА_A рецептора. Ово је трансмембрански рецептор, који се састоји од пет субјединица две α , две β и једне γ или δ (154). Постоје бројне изоформе ових субјединица ($\alpha 1 - \alpha 6$, $\beta 1 - \beta 3$, $\gamma 1 - \gamma 3$). Ове субјединице окружују хлоридни (Cl^{-1}) канал. Ендогени неуротрансмитер за ове рецепторе је γ аминокбутерна киселина (ГАБА). Она представља снажан инхибиторни неуротрансмитер у ЦНС-у. Она се везује за своја места на ГАБА_A рецептору,

ортостерично место везивања, услед чега долази до промене конформације рецепторног протеина. Ово условљава отварање канала за хлоридни анјон и продор хлоридних јона унутар ћелије. Дакле активацијом ГАБА_A рецептора долази до стабилизације, односно до хиперполаризације ћелијске мембране. Сада је ексцитаторним неуротрансмитерима много теже да изврше деполаризацију неурона и генеришу акциони потенцијал (155). Ендогени лиганд γ аминок бутерна киселина се везује за посебна места на овом протеинском комплексу смештена између α и β субјединице. Бензодиазепини пак имају своја места за везивање на овом комплексу а то је између α и γ субјединице (155). Бројни лиганди се везују за ГАБА_A протеински комплекс доводећи до модулатије отварања хлоридног канала. Они могу бити агонисти, везују се за главно рецепторско место (место за које се везује ГАБА) и активирају га, што доводи до повећане пропустљивости за хлоридни јон; антагонисти, они се везују за главно рецепторско место али га не активирају. Иако на овај начин немају никакав утицај у смислу промене пропустљивости хлоридног канала, они са ГАБА-ом конкуришу за исто место везивања те на тај начин спречавају деловање ГАБА-е и тако доводе до смањења протока хлоридних јона; позитивни алостерни модулатори, везују се за алостерична места протеинског комплекса, што утиче на позитиван начин, односно повећавају ефикасност главном месту и самим тим индиректно повећавају пропустљивост за хлоридне јоне; негативни алостерични модулатори, везују се на алостерично место рецепторног комплекса и утичу на њега на негативан начин, заправо њиховим везивањем смањује се ефикасност главног места а самим тим индиректно се смањује пропустљивост за хлоридне јоне. Пример за агонист је ендогени неуротрансмитер ГАБА, за позитивни алостерични модулатор су бензодиазепини, етанол, барбитурати... а за негативни алостерични модулатор је флумазенил.

Од открића бензодиазепина, средином 1970-тих, они су постали најчешће преписивани лекови. Као и сви лекови и они имају жељене (анксиолитичко, антиконвулзивно и седтивно – хипнотичко) и нежељене (седативно, губитак меморије и физичка зависност) ефекте. Бензодиазепини не испољавају директно деловање на ГАБА_A рецепторе већ модулишу активност ГАБА преко алостеричних места на рецепторском комплексу. Ефекти бензодиазепина на ГАБА_A рецепторе су прилично комплексни и у многоме зависе од комбинације субјединица у ГАБА_A рецепторском комплексу. Сматра се да бензодиазепини преко γ_2 рецептора остварују највећи број својих ефеката, док α

субјединица одређује осетљивост комплекса на бeдзодиазепине (156). Тако диазепам, као снажни бензодиазепински агониста повећава активност ГАБА са високим афинитетом за ГАБА_A рецепторски комплекс који садржи $\alpha 1$ - $\alpha 3$ и $\alpha 5$ субјединицу. Насупрот овоме, рецепторни комплекс који садржи $\alpha 4$ или $\alpha 6$ субјединицу је практично неосетљив на диазепам (157).

Као што смо видели флавоноиди се карактеришу фенилбензопиранском хемијском структуром. Основна структура укључује два ароматична прстена и један хетероциклични бензопирански прстен. Ароматични прстен је означен као А прстен, прстен који у свом саставу садржи фенил групе је означен као Б прстен и бензопирански прстен је Ц прстен. Сматра се да је ова основна хемијска структура одговорна за способност везивања флавоноида високим афинитетом за бензодиазепинске места на ГАБА_A рецепторима. Флавоноиди су подељени у осам различитих класа у зависности од оксидативног статуса као и од броја и типа субституената на хетероцикличном прстену, али им је основна структура иста (73).

Скорашње експерименталне студије су показале да је 6-хидроксифлаван позитивни парцијални алостерични модулатор на флумазенил осетљивим бензодиазепинским местима. Он је показао значајно већи афинитет према $\alpha 2$ и $\alpha 3$ субјединицама рецепторског комплекса него према $\alpha 1$ и $\alpha 5$. У *in vivo* испитивањима 6-хидроксифлаван је показао значајни анксиолитички ефекат (158).

Међутим, поједине *in vivo* и *in vitro* студије су показале да поједини флавоноиди испољавају своје деловање независно од присуства флумазенила (антагонист бензодиазепина). Утврђено да флавоноиди делују на ГАБА_A рецепторе преко два различита механизма. Први укључује флумазенил осетљива места везивања а други флумазенил неосетљива места везивања. С друге стране, утврђено је да су поједини флавоноиди довели до модулације утицаја бензодиазепинских лиганата на ГАБА_A рецепторе, при чему су сами флавоноиди имали практично немерљиви ефекат на ГАБА одговор (159,160). Такође је утврђено да су ефекти апигенина и кверцетина на $\alpha 1\beta 1\gamma 2$ ГАБА_A рецептора били неосетљиви на бензодиазепински антагонист флуамизин. Ови резултати су показали да се механизам модулације јонотропних ГАБА рецептора код неких флавоноида разликује од оног описаног за класичну модулацију бензодиазепинског места на ГАБА_A рецепторном комплексу (161).

Супституисани флавоноиди, који у себи садрже бром, азот или метил групу, као 6-бромофлафон, 6,3`-динитрофлафон... имају врло висок афинитет за класичне бензодиазепинске рецепторе. Док је аментофлафон први флавоноид за који је доказано да има високи афинитет ка бензодиазепинским рецепторима а да у својој хемијској структури не садржи нитроген или неки други супституент (162).

Дакле, од првих студија које су показале афинитет флавоноида за бензодиазепинска места на ГАБА_A рецепторима па до данас, постало је јасно да су ефекти флавоноида на ове рецепторе далеко сложенији и комплекснији него што је везивање за једно тачно дефинисано место на рецепторском комплексу. У светлу деловања флавоноида имамо релативно добро окарактерисана, објашњена флумазенил сензитивна места на рецептору. Међутим од великог интереса су и флумазенил неосетљива места везивања флавоноида. Али од великог значаја су и места која су укључена у модулацију бензодиазепинских ефеката под утицајем неких флавоноида и способношћу активирања неких подтипова ГАБА_A рецептора у одсуству ГАБА-е.

На основу ових података, можемо доказати анксиолитички ефекат екстракта *C. nigra* у већој мери приписати флавоноидима а механизам њиховог деловања може бити очигледно разнолик. Што се тиче седативног ефекта екстракта, такође га можемо приписати флавоноидима. У експерименталном моделу на мишевима је показано да флавоноидни гликозиди, кверцитрин и изокверцитрин доводе до продужења спавања изазваног пентобарбиталом (163). Такође у овој студији је потврђено да није било леталних исхода на животињама под утицајем ових једињења. Ово може указати на приличну сигурност флавоноида као анксиолитика и благих седатива.

Антимикробну активност етанолног екстракта *C. nigra* смо посматрали на по једном представнику грам позитивних и грам негативних бактерија као и на *C. albicans* као представнику гљивица. Добијени резултати су у складу са раније приказаним резултатима. Односно код екстракта *C. nigra* није уочена активност наспрам *C. albicans* док су дозе од 50 mg/ml и 100 mg/ml показале антимикробна својства наспрам *Escherichia coli* као представника грам негативних и *Staphylococcus aureus* као представника грам позитивних бактерија (30).

Као што смо видели екстракт црног глога је богат фенолима, дериватима фенола као и флавоноидима. Још раније је утврђено да феноли из биљака представљају снажне

антимикробне агенсе. Они своју антимикробну активност испољавају деловањем на ћелијску мембрану патогена. Ћелијска мембрана је баријера селективне пропустљивости између цитоплазме и спољашње средине. Њена основна улога је да регулише ток растворених материја у ћелију и из ћелије. Феноли оштећују ћелијску мембрану и тако доводе до ослобађања ћелијског садржаја. Такође доводе до интрацелуларне коагулације цитоплазматског садржаја што доводи до смрти ћелије или инхибиције њеног раста (164).

Показало се да супституција фенола у пара положају повећава антимикробна својства једињења. Тако и бензоева киселина има извесна антимикробна својства. Мада се тачан механизам њеног антимикробног деловања још не зна, сматра се да и она као друге липофилне киселине инхибира преузимање аминокиселина од стране *E coli* (164).

Кверцетин и кемферол су једни од најчешће присутних флавоноида у многим биљкама и то у различитим формама гликозида. Потврђено је у бројним ранијим студијама да различити њихови гликозиди имају антимикробну активност, па у складу са овим се антимикробна активност биљних екстраката често приписује баш кверцетину и кемферолу. Поједини аутори сугеришу да је антимикробни ефекат ка грам негативним бактеријама већи код флавоноида, док флавоноиди који садрже две или три хидроксилне групе у прстеновим а А и Б имају већу активност у инхибицији раста грам позитивних бактерија. Такође поједини аутори сматрају да супституцијом флавоноида као што су хидроксилација, метоксилација или гликозилација долази до смањења и губитка њихове антифунгалне и антимикробне активности (164).

Биљни екстракти углавном садрже флавоноиде у њиховој гликозидној форми. Ово може бити разлог зашто биљни екстракти не показују тако интензивно антимикробно деловање као чисте компоненте. У експерименталној *in vitro* студији је испитивано антимикробно деловање чистих фенолних и флавоноидних деривата на одређене сојева грам позитивних, грам негативних микроорганизама и на *C. albicans*. Не само што је показано да чисте супстанце имају интензивнији антимикробни ефекат од биљних екстраката у којима су исте присутне, већ је показано које од њих у ствари представљају носиоце антимикробне активности. Кверцетин је показао јасну антимикробну активност наспрам *Staphylococcus aureus* и умерену активност према *Escherichia coli*. Кемферол је имао јасну антимикробну активност ка *Staphylococcus aureus* и није показао никакву активност према *Escherichia coli*. Према соју *Candida albicans* ни једна ни друга супстанца

нису показале ефекат (165). Сходно томе да је наш екстракт показао сличну активност према поменутиим бактеријама и гљивицама можемо закључити да су и у њему носоци антимикуробне активности кверцетин и кемферол.

6. Закључци

1. Хемијском анализом водено-етанолног екстракта плодова *Crataegus nigra* Wald. et Kitt. уочено је да су у највећој мери присутни флавоноидни хетерозиди, фенолна једињења и процијанидини. Од флавоноидних хетерозида се по количини издвајају кверцетин-3-О-рутинозид (рутин), кверцетин-3-О-глукозид (изокверцитрин), кверцетин-3-О-галактозид (хиперозид), док је од бројних идентификованих фенолних једињења у највећој мери присутана 5-О-кафеоилхинска киселина.
2. Испитивани екстракт *Crataegus nigra* је показао антиоксидативну активност. Она је слабија у порђењу са испитиваним стандардима (ВНТ, ВНА и кверцетина), међути у рангу је антиоксидативних активности других врста глога.
3. Водено-етанолни екстаркат плодова *Crataegus nigra* је показао значајни анксиолитички ефекат. Дозе од 300 и 600 mg/kg су показале статистички значајно повећање укупног времена које су експерименталне животиње проводиле у отвореним крацима у односу на контролну групу. Најочљивији ефекат је изазвала доза од 300 mg/kg. Међутим, иако је ова доза екстракта доводила до сигнификантно већег ефекта у односу на групу која је примала физиолошки раствор, ова доза није показала и сигнификантно већи ефекат у односу на диазепамску групу. Дозе од 300 и 600 mg/kg су такође показале и статистички значајно повећање процента броја улазака у отворене краке у односу на групу која је примала физиолошки раствор.
4. Водено-етанолни екстаркат плодова *Crataegus nigra* је показао значајни хипнотички ефекат. Дозе екстракт *C. nigra* од 300 и 600 mg/kg су довеле до статистички значајног повећања времена спавања у односу на групу са физиолошким раствором. Међутим ни овде није било статистички значајне разлике између групе које је примила диазепам и група које су примале екстракт. Из овога закључујемо да екстракт плодова *C. nigra* може послужити за олакшавање уласка у сан. Међутим у случају да се установи одсуство резидуалног седативног ефекта код испитиваног екстракта, он би могао да буде и погодна алтернатива дугоделујућим бензодиазепинима као што је диазепам.
5. Водено-етанолни екстракт плодова *Crataegus nigra* у концентрацијама од 50 – 150 mg/ml испољава антимицробну активност према *Escherichia coli*; у

концентрацијама од 100 - 150 mg/ml испољава антимикуробну активност према *Staphylococcus aureus*, док ни једна од примењених концентрација није довела до значајне инхибиције раста гљивице *Candida albicans*.

6. Антимикуробно деловање је било најизраженије при највећим испитиваним дозама и то чак 114.28% активности цефтриаксона (30 µg/диск) за *Escherichia-y coli* и 59.37% за *Staphylococcus aureus*. Посматрани сој *Candida albicans* је показао потпуну резистентност на било коју примењену дозу етанолног екстракта *C. nigra*.

7. Литература

1. Сарић М. (1989). *Лековите биљке СР Србије*, БИГЗ, Београд.
2. Горуновић М, Лукић П. (2001). *Фармакогнозија*, Фармацеутски факултет Београд, Београд.
3. Васиљевић Д, Крајишник Д, Грбић С, Ђекић Љ. (2009). *Фармацеутска технологија I*, Фармацеутски факултет Београд, Београд.
4. Посећено у јулу 2013 на <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/welcome.html>
5. Potter D, Eriksson T, Evans RC, et al. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution* 2007; 266: 5-43.
6. Campbell CS, Evans RC, Morgan DR, Dickinson TA, Arsenault MP. Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution* 2007; 266: 119-145.
7. Јосифовић М. (1976). *Флора СР Србије*, Научно дело, Београд, 8 издање.
8. Dönmez A. The Genus *Crataegus* L. (Rosaceae) with Special Reference to Hybridisation and Biodiversity in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 2004; 28: 29-37.
9. Verma SK, Jain V, Verma D, Khamesra R. *Crataegus oxyacantha*- A cardioprotective herb. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology* 2007; 1: 65-71.
10. Chang Q, Zuo Z, Harrison F, Chow MS. Hawthorn. *The Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 42: 605-612.
11. Ковачевић Н. (2004). *Основи фармакогнозије*. Српска школска књига, Београд. 3 издање.
12. Гостушки Р. (1979). *Лечење лековитим биљем*. Народна књига, Београд.
13. Посећено у јулу 2013 на <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/9.html#Js4927e.9>
14. Miller AL. Botanical influences on cardiovascular disease. *Alternative Medicine Review* 1998; 3: 422-431.
15. Ali-Shtayeh M, Jamous R, Jamous R. Herbal preparation use by patients suffering from cancer in Palestine. *Complementary Therapies in Clinical Practice* 2011; 17: 235-240.
16. Rigelsky JM, Sweet BV. Hawthorn: Pharmacology and therapeutic uses. *American Journal of Health-System Pharmacy* 2002; 59: 417-422.

17. Cour B, Molgaard P, Yi Z. Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology* 1995; 46:125-129.
18. Lin Y, Vermeer M, Trautwein E. Triterpenic Acids Present in Hawthorn Lower Plasma Cholesterol by Inhibiting Intestinal ACAT Activity in Hamsters. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; doi:10.1093/ecam/nep007.
19. Kai H, Xuegang L, Xin C, et al. Evaluation of antidiabetic potential of selected traditional Chinese medicines in STZ-induced diabetic mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2011; 137: 1135-1142.
20. Gu J, Zhang H, Chen L, Xu S, Yuan G, Xu X. Drug–target network and polypharmacology studies of a Traditional Chinese Medicine for type II diabetes mellitus. *Computational Biology and Chemistry* 2011; 35: 293-297.
21. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 2004; 74: 2157-2184.
22. Xie H, Huan L, Merritt AM, Ott EA. Equine chronic diarrhea: Traditional Chinese veterinary medicine review. *Journal of Equine Veterinary Science* 1997; 17: 667-674.
23. Long SR, Carey RA, Crofoot KM, Proteau PJ, Filtz TM. Effect of hawthorn (*Crataegus oxycantha*) crude extract and chromatographic fractions on multiple activities in a cultured cardiomyocyte assay. *Phytomedicine* 2006; 13: 643-650.
24. Degenring FH, Suter A, Weber M, Saller R. A randomised double blind placebo controlled clinical trial of a standardised extract of fresh *Crataegus* berries (*Crataegisan*®) in the treatment of patients with congestive heart failure NYHA II. *Phytomedicine* 2003; 10: 363-369.
25. Jayalakshmi R, Thirupurasundari CJ, Niranjali Devaraj S. Pretreatment with alcoholic extract of *Crataegusoxycantha* (AEC) activates mitochondrial protection during isoproterenol – induced myocardial infarction in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2006; 292: 59-67.
26. Garjani A, Nazemiyeh H, Maleki N, Valizadeh H. Effects of Extracts from Flowering Tops of *Crataegus meyeri* A. Pojark. on Ischaemic Arrhythmias in Anaesthetized Rats. *Phytotherapy Research* 2000; 14: 428-431.

27. Ljubuncic P, Azaizeh H, Cogan U, Bomzon A. The effects of a decoction prepared from the leaves and unripe fruits of *Crataegus aronia* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Alternative and Complementary Medicine* 2006; 3:6. doi:10.2202/1553-3840.1027.
28. Andrade-Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 99: 325-348.
29. Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Yin YF, Wang CP, Tseng TH. Anti-inflammatory Potential of Flavonoid Contents from Dried Fruit of *Crataegus pinnatifida* in Vitro and in Vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 430-436.
30. Tadić V, Dobrić S, Marković G, et al. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2008; 56: 7700–7709.
31. Koçyıldız ZÇ, Birman H, Olgaç V, Dar K, Melikoğlu G, Meriçli AH. *Crataegus tanacetifolia* Leaf Extract Prevents L-NAME-induced Hypertension in Rats: A Morphological Study. *Phytotherapy research* 2006; 20: 66-70.
32. Belz GG, Butzer R, Gaus W, Loew D. *Camphor-Crataegus* berry extract combination dose-dependently reduces tilt induced fall in blood pressure in orthostatic hypotension. *Phytomedicine* 2002; 9: 581-588.
33. Aynilian GH, Gora P, Farnsworth NR. *Preliminary study of potential antiarrhythmic effects of Crataegus monogyna*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1974; 63: 1936-1937.
34. Kashyap CP, Arya V, Thakur N. Ethnomedicinal and phytopharmacological potential of *Crataegus oxyacantha* Linn. - A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2012; S1194-S1199.
35. Fürst R, Zirrgiebel U, Totzke F, et al. The *Crataegus* extract WS® 1442 inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia in the rat carotid artery by directly influencing PDGFR- β . *Atherosclerosis* 2010; 211: 409-417.
36. Zhang Z, Ho WKK, Huang Y, James AE, Lam LW, Chen ZY. Hawthorn Fruit Is Hypolipidemic in Rabbits Fed a High Cholesterol Diet. *The Journal of Nutrition* 2002; 132: 5-10.

37. Khalil R, Abuharfeil N, Shabsoug B. The effect of *Crataegus aronica* aqueous extract in rabbits fed with high cholesterol diet. *European Journal of Scientific Research* 2008; 22: 352-360.
38. Kirakosyan A, Seymour E, Kaufman PB, Warber S, Bolling S, Chul Chang S. Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna* (Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3973-3976.
39. Ljubunčić P, Portnaya I, Cogan U, Azaizeh H, Bomzon A. Antioxidant activity of *Crataegus aronia* aqueous extract used in traditional Arab medicine in Israel. *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 101: 153-161.
40. Ebrahimzadeh MA, Bahramian F. Antioxidant Activity of *Crataegus pentaegyna* Subsp. *elburensis* Friuts Extracts Used in Traditional Medicine in Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009; 12: 413-419.
41. Wang T, Zhang P, Zhao C, et al. Prevention Effect in Selenite-Induced Cataract in Vivo and Antioxidative Effects in Vitro of *Crataegus pinnatifida* Leaves. *Biological Trace Element Research* 2011; 142: 106-116.
42. Benli M, Yiğit N, Geven F, Güney K, Bingöl Ü. Antimicrobial activity of endemic *Crataegus tanacetifolia* (Lam.) Pers and observation of the inhibition effect on bacterial cells. *Cell Biochemistry and Function* 2008; 26: 844-851.
43. Orhan I, Özçelik B, Kartal M, Özdeveci B, Duman H. HPLC Quantification of Vitexine-2'-O-rhamnoside and Hyperoside in Three *Crataegus* Species and Their Antimicrobial and Antiviral Activities. *Chromatographia* 2007; 66: S153-S157.
44. Shahat AA, Ismail SI, Hammouda FM, et al. Anti-HIV activity of flavonoids and proanthocyanidins from *Crataegus sinaica*. *Phytomedicine* 1998; 5:133-136.
45. Hu L, Xiong CL. The influence of medicated serum with root of *Crataegus cuneata* on human sperm motility parameters in vitro. *China Journal of Chinese material medica* 2006; 31: 333-335.
46. Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Mousavi SM, Mahmoudzadeh A, Akhlaghpour S. Radioprotective Effects of Hawthorn Fruit Extract Against Gamma Irradiation in Mouse Bone Marrow Cells. *Journal of Radiation Research* 2007; 48: 63-68.

47. Li F, Yuan Q, Rashid F. Isolation, purification and immunobiological activity of a new water-soluble bee pollen polysaccharide from *Crataegus pinnatifida* Bge. Carbohydrate Polymers 2009; 78: 80-88.
48. Hanus M, Lafon J, Mathieu M. Double-blind, randomised, placebo-controlled study to evaluate the efficacy and safety of a fixed combination containing two plant extracts (*Crataegus oxyacantha* and *Eschscholtzia californica*) and magnesium in mild-to-moderate anxiety disorders. Current Medical Research and Opinion 2004; 20: 63-71.
49. Tabach R, Mattei R, Carlini EL. Pharmacological evaluation of a phytotherapeutic product – CPV (dry extract of *Crataegus oxyacantha* L., *Passiflora incarnata* L. and *Valeriana officinalis* L.) in laboratory animals. Revista Brasileira de Farmacognosia 2009; 19: 255-260.
50. Byung SM, Young HK, Sang ML, et al. Cytotoxic triterpenes from *Crataegus pinnatifida*. Archives of Pharmacal Research 2000; 23: 155-158.
51. Kao ES, Wang CJ, Lin WL, Chu CY, Tseng TH. Effects of polyphenols derived from fruit of *Crataegus pinnatifida* on cell transformation, dermal edema and skin tumor formation by phorbol ester application. Food and Chemical Toxicology 2007; 45: 1795-1804.
52. Lakshmi T, Geetha RV, Anitha R. *Crataegus oxyacantha* Linn. commonly known as Hawthorn-A Scientific Review. International Journal of PharmTech Research 2012; 4: 458-465.
53. Bahorun T, Aumjaud E, Ramphul H, et al. Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts. Nahrung 2003; 47: 191-198.
54. Zhang PC, Zhou YJ, Xu SX. Two novel flavonoid glycosides from *Crataegus pinnatifida* Bge.var. *major* N.E.Br. Journal of Asian Natural Products Research 2000; 3: 77-82.
55. Maurya R, Yadav PP. Furanoflavonoids: An overview. Natural Product Reports 2005; 22: 400-424.
56. Chen J, Song S, He J, Xu S. A study of the chemical constituents of the leaves of *Crataegus pinnatifida*. Asian Journal of Traditional Medicines 2008; 3: 80-83.

57. Svedstrom U. Isolation and identification of oligomeric procyanidins from *Crataegus* leaves and flowers. *Phytochemistry* 2002; 60: 821-825.
58. Melikoglu G, Bitis L, Mericli AH. Flavonoids of *Crataegus microphylla*. *Natural Product Research* 2004; 18: 211-213.
59. Demiray S, Pintado ME, Castro PML. Evaluation of phenolic profiles and antioxidant activities of Turkish medicinal plants: *Tilia argentea*, *Crataegi folium* leaves and *Polygonum bistorta* roots. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 2009; 54:312-317.
60. Liu P, Kallio H, Lu D, Zhou C, Ou S, Yang B. Acids, sugars, and sugar alcohols in chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 1012-1019.
61. Sozer U, Donmez AA, Mericli AH. Constituents from the leaves of *Crataegus davisii* Browicz. *Scientia Pharmaceutica* 2006; 74: 203-208.
62. Ringl A, Prinz S, Huefner A, Kurzmann M, Kopp B. Chemosystematic value of flavonoids from *Crataegus x macrocarpa* (Rosaceae) with special emphasis on (*R*)- and (*S*)-eriodictyol-7-*O*-glucuronide and luteolin-7-*O*glucuronide. *Chemistry and Biodiversity* 2007; 4: 154-162.
63. Horvat RJ, Chapman GW. Identification of volatile compounds from ripe Mayhaw fruit (*Crataegus opaca*, *C. aestzvalzs*, and *C. rufula*. *Journal of Food Quality* 2007; 14: 307-312.
64. Aneta W, Oszmianski J. Influence of polyphenols isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi and *Crataegus oxyacantha* on the oxidative stability of cholesterol in butter stored in various conditions. *Eur Food Res Technol* 2007; 224: 635-642.
65. Bahri-Sahloul R, Ammar S, Fredj RB, et al. Polyphenol contents and antioxidant activities of extracts from flowers of two *Crataegus azarolus* L. varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2009; 12: 660-668.
66. Maharik N, Elgengaihi S, Taha H 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* boiss. *International Journal of Academic Research* 2009; 1: 30-34.
67. Rayyan S, Fossen T, Nateland HS, Andersen OM. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug '*Crataegi folium cum flore*' (hawthorn). *Phytochemical Analysis* 2005; 16: 334-41.

68. Ikeda T, Ogawa Y, Nohara T. A new triterpenoid from *Crataegus cuneata*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 1999; 47: 1487-1488.
69. Vivar-Vera MA, Salazar-Montoya JA, Calva-Calva G, Ramos-Ramirez EG. Extraction, thermal stability and kinetic behavior of pectinmethylesterase from hawthorn(*Crataegus pubescens*) fruit. Food Science and Technology 2007; 40: 278-284.
70. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- κ B pathway in the treatment of inflammation and cancer. The Journal of Clinical Investigation 2001; 107: 135-142.
71. Schuier M, Sies H, Sies B, Fischer H. Cocoa-Related Flavonoids Inhibit CFTR-Mediated Chloride Transport across T84 Human Colon Epithelia. The Journal of Nutrition 2005; 2320-2325.
72. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 2011; 38: 99-107.
73. Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. Biotechnology Journal 2007; 2: 1214-1234.
74. Fine AM. Oligomeric Proanthocyanidin Complexes: History, Structure, and Phytopharmaceutical Applications. Alternative Medicine Review 2000; 5: 144-151.
75. Јерковић И, Радонић А. (2009). *Практикум из органске кемије*, Хемијско-технолошки факултет Свеучилишта у Сплиту, Сплит.
76. Naczk M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. Journal of Chromatography A 2004; 1054: 95-111.
77. Urbonaviciute A, Jakstas V, Kornysova O, Janulis V, Maruska A. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. Journal of Chromatography A 2006; 1112: 339-344.
78. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 1999; 299: 152-178.

79. Beara IN, Lesiak MM, Jovin ED, et al. Plantain (*Plantago* L.) Species as Novel Sources of Flavonoid Antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 9268-9273.
80. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 2002; 10: 178-182.
81. Orčić ZD, Dukić MN, Francišković MM, Petrović SS, Jovin ĐE. Antioxidant activity relationship of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. *Chemistry Central Journal* 2011; 5:34.
82. Porter LJ, Hristich LN, Chan BG. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; 25: 223-230.
83. Soler-Rivas C, Espin JC, Wichers HJ. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis* 2000; 11: 330-338.
84. File S. Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behavioural Brain Research* 2001; 125: 151-157.
85. Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1997; 30: 289-304.
86. Каличанин П. (1996). *Анксиозни поремећаји: (стања патолошког страха)*, Tehniss, Београд.
87. Fuchs E, Flügge G. Experimental animal models for the simulation of depression and anxiety. *Dialogues in Clinical NeuroSciences* 2006; 8: 323-333.
88. Lang P, Davis M, Öhman A. Fear and anxiety: animal models and human cognitive psychophysiology. *Journal of Affective Disorders* 2000; 61: 137-159.
89. Blanchard RJ, Yudko EB, Rodgers RJ, Blanchard DC. Defense system psychopharmacology: an ethological approach to the pharmacology of fear and anxiety. *Behavioural Brain Research* 1993; 58: 155-165.
90. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 2003; 463: 3-33.
91. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1989; 32: 777-785.

92. Ripoll N, Hascoet M, Bourin M. The four-plates test: Anxiolytic or analgesic paradigm? *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biology Psychiatry* 2006; 30: 873-880.
93. Brown JS, Kalish HI, Farber IE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *Journal of Experimental Psychology: General* 1951; 41: 317–328.
94. Lister R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 92: 180–185.
95. Jones N., King S.M. Influence of circadian phase and test illumination on pre-clinical models of anxiety. *Physiology and Behavior* 2001; 72: 99–106.
96. Griebel G, Belzung C, Perrault G, Sanger DJ. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology* 2000; 148: 164–170.
97. Wahlsten D, Metten P, Phillips T, et al. Different data from different labs: lessons from studies of gene–environment interaction. *Journal of Neurobiology* 2003; 54: 283–311.
98. Mimura M, Namiki A, Kishi R, Ikeda T, Miyake H. Antagonistic effect of physostigmine on ketamine-induced anesthesia. *Psychopharmacology* 1990;102:399–403.
99. Rabbani M, Sajjadi SE, Mohammadi A. Evaluation of the anxiolytic effect of *Nepeta persica* Boiss. in mice. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2008; 5:181-186.
100. Cheruiyot KR, Olila D, Kateregga J. In-vitro antibacterial activity of selected medicinal plants from Longisa region of Bomet district, Kenya. *African Health Sciences* 2009; 9: S42-6.
101. Anwar F, Przybylski R. Effect of Solvents Extraction on Total Phenolics and Antioxidant Activity of Extracts from Flaxseed (*Linum Usitatissimu* L.). *Acta Scientiarum Polonorum* 2012; 11: 293-301.
102. Gao M, Liu CZ. Comparison of techniques for the extraction of flavonoids from cultured cells of *Saussurea medusa* Maxim. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2005; 21: 1461-1463.

103. Umale S, Mahanwar PA. Extraction of colorant from leaves of *Terminalia catappa* using Non conventional technique. *International Journal of Basic and Applied Sciences* 2012; 12: 79-88.
104. Watt E, Pretorius JC. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotusedulis* L. *Journal of Ethnopharmacology* 2001; 76: 87–91.
105. Ibtissem B, Abdelly C, Sfar S. Antioxidant and Antibacterial Properties of *Mesembryanthemum crystallinum* and *Carpobrotus edulis* Extracts. *Advances in Chemical Engineering and Science* 2012; 2: 359-365.
106. Santos KFR, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS, Oliveira MG. Hypolipidaemic Effects of Naringenin, Rutin, Nicotinic and Their Associations. *Pharmacological Research* 1999; 40: 493–496.
107. Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, et al. Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *The Journal of Nutrition* 2005; 135: 729–734.
108. Navarro-Núñez L, Lozano ML, Palomo M, et al. Apigenin Inhibits Platelet Adhesion and Thrombus Formation and Synergizes with Aspirin in the Suppression of the Arachidonic Acid Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 2970–2976.
109. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Il Farmaco* 2001; 56: 683–7.
110. Comalada M, Gamuesco D, Sierra S, et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *European Journal of Immunology* 2005; 35: 584-592.
111. Soromou LW, Chen N, Jiang L, et al. Astragalín attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by down-regulating NF- κ B signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2012; 419: 256-261.
112. Kotani M, Matsumoto M, Fujita A, et al. Persimmon leaf extract and astragalín inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2000; 106: 159-166.

113. Liu Z, Tao X, Zhang C, Lu Y, Wei D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-*o*-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2005; 59: 481-490.
114. Park H, Lee CM, Jung ID, et al. Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology* 2009; 9: 261-267.
115. Nöthlings U, Murphy SP, Wilkens LR, Henderson BE, Kolonel LN. Flavonols and pancreatic cancer risk: the multiethnic cohort study. *American Journal of Epidemiology* 2007; 166: 924-31.
116. Xavier CP, Lima CF, Rohde M, Pereira-Wilson C (December 2011). "Quercetin enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis in MSI colorectal cancer cells through p53 modulation". *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 2011; 68: 1449-57.
117. Edwards RL, Lyon T, Litwin SE, Rabovsky A, Jalil T. Quercetin Reduces Blood Pressure in Hypertensive Subjects. *The Journal of Nutrition* 2007; 137: 2405-2411.
118. Egert S, Bosy-Westphal A, Seiberl J, et al. Quercetin reduces systolic blood pressure and plasma oxidised low-density lipoprotein concentrations in overweight subjects with a high-cardiovascular disease risk phenotype: a double-blinded, placebo-controlled cross-over study. *British Journal of Nutrition* 2009; 102: 1065-74.
119. Katavic PL, Lamb K, Navarro H, Prisinzano TE. Flavonoids as Opioid Receptor Ligands: Identification and Preliminary Structure-Activity Relationships. *Journal of Natural Products* 2007; 70: 1278-1282.
120. Sun X, Sun G, Wang M, Xiao J, Sun X. Protective effects of cynaroside against H₂O₂-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry* 2011; 112: 2019-2029.
121. Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective Effect of Epicatechin, Epicatechin Gallate, and Quercetin on Lipid Peroxidation in Phospholipid Bilayers. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994; 308: 278-284.
122. Calderón-Montaño JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2011; 11: 298-344.

123. Hosseinzadeh H, Motamedshariaty V, Hadizadeh F. Antidepressant Effect of Kaempferol, a Constituent of Saffron (*Crocus stivus*) PETAL, in Mice and Rats. *Pharmacologyonline* 2007; 2: 367-370.
124. Посећено на сајту август 2013. <http://newsroom.ucla.edu/portal/ucla/fruits-vegetables-and-teas-may-51210.aspx>
125. Ferguson L, Zhu S, Harris P. Antioxidant and antigenotoxic effects of plant cell wall hydroxycinnamic acids in cultured HT-29 cells. *Molecular Nutrition and Food Research* 2005; 49: 585-593.
126. Kikugawa K, Hakamada T, Hasunuma M, Kurechi T. Reaction of *p* - Hydroxycinnamic Acid Derivatives with Nitrite and Its Relevance to Nitrosamine Formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1983; 31: 780-785.
127. Liu CL, Wang JM, Chu CY. In vivo protective effect of protocatechuic acid on tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatotoxicity. *Food and Chemiacal Toxicology* 2002; 40: 635–641.
128. Nakamura Y, Torikai K, Ohto Y, Murakami A, Tanaka T, Ohigashi H. A simple phenolic antioxidant protocatechuic acid enhances tumor promotion and oxidative stress in female ICR mouse skin: dose- and timing-dependent enhancement and involvement of bioactivation by tyrosinase. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1899-1907.
129. Akindele AJ, Adeyemi OO. Anxiolytic and sedative effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae) extract. *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2010; 3:28-36.
130. Lolli LF, Sato CM, Romanini CV, Villas-Boas LDB, Moraes Santos CA, Oliveira RMW. Possible involvement of GABA_A-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 111: 308-314.
131. Peng WH, Hsieh MT, Lee YS, Lin YC, Liao J. Anxiolytic effect of seed of *Ziziphus jujuba* in mouse models of anxiety. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 72: 435-441.
132. Rabbani M, Sajjadi SE, Zarei HR. Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 89: 271-276.

133. Edwards JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry* 2012; 79: 5-26.
134. Buer CS, Imin N, Djordjevic M. Flavonoids: New Roles for Old Molecules. *Journal of Integrative Plant Biology* 2010; 52:98-111.
135. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics* 2002; 96: 67-202.
136. Fong HHS, Bauman JL. Hawthorn. *Journal of Cardiovascular Nursing* 2002; 16: 1-8.
137. Calixto JB, Beirith A, Ferreira J, Santos ARS, Filho VC, Yunes RA. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytotherapy research* 2000; 14: 401-418
138. Porter RK, Brand MD. Mitochondrial proton conductance and H⁺/O ratio are independent of electron transport rate in isolated hepatocytes. *Biochemical Journal* 1995; 310: 379-382.
139. Посећено на сајту у августу 2013.
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/CellularRespiration.html>
140. Han D, Williams E, Cadenas E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochemical Journal* 2001; 353: 411-416.
141. Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 1979; 9: 527-605.
142. Hoyt A, Luukkonen J, Juutilainen J, Naarala J. Proliferation, Oxidative Stress and Cell Death in Cells Exposed to 872 MHz Radiofrequency Radiation and Oxidants. *Radiation Research* 2008; 170:235-243.
143. Tennant DA, Durán RV, Boulahbel H, Gottlieb E. Metabolic transformation in cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1269-1280.
144. Frostegard J, Nilsson J, Haegerstrand A, Hamsten A, Wigzell H, Gidlund M. Oxidized low density lipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and the monocytic cell line U937. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 1991; 87: 904-08.

145. Mihajlović Lj, Mihajlović KN, Petrović A, Pavlović R. Molekularni mehanizam ćelijskih oštećenja pri akutnoj hipoksiji. *Acta medica Medianae* 2002; 4: 51 -61.
146. Michalak A. Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 2006; 15: 523-530.
147. Burda S, Oleszek W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 2774-2779.
148. Cheel J, Theoduloz C, Rodríguez J, Schmeda-Hirschmann G. Free Radical Scavengers and Antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 2511-2517.
149. Yoo KM, Lee CH, Lee H, Moon BK, Lee CY. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry* 2008; 106: 929-936.
150. Froehlicher T, Hennebelle T, Martin-Nizard F, et al. Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry* 2009; 115: 897-903.
151. Pellow S, File SE. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 1986; 24: 525-529.
152. Winslow JT, Insel TR. Infant rat separation is a sensitive test for novel anxiolytics. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry* 1991; 15: 745-757.
153. Ankitkumar A, Ashok M, Veera Jyothsna M, Radhakrishna B, Shivalinge Gowda KP. Evaluation of anxiolytic activity of aqueous and alcoholic extracts of leaves of *Crataegus oxycantha* in mice. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2011; 2: 86-91.
154. Whiting PJ. GABA-A receptor subtypes in the brain: a paradigm for CNS drug discovery? *Drug Discov Today* 2003; 8: 445-450.
155. Guyton A, Hall J. (1999). *Medicinska fiziologija*. Beograd, Savremena administracija, 9 издање.

156. Wafford KA, Bain CJ, Whiting PJ, Kemp JA (1993). Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. *Molecular Pharmacology* 1993; 44: 437–442.
157. Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH (1992). A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *The Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 1426–1429.
158. Ren L, Wanga F, Xua Z, Chana WM, Zhaoa C, Xue H. GABAA receptor subtype selectivity underlying anxiolytic effect of 6-hydroxyflavone. *Biochemical Pharmacology* 2010; 79: 1337–1344.
159. Campbell EL, Chebib M, Johnston GAR. The dietary flavonoids apigenin and (–)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA_A receptors. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 1631–1638.
160. Fernandez SP, Wasowski C, Paladini AC, Marder M. Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam. *European Journal of Pharmacology* 2005; 512: 189–198.
161. Goutman JD, Waxemberg MD, Donate-Oliver F, Pomata PE, Calvo DJ. Flavonoid modulation of ionic currents mediated by GABA_A and GABA_C receptors. *European Journal of Pharmacology* 2003; 461: 79–87.
162. Medina JH, Viola H, Wolfman C, et al. Neuroactive flavonoids: new ligands for the Benzodiazepine receptors. *Phytomedicine* 1998; 5: 235-243.
163. Kang TH, Jeong SJ, Kim NY, Higuchi R, Kim YC. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *Journal of Ethnopharmacology* 2000; 71: 321-323.
164. Park ES, Moon WS, Song MJ, Kim MN, Chung KH, Yoon JS. Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *International Biodeterioration and Biodegradation* 2001; 47: 209-214.
165. Rauha JP, Remes S, Heinonen M, et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology* 2000; 56: 3-12.

8. ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број: РБ

Идентификациони број: ИБР

Тип документације: ТД

Монографска публикација

Тип записа: ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада: ВР

Докторска дисертација

Аутор: АУ

Марија Т. Поповић-Миленковић

Ментор/коментор: МН

проф. др. Слободан Јанковић

Наслов рада: НР

Испитивање билошких ефеката екстракта
плода *Crataegus nigra* Wald. et Kit

Језик публикације: ЛП

Српски (ћирилица)

Језик извода: ЈИ

Српски / Енглески

Земља публиковања: ЗП

Србија

Уже географско подручје: УГП

Србија

Година: ГО

2014

Издавач: ИЗ

Ауторски репринт

Место и адреса: МС	Светозара Марковића 69, 34 000 Крагујевац
Физички опис рада: ФО	Дисертација има 114 страна, 7 поглавља, 15 слика, 11 табела, 165 референци, 2 фотографије
Научна област: НО	Медицина
Научна дисциплина: ДИ	Клиничка и експериментална фармакологија
Предметна одредница/ кључне речи: ПО	<i>Crataegus nigra</i> Wald. et Kit, анксиолитичко, антимикробно дејство, фитохемијска анализа
УДК	
Чува се: ЧУ	У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Светозара Марковића 69, 34 000 Крагујевац
Важна напомена: МН	
Извод: ИД	

Crataegus nigra, црни глог, може бити жбун или ниско дрво. Његово станиште су плавни, алувијални терени крај већих река у Мађарској, Србији, Хрватској. Сам род *Crataegus* је врло богат врстама и многе од њих су детаљно фитохемијски и фармаколошки испитиване. Хемијском карактеризацијом различитих врста рода *Crataegus* је утврђено присуство флавоноида, флавоноидних гликозида, процијанидина, док су фармаколошка испитивања показала кардиопротективно, антиоксидативно, антимикробно, гастропротективно деловање. Међутим у досадашњим испитивањима врсте *Crataegus nigra* истраживања су била усмерена само на ботаничке и морфолошке карактеристике. У литератури нема података о хемијском саставу и фармаколошким

особинама ове врсте. Циљ овог истраживања је био да се одреди хемијски профил ове врсте глога, као и утврђивање биолошке активности и фармаколошких ефеката водено-етанолног екстракта плодова *C. nigra*.

За предвиђене анализе припремљен је екстракт плодова *C. nigra* са 80% етанолом. Применом референтне методологије одређен је садржај укупних фенола, флавоноида и процијанидина. Извршена је идентификација фенолних једињења помоћу 45 стандардних супстанци. У *in vitro* условима применом DPPH теста одређена је антиоксидативна активност екстракта. Испитивање фармаколошких ефеката спроведено је применом одговарајућих методологија при чему је одређиван анксиолитички, хипнотички ефекат и антимикуробна активност етанолног екстракта плодова црног глога.

Резултати истраживања су показали доминантно присуство флавоноидних гликозида, од којих се по количини издвајају рутин, изокверцитрин, хиперозид. Доказано је и присуство бројних фенолних једињења и процијанидина. Испитивани екстракт је показао антиоксидативни ефекат. Он је слабији у порђењу са испитиваним стандардима (ВНТ, ВНА и кверцетина), међути у рангу је антиоксидативних активности других врста глога. Етанолни екстаркат плодова *Crataegus nigra* је показао значајни анксиолитички ефекат. Ова статистичка значајност је уочена у односу на негативну контролу, међутим у односу на позитивну контролу (диазепам), није је било. Хипнотички ефекат екстракта је такође имао статистичку значајност у односу на негативну контролу. Антимикуробно деловање на грам позитивне и грам негативне бактерије је било најизраженије при највећим примењеним концентрацијама. Међутим ни једна примењена концентрација није довела до инхибиције раста гљивице *Candida albicans*.

Датум прихватања теме од стране ННВ: ДП

Датум одбране: ДО

Чланови комисије: КО

Доц. др Срђан Стефановић - председник
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Доц. др Марина Костић – члан
Факултет медицинских наука у Крагујевцу

Проф. др Силва Добрић – члан
Медицински факултет ВМА Универзитета
одбране у Београду

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICINE KRAGUJEVAC**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Documentation type: DT	Monographic publication
Type of record: TR	Textual material, printed
Contents code: CC	Ph.D. Thesis
Author: AU	Marija T. Popovic-Milenkovic
Menthor/comenthor: MN	Prof. dr Slobodan Jankovic
Title: TI	Examination biological effects of the extract <i>Crataegus nigra</i> Wald. et Kit berries
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract:	Serbian / English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Serbia
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Reprint by author

Publication place: PP	Svetozara Markovica 69, 34 000 Kragujevac
Physical description: PD	Thesis contains 114 pages, 7 chapters, 15 images, 11 tables, 165 literature references, 2 photos
Scientific field: SF	Medicine
Scientific discipline: SD	Clinical and experimental pharmacology
Subject/key words: SKW	<i>Crataegus nigra</i> Wald. et Kit, anxiolytic, antimicrobial effects, phytochemical analysis
UDC	
Holding data:	Library of Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia
Note: N	
Abstract: AB	

Crataegus nigra, black hawthorn, may grow either into shrubs or small trees. Its habitat is the alluvial flood plain along the larger rivers in Hungary, Serbia and Croatia. The genus *Crataegus* is very rich in species and many of them have been phytochemically and pharmacologically examined thoroughly. Chemical characterization of different species of *Crataegus* has revealed the presence of flavonoids, flavonoid glycoside, procyanidins, while pharmacological analysis has shown cardioprotective, antioxidative, antimicrobial, gastroprotective effects. However, the previous studies in *Crataegus nigra* species were focused only on botanical and morphological characteristics. In the literature, there is no data concerning the chemical composition and pharmacological properties of this species. The aim of this research is to determine the chemical profile of this hawthorn species, as well as to determine the biological activity and pharmacological effects of water-ethanol extracts of *C. nigra* fruits.

For the planned analysis, *C.nigra* fruit extract was prepared in 80% ethanol. Applying reference methodology, the total content of phenols, flavonoids and procyanidins was determined. Phenolic compounds were identified using 45 standard substances. In vitro, antioxidant activity of the extract was determined using DPPH test. Studies on the

pharmacological effects were carried out using appropriate methodologies while assessing anxiolytic effect, hypnotic effect and antimicrobial activity of the ethanol extract of black hawthorn fruit.

The research findings showed the dominant presence of flavonoid glycosides, among which rutin, isoquercetin and hyperoside stand out by their quantity. The presence of numerous phenolic compounds and procyanidins was proved. The studied extract showed antioxidant effect. When compared with the examined standards (BHT, BHA and quercetin) it was weaker, but it ranked equal in antioxidant activities to other hawthorn species. *C.nigra* fruit ethanol extract showed significant anxiolytic effect. This statistical significance was noticed as compared to negative control, but was not noticed as compared to positive control (diazepam). Hypnotic effect of the extract also had statistical significance as compared to negative control. Antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria was the strongest at the highest applied concentrations. However, not one of the applied concentrations led to growth inhibition of the fungus *Candida albicans*.

Accepted by the Scientific Board on: ASB

Defended on: DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty): DB

Doc. dr Srdjan Stefanovic –Chairmen
Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

Doc. dr Marina Kostic – member
Faculty of Medical Sciences, Kragujevac

Prof. dr Silva Dobric – member
Medical faculty of Military Academy,
Belgrade

8.3. Биографски подаци аутора

Дипл. фарм. специјалиста Марија Поповић-Миленковић рођена је 14.11.1975. године у Крагујевцу, где је завршила основну школу и Гимназију, природно-математички смер. Фармацеутски факултет, смер дипломирани фармацеут Универзитета у Београду је уписала школске 1994/95. године а дипломирала 20.06.2001. године. Дипломски испит је положила са оценом 10 пред члановима Завода за медицинску биохемију. Академску специјализацију из Фармацеутске здравствене заштите уписује 2005 а 25.03.2007 је завршава на Фармацеутском факултету у Београду. Удата је, мајка двоје деце.

Од августа 2001 до данас је запослена у Апотеци Крагујевац на месту дипломираног фармацеута специјалисте. Од 2005 до 2007 обавља функцију помоћника директора за фармацеутску област у Апотеци Крагујевац као и 2007 функцију начелника апотеке „1 Мај“ у Крагујевцу.

Од септембра 2002 до децембра 2003 обавља послове професора фармацеутске технологије у Медицинској школи „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу.

Учествовала је у два истраживачка пројекта: „Јуниор“ пројекат Факултета медицинских наука у Крагујевцу и међународном пројекту, „Пројекат истраживања индикатора фармацеутске здравствене заштите“ који спроводи Европска агенција за квалитет лекова и здравствену заштиту (EDQM) при Савету Европе и који још увек траје. До сада је објавила више научних радова од којих су четири у часописима на СЦИ листи. Као аутор или коаутор публиковала је и презентовала на домаћим и међународним скуповима више стручних и научних радова, чија се тема односила на различите проблеме из области клиничке и експерименталне фармакологије и свакодневне фармацеутске праксе. Од 2010 је предавач на програмима континуиране медицинске едукације.

Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу одсек молекулска медицина (клиничка и експериментална фармакологија) уписала је 2008/2009 године. Усмени докторски испит положила је у јуну 2010 године са оценом 10. Докторску дисертацију под називом „Испитивање биолошких ефеката екстракта плода *Crataegus nigra* Wald. et Kit“ пријавила је 01.02.2011. године. Стручно веће за медицинске науке Универзитета у Крагујевцу дало је сагласност на тему докторске дисертације на седници одржаној 09.03.2011. године. Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације у саставу: доц. др Срђан Стефановић (председник), проф. др Силва Добрић

(члан), доц. др Марина Костић (члан) именована је на седници Наставно-нучног већа Факултета медицинских наука 27.11.2013. године.

8.4. Списак објављених радова

Радови у часописима националног и међународног значаја

1. **Popović-Milenković M**, Tomović M, Branković S, Ljujić B, Janković S. Antioxidant and Anxiolytic Activities of *Crataegus Nigra* Wald. et Kit Berries. *Acta Pol Pharm* 2014; 71(2): *in press*
2. Kostic M, Jovanovic S, Tomovic M, **Popovic Milenkovic M**, Jankovic S. Cost – effectiveness analysis of tocilizumab in combination with methotrexate for rheumatoid arthritis: a Markov model based on data from a Balkan country in socio – economic transition. *Vojnosanit Pregl* 2014; 71(2): *in press*
3. Dostić PM, Tomović TM, **Popović-Milenković TM**, Stefanović MS, Janković MS. Risk factors for intraoperative arrhythmias in general surgery patients operated under general anesthesia. *Med Glas* 2012; 9(2): 204-10.
4. Tomović M, Cupara S, **Popović-Milenković M**, Ljujić B, Kostić M, Janković S. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activity of *Potentilla Reptans* L. *Acta Pol Pharm* 2015; 72(1): *in press*
5. **Popović-Milenković M**. Pharmacological Aspects of the Genus *Crataegus*. *Racionalna terapija* 2010; II (1): 7-13.

Радови саопштени на скупу националног и међународног значаја у форми апстракта

1. **Popović-Milenković M**, Tomović M. Prirodni preparati i moguće interakcije sa lekovima. Treći nacionalni kongres racionalne terapije u medicini. *Racionalna terapija. Knjiga sažetaka* 2011; 3(1): 62.
2. **Popović-Milenković M**. Prikaz upotrebe gloga (*Crataegus Monogyna*, *Crataegus Oxyacantha*) u terapijake svrhe. *Racionalna terapija. Knjiga sažetaka* 2009; I(2): 65.
3. **Popović-Milenković M**, Tomović M. Prirodni preparati-potpuno bezbedni preparati? *Medicinski časopis. Srpsko lekarsko društvo* 2013; 47 (3): 28.

8.5 ИНДЕТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Марија Поповић-Миленковић
Датум и место рођења: 14.11.1975, Крагујевац
Садашње запослење: Апотека Крагујевац
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: Испитивање билошких ефеката екстракта плода <i>Crataegus nigra</i> Wald. et Kit
Број страница: 114 (без Прилога)
Број слика: 15
Број библиографских података: 165
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских Наука у Крагујевцу, Природно математички факултет - Нови Сад. Институт за јавно здравље Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина (Клиничка и експериментална фармакологија)
Ментор: Проф. др. Слободан Јанковић
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 01.02.2011.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 186/11 од 09.03.2011.
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Силва Добрић Доц. др Драгана Павловић-Муратспахић
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: Проф. др Слободан Јанковић Проф. др Силва Добрић Доц. др Драгана Павловић-Муратспахић
Комисија за оцену докторске дисертације: Доц. др Срђан Стефановић Доц. др Марина Костић Проф. др Силва Добрић
Комисија за одбрану докторске дисертације: Доц. др Срђан Стефановић Доц. др Марина Костић Проф. др Силва Добрић
Датум одбране дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Марија Поповић-Милениковић
број уписа 2008/20

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Испитивање Биолошких ефеката Екстракта
Плоде Crataegus nigra WALD. et KIT

- 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 аутора

у Крагујевцу, 25.02.2014.

Марија Поповић-Милениковић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Поповић-Милетиновић
 Број уписа 2008/20
 Студијски програм Докторске академске студије - клиничка и експериментална фармација
 Наслов рада Испитивање Биолошких ефеката екстракта плова *Spartococcus nigra* Wild. et Kt
 Ментор проф. др. Слободан Јанковић

Потписани Марија Поповић-Милетиновић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу.**

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 Крагујевцу.

Потпис аутора

у Крагујевцу, 26.02.2014.

Марија Поповић-Милетиновић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Испитивање Биолошких ефеката екстракта
плочи *Streptococcus nigra* Wallol. et Kit

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 Крагујевцу 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, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 25.02.2014

Марија Ђокић-Менакшић