



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Ксенија З. Обрадовић

**Карактеризација биљних врста
представника рода *Suslaten* са подручја
Србије –
хемијска и фармаколошка анализа**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2023. године



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Ksenija Z. Obradović

**Karakterizacija biljnih vrsta predstavnika roda
Cyclamen sa područja Srbije –
hemijska i farmakološka analiza**

Doktorska disertacija

Kragujevac, 2023. godine



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Ksenija Z. Obradović

**Characterization of plant species of the genus
Cyclamen from Serbia –
chemical and pharmacological analysis**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2023.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Аутор
Име и презиме: Ксенија З. Обрадовић
Датум и место рођења: 22.08.1992. године, Крагујевац, Србија
Садашње запослење: Магистар фармације, АУ БЕНУ
Докторска дисертација
Наслов: Карактеризација биљних врста представника рода <i>Syclamen</i> са подручја Србије – хемијска и фармаколошка анализа
Број страница: 81
Број слика: 4
Број библиографских података: 119
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Природно-математички факултет Универзитета у Нишу
Научна област (УДК): Медицина
Ментор: Др сци. мед. Снежана Цупара, редовни професор, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 17.12.2019.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: IV-03-93/9 од 19.02.2020.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Проф. др Марија Миловановић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;
2. Проф. др Весна Станков-Јовановић , редовни професор Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Аналитичка хемија, члан;
3. Др сци. Марија Марковић , научни сарадник Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу за ужу научну област Ботаника, члан;
4. Проф. др Драган Миловановић , редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, члан;
5. Проф. др Марина Томовић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације:
1. Проф. др Ана Барјактаревић , ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Фармацеутска технологија, председник
2. НС Данијела Пецарски , научни сарадник Технолошког-металуршког факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Биотехнологија - Фармацеутска технологија, члан
3. ВНС Марија Марковић , виши научни сарадник Института за шумарство у Београду за ужу научну област Биологија, члан
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

Autor
Ime i prezime: Ksenija Z. Obradović
Datum i mesto rođenja: 22.08.1992. godine, Kragujevac, Srbija
Sadašnje zaposlenje: Magistar farmacije, AU BENU
Doktorska disertacija
Naslov: Karakterizacija biljnih vrsta predstavnika roda <i>Cyclamen</i> sa područja Srbije – hemijska i farmakološka analiza
Broj stranica: 81
Broj slika: 4
Broj bibliografskih podataka: 119
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Nišu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentor: Dr sci. med. Snežana Cupara, redovni profesor, Fakultet medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 17.12.2019.
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske disertacije: IV-03-93/9 od 19.02.2020.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none">1. Prof. dr Marija Milovanović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Mikrobiologija i imunologija, predsednik;2. Prof. dr Vesna Stankov-Jovanović, redovni profesor Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu za užu naučnu oblast Analitička hemija, član;3. Dr sci. Marija Marković, naučni saradnik Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Nišu za užu naučnu oblast Botanika, član;4. Prof. dr Dragan Milovanović, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmakologija i toksikologija, član;5. Prof. dr Marina Tomović, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, član
Komisija za odbranu doktorske disertacije:
<ol style="list-style-type: none">1. Prof. dr Ana Barjaktarević, vanredni profesor Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Farmaceutska tehnologija, predsednik2. NS Danijela Pecarski, naučni saradnik Tehnološkog-metalurškog fakulteta Univerziteta u Beogradu za užu naučnu oblast Biotehnologija - Farmaceutska tehnologija, član3. VNS Marija Marković, viši naučni saradnik Instituta za šumarstvo u Beogradu za užu naučnu oblast Biologija, član
Datum odbrane disertacije:

THE DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

Author
Name and surname: Ksenija Obradović
Date and place of birth: 22.08.1992. Kragujevac, Serbia
Current employment: Master of Pharmacy, AU BENU
Doctoral Dissertation
Title: Characterization of plant species of the genus <i>Cyclamen</i> from Serbia – chemical and pharmacological analysis
No. of pages:81
No. of images:4
No. of bibliographic data:119
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Faculty of Science, University of Niš
Scientific area (UDK): Medicine
Mentor: Prof. dr Snezana Cupara, PhD, RPharm, Full Professor - tenured position, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 17.12.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-93/9 from 19.02.2020
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Marija Milovanović, PhD, Associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Departement of Microbiology and Immunology, chairman; 2. Prof. dr Vesna Stankov-Jovanović, PhD, Full professor of the Faculty of Science, University of Niš, Analytical Chemistry, member; 3. Marija Marković, PhD, Research Associate of the Faculty of Science, University of Niš, Department of Botany, member; 4. Prof. dr Dragan Milovanović, PhD, full professor, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, Department of of Pharmacology and Toxicology, member; 5. Prof. dr Marina Tomović, PhD, Associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Department of Pharmaceutical Technology, member
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> 1. Prof. dr Ana Barjaktarević, PhD, Associate professor, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Departement of Pharmaceutical Technology, chairman 2. Danijela Pecarski, PhD, research associate, Technological and Metallurgical Faculty, University of Belgrade, Department of Biotechnology - Pharmaceutical Technology, member 3. Marija Marković, PhD, senior research associate, Institute of Forestry in Belgrade, Department of Biology, member
Date of Dissertation Defense:

Посебну захвалност дугујем свом ментору, проф. др Снежани Цупари, на несебичном, безусловном и безграничном разумевању, залагању, стрпљењу, подрици и уложеном труду и времену. Захваљујем се на помоћи у одабиру истраживачког задатка, смерницама за прихватање изазова и превазилажење теškoћа у свим фазама овог рада, као и на безрезервном дељењу професионалног искуства са мном. Наставнику који ме је инспирисао да продубим и изоштрим чула за богатсва медицинских наука хвала на задовољству које је пратило нашу дугогодишњу сарадњу.

Проф. др Небојши Арсенијевићу неизмерно захваљујем на подрици и указаном поверењу за сарадњу са истраживачким тимом који се успешно и искусно бави проучавањем антитуморске активности, а што је био важан сегмент истраживачког задатка који је био преда мном.

Проф. др Весни Станков - Јовановић најтоплије захваљујем на омогућеном експерименталном раду и стручним саветима без којих не би била могућа хемијска карактеризација материјала коришћеног у овом раду.

Проф. др Александру Арсенијевићу захваљујем на стрпљењу, сарадњи и саветима током експерименталног рада.

Проф. др Марији Миловановић захваљујем на драгоценим саветима и сугестијама током писања тезе.

Проф. др Ани Барјактаревић захваљујем на надахнутој стручној подрици и саветима који су значајно допринели финалном облику ове докторске дисертације.

Захваљујем се Вишем научном сараднику др Марији Марковић на свим корисним сугестијама и смерницама из ботанике, као и на непроценљивој помоћи у прикупљању биљног материјала.

Својој породици захваљујем на безусловној љубави, пруженој подрици и мотивацији да истрајем и успешно завршим израду докторске дисертације

***Ову докторску дисертацију посвећујем својој деци,
Магдалени и Теодори***

САЖЕТАК

Увод: Циљ ове докторске дисертације је хемијска и фармаколошка карактеризација водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens*, прикупљаних у два различита вегетациона периода.

Материјал и методе: У циљу хемијске карактеризације одређиван је садржај укупних фенола, флавоноида и сапонина. Антиоксидациона активност је испитивана употребом пет различитих *in vitro* тестова. Антимикробна активност је испитивана микродилуционом методом на одабраним сојевима Грам-позитивних, Грам-негативних бактерија и гљивице. Цитотоксична активност испитивана је МТТ тестом на сојевима хуманих туморских ћелијских линија (HeLa, A549, HCT-116).

Резултати: Екстракти луковица *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens* садрже феноле, флавоноиде и сапонине, чије концентрације зависе од врсте растварача употребљеног за екстракцију, вегетационог периода и биљне врсте. Сви испитивани екстракти показали су антиоксидационо дејство. Екстракти циклама показали су антимикробну активност ка свим испитиваним сојевима микроорганизама. *Cyclamen hederifolium* показује бољу антимикробну активност ка већем броју микроорганизама у односу на *Cyclamen purpurascens*. Испитивани екстракти показали су антитуморско дејство ка свим туморским ћелијским линијама. Степен инхибиције вијабилности ћелија разликовао се у односу на тип екстракта и ћелијску линију. Резултати антитуморског дејства *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens* су први документовани подаци о овим биљним врстама, а удружени са осталим резултатима овог истраживања представљају прве систематизоване информације о овим двома биљним врстама које расту на територији Републике Србије.

Кључне речи: *Cyclamen hederifolium*, *Cyclamen purpurascens*, антиоксидациона активност, антимикробна активност, цитотоксична активност

ABSTRACT

Introduction: The aim of this doctoral dissertation is the chemical and pharmacological characterization of aqueous, ethanol and acetone extracts of *Cyclamen hederifolium* and *Cyclamen purpurascens* bulbs, collected in two different growing seasons.

Material and methods: Chemical characterization was performed to determine the content of total phenols, flavonoids and saponins. The antioxidant activity was evaluated by five different *in vitro* tests. Antimicrobial activity was tested using the microdilution method on selected strains of Gram-positive, Gram-negative bacteria and fungi. Cytotoxic activity was tested by MTT test on strains of human tumor cell lines (HeLa, A549, HCT-116).

Results: All tested extracts contain phenols, flavonoids and saponins. Concentration of the mentioned compounds depend on the type of solvent used for extraction, the vegetation period and the plant species. All tested extracts showed antioxidant activity. *Cyclamen* extracts showed antimicrobial activity against all tested strains of microorganisms. *Cyclamen hederifolium* shows better antimicrobial activity against a greater number of microorganisms compared to *Cyclamen purpurascens*. The examined extracts showed antitumor activity against all tumor cell lines. Cytotoxic activity differed in relation to extract type and cell line. A dose-dependent effect was observed for different concentrations of plant extracts in different cell lines. The results of the antitumor effect of *Cyclamen hederifolium* and *Cyclamen purpurascens* are the first documented data on these plant species, and combined with the other results of this research, represent the first systematized information on these two plant species that grow on the territory of the Republic of Serbia.

Key words: *Cyclamen hederifolium*, *Cyclamen purpurascens*, antioxidant activity, antimicrobial activity, cytotoxic activity

Садржај

1. УВОД.....	1
1.1. <i>CYCLAMEN HEDERIFOLIUM</i> АЙТОН	4
1.1.1. Таксономија и распрострањеност <i>C. hederifolium</i> Ait.....	4
1.1.2. Етимологија и ботаничке карактеристике <i>C. hederifolium</i> Ait.....	4
1.1.3. Употреба <i>C. hederifolium</i>	5
1.2. <i>CYCLAMEN PURPURASCENS</i> MILLER	7
1.2.1. Таксономија и распрострањеност <i>C. purpurascens</i> Mill.....	7
1.2.2. Етимологија и ботаничке карактеристике <i>C. purpurascens</i> Mill.....	7
1.2.3. Употреба <i>C. purpurascens</i>	8
1.3. ХЕМИЈСКИ САСТАВ <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	10
1.3.1. Хемијски састав <i>C. hederifolium</i>	11
1.3.2. Хемијски састав <i>C. purpurascens</i>	12
1.4. ФАРМАКОЛОШКА АКТИВНОСТ <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	16
1.4.1. Антиоксидациона активност екстракта луковица <i>C. hederifolium</i> и <i>C.purpurascens</i>	16
1.4.2. Антимикробна активност екстракта луковица <i>C. hederifolium</i> и <i>C.purpurascens</i>	17
1.4.3. Цитотоксична активност екстракта луковица <i>C. hederifolium</i> и <i>C.purpurascens</i>	18
2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	20
2.1. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА	20
2.2. ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА	21
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	22
3.1. ПРИКУПЉАЊЕ ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	22
3.2. ИЗРАДА ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	22
3.3. ХЕМИЈСКА КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	23
3.3.1. Испитивање садржаја укупних фенола.....	23
3.3.2. Испитивање садржаја укупних флавоноида	23
3.3.3. Испитивање садржаја укупних сапонина	23
3.4. ИСПИТИВАЊЕ АНТИОКСИДАЦИОНЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C.HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	24
3.4.1. Одређивање способности неутралисања 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала.....	24
3.4.2. Одређивање способности неутралисања 2, 2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) (ABTS) радикала.....	24
3.4.3. Одређивање укупног редукционог потенцијала.....	25
3.4.4. Испитивање способности редукције јона гвожђа.....	25
3.4.5. Испитивање способности редукције јона бакра.....	25
3.5. ОДРЕЂИВАЊЕ АНТИМИКРОБОГ ДЕЛОВАЊА ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C.HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	26
3.6. ИСПИТИВАЊЕ АНТИТУМОРСКЕ АКТИВНОСТИ ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C.HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	27
3.7. РЕАГЕНСИ И АПАРАТУРА	28
3.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА	28
4. РЕЗУЛТАТИ	29
4.1. САДРЖАЈ УКУПНИХ ФЕНОЛА И ФЛАВОНОИДА У ЕКСТРАКТИМА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	29
4.2. УКУПНИ САПОНИНИ У ЕКСТРАКТИМА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	31
4.3. АНТИОКСИДАЦИОНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	32
4.4. ИНДЕКС АНТИОКСИДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM IN VITRO</i>	33
4.5. ИНДЕКС АНТИОКСИДАЦИОНОГ ПОТЕНЦИЈАЛА ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C. PURPURASCENS IN VITRO</i>	38
4.6. АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C.HEDERIFOLIUM</i> И <i>C.PURPURASCENS</i>	46
4.7. АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКТА ЛУКОВИЦА <i>C.HEDERIFOLIUM</i> И <i>C.PURPURASCENS</i>	48
5. ДИСКУСИЈА	61
5.1. УКУПНИ ФЕНОЛИ, ФЛАВОНОИДИ И САПОНИНИ У ЕКСТРАКТИМА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	61

5.2.	АНТИОКСИДАЦИОНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i> ...	64
	АНТИМИКРОБНА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	67
5.3.	АНТИТУМОРСКА АКТИВНОСТ ЕКСТРАКАТА ЛУКОВИЦА <i>C. HEDERIFOLIUM</i> И <i>C. PURPURASCENS</i>	69
6.	ЗАКЉУЧЦИ	73
7.	ЛИТЕРАТУРА	76

1. УВОД

Коришћење лековитих биљака у превенцији и лечењу различитих обољења стара је колико и човечанство, о чему сведоче древна документа која су од непроценљиве вредности. Бројни су биљни препарати који имају примену у медицини или представљају модел за развој нових. Почетком 19. века настала је прекретница којом је синтетска фармација преузела примат над природним изворима, јер су синтетисана нова једињења, посебно органски молекули, који су даље испитивани као активни фармаколошки принципи. Тај тренд је означио и нови приступ лековитим биљкама - из биљака су изоловани појединачни активни принципи који су били одговорни за фармаколошко дејство. Тако су лековите биљке добиле ново место у истраживањима, јер су служиле као извор изолованих активних принципа који су нашли своје место у превенцији и лечењу одређених индикација. Неки од најзначајнијих примера су дигоксин, морфијум, колхицин, пилокарпин, натријум кромогликат, неостигмин, етопозид и др. Ова основна сазнања су надграђивана током времена и данас је модерна, софистицирана употреба лековитих биљака заснована на добро проученим механизмима деловања појединачних активних принципа изолованих и пречишћених из лековитих биљака (1-4).

Биљке су сложеног састава, због тога што поред молекула неопходних за примарни метаболизам свих биљних ћелија (аминокиселине, протеини, угљени хидрати, липиди, и др.) лековите биљке садрже и секундарне метаболите (феноли, флавоноиди, терпени, алкалоиди, итд.), а који су најчешће и носиоци фармаколошког дејства. Неки секундарни метаболити су често присутни у различитим биљним врстама, а неки су карактеристични само за одређени биљни род или врсту. За разлику од примарних метаболита, који имају структурну улогу у физиологији, генетици и метаболизму биљне ћелије, секундарни метаболити немају есенцијалну улогу у животу биљних ћелија. Њихова улога је преодминатно да обезбеде интеракцију биљке са окружењем, тј. да обезбеде различите одбрамбене механизме и/или помогну биљци да се прилагоди условима који високо варирају (висока или ниска температура, изразито повећана или смањена влажност земљишта или ваздуха, и др.). Неки од секундарних метаболита су заслужни за изглед биљке (учествују у формирању боја или мириса, и одговорни су за привлачење опрашивача). Захваљујући хемијској разноликости ових једињења, а посебно захваљујући особинама, које често обезбеђују и фармаколошко деловање, секундарни метаболити биљака имају своје заслужено место у фармацеутској, козметичкој, прехранбеној и хемијској индустрији (5).

Биљни екстракти или активни принципи изоловани из биљних екстраката представљају непресушан извор информација за истраживаче. Због појаве да хемијски синтетисане лековите супстанце изазивају поред жељених и негативне ефекте на људско здравље, као и због отпорности коју микроорганизми стварају на лековите супстанце које треба да сузбију њихов раст, пацијенти прибегавају самоиницијативној медијацији лековитим биљкама. Због тога је биљни материјал све више интересантан истраживачима за проучавање. Употреба лековитих биљака, а посебно оних које нису довољно истражене, је ризична. Као проблеми при употреби лековитих биљака у медицинске сврхе могу се јављати да се неодговарајућа биљка користи за дату индикацију, да се употреби неодговарајући део биљке, да је биљни препарат направљен од биљног материјала лошег квалитета (биљка онечишћена тешким металима, лош хемијски састав биљке, брање биљног материјала у неодговарајућем тренутку и др.)

или је квалитет биљног препарата нарушен у току процеса прераде материјала и производње препарата (6).

Број нових дијагностикованих случајева оболелих од малигнух болести као и проценат смрти од карцинома је у порасту у свим деловима света. Пошто је конвенционална терапија малигнитета праћена бројним нежељеним ефектима, који значајно смањују квалитет живота пацијената, пажња истраживача је усмерена ка проналаску извора за безбеднију антитуморску терапију. Као извор потенцијалних једињења који би могли да задовоље тражене критеријуме проучава се деловање лековитих биљака, као и њихов састав тј. активни принципи (1).

Због свега наведеног, употреба лековитог биља у савременој терапији, може бити адјувантна, што показује и искуство, а посебно у лечењу аутоимуних, инфективних, метаболичких или туморских обољења. Уобичајен процес испитивања биљака започиње *in vitro*, затим се наставља *in vivo* студијама, а све у циљу да се утврди што прецизнији хемијски састав и фармаколошки ефекти. Овај процес испитивања биљног материјала је дуг, тежак, и несигуран, због чега се свако истраживање биљног материјала не завршава обавезно формулисањем ефикасног терапијског производа. Иако је овај процес непредвидив, јер је отежан бројним препрекама, почетна истраживања лековитих биљака остају неопходан услов за развој даљег мисаоног процеса како дату лековиту биљку употребити, да би се стигло и до новог производног процеса и обезбедио нови терапијски облик (7-9). Зато се предузимају методе хемијске и фармаколошке карактеризације тј. доказивања ефикасности биљних екстраката, којима би следила истраживања о изоловању специфичног активног принципа, његове фармакокинетице и фармакодинамике, а затим испитивања о формулацији препарата и његове примене у терапији (10).

Cyclamen hederifolium и *Cyclamen purpurascens* су вишегодишње биљке из породице *Primulaceae*, која обухвата 23 врсте циклама. Неке од врста рода *Cyclamen* су географски широко распрострањене и расту у различитим деловима света (нпр. *Cyclamen hederifolium*), док су друге карактеристичне само за одређена станишта (нпр. *C. somalense*, *C. libanoticum*). Велики број врста овог рода су окарактерисане у погледу хемијског састава и биолошке активности (11).

На територији Европе расте више врста које се наводе у *Flora Europaea III* (12). Наведено је осам врста рода *Cyclamen*:

- *Cyclamen hederifolium* Aiton
- *Cyclamen graecum* Link
- *Cyclamen purpurascens* Miller
- *Cyclamen repandum* Sibth. & Sm.
- *Cyclamen creticum* Hildebr.
- *Cyclamen balearicum* Willk.
- *Cyclamen coum* Miller
- *Cyclamen persicum* Miller

На територији Републике Србије расту само две врсте рода *Cyclamen* које су описане у Флори Србије III: *Cyclamen neapolitanum* Ten. (*Cyclamen hederifolium* Ait.) и *Cyclamen europaeum* L. (13)

Према интернационалној номенклатури, предложеној од стране интернационалне организације за класификацију информација о биљним врстама (International Organization for Plant Information, Global Plant Check List), *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens* имају синонине. *Cyclamen neapolitanum* је синоним за врсту *Cyclamen hederifolium*, а *Cyclamen europeum* је синоним за врсту *Cyclamen purpurascens*. Стога су у овом раду даље коришћени интернационални називи за ове две врсте рода *Cyclamen* које расту у Републици Србији - *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens*, што је и у сагласности са Флором Европе (13).

1.1. *Cyclamen hederifolium* Aiton

1.1.1. Таксономија и распрострањеност *C. hederifolium* Ait.

Cyclamen hederifolium Ait. је врло отпорна вишегодишња цветница која природно расте у централној и јужној Европи. Карактеристична је за област Медитерана. Може се наћи у Албанији, Француској, Турској, Италији и Швајцарској, као и на територији бивше Југославије. Станишта *Cyclamen hederifolium* Ait. се налазе и на територији Републике Србије. Постоји неколико подврста *C. hederifolium*, које се разликују по облику и боји цветова (14-16). Таксономија подврсте *C. hederifolium* приказана је на Графику 1.



График 1. Таксономија *Cyclamen hederifolium* Ait.

1.1.2. Етимологија и ботаничке карактеристике *C. hederifolium* Ait.

Cyclamen hederifolium Ait. носи назив *hederifolium* од латинских речи *hedera* - (бршљан) и *folium* (лист). Овакво име ова биљка је добила због облика и шара на листовима који подсећају на младе листове бршљана. Они могу бити различитог облика, срцастог до издуженог са 2-3 угаона режња. Листови су тамно су зелене, до сребрне боје, са карактеристичним шарам светлије боје. Крупни, атрактивни цветови се састоје од пет круничних латица (5-20 cm) које су уназад савијене, и чија боја варира од светло ружичасте или јарко циклама боје до беле боје (14,16,17). Биљка расте из луковице која је округлог до бубрежастог облика, из које се пружа корење у дубину и на различите стране. Из горњег дела луковице расте стабљика. Ова врста цикламе цвета и листа у касно лето и јесен. Луковица са старењем биљке постаје све већа, при чему може да нарасте и до пречника од 25cm (16,17). На нашим просторима насељава сеновите шуме и планинске ливаде. Расте углавном испод дрвећа или жбуња, у делимичном хладу, на тлу које је добро дренирано (14).



Слика 1. *Cyclamen hederifolium* Ait.

1.1.3. Употреба *C. hederifolium*

У српском језику *C. hederifolium* има више назива - бршљанолисна циклама, скрж, клобучац или колугка (18). Ова биљка се традиционално у многим земљама назива још и храном за свиње („свињско корење“), јер је примећено да свиње конзумирају луковице цикламе без икаквог штетног утицаја на организам. То је необично, јер су истраживања показала да су луковице ове биљке за људе и друге животиње отровне тј. да нису јестиве. Разлог томе је присуство компоненти у луковимама које код људи изазивају мучнину, повраћање, дијареју, бол у стомаку, крваву столицу, хемолизу, конвулзије, иритацију коже, појаву пликова, чак и смрт услед гушења, у случају уношења већих количина. Упркос оваквим сазнањима, екстракти луковица *C. hederifolium* имају одређену примену у традиционалној медицини и хомеопатији (14,16,19).

Луковице *C. hederifolium* на страним језицима цикламе носе следеће називе: *sow-bread*, *hog's-bread* (енглески), *pain de pourceau* (француски), *pan porcino* (италијански), *varkensbrood* (холандски) и *pigs' manjū* (јапански). Различите врсте рода *Cyclamen* су широко испитиване, у смислу хемијског састава и биолошке активности. Данас је познато њихово антиинфламаторно, антиноцицептивно, антимикробно, спермицидно, антипаразитарно, антиоксидационо и антитуморско дејство (14,16,20,21-24). Неке врсте налазе примену у терапији риносинуситиса и назалне конгестије (*Cyclamen europaeum*), али постоје и врсте које се традиционално користе у исхрани (*Cyclamen persicum* у Палестини) (21,25-28) У записима о употреби лековитих биљака у јужним деловима Италије помиње се употреба *Cyclamen* spp. у лечењу болести гастро-интестиналног и скелето-мускуларног система, у гинекологији и неким дерматолошким стањима (29).

У култури наше земље употреба лековитих биљака има дугу традицију. Томе сведоче списи који потичу још из 12. века. Манастири су били једини центри медицине

и фармације. Најстарији споменици употребе лековитог биља датирају од 12-16. века (Хиландарски Типик, Шестоднев Јована Егзарха, Ходошки зборник и Хиландарски медицински кодекс). Касније је развој медицине био под утицајем источних и западних култура, а значај употребе лековитих биљака су најбоље код нас истакли Јосиф Панчић, Сава Петровић и проф. Јован Туцаков, који су поставили основу за савремени став научне јавности у Србији према лековитим биљкама. Самомедикација једном или комбинацијом више лековитих биљака је популарна на нашем поднебљу. Истраживања о познавању и коришћењу лековитог биља последњих година заузимају велики проценат научне сцене Републике Србије (30,31) *C. hederifolium* се спорадично користи у народној медицини Републике Србије у лечењу реуматизма, менструалних проблема, мигрене и кожних обољења, као пургатив и анти-туморски агенс. Свеже луковице се користе у италијанској традиционалној медицини у лечењу хемороида и промрзина (14,16,20,29,30).

1.2. *Cyclamen purpurascens* Miller

1.2.1. Таксономија и распрострањеност *C. purpurascens* Mill.

Cyclamen purpurascens Mill., је алпска или љубичаста циклама, која природно расте у свим деловима Европе, због чега се још и назива европска циклама. Расте на подручју централне Европе (Аустрија, Чешка, Француска, Немачка, Мађарска, Пољска, Словачка, Швајцарска), северне Италије, Украјине и земаља Балкана. Станишта *Cyclamen purpurascens* Mill. се налазе и на територији Републике Србије. Таксономија подврсте *C. purpurascens* Mill. приказана је на Графику 2 (32,33).



График 2. Таксономија *Cyclamen purpurascens* Mill.

1.2.2. Етимологија и ботаничке карактеристике *C. purpurascens* Mill.

Назив *C. purpurascens* води порекло од латинске речи *purpurāscō*, што значи постати љубичаст. Синоними су *Cyclamen purpurascens f. purpurascens* Mill. Hendrikkx, *Cyclamen purpurascens ssp. purpurascens* Mill., *Cyclamen europaeum* L. *Cyclamen purpurascens f. album* Grey-Wilson (32).

C. purpurascens је вишегодишња биљка, цветница, која расте из луковице облика диска. За ову врсту је карактеристично да са старењем биљке, долази до све већих промена у облику и изгледу луковице. Луковица може да нарасте до величине 10-15cm. Корен се пружа на доле и у страну, а из горњег дела луковице израста дугачка стабљика, на чијем се врху налази цвет (32-35).

Листови су срцасти са назубљеним ивицама, најчешће тамно зелене боје са сребрним шарам. Боја листова може да варира, због чега могу бити или потпуно

зелени или сребрнасти са зеленим шарама. Доња страна листова је црвенкасто-љубичасте боје (32-35). Цветови могу бити беле до интензивно љубичасте боје, зависно од врсте. Цветови имају карактеристичан интензиван и слаткаст мирис. Састоје се од пет латица, ширине око 2 cm, постављених уназад. Ова врста цикламе цвета од јуна до октобра. Како биљка стари, стабљика се увија спирално ка земљи и омогућава семену да пада на земљу. Семе привлачи инсекте, који их разносе и шире. Насељава листопадне и мешовите шуме, посебно подручја кречњака и друга добро дренирана подручја (32-35).

1.2.3. Употреба *C. purpurascens*

C. purpurascens је заступљена у хомеопатији тако што се у облику хомеопатски припремљеног лека користи за лечење низа здравствених стања. Најчешће индикације за употребу су: менструални поремећаји, главобоља и мигрена, депресивна расположења, *hyperemesis gravidarum*, диплопија, страбизам, проблеми са видом, вагинитис, гастритис и диспепсија, шуцање, вртоглавица. Постоје наводи да се користи у лечењу реуматизма, уретритиса, простатитиса и анемије. Један од познатих лекара хомеопата (Von Lippe) наводи примере где је хомеопатски лек припремљен од ове биљке коришћен са успехом у лечењу промрзина, бола, дигестивних тегоба, као и емоционалних поремећаја (36-40). На тржишту у различитим земљама постоје комерцијални хомеопатски препарати који садрже *C. purpurascens*, а намењени су третману поменутих проблема (41). У складу са важећом хомеопатском литературом, за припрему препарата користе се свеже луковице прикупљене у јесен.

Посебна необичност ове биљне врсте везана је за употребу интраназалних препарата (спреј) направљених од екстракта луковице *C. purpurascens*, а намењених третману акутног синуситиса. У литератури постоји незанемарљив број клиничких студија у којима је испитан ефекат наведене терапије (42-50).

Сматра се да интраназална употреба екстракта *C. purpurascens*, као монотерапија или у комбинацији са конвенционалном терапијом, постиже ефекат у лечењу конгестије носа и упале. Евалуирана је употреба препарата *Cyclamen purpurascens* као монотерапије или у комбинацији са оралним антибиотицима, јер се показало да је значајно ефикаснија у лечењу благих до умерених симптома риносинуситиса и акутног синуситиса, у односу на терапију антибиотицима или комбиновану терапију антибиотицима и кортикостероидима (42-49). Ефикасност је мерена знатно бржем ублажавањем симптома конгестије носа и синуса, секреције и осећаја притиска у пределу лица. Такође, сматра се да употреба екстракта *C. purpurascens* у комбинацији са оралним антибиотиком успешније смањује појаву рецидива риносинуситиса у односу на монотерапију само антибиотиком или само екстрактом *C. purpurascens*. Комбинована терапија је смањила број дана и трошкове лечења, као и злоупотребу антибиотика и последичну резистенцију бактерија (42-49). Ипак, мишљења су подељена, јер други истраживачи у студији спроведеној 2018. године нису могли да докажу ефикасност интраназалне примене *C. purpurascens* у лечењу акутног синуситиса, због чега се сматра да је наопходно извршити додатна истраживања (49,50).

Иако се интраназална употреба екстракта *C. purpurascens* сматра безбедном, забележена су блага нежељена дејства која су углавном везана за локално дејство (кијање, иритација слузнице и благо крварење) (49,50).

У литератури тренутно нема довољно информација за разумевање којим механизмом делује екстракт циклама након оралне употребе. За сада је познато да се супстанце одговорне за деконгестију и дренажу слузи након интраназалне примене екстракта цикламе налазе у њеном корену. Тритерпенски гликозиди или сапонини екстраховани из корена цикламе се понашају као површински активна једињења која смањују површински напон на ћелијама слузокоже носа и стимулишу ноцицептивне рецепторе гране тригеминалног нерва, што за последицу има појачање назалне секреције и дренажу носа и синуса (46,51).

Фармакокинетичка испитивања сапонина изолованих из цикламе показују да је апсорпција након локалне администрације врло ниска, због чега би се могли очекивати само локални ефекти. У прилог томе говори појава локалних нежељених ефеката након примене интраназалног спреја. Сматра се стога да би се постигао жељени системски ефекат након локалне примене, да би било потребно употребити високе дозе екстракта ове биљке, који је богат сапонинима (51,52).

Поред наведених клиничких испитивања, рађена су и *ex vivo* и *in vivo* испитивања потенцијалних ефеката лиофилизованог екстракта *C. purpurascens* у терапији риносинуситиса. Испитивање на животињама је доказало да при примени терапеутских доза не долази до појаве локалних нежељених ефеката, већ да се она могу очекивати када се апликује троструко већа доза. При томе се може очекивати иритација слузнице на месту администрације и појачање секреције и дренаже. Такође, примена терапијских доза не доводи до значајних хистолошких, хематолошких или биохемијских промена (51).

1.3. Хемијски састав *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Иако ове две биљне врсте циклама имају сличну морфолошку грађу у ботаничком смислу, њихов хемијски састав је различит, због чега се разликују и аналитичке методе употребљене за њихово испитивање.

Хемијски састав биљке, тј. састав секундарних метаболита, варира, јер на њега утичу бројни еколошки фактори (хемијски састав земљишта, количина воде, светлости, температура и сл.). Управо од тога зависи и биолошка активност посматране врсте. Секундарни метаболити су хемијска једињења која нису нужно неопходна да би биљка преживела, за разлику од примарних метаболита који су есенцијални у структури, физиологији, исхрани и репродукцији јединке. Њихова улога је у заштити и интеракцији биљке са околином. Штите биљку од паразита, бактерија, гљивица и животиња, али и стресова изазваних променом климатских услова попут високе или ниске температуре, светлости и влажности, присуства токсина и тешких метала у земљишту. Ови молекули су углавном присутни у ниским концентрацијама. Због својих карактеристика непресушан су извор сировина у индустрији лекова, козметичких препарата и парфема, у прехранбеној и хемијској индустрији (боје, инесктициди) (53-56).

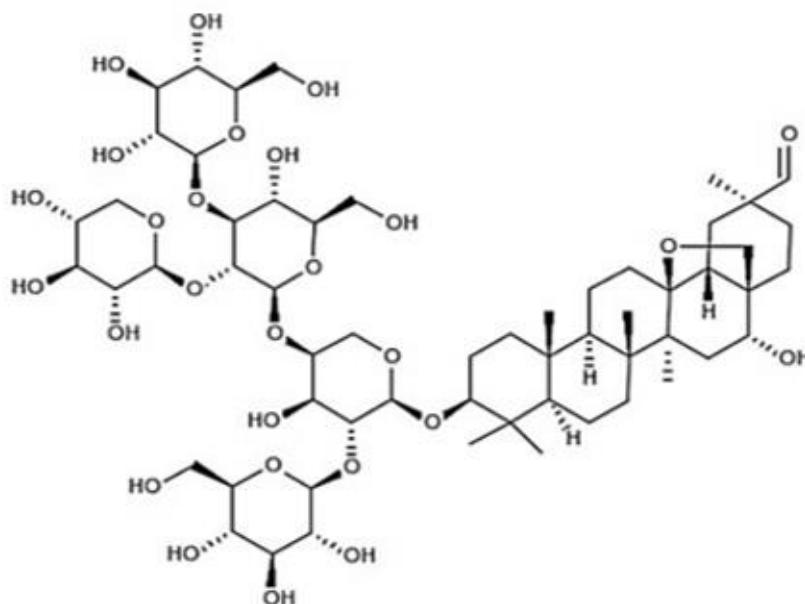
Испитивањем хемијског састава различитих врста циклама, откривено је присуство различитих биоактивних једињења, носиоца лековитих својстава посматраних врста: тритерпенских сапонина, гликозида, фенола и полифенолних компоненти, антоцијанина, флавоноида, деривата пиперидина, алкалоида и стерола. До данас, хемијски састав *C. hederifolium* и *C. purpurascens* није детаљно испитан. Биоактивна једињења одређена у екстрактима луковица ове две врсте циклама, а која су највише испитивана су сапонини, за које се везује већина биолошких дејства ових биљних врста. Сапонини су гликозиди велике молекулске тежине. Састоје се од гликанског (шећерног) дела повезаног са агликоном који може бити по структури тритерпен или стероид. У зависности ког типа је агликон, гликозиди се деле у две велике групе: тритерпенски и стероидни гликозиди (52-55). Гликозиди су хемијски хетерогена група једињења, која су често присутна у малим количинама. Сапонини имају особине површински активних материја, због чега смањују напон на површини ћелије (што је основна особина хемијских супстанци из групе детерџената). Због ових особина сапонини су нашли примену у различитим сегментима индустрије (фармацеутска и индустрија пића). Сапонини имају различите биолошке ефекте. Доказано је да испољавају антимикуробни, антивирусни и фунгицидни ефекат (57,58). Такође, испољавају и антиагрегационо, антиоксидационо, антиинфламаторно и антитуморско дејство. Уочен је и токсични ефекат услед везивања за стероле мембране ћелија, што доводи до нарушавања њене пермеабилности и последично до хемолize. Изолација и карактеризација сапонина сложене структуре из природних извора је захтеван задатак, због чега се истраживачи усмеравају ка синтези што сличнијих молекула природним сапонинима, а који би могли бити терапијски активни (56-60).

1.3.1. Хемијски састав *C. hederifolium*

Постоји врло мали број доступних података о хемијском саставу цикламе *C. hederifolium*. Главна биоактивна једињења идентификована у екстракту луковица *C. hederifolium* су сапонини. Главни сапонин добијен из етанолног екстракта луковице *C. hederifolium* је цикламин, а изолован је 1978. године (Слика 2). Његовом хидролизом добијени су цикламиретини А, Б, Ц и Д. Хидролизом другог присутног сапонина настао је цикламигенин Б (60). Скорија истраживања из 2012. године су у метанолном екстракту луковица *C. hederifolium* идентификовала тритерпенске сапонине цикламин, ардисикренозид Д, десглукоцикламин, цикламинорин и пет хедерофолиозида - А, Б, Ц, Д и Е (61).

Анализом свих поменутих хедерофолиозида (А-Е) утврђено је да садрже агликоне који су тритерпени олеананског типа (61). Номенклатура хедерофолиозида А-Е (1-5) је следећа:

1. $3\beta,16\alpha$ -дихидрокси-13 β ,28-епоксиолеан-30-оична киселина 3-О- $\{[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О]- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О-а-L-арабинопиранозид},
2. $3\beta,16\alpha$ -дихидрокси-13 β ,28-епоксиолеан-30-оична киселина 3-О- $\{[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О]- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- $[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 3)]-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О-а-L-арабинопиранозид},
3. $3\beta,16\alpha$ -дихидрокси-13 β ,28-епоксиолеан-30-ал 3-О- $\{[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О]- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- $[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 3)]-О- $[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)]-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О-а-L-арабинопиранозид},
4. 30-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- β -D-глюкопиранозил-3 $\beta,16\alpha,30$ -трихидроксиолеан-12-ен-28-ал 3-О- $\{[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О]- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 4)-О-а-L-арабинопиранозид},
5. 30-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- β -D-глюкопиранозил-3 $\beta,16\alpha,28,30$ -тетрахидроксиолеан-12-ен 3-О- $\{[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О]- β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 2)-О- $[\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 3)]-О- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-О-а-L-арабинопиранозид}.



Слика 2. Хемијска структура цикламина

1.3.2. Хемијски састав *C. purpurascens*

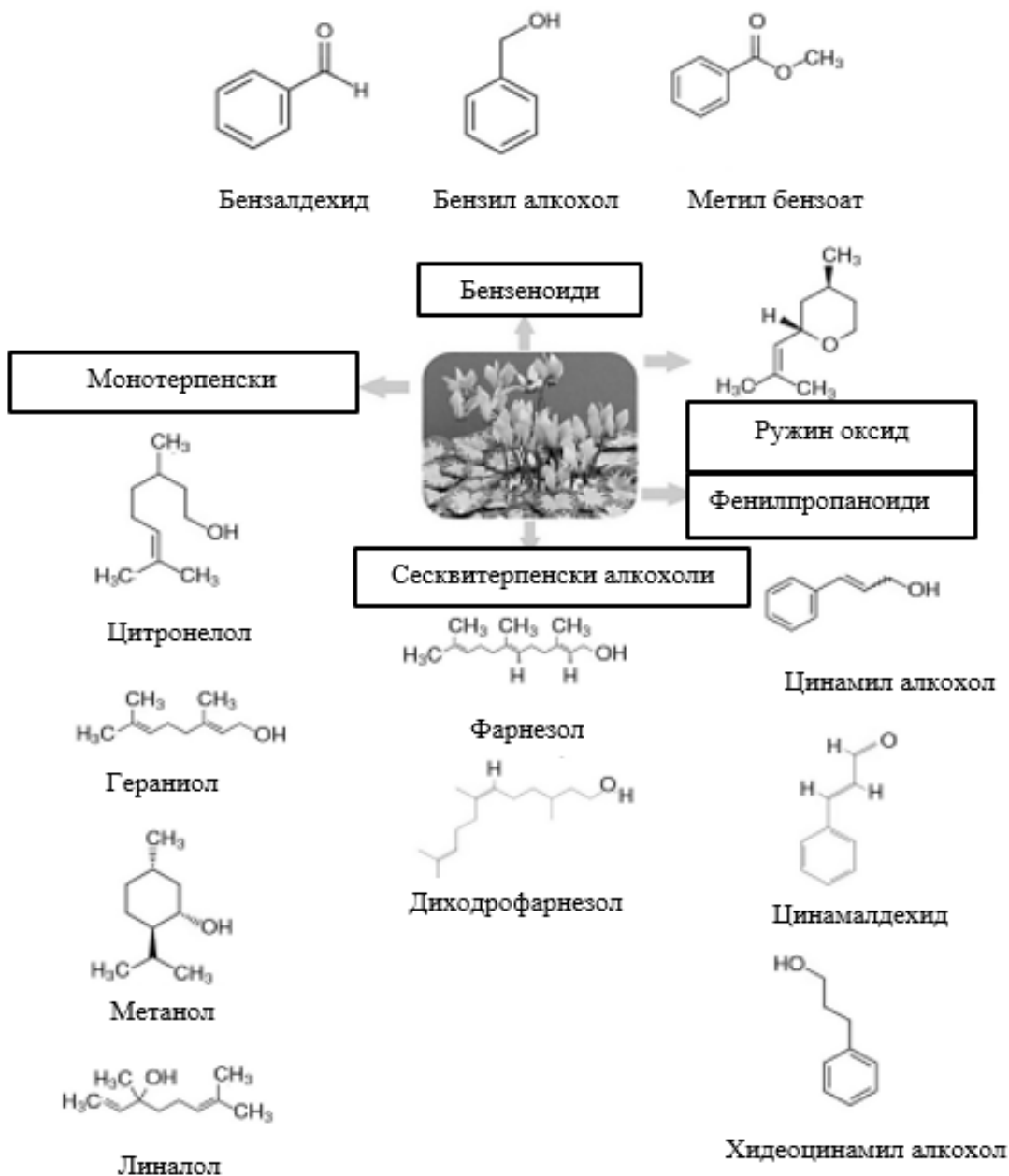
C. purpurascens је више истраживана од цикламе *C. hederifolium* због чега постоји више информација о хемијском саставу ове врсте. Боја цветова ове цикламе, варира од беле до изразито љубичасте. Боја зависи од присуства и концентрације једињења одговорних за пигмент – антоцијанина, који одређују црвено-љубичасту боју, и флавонол гликозида који одређују светлије нијансе. Једињења одговорна за пигмент латица ове врсте цикламе су кверцетин, кемпферол гликозиди, мирицетин и малвидин 3,5-диглукозид (62,63). Како се боја и варијетет једињења одговорних за пигмент разликују међу цикламама са различитих станишта (генотип), то су поред наведених једињења детектовани још и 3,5-диглукозид и пеонидин 3,5-диглукозид (63).

Међу цикламама *C. purpurascens* са станишта на Балкану, испитивана је врста која расте у Словенији и у њеним цветовима и листовима је идентификовано више антоцијана. У цветовима су идентификовани: малвидин-3,5-диглукозид, цијанидин-3-неохесперидозид, делфинидин-3-глукозид, делфинидин-3,5-диглукозид и делфинидин-3-рутинозид, а у листовима: малвидин-3-рутинозид, малвидин-3,5-диглукозид, малвидин-3-глукозид, пеонидин-3-неохесперидозид и цијанидин-3-неохесперидозид (62).

Цветови цикламе имају слабо изражен мирис. Врста *C. purpurascens* је позната као најмириснија врста у роду циклама. Мирис њених цветова подсећа на мирис руже, ђурђевка или зумбула. За мирис биљака одговорна је група испарљивих једињења мале молекулске тежине, чија је улога у привлачењу опрашивача или у одбрани од предатора. Мирисне супстанце секретују жлездасте ћелије које могу бити смештене у листовима, стабљикама или цветовима. По хемијској структури могу бити терпеноиди, органске киселине, алдехиди, кетони, алкохоли, естри, етри, сумпорна или азотна једињења, фенилпропаноиди, бензеноиди и др. Ове супстанце се могу изоловати из

природног материјала и користе се због својих карактеристика у индустрији хране и/или хемијској индустрији (63,64).

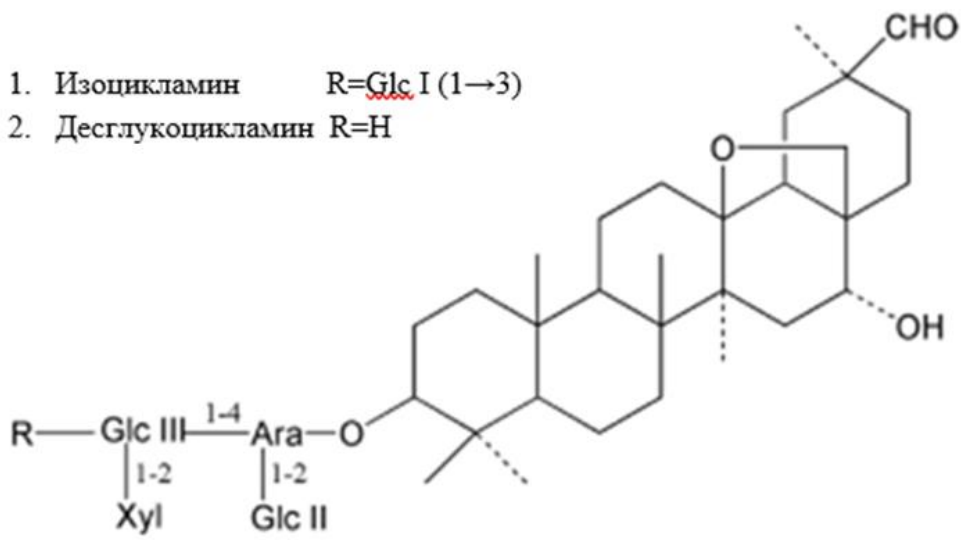
Преко 60 различитих испарљивих једињења је изоловано из цветова *C. purpurascens*. Варијације у садржају и концентрацији изолованих једињења зависе од времена прикупљања узорка, да ли је узоркована цела биљка или њен део. Уколико је испитиван екстракт на квантитативни и квалитативни садржај испарљивих једињења, на добијене резултате највише утиче врста и поларност растварача за екстракцију, као и метода екстракције и изолације (63,64). Испарљива једињења из цветова *C. purpurascens* по хемијској структури могу бити монотерпенски и сесквитерпенски алкохоли, фенилпропаноиди и бензеноиди. Квантитативно доминирају цинамалдехид, цинамил алкохол и хидроцинамил алкохол, цитронелол, цитронелал и цитронелил ацетат. Такође, у мањим концентрацијама, идентификовани су фарнезол, дихидрофарнезол, β -кариофилен, гераниол, лимонен, линалол, ментол, α -терпионеол и бензил алкохол. Сматра се да су за слаткасти мирис цветова *C. purpurascens* одговорни цитранелол, цинамил алкохол и њихови естри (Слика 3) (63,64).



Слика 3. Хемијске структуре испарљивих једињења цветова *C. purpurascens*

Фитохемијска истраживања луковица *C. purpurascens* указују на присуство сапонина. Најзаступљенији сапонини у овој биљној врсти су десглукоцикламин I и изоцикламин (Слика 4). Концентрација идентификованих сапонина зависи од врсте (поларности) растварача употребљеног за екстракцију. Највећа концентрација се може пронаћи у метанолним, затим у воденим и најмање у хлороформским и петрол етарским екстрактима (65).

1. Изоцикламин R=Glc I (1→3)
2. Десглюкоцикламин R=H



Слика 4. Структуре изоцикламина и десглюкоцикламина

1.4. Фармаколошка активност *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

1.4.1. Антиоксидациона активност екстракта луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Као продукти хуманог метаболизма, у физиолошким условима се у организму свакодневно стварају слободни радикали. То су нестабилне хемијске врсте, са једним или више електрона који нису спарени, због чега имају високи афинитет за ступање у реакцију са другим једињењима. Називају се и реактивним врстама – реактивне врсте кисеоника (Reactive Oxygen Species - ROS) и реактивне врсте азота (Reactive Nitrogen Species - RNS). У ову групу спадају радикали али и друга једињења која нису радикали по хемијској категоризацији (Табела 1). Нерадикалска једињења се могу лако претворити у радикале под утицајем оксидујућих агенаса. Под нормалним условима метаболизма, они су у равнотежи са антиоксидансима, који их неутралишу. Због тога антиоксиданси су једињења која најчешће имају ароматични прстен са хидроксилним групама које служе као донори протона. Процесом неутралисања слободних радикала се формирају мање реактивна једињења. Ендогени антиоксиданси су глутатион пероксидаза, супероксид дисмутаза, каталаза и др. У случају када је ова равнотежа нарушена, слободни радикали постају покретачи или посредници за настанак оксидативног оштећења на ћелијском и молекулском нивоу. Стање у коме је повећан настанак слободних радикала или су ендогени антиоксиданси онемогућени да их неутралишу назива се оксидативни стрес (66,67).

Оксидативно оштећење је кључно за настанак патофизиолошког стања, због чега се оксидативни стрес сматра основним механизмом настанка многих обољења (кардиоваскуларних болести, дијабетеса, инфламаторних болести, убрзаног старења, болести нервног система, катаракте, реуматоидног артритиса, карцинома, астме и др.). Бројна истраживања су усмерена ка проналаску антиоксидационих агенаса као и разумевању потенцијалних антиоксидационих ефеката егзогенних молекула који би се могли користити у циљу спречавања или успоравања оксидативних оштећења. Биљни екстракти су богати извори молекула који имају доказану антиоксидациону активност и због тога је истраживање антиоксидационог потенцијала неког биљног екстракта прелиминарни и обавезни корак у његовој карактеризацији (66-69).

Табела 1. Приказ радикалских и нерадикалских реактивних врста кисеоника и азота

ROS		RNS	
Хидропероксил радикал	HOO [•]	Нитрозил катјон	NO ⁺
Алкоксил радикал	RO [•]	Азот-диоксид радикал	NO ₂ [•]
Хидроксил радикал	OH [•]	Азот-моноксид радикал	NO [•]
Супероксид анјон радикал	O ₂ ^{•-}	Алкил пероксинитрит	ROONO
Пероксил радикал	ROO [•]	Пероксинитрит анјон	OONO ⁻
Водоник пероксид	H ₂ O ₂	Динитро-тетраоксид	N ₂ O ₄
Озон	O ₃	Азотаста киселина	HNO ₂
Хипохлораста киселина	HClO		
Хипобромаста киселина	HBrO		

Антиоксидациона активност биљака тј. различитих делова биљака из рода *Cyclamen* је проучавана (5-10). Испитивана је референтним *in vitro* методама као што су неутралисање слободних радикала (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил и 2,2'-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина радикала) и способност редуковања јона метала (гвожђа и бакра) (68,70-75).

Испитан је антиоксидациони потенцијал метанолних екстраката цветова и листова *C. hederifolium*. Екстракт цветова ове врсте у односу на екстракт листова показује статистички значајнију способност неутралисања слободних радикала. Сматра се да је узрок таквог деловања већа концентрација фенола и флавоноида, једињења који су носиоци антиоксидационе способности, детектована у екстракту цветова (71).

Испитивањем надземног дела биљке врсте *C. hederifolium* која расте у Турској, доказано је да већу способност неутралисања слободних радикала има етанолни екстракт, а да следе у опадајућем редоследу метанолни и ацетонски екстракти. Испитивањем екстраката подземног дела биљке (луковица) највећу способност неутралисања слободних радикала показао је метанолни екстракт, а затим у опадајућем редоследу следе ацетонски и етанолни екстракти. Аутори су закључили да су екстракти подземних делова *C. hederifolium* били ефикаснији у неутралисању АВТS радикала у односу на екстракте надземних делова биљке (75).

1.4.2. Антимикробна активност екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Антимикробна (антибактеријска и антифунгална) активност екстраката различитих врста рода *Cyclamen* је истраживана. За испитивање антимикробне активности коришћене су диск-дифузиона и микродилуциона метода (73,74,76-82). Доказано је да етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* инхибира формирање биофилма метицилин резистентног *Staphylococcus aureus*-а (79). На основу досадашњих истраживања сазнајемо да антимикробна активност екстракта зависи од поларности растварача који се користи за екстракцију. У прилог овоме сведоче подаци да метанолни екстракт луковица *C. hederifolium* показује добар антимикробни ефекат ка *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* који је дозно-зависан. Хлороформски и етил-ацетатни екстракт показују инхибиторни потенцијал према овим сојевима у концентрацији од 100 mg/ml, док петрол-етарски екстракт није показао антимикробни ефекат (80). Потврђено је антифунгално дејство метанолног екстракта *C. hederifolium* према *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* и *Penicillium expansum* (81).

Подаци о антимикробној активности *C. purpurascens* су оскудни. До данас је познато да водени екстракт луковица ове врсте показује антимикробну активност према *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus faecalis*. Водени екстракт *C. purpurascens* не показује активност према *Klebsiella pneumoniae* (82).

Сматра се да су за антимикробну активност циклума одговорни сапонини који нарушавају интегритет мембране микроорганизама. Сапонини се везују за стероле ћелијске мембране стварајући поре, којима се нарушава уобичајена пермеабилност мембране. Као последица дисконтинуитета у стабилности и интегритету мембарне ћелије наступа њена лиза тј. смрт ћелије микроорганизама (80,83).

1.4.3. Цитотоксична активност екстракта луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

У литератури су доступни подаци о антитуморској активности различитих врста рода *Cyclamen* (Табела 2) (70-73,83-84,86-88). Изоловани су активни принципи из врста *Cyclamen libanoticum* и *Cyclamen persicum* (саксифрагифолин Б и цикламин), који су испољили значајну антитуморску активност ка ћелијама аденокарцинома дојке, аденокарцинома колоне, хепатоцелуларног карцинома, карцинома плућа, панкреаса и простате. Сматра се да је саксифрагифолин Б потентнији антитуморски агенс у односу на цикламин (IC_{50} 0,18-0,55 μ M/ IC_{50} 0,33-0,84 μ M), са посебним афинитетом према ћелијама карцинома дојке и плућа (84).

Предложени механизам дејства јаког антитуморског ефекта саксифрагифолина је идукција програмиране смрти ћелије (апоптозе) која је узрокована активацијом поли(АДП-рибоза)полимеразе-3 (*Poly(ADP-ribose)polymerase-3* - PARP), иницијаторских апоптотских каспаза 8 и 9, ефекторске каспазе 3, као и колапсом интегритета митохондријалне мембране и доспећем цитохрома Ц у цитоплазму (85).

Без обзира на сличност у врсти и садржају активних принципа различитих врста циклама, уочено је да постоје различити механизми антитуморског дејства. На пр. екстракт врсте *Cyclamen pseudibericum*, показује способност да омета и смањује инвазију и миграцију ћелија карцинома плућа (A549), а предложени механизам антитуморског деловања је ометање епител-мезенхим транзиције (*epithelial-to-mesenchymal transition* - ЕМТ) (86).

Подаци о цитотоксичној активности *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су оскудни. Тритерпенски сапонини *C. hederifolium* у концентрацијама 1-50 μ M нису испољили антитуморско дејство према ћелијама хуманих карцинома: грлића материце (HeLa), микроцелуларног карцинома плућа (H-446), карцинома дебелог црева (HT-29) и хистиоцитног лимфома (U937) (61).

Са друге стране, у студији коју су спровели истраживачи из Румуније добијени су другачији резултати (71). Испитивана је цитотоксичност водено-метанолних екстракта листова и цветова *C. hederifolium*. Оба екстракта су показала добру антитуморску активност ка ћелијама MDA-MB-231, односно, ћелијама карцинома дојке. Истраживачи су претпоставили да су за њу били одговорни цикламин и група једињења каротеноида (71).

Података о потенцијалној цитотоксичној активности *C. purpurascens* готово да нема. Једино је забележен цитотоксични ефекат комерцијалног препарата који садржи екстракт *C. purpurascens*, према ћелијској линији мишјих фибробласта (L929). Истраживачи су закључили да високе дозе екстракта имају потенцијално токсичан ефекат на испитиване ћелије (87).

Табела 2. Преглед резултата *in vitro* истраживања у којима је испитивана цитотоксична активност екстракта различитих врста циклама

Биљни материјал	Метода	Ћелијска линија	Резултат	Референца
Метанолни екстракт цвета и корена <i>C.cilicium</i>	МТТ тест	DU-145 MCF-7 MDA-MB-231	13,66% 3,61% 3,09%; 16,08% 3,61% 3,60%	70
Метанолни екстракт луковице и листова <i>C.cilicium</i>	МТТ тест	DU-145 MCF-7 MDA-MB-231	11,88% 3,17% 2,79%; 28,57% 5,01% 5,29%	70
Метанолни екстракт (метанол/вода = 80/20) листова и цветова <i>C. mirabile</i>	МТТ тест	MDA-MB-231	68,44 ± 0,81 % 78,09 ± 7,05 %	71
Метанолни екстракт (метанол/вода = 80/20) листова и цветова <i>C. persicum</i>	МТТ тест	MDA-MB-231	68,06 ± 1,06 % 77,42 ± 1,22 %	71
Саксифрагифолин Б изолован из <i>C.persicum</i> и <i>C.libanoticum</i>	WST-1 тест	BXPC-3, SK-BR-3, 22RV1, HepG2/3A, NCI-H1299, HT-29	IC ₅₀ (μM): 0,36; 0,25; 0,29; 0,55; 0,28; 0,18; 0,28	84
Цикламин изолован из <i>C.persicum</i> и <i>C.libanoticum</i>	WST-1 тест	BXPC-3, SK-BR-3, 22RV1, HepG2/3A, NCI-H1299, HT-29	IC ₅₀ (μM): 0,84; 0,33; 0,51; 0,64; 0,73; 0,34; 0,32	84
Екстракт <i>C. pseudibericum</i>	Луминометричка метода	A549	IC ₅₀ (μg/mL): 41,64±2,35	86
3β-О-{4-О-[3-hydroxyl-3-methylglutaryl]-β-D-xylopyranosyl-(1 →2)-β-D-glucopyranosyl-(1 →4)-[β-D-glu-copyranosyl-(1 →2)]-α-L-arabinopyranosyl}-16α-hydroxy-13β,28-epoxy-oleanan-30-al изолован из <i>C.trocopteranthum</i>	МТТ тест	НСТ116 HT-29	IC ₅₀ (μM): 1,47 ± 0,50; 2,54 ± 0,29	88
Деглукоцикламин I изолован из <i>C.trocopteranthum</i>	МТТ тест	НСТ116 HT-29	IC ₅₀ (μM): 1,47 ± 0,09 1,21 ± 0,30	88
Цикламин изолован из <i>C.trocopteranthum</i>	МТТ тест	НСТ116 HT-29	IC ₅₀ (μM): 9,98 ± 0,41 8,67 ± 0,54	88

WST- 1 тест (Water Soluble Tetrazolium test)

2. ЦИЉЕВИ И ХИПОТЕЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

Cyclamen hederifolium и *Cyclamen purpurascens*, самоникле биљне врсте рода *Cyclamen* које расту у Србији, нису довољно испитане.

У циљу детаљнијег карактерисања ових испитиваних биљних врста постављени су следећи циљеви и хипотезе.

2.1. Циљеви истраживања

Главни циљ ове дисертације је испитивање хемијског састава и поређење фармаколошких ефеката екстракта *Cyclamen hederifolium* и *Cyclamen purpurascens*.

Употребљена су три различита растварача за добијање екстракта - вода, 70% етанол и ацетон.

У циљу испитивања степена утицаја пролећа и јесени на садржај активних принципа, као и степен њиховог фармаколошког деловања, водени, етанолни и ацетонски екстракти су припремљени од биљног материјала који су потицали из два различита вегетациона периода тј. из пролећа и јесени.

Да би се испитале хипотезе овог истраживања постављени су следећи конкретни циљеви:

1. Прикупљање биљног материјала (луковица) *C. hederifolium* и *C. purpurascens* са станишта у Републици Србији
2. Одабир растварача различите поларности за добијање екстракта *C. hederifolium* и *C. purpurascens*. Одабрани растварачи су били вода, 70% етанол и ацетон.
3. Екстраховање луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* одабраним растварачима – водом, 70% етанолом и ацетоном.
4. Направити 12 различитих екстракта - у зависности од:
 - биљне врсте *C. hederifolium* и *C. purpurascens*,
 - одабраних растварача – вода, етанол и ацетон и
 - периода сакупљања биљног материјала - сакупљаног у пролеће и јесен.
5. Извршити хемијску карактеризацију свих испитиваних екстракта (одредити садржај укупних фенола, флавоноида и сапонина).
6. Испитати *in vitro* антиоксидациону активност свих испитиваних екстракта различитим методама.
7. Испитати *in vitro* антимикуробну активност (антибактеријску и антифунгалну) свих испитиваних екстракта на одабраним микробиолошким сојевима.
8. Испитати цитотоксичну активност свих испитиваних екстракта на хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), хуманим ћелијама карцинома плућа (A549) и хуманим ћелијама карцинома колоне (HCT-116).

2.2. Хипотезе истраживања

1. Сви испитивани екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* садрже феноле, флавоноиде и сапонине, без обзира на период сакупљања биљног материјала.
2. Садржај фенола, флавоноида и сапонина зависи од растварача употребљеног за екстракцију, биљне врсте и вегетацијског периода у коме је биљни материјал прикупљен.
3. Сви испитивани екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испољавају антиоксидационо дејство *in vitro*.
4. Сви испитивани екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* показују антимикуробну активност према испитиваним сојевима бактерија и гљивица.
5. Сви испитивани екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* показују цитотоксичну активност према испитиваним сојевима туморских ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Прикупљање луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Испитивани биљни материјал су представљале луковице самониклих врста *C. hederifolium* и *C. purpurascens*. Обе врсте су сакупљене у пролеће и јесен 2018. године са природних станишта у Р. Србији.

Луковице *C. hederifolium* прикупљане су на обронцима Суве планине, а *C. purpurascens* у Ђавољој Вароши. Материјал је идентификован стандардним ботаничким кључевима за одређивање биљака Флоре Републике Србије и Флоре Европе, на Одељењу за биологију Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу (13,89). Узорци су заведени под ваучерима бр. 13556, 13873, 13870 и 13871, у хербаријуму Природно-математичког факултета Универзитета у Нишу (Herbarium Moesiacum).

Прикупљане луковице очишћене су од земље и осталих делова биљке. До анализе сушене су на собној температури, заштићене од светлости и влаге.

3.2. Израда екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Осушене и ситно уситњене луковице *C. hederifolium* и *C. purpurascens* екстраховане су мацерацијом, а коришћени су растварачи различите поларности: вода, 70% етанол и ацетон. На овај начин добијено је 12 различитих екстраката, приказаних у Табели 3:

Табела 3. Испитивани екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

	Биљка	Време прикупљања материјала	Растварач	Ознака екстракта
1.	<i>C. hederifolium</i>	Пролеће	Вода	1 ChP
2.	<i>C. hederifolium</i>	Пролеће	Етанол	2 ChP
3.	<i>C. hederifolium</i>	Пролеће	Ацетон	3 ChP
4.	<i>C. purpurascens</i>	Пролеће	Вода	1 CpP
5.	<i>C. purpurascens</i>	Пролеће	Етанол	2 CpP
6.	<i>C. purpurascens</i>	Пролеће	Ацетон	3 CpP
7.	<i>C. hederifolium</i>	Јесен	Вода	1 ChJ
8.	<i>C. hederifolium</i>	Јесен	Етанол	2 ChJ
9.	<i>C. hederifolium</i>	Јесен	Ацетон	3 ChJ
10.	<i>C. purpurascens</i>	Јесен	Вода	1 CpJ
11.	<i>C. purpurascens</i>	Јесен	Етанол	2 CpJ
12.	<i>C. purpurascens</i>	Јесен	Ацетон	3 CpJ

Сви екстракти остављени су пет дана на собној температури, у затвореним стакленим посудама заштићеним од светлости, уз често мешање. Након филтрације, суви екстракти су добијени употребом ротационог вакуум упаривача (RV05 basic IKA, Немачка) и лиофилизатора. Добијени екстракти су чувани у десикатору до испитивања.

3.3. Хемијска карактеризација екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

3.3.1. Испитивање садржаја укупних фенола

У свим биљним екстрактима испитиваних врста одређиван је садржај укупних фенола (Total phenol content - TPC). Коришћена је метода по *Folin-Ciocalteu*-у (90). Метода се заснива на реакцији оксидације фенола у присуству *Folin-Ciocalteu* реагенса. Реагенс се редукује, што се детектује променом боје из жуте у плаву. Интензитет настале боје је сразмеран концентрацији фенолних једињења.

Реакциону смешу чини 0,02 ml екстракта, 0,5 ml *Folin-Ciocalteu* реагенса, 5,03 ml дестиловане воде и 2 ml натријум карбоната (20% Na₂CO₃). Смеша је остављена да стоји у мраку 30 мин. Апсорбанца је измерена спектофотометријски (750 nm). Гална киселина (0,5 mg/ml) је коришћена као стандард. Тест је изведен у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката. Садржај укупних фенола изражен је као µg еквивалента галне киселине (GAE) по mg суве масе (µg GAE/ mg сувог екстракта).

3.3.2. Испитивање садржаја укупних флавоноида

Хемијска карактеризација испитиваних екстраката циклума обухватила је и испитивање садржаја укупних флавоноида (Total flavonoid content - TFC). Извршено је колориметријском методом базираном на формирању комплекса између флавоноида и алуминијум хлорида (91). Реакцијом између флавоноида и поменутог раствора настаје комплекс са јонима Al³⁺, што се детектује променом боје раствора из жуте у жуто-зелену.

Реакциону смешу чини 0,05 ml екстракта, са 0,15 ml 5% NaNO₂. После 5 мин инкубације, додато је 0,75 ml 2% AlCl₃. Након 5 мин додато је 1 ml NaOH и 2,05 ml дестиловане воде. Смеша је остављена да одстоји 15 мин. Апсорбанција је измерена спектофотометријски на 520 nm. Рутин је коришћен као стандард. Тест је изведен у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати изражени као µg еквивалента рутина по mg суве масе (µg RE/ mg сувог екстракта).

3.3.3. Испитивање садржаја укупних сапонина

Спектрофотометријско одређивање садржаја укупних сапонина извршено је тестом ванилин-сумпорне киселине, на основу реакције између оксидованих сапонина и ванилина. За оксидовање сапонина користи се сумпорна киселина (72% v/v) (92).

Стандардни раствор сапонина припремљен је растварањем 10 mg диосгенина у 16 ml метанола и 4 ml дестиловане воде. У сваку епрувету додато је 10 ml узорка (20 mg/ml), 240 ml диметил сулфоксида (DMSO) и 250 ml ванилин реагенса (8%). На крају је пажљиво, низ зид епрувете додато 2,5 ml сумпорне киселине (72% v/v). Овако припремљен раствор је добро измешан и остављен 10 минута у воденом купатилу (60°C). Након инкубације и хлађења, апсорбанција је измерена на 544 nm. Тест је изведен у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати су приказани као mg диосгенин еквивалената/g сувог екстракта (mg DE/g) (92).

3.4. Испитивање антиоксидационе активности екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Антиоксидационо дејство екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испитано је помоћу пет различитих *in vitro* антиоксидационих тестова.

3.4.1. Одређивање способности неутралисања 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил (DPPH) радикала

Потенцијална антиоксидациона активност екстраката процењена је спектрофотометријским DPPH тестом (93). Метода се заснива на редукацији стабилног DPPH радикала прихватањем Н-атома или електрона из антиоксидационих молекула. Када DPPH радикал реагује са антиоксидансом, редукује се у хидразин и мења боју из љубичасте у жуту (93).

Тест се изводи мешањем 1,5 ml метанолног раствора DPPH радикала (90 $\mu\text{mol/l}$), 0,002 ml испитиваног екстракта и 2,5 ml метанола. Епрувете са смешом су остављене да одстоје на тамном месту на собној температури 60 мин. Апсорбанца, тј. способност екстракта да неутралише DPPH радикал, се мери спектофотометријски на 515 nm насупрот слепој проби (метанол). 6-хидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоксилна киселина (Trolox) је коришћена као стандард. Тест је изведен у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати су приказани као μg Trolox еквивалената (TE) по mg тежине сувог екстракта ($\mu\text{g TE/ mg}$ сувог екстракта).

Процент неутралисања DPPH радикала изражава се формулом:

$$\% \text{ неутрализације DPPH радикала} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A_0 : апсорбанца контроле, A_1 : апсорбанца екстракта.

3.4.2. Одређивање способности неутралисања 2, 2'-азино-бис-(3-етилбензотиазолин-6-сулфонат) (ABTS) радикала

Способност неутралисања слободних радикала посматраних екстраката испитана је и методом неутрализације ABTS радикала (93). Метода се заснива на обезбојавању раствора слободног радикала $\text{ABTS}^{\bullet+}$ у присуству антиоксиданса. Поменути радикал настаје оксидацијом ABTS-а са калијум персулфатом ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$).

Радни раствор припремљен је мешањем једнаких количина раствора ABTS (7 mM) и калијум персулфата (2,4 mM). Реакцијом ова два раствора ствара се плаво/зелени ABTS радикал. Након 12-16 часова инкубације овако добијеног раствора на собној температури у мраку, 0,002 ml испитиваног екстракта помешано је са 1,8 ml претходно припремљеног раствора ABTS, а затим разблажено додатком 2,198 ml метанола. Антиоксиданси из екстракта обезбојавају раствор, пропорционално њиховој концентрацији. Апсорбанција је мерена након 6 минута спектофотометријски на 734 nm. Trolox је коришћен као стандард, а резултати изражени као μg Trolox еквивалената по mg сувог екстракта ($\mu\text{g TE/ mg}$ сувог екстракта). Тест је изведен у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката.

Способност неутралисања ABTS радикала изражава се формулом:

$$\% \text{ инхибиције ABTS радикала} = ((A_0 - A_1) / A_0) \times 100$$

A₀: апсорбанца контроле, A₁: апсорбанца екстракта

3.4.3. Одређивање укупног редукционог потенцијала Total reducing power assay - TRP

Одређивање укупног редукционог потенцијала испитиваних екстраката извршено је методом засниваном на редукцији Fe³⁺ јона у Fe²⁺ (93).

Испитивани раствор је припремљен мешањем 0,01 ml екстракта, 1 ml фосфатног пуфера (pH 6,6), 1 ml 1% раствора калијум-хексацијаноферата(III) и 1,69 ml дестиловане воде. Смеша је остављена да одстоји на 50°C током 30 минута. Након истека времена инкубације, додат је 1 ml 10% раствора трихлорсирћетне киселине (CCl₃COOH) и 0,6 ml FeCl₃. Апсорбанција је измерена спектофотометријски (700 nm). Аскорбинска киселина је коришћена као стандард. Експерименти су изведени као три независна мерења за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати изражени су као µg еквивалента аскорбинске киселине по mg сувог екстракта (µg AAE/ mg сувог екстракта). Већа апсорбанција указује на већу редукујућу снагу екстракта (93).

3.4.4. Испитивање способности редукције јона гвожђа Ferric-reducing antioxidant power assay - FRAP

Антиоксидациона активност свих испитиваних екстраката луковица циклама је одређена тестом заснованим на редукцији Fe³⁺ јона у Fe²⁺ јон, у трипиридил триазин комплексу (TPTZ). У присуству антиоксиданаса, при киселој pH, ствара се интензивно плави [Fe(II)-(TPTZ)₂]²⁺ (93).

FRAP реагенс је направљен од 200 ml натријум ацетат-3-хидрата (CH₃COONa x 3H₂O), 20 ml TPTZ и 20 ml FeCl₃ у односу 10:1:1. Реакциони раствор је припремљен мешањем 0,01 ml екстракта, 1 ml FRAP реагенса и 2,99 ml дестиловане воде. Смеша је остављена да стоји 5 минута на 37°C. Апсорбанција је одређена спектофотометријски на 595 nm. Експеримент је изведен као три независна мерења за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати израчунати као њихове средње вредности. Резултати су приказани као µg Fe(II) еквивалента/ mg сувог екстракта.

3.4.5. Испитивање способности редукције јона бакра Cupric reducing antioxidant capacity assay - CUPRAC

Антиоксидациона активност свих испитиваних екстраката луковица циклама је одређена и тестом заснованим на редукцији јона метала из бакар(II)–неокупроин комплекса (Cu(II)–Nc) антиоксидансима из екстракта до облика Cu(I)–Nc. Метода је применљива на широк спектар хидрофилних и липофилних антиоксидантних молекула, као што су полифенолне киселине, флавоноиди, каротеноиди, антоцијанини, синтетички антиоксиданти и витамин Ц и Е (94).

Експеримент је изведен мешањем 0,01 ml испитиваног екстракта, 1 ml фосфатног пуфера (pH 7,0), 1 ml неокупроина и 1 ml бакар(II) хлорида. У смешу је додато 1,09 ml

етанола. Добијени реакциони раствор остављен је да стоји 30 мин на собној температури. Апсорбанција је одређена спектофотометријски на 700 nm. Више вредности апсорбанце указују на већу редукциону способност испитиваног екстракта. Trolox (410 µg/ml) је коришћен као стандард. Експеримент је изведен као три независна мерења за сваки од дванаест биљних екстраката, а резултати израчунати као њихова средња вредност. Резултати су изражени као µg еквивалента Trolox по mg суве тежине (µg TE/ mg сувог екстракта).

3.5. Одређивање антимикуробог деловања екстраката луковица *C.hederifolium* и *C. purpurascens*

Потенцијална антимикуробна активност испитиваних екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испитано је на 10 различитих сојева микроорганизама (бактерија и гљивице) (Табела 4).

Табела 4. Приказ сојева бактерија и гљивице коришћених за испитивање антимикуробне активности екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Микроорганизам	Сој
Грам позитивне бактерије	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
	<i>B. cereus</i> ATCC 11778
	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433
Грам негативне бактерије	<i>S. enteritidis</i> ATCC 13076
	<i>E. coli</i> ATCC 25922
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
	<i>P. mirabilis</i> ATCC 12453
	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 10031
	<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048
Гљивица	<i>C. albicans</i> ATCC 14053

Антимикуробна активност испитана је микродилуционом методом (95). Одређене су минимална инхибиторна и минимална микробицидна концентрација (mg/ml). Најмања концентрација екстракта при којој не долази до промене боје ресазурина је означена као минимална инхибиторна концентрација (МИК). Прати се промена боје из плаве у ружичасту. Преношењем 10 µl узорка из бунара у којима није детектован раст микроорганизама на плочаст агар, одређена је минимална микробицидна концентрација (МБК). Она је дефинисана као концентрација при којој након времена инкубације није забележен пораст микроорганизама (95).

3.6. Испитивање антитуморске активности екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Испитивање антитуморске активности водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* спроведено је у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Потенцијално антитуморско дејство свих екстраката испитано је на хуманим ћелијским линијама карцинома грлића материце (HeLa), хуманим ћелијама карцинома колоне (HCT-116) и хуманим ћелијама карцинома плућа (A549). Испитиване ћелије су култивисане у комплетном медијуму (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - DMEM) са 10% феталног говеђег серума (*fetal bovine serum* - FBS), 100 U/ml пеницилина, 100 µg/ml стрептомицина, 2mmol/l L-глутамин и 1 mmol/l неесенцијалних аминокиселина. Узгајање је спроведено у инкубатору, у асептичним условима на 37°C у атмосфери од 95% O₂ и 5% CO₂.

Потенцијална антитуморска активност испитиваних екстраката утврђена је колориметријским тестом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолијум бромид (МТТ). МТТ се у живим, метаболички активним ћелијама, под утицајем митохондријалне редуктазе редукује до формазана. Формазан се формира у облику љубичастих кристала који се растварају у присуству диметилсулфооксида. Интензитет настале боје мери се спектофотометријски на 595nm (95, 96). Непосредно пре извођења теста ћелије се третирају 1 минут раствором 0,25% трипсина и 0,02% етилен диамин тетра сирћетна киселине (*ethylenediaminetetraacetic acid* - EDTA) раствореног у фосфатном пуферу (*Phosphate Buffered Saline* - PBS), у циљу одлепљивања са дна флашка. Како би се спречило оштећење ћелија трипсином, ћелије су третиране DMEM-ом са додатком FBS (10%). Следило је центрифугирање у трајању од 10 мин на 1500 обртаја.

Вијабилност ћелија је процењена бојењем трипан плавим. Наведена боја продира у ћелије чија је мембрана оштећена, бојећи је плаво. Ћелије чија је мембрана интактна остају необојене.

МТТ тест се изводи у микротитар плочама. Туморске ћелије су засејане у плоче са 96 бунара, а затим инкубиране на 37°C и 5% CO₂ током 24 сата како би се залепиле за подлогу. Након 24 сата, када су ћелије причвршћене на дно плоче, супернатант је уклоњен, додато је 100 µl раствора екстракта. Серијски је разређиван два пута у медијуму до концентрација у распону од 2000 µg/ml, 1000 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 62,5 µg/ml, 31,25 µg/ml и 15,625 µg/ml.

Сваки екстракт је тестиран у трипликату. Као позитивна контрола коришћена је цисплатина. Плоче су инкубиране на 37°C у 5% CO₂ током 24, 48 и 72 сата. После периода инкубације, супернатант је уклоњен и 100 µl раствора МТТ (5 mg/ml у PBS) у DMEM-у (10 µl МТТ и 90 ml, по бунару) је додато у сваки бунар. У овој реакцији, од жутог МТТ-а настају љубичасти кристали формазана. После 4 сата инкубације под горе поменутим условима, садржај бунара је уклоњен. Додат је DMSO (150 µl) са глицинским пуфером (20 µl) у сваки бунар у циљу растварања кристала формазана.

За мерење апсорбанција на 595 nm коришћен је Zenyth 3100 Multimode detector. Интензитет љубичасте боје настале растварањем формазана директно је пропорционалан броју живих ћелија. За сваки од испитиваних екстраката процењена је цитотоксичност у три одвојена експеримента (95, 96).

3.7. Реагенси и апаратура

2,2-дифенил-1-пикрилхидразил, гвожђе (III) хлорид хексахидрат, *Folin-Ciocalteu* реагенс, 2,20-азино-бис(3-етилбензотиазолин-6-сулфонска киселина), гална киселина, Trolox, аскорбинска киселина, метанол, азотна киселина, перхлорна киселина и сви реагенси који се користе за цитотоксични тест набављени су од Sigma Chemicals Co. St. Louis, Missouri, USA.

Неокупроин, бакар(II) хлорид дихидрат, натријум карбонат, хлороводонична киселина, ТРТЗ, калијум хексацијаноферат(III), фосфатни пуфер, амонијум ацетатни пуфер, трихлорсирћетна киселина, калијум персулфат, гвожђе-сулфат хептахидрат и диметил сулфоксид набављени су од Merck, Darmstadt, Немачка.

Мерење апсорпције извршено је на двоструком UV-Vis спектрофотометру Perkin Elmer lambda 15 (Massachusetts, USA). Спектрофотометар је опремљен читачем Zenyth 3100 Multimode detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Austria).

3.8. Статистичка обрада података

Сви експерименти изведени су у трипликату за сваки од дванаест биљних екстраката. Резултати изражени као средње вредности мерења и стандардне девијације и приказани су графички или табеларно. За обраду резултата коришћен је Microsoft Office Excel 2007.

Статистичка анализа добијених резултата извршена је у SPSS 19.0 пакету. Употребљени су одговарајући параметарски и непараметарски тестови.

За анализу садржаја фенола, флавоноида, сапонина и антиоксидационе активности посматраних екстраката, а у зависности од резултата испитивања нормалности расподеле, употребљени су *Kruskal-Wallis* или ANOVA тест.

Одговарајућом post-hoc анализом, употребом *Mann-Whitney* или *Bonfferoni* теста, одређене су статистички значајне разлике између конкретних група.

Извршена је корелација антиоксидационе активности са укупним фенолима и флавоноидима.

Добијене разлике се карактеришу као статистички значајне ако је вредност $p < 0,05$. Уколико је вредност $p < 0,01$, добијене разлике се карактеришу као високо статистички значајне.

4. РЕЗУЛТАТИ

Испитивања различитих екстраката луковица две врсте дивљих циклама које расту на нашем поднебљу, *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, обухватила су прикупљање и обраду луковица, екстракцију биљног материјала употребом растварача различите поларност (воде, 70% етанола и ацетона), испитивање хемијског састава и биолошке активности добијених екстраката.

Одређен је садржај укупних фенола, флавоноида и сапонина.

Испитано је антиоксидационо, антимикумно и цитотоксично дејство екстраката.

Антимикумно дејство екстраката луковица цикламе испитано је на девет бактеријских и један гљивични сој.

Цитотоксично дејство испитано је на хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), карцинома колона (HCT-116) и карцинома плућа (A549).

4.1. Укупни феноли и флавоноиди у екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Концентрације укупних фенола и флавоноида у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима *C. hederifolium* и *C. purpurascens* приказане су у Табелама 5 и 6. Резултати су приказани као средње вредности три мерења и стандардне девијације.

У екстрактима припремљеним од луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* прикупљаних у јесен детектовано је више фенола у односу на екстракте луковица прикупљаних у пролеће. Време прикупљања биљног материјала у овом случају има мали утицај на садржај активних принципа.

Постоји статистички значајна разлика у садржају укупних фенола воденог, етанолног и ацетонског екстракта луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и јесен ($p=0,027$; $p<0,01$). Посматрајући екстракте луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, највећа концентрација фенола детектована је у воденом екстракту ($31,76\pm 2,92 \mu\text{g GAE/mg}$). Нижа концентрација измерена је у екстрактима луковица прикупљаних у пролеће, при чему је највећа била у ацетонском екстракту ($15,79\pm 0,16 \mu\text{g GAE/mg}$).

Концентрација укупних фенола у екстрактима луковица *C. purpurascens* је највећа у ацетонским, нижа у етанолним а најнижа у воденим екстрактима. Вредности су биле веће у екстрактима луковица прикупљаних у јесен него у екстрактима луковица прикупљаних пролеће. Највећа концентрација је детектована у ацетонском екстракту луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен ($16,46\pm 0,33 \mu\text{g GAE/mg}$), а најмања у воденом екстракту луковица ове врсте прикупљаних у пролеће ($7,91\pm 0,19 \mu\text{g GAE/mg}$).

Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* се статистички значајно разликују и по садржају укупних флавоноида ($p<0,01$).

Садржај укупних флавоноида у свим испитиваним екстрактима зависи од употребљеног растварача и времена прикупљања биљног материјала. Као најбољи растварач за екстраховање флавоноида у екстрактима биљног материјала прикупљаних

у пролеће издвојио се етанол, док је за екстракте биљног материјала прикупљаног у јесен то био ацетон.

Највећа концентрација флавоноида изолована је у ацетонском екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен ($60,33 \pm 1,91 \mu\text{g RE/mg}$), а најнижа у воденом екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће ($16,58 \pm 0,72 \mu\text{g RE/mg}$).

Највећа концентрација флавоноида изолована је у етанолном екстракту луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће ($49,08 \pm 3,82 \mu\text{g RE/mg}$), а најнижа у воденом екстракту луковица ове циклеме прикупљаних у јесен ($15,33 \pm 0,72 \mu\text{g RE/mg}$).

Табела 5. Укупни феноли и флавоноиди у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће

Екстракт	Укупни феноли (TPC) ($\mu\text{g GAE/mg}$)	Укупни флавоноиди (TFC) ($\mu\text{g RE/mg}$)
1 ChP	$13,43 \pm 0,25$	$16,58 \pm 0,72$
2 ChP	$12,42 \pm 0,20$	$35,33 \pm 2,6$
3 ChP	$15,79 \pm 0,16$	$34,08 \pm 1,91$
1 CpP	$7,91 \pm 0,19^*$	$20,33 \pm 1,44^*$
2 CpP	$9,46 \pm 0,17$	$49,08 \pm 3,82$
3 CpP	$12,39 \pm 0,28$	$32,83 \pm 1,44$

* статистички значајна разлика у односу на 3CpP ($p=0,021$)

▪ статистички значајна разлика у односу на 2 CpP ($p=0,02$)

Табела 6. Укупни феноли и флавоноиди у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, прикупљаних у јесен

Екстракт	Укупни феноли ($\mu\text{g GAE/ mg}$)	Укупни флавоноиди ($\mu\text{g RE/ mg}$)
1 ChJ	$31,76 \pm 2,92^*$	$28,17 \pm 10,06^\diamond$
2 ChJ	$26,03 \pm 1,32$	$23,2 \pm 7,37$
3 ChJ	$26,67 \pm 0,25$	$60,33 \pm 1,91$
1 CpJ	$8,58 \pm 0,27^*$	$15,33 \pm 0,72^\#$
2 CpJ	$12,20 \pm 0,28$	$27 \pm 2,16$
3 CpJ	$16,46 \pm 0,33$	$40,33 \pm 3,15$

* статистички значајна разлика у односу на 3 CpJ ($p=0,02$)

▪ статистички значајна разлика у односу на 3 ChJ ($p=0,009$)

статистички значајна разлика у односу на 3 CpJ ($p<0,05$)

◇ статистички значајна разлика у односу на 3 ChJ ($p=0,03$)

4.2. Укупни сапонини у екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Садржај укупних сапонина у екстрактима *C. hederifolium* био је највећи у воденом екстракту луковица прикупљаних у пролеће, а најнижи у воденом екстракту луковица прикупљаних у јесен.

Садржај укупних сапонина у екстрактима *C. purpurascens* био је највећи у ацетонском екстракту луковица прикупљаних у јесен, а најнижи у воденом екстракту луковица прикупљаних у пролеће

Веgetацијски период у коме је биљни материјал прикупљен имао је утицаја на садржај сапонина у испитиваним екстрактима. У екстрактима биљног материјала прикупљаног у јесен измерене су веће концентрације сапонина у односу на екстракте биљног материјала прикупљаног у пролеће. Изузетак су водени екстракти луковица *C. hederifolium*, где је садржај укупних сапонина био већи у екстракту луковица прикупљаних у пролеће (Табела 7).

Табела 7. Садржај укупних сапонина у воденим, етанолним и ацетонским екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће и јесен

Екстракт	Укупни сапонини (mg DE/g)	Екстракт	Укупни сапонини (mg DE/g)
1 ChP	401,75±3,58	1 ChJ	241,62±3,58
2 ChP	347,03±2,15	2 ChJ	362,74±4,30
3 ChP	353,11±5,02	3 ChJ	394,45±5,76
1 CpP	237,57±2,15	1 CpJ	310,03±2,86
2 CpP	362,23±5,02	2 CpJ	392,53±3,73
3 CpP	361,72±2,86	3 CpJ	413,41±2,86

Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће и јесен, се не разликују значајно по садржају сапонина ($p=0,056$; $p=0,063$).

4.3. Антиоксидациона активност екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Резултати испитивања антиоксидационе активности свих испитиваних екстраката приказани су у Табели 8. Вредности су изражене као средња вредност три мерења и стандардна девијација.

Табела 8. Антиоксидациона својства водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Екстракт	DPPH μg TE/mg	ABTS μg TE/mg	TRP μg AAE /mg	FRAP μg FE/mg	CUPRAC μg TE/mg
1ChP	2,56±0,03	8,98±0,05	0,06	5,17±0,02	30,47±0,1 †
2 ChP	5,79±0,02	6,68±0,05	0,01	3,86±0,02	14,88±0,03
3 ChP	6,79±0,04	9,33±0,05 #	0,02	5,6±0,02	20,85±0,05
1 ChJ	8,15±1,88 ◊	6,21±0,56 *	0,07	15,62±0,58 ▼	5,89±1,85 ♠
2 ChJ	8,29±1,17	6,97±0,53	0,05	12,57±1,82	1,36±1,16
3 ChJ	6,93±0,03 §	9,69±0,09 ▪	0,12	9,81±0,06	40,09±0,09
1 CpP	2,95±0,05	7,58±0,12	0,13 ▲	3,75±0,02	15,93±0,05
2 CpP	6,91±0,01	9,17±0,07	0,02	5,87±0,01	22,95±0,06
3 CpP	6,83±0,02	8,83±0,05	0,01	4,52±0,01	19,52±0,08
1 CpJ	4,42±0,02	5,97±0,05	0,01	2,9±0,01	14,27±0,05
2 CpJ	6,03±0,04	6,00±0,07	0,02	3,10±0,02	12,82±0,05
3 CpJ	6,79±0,01	8,97±0,09	0,02	5,39±0,02	21,16±0,08

DPPH ◊ статистички значајна разлика у односу на 2CpP (p=0,022); § статистички значајна разлика у односу на 1ChJ (p=0,012) и у односу на 1ChP (p=0,018).

ABTS * статистички значајна разлика у односу на 3ChP (p=0,032); ▪ статистички значајна разлика у односу на 1ChJ (p<0,01); # статистички значајна разлика у односу на 1CpJ (p=0,049).

TRP ▲ статистички значајна разлика у односу на 3CpP (p=0,023) и у односу на 1ChJ (p=0,036);

FRAP ▼ статистички значајна разлика у односу на 3ChJ (p=0,008).

CUPRAC † статистички значајна разлика у односу на 1ChJ (p<0,05); ♠ статистички значајна разлика у односу на 3ChJ (p<0,01).

4.4. Индекс антиоксидационог потенцијала екстраката луковица *C. hederifolium* in vitro

За испитиване екстракте луковица *C. hederifolium* одређен је индекс антиоксидационог потенцијала. Вредности су добијене из резултата пет различитих, претходно поменутих, *in vitro* антиоксидационих тестова за сваки испитивани узорак.

Највећа вредност индекса антиоксидационог потенцијала утврђена је за ацетонски екстракт луковица прикупљаних у јесен (100), а затим за водени и ацетонски екстракти луковица прикупљаних у пролеће (85,22; 80,21). Нижу вредност имали су етанолни екстракти луковица прикупљаних у пролеће (58,87) и јесен (53,54), док је најнижу вредност имао водени екстракт луковица прикупљаних у јесен (19,15) (Табела 9).

Табела 9. Антиоксидациони потенцијал екстраката *C. hederifolium*

Екстракти	ABTS	DPPH	CUPRAC	FRAP	TRP	Индекс антиоксидационог потенцијала
1 ChP	96,28	37,70	100,00	92,14	100,00	85,22
2 ChP	71,63	85,27	48,84	68,93	19,67	58,87
3 ChP	100	100,00	68,44	100,00	32,62	80,21
1 ChJ	33,10	14,86	22,05	17,33	8,40	19,15
2 ChJ	81,93	85,86	41,33	39,25	19,33	53,54
3 ChJ	100	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Однос индекса антиоксидационог потенцијала екстраката луковица *C. hederifolium* и укупних фенола

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће приказана је на Графику 3.

Утврђена је средње јака корелација посматраних вредности ($r^2=0,3491$; $r=0,59$).

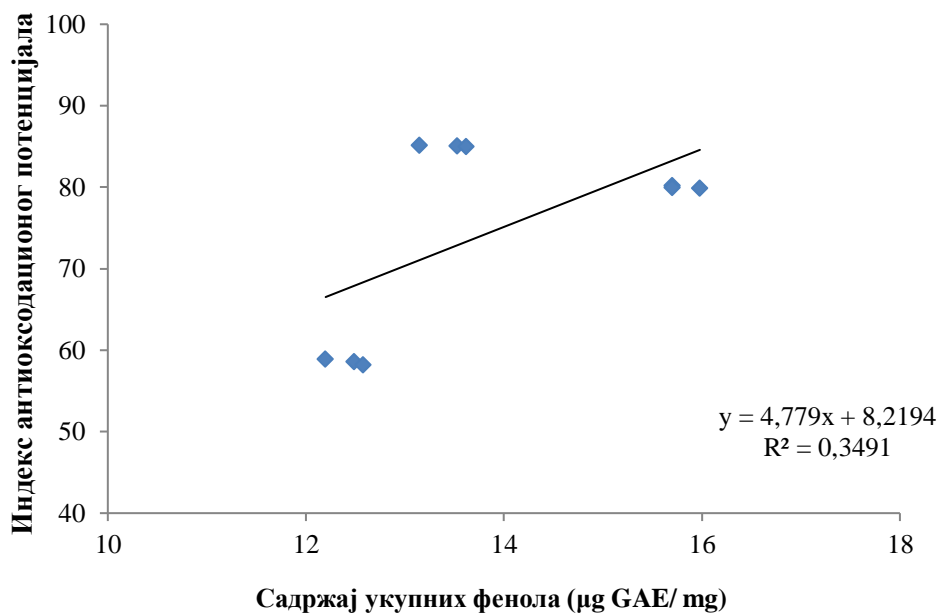


График 3. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних прикупљаних у јесен приказана је на Графику 4.

Утврђена је јака позитивна корелација посматраних вредности ($r^2=0,9471$; $r=0,97$).

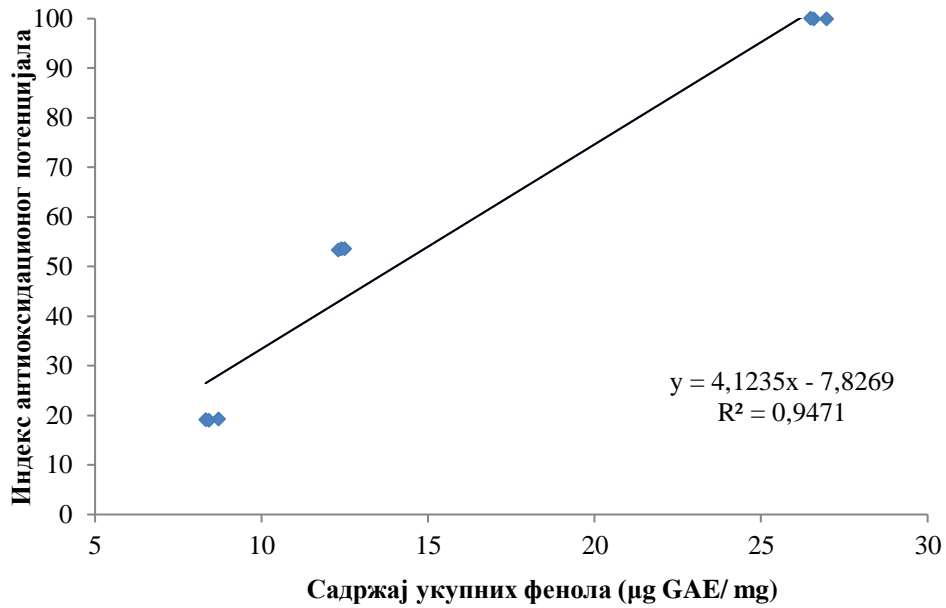


График 4. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен

Однос индекса антиоксидационог потенцијала екстракта луковица *C. hederifolium* и укупних флавоноида

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће приказана је на Графику 5.

Утврђена је средње јака корелација посматраних вредности ($r^2=0,3621$; $r=0,60$).

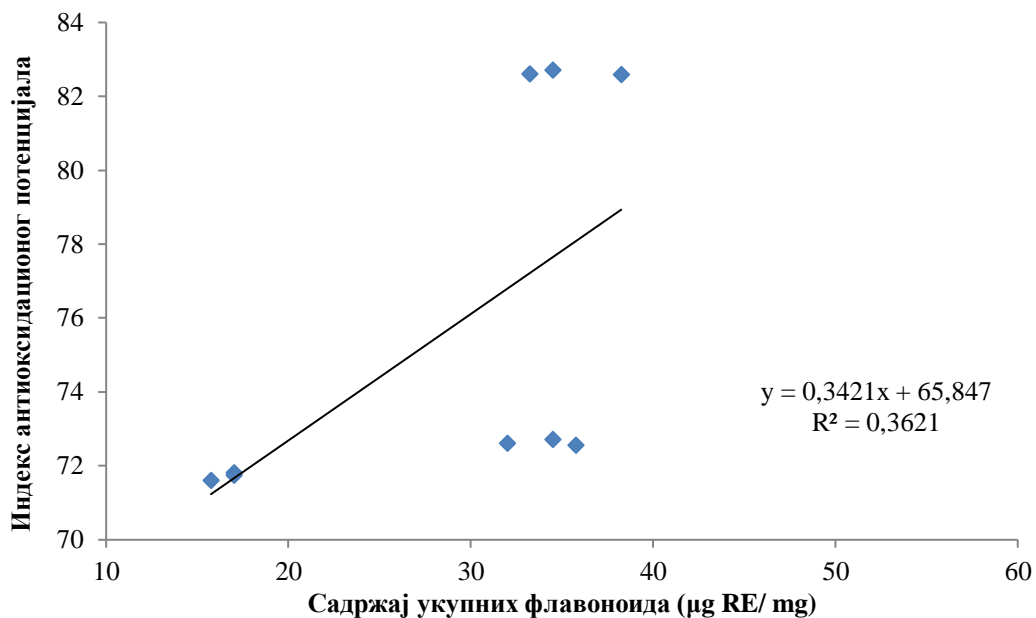


График 5. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен приказана је на Графику 6.

Утврђена је јака позитивна корелација посматраних вредности ($r^2=0,8513$; $r=0,92$).

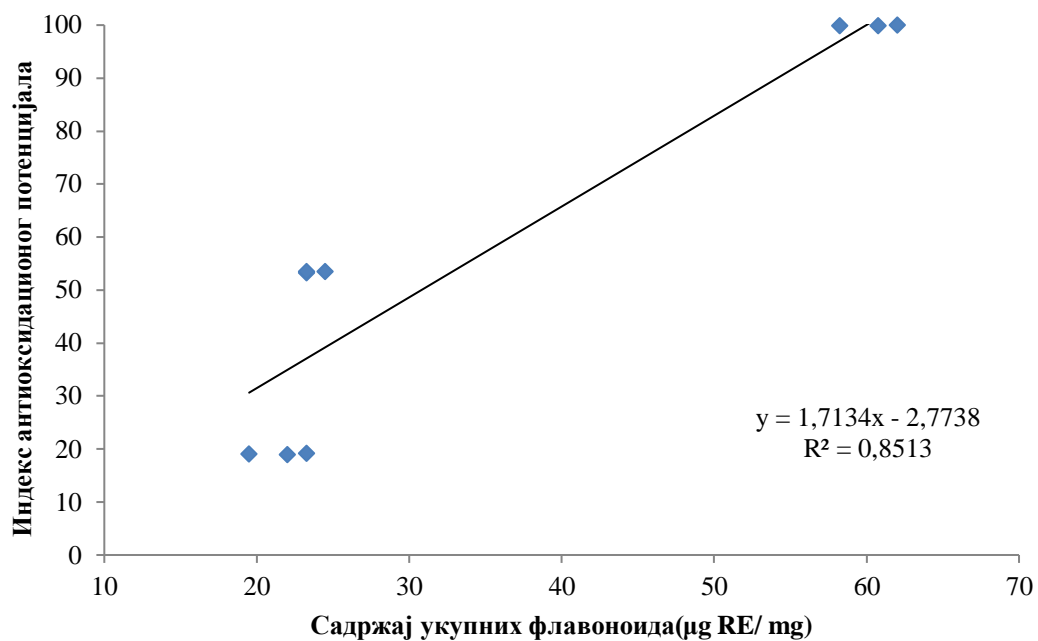


График 6. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен

4.5. Индекс антиоксидационог потенцијала екстраката луковица *C. purpurascens in vitro*

За водене, етанолне и ацетонске екстракте луковица *C. purpurascens* одређен је индекс антиоксидационог потенцијала. Вредности су добијене из резултата пет различитих, претходно поменутих, *in vitro* антиоксидационих тестова за сваки узорак.

Највећу вредност индекса антиоксидационог потенцијала имао је ацетонски екстракт луковица прикупљаних у јесен (100). Ниже вредности имали су етанолни екстракти луковица прикупљаних у пролеће (82,59) и јесен (73,62), као и ацетонски (72,64) и водени (71,74) екстракти луковица прикупљаних у пролеће. Најнижу вредност имао је водени екстракт луковица прикупљаних у јесен (61,00) (Табела 10).

Табела 10. Антиоксидациони потенцијал екстраката *C. purpurascens*

Екстракти	ABTS	DPPH	CUPRAC	FRAP	TRP	Индекс антиоксидационог потенцијала
1 СрР	82,70	42,69	69,41	63,88	100,00	71,74
2 СрР	100,00	100,00	100,00	100,00	12,95	82,59
3 СрР	96,33	98,84	85,05	77,00	5,96	72,64
1 СрЈ	66,55	65,10	67,44	53,80	52,10	61,00
2 СрЈ	66,92	88,81	60,59	57,51	94,27	73,62
3 СрЈ	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Однос индекса антиоксидационог потенцијала екстраката луковица *C. purpurascens* и укупних фенола

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће приказана је на Графику 7.

Утврђена је релативно слаба корелација посматраних вредности ($r^2=0,0676$; $r=0,26$).

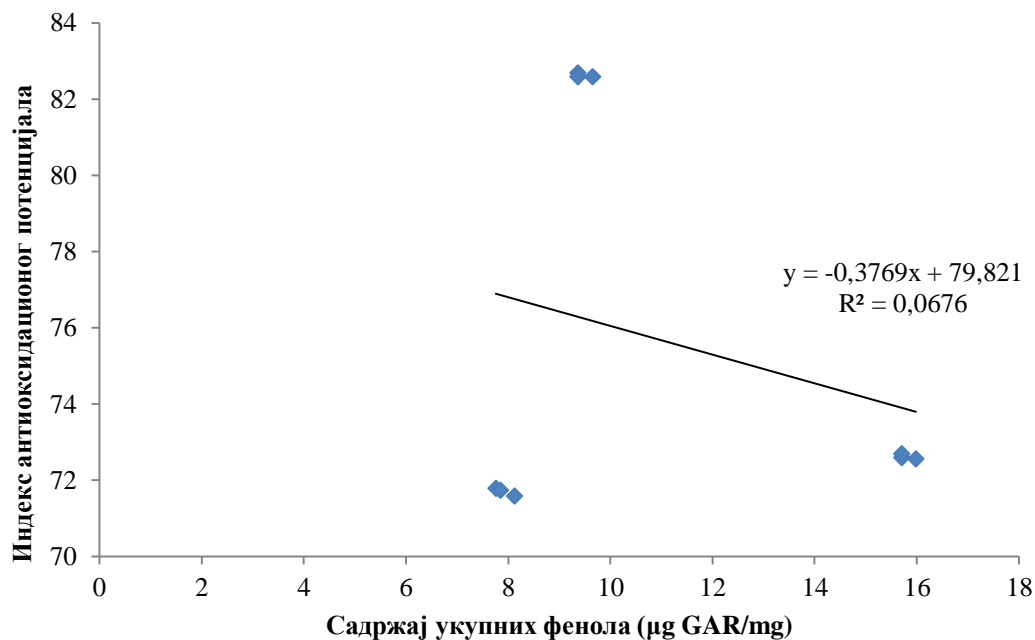


График 7. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C.purpurascens* прикупљаних у пролеће

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен приказана је на Графику 8.

Утврђена је јака позитивна корелација посматраних вредности ($r^2=0,9702$; $r=0,98$).

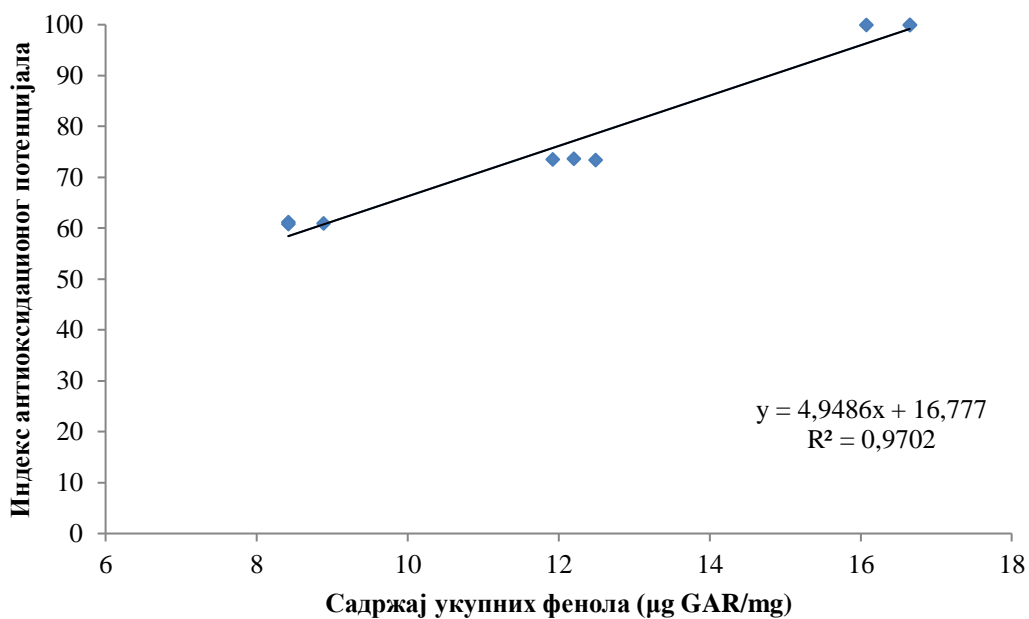


График 8. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних фенола екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката *C. purpurascens*

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће приказана је на Графику 9.

Утврђена је јака позитивна корелација посматраних вредности ($r^2=0,8419$; $r=0,92$).

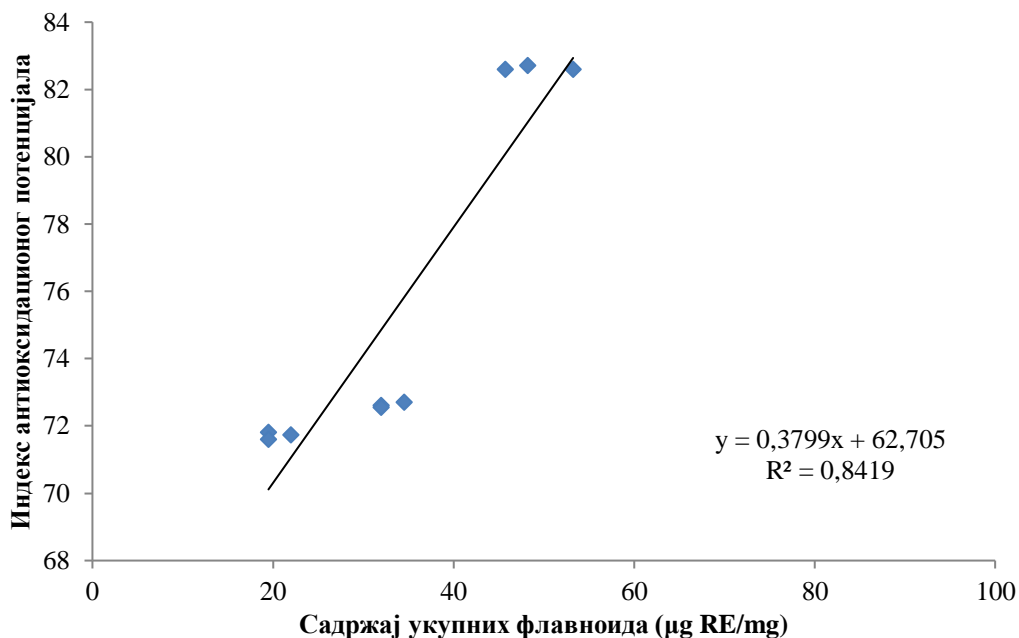


График 9. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће

Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен приказана је на Графику 10.

Утврђена је јака позитивна корелација посматраних вредности ($r^2=0,9428$; $r=0,97$).

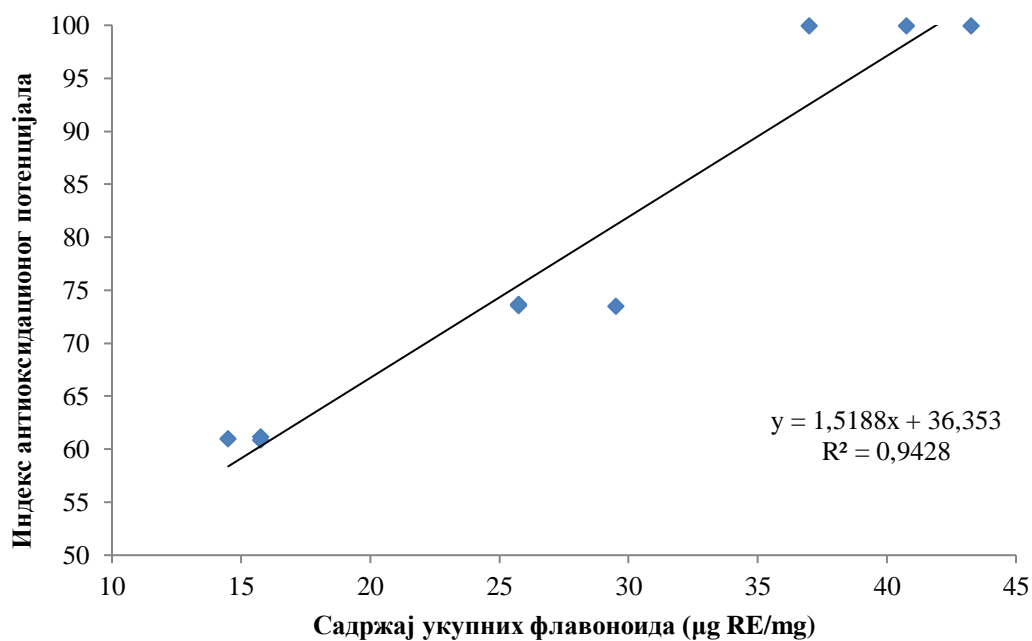


График 10. Однос индекса антиоксидационог потенцијала и укупних флавоноида екстраката луковица *C.purpurascens* прикупљаних у јесен

Однос укупних фенола и флавоноида екстраката *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, зависно од времена прикупљања биљног материјала

Однос укупних фенола у екстрактима луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и јесен, приказана је на Графику 11. Утврђена је јака позитивна корелација између посматраних вредности ($r^2=0,757$; $r=0,870$).

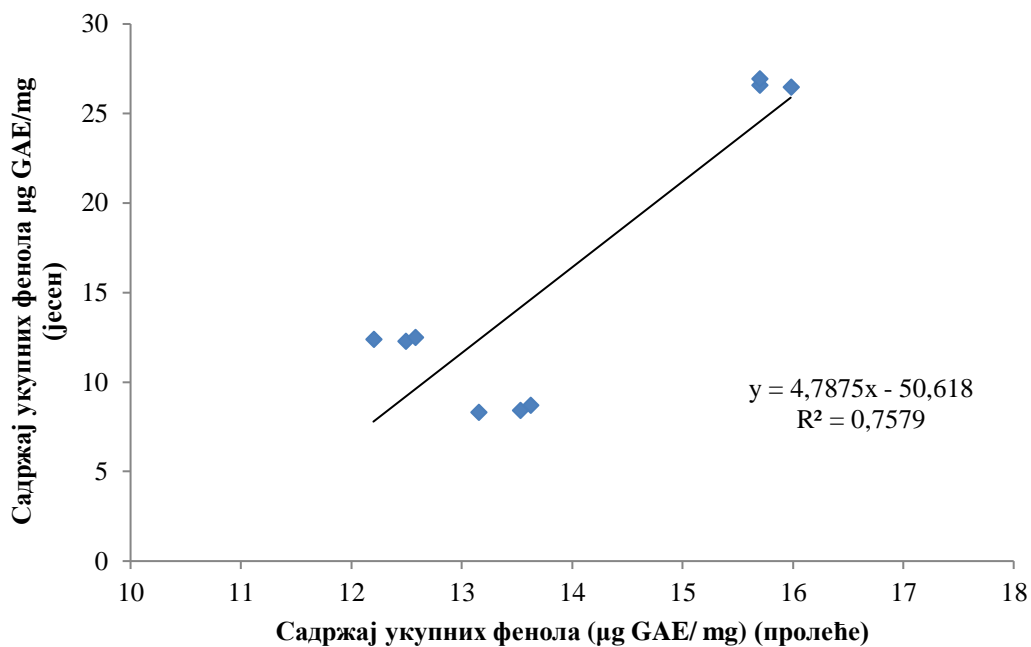


График 11. Однос укупних фенола у екстрактима луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и јесен

Однос укупних флавоноида у екстрактима луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и јесен, приказана је на Графику 12. Утврђена је релативно слаба корелација посматраних вредности ($r^2=0,233$; $r=0,483$).

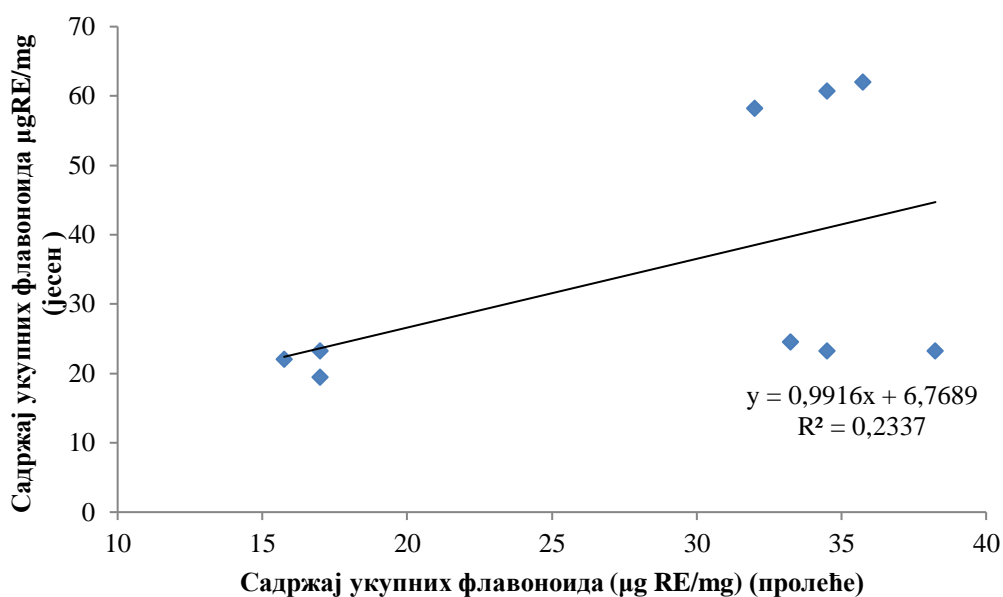


График 12. Однос укупних флавоноида у екстрактима луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и јесен

Однос укупних фенола у екстрактима луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и јесен, приказана је на Графику 13. Утврђена је јака корелација посматраних вредности ($r^2=0,909$; $r=0,953$).

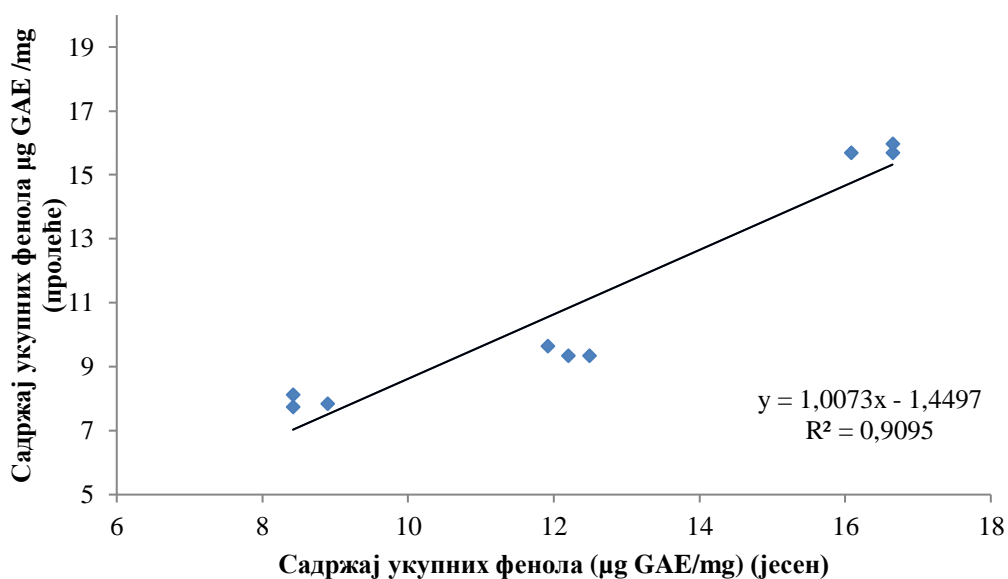


График 13. Однос укупних фенола у екстрактима луковица *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће и јесен

Однос укупних флавоноида у екстрактима луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и јесен, приказана је на Графику 14. Утврђена је релативно слаба корелација посматраних вредности ($r^2=0,153$ $r=0,391$).

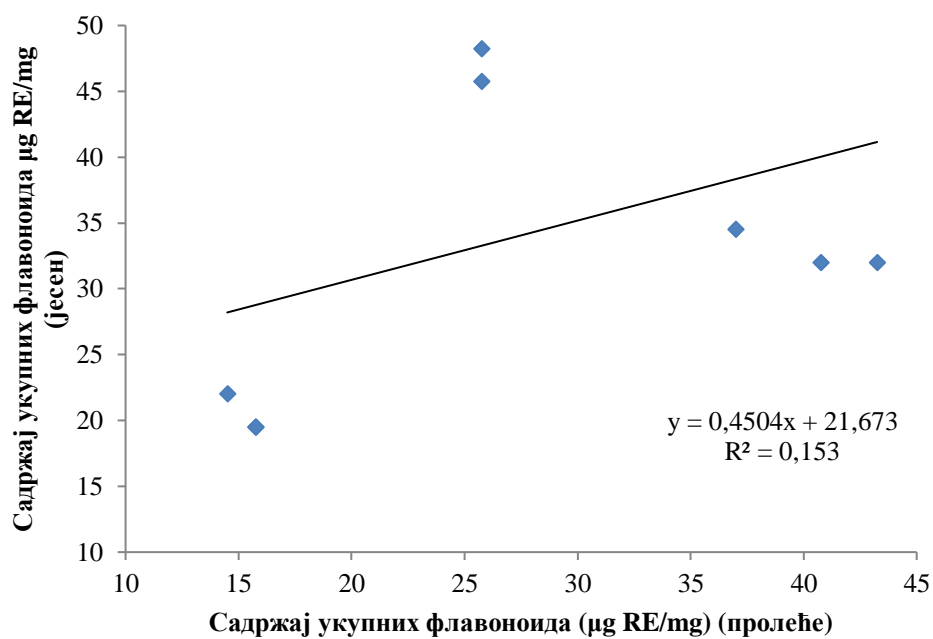


График 14. Однос укупних флавоноида у екстрактима луковица *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће и јесен

4.6. Антимикробна активност екстраката луковица *C.hederifolium* и *C.purpurascens*

Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, прикупљаних у пролеће и јесен, дати су у Табели 11. Доксициклин и нистатин су употребљени као стандардне позитивне контроле, а DMSO као стандардна негативна контрола. Резултати су приказани као минимална инхибиторна концентрација (МИК), минимална бактерицидна (МБК) и минимална фунгицидна концентрација (МФК). Антимикробни потенцијал зависио је од испитиваног микроорганизма, биљне врсте и типа екстракта.

Резултати МИК и МБК су били у опсегу од 3,13 mg/ml до 100,00 mg/ml. Највећу антимикробну активност екстракти су остварили на сојевима *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* и *S. aureus*. Међу испитиваним Грам (-) бактеријским сојевима, *E. aerogenes* је показала сензитивност ка највећем броју екстраката – воденом екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће, воденом екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен и воденом екстракту луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће. *P. aeruginosa* је показала сензитивност ка воденом екстракту луковица *C.hederifolium* прикупљаних у пролеће. Од Грам (+) бактерија, *S. aureus* је показала највећу осетљивост ка ацетонском екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен.

Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* показали су бољу антимикробну активност ка испитиваним сојевима у односу на екстракте луковица *C. purpurascens*. Значајнија антибактеријска активност врсте *C. purpurascens* забележена је у случају деловања воденог екстракта луковица прикупљаних у пролеће на *E. aerogenes* (МИК 3,13 mg/ml; МБК 6,25 mg/ml).

Антифунгални потенцијал водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испитиван је на гљивици *Candida albicans*. Резултати су дати у Табели 11. МИК вредности испитиваних екстраката су биле у опсегу 3,13-25 mg/ml, а МФК вредности 6,25-50 mg/ml. Највећи антифунгални потенцијал имали су водени екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен (МИК 3,13 mg/ml; МФК 6,25 mg/ml), водени екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће (МИК 6,25 mg/ml; МФК 6,25 mg/ml) и водени екстракт луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће (МИК 6,25 mg/ml; МФК 6,25 mg/ml).

Резултати антимикробне активности контрола, нистатина и доксициклина, изражени су у $\mu\text{g/ml}$. Вредности антибактеријског ефекта доксициклина биле су МИК 7,31-15,46 $\mu\text{g/ml}$ и МБК 15,46 $\mu\text{g/ml}$. Вредности антифунгалног ефекта нистатина биле су МИК 7,31 $\mu\text{g/ml}$ и МФК 15,46 $\mu\text{g/ml}$.

Табела 11. Антимикробна активност екстракта луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Сојеви	Екстракти – МИК/МБК (mg/ml)												Контроле (µg/ml)	
	1 ChP	2 ChP	3 ChP	1 ChJ	2 ChJ	3 ChJ	1 CpP	2 CpP	3 CpP	1 CpP	2 CpP	3 CpP	DMSO %	Доксициклин МИК/МБК
<i>S. enteritidis</i>	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	15,46/15,46
<i>E. coli</i>	25,0/ /50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	15,46/15,46
<i>P. aeruginosa</i>	6,25/ 6,25	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 100,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	12,5/ 12,5	7,31/15,46
<i>P. mirabilis</i>	50,0/ 50,0	25,0/ 50,0	50,0/ 50,0	12,5/ 100,0	25,0/ 50,0	50,0/ 50,0	50,0/ 100,0	25,0/ 50,0	50,0/ 100,0	50,0/ 50,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	15,46/15,46
<i>K. pneumoniae</i>	50,0/ 50,0	25,0/ 50,0	50,0/ 50,0	50,0/ 100,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	50,0/ 100,0	25,0/ 50,0	100,0/ 100,0	25,0/ 100,0	50,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	15,46/15,46
<i>E. aerogenes</i>	3,13/ 50,0	12,5/ 25,0	12,5/ 100,0	6,25/ 6,25	6,25/ 25,0	12,5/ 50,0	3,13/ 6,25	12,5/ 25,0	12,5/ 100,0	25,0/ 50,0	12,5/ 50,0	12,5/ 25,0	12,5/ 12,5	7,31/15,46
Грам (+)														
<i>B. cereus</i>	25,0/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	12,5/ 12,5	15,46/15,46
<i>S. aureus</i>	12,5/ 25,0	12,5/ 25,0	25,0/ 25,0	100,0/ 100,0	12,5/ 25,0	3,13/ 3,13	12,5/ 25,0	6,25/ 12,50	25,0/ 25,0	25,0/ 50,0	6,25/ 12,50	25,0/ 25,0	12,5/ 12,5	7,31/15,46
<i>E. faecalis</i>	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	12,5/ 25,0	12,5/ 25,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	50,0/ 100,0	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	15,46/15,46
Гљивица														Нистатин МИК/МФК
<i>C. albicans</i>	6,25/ 6,25	6,25/ 12,5	12,5/ 25,0	3,13/ 6,25	6,25/ 12,5	12,5/ 25,0	6,25/ 6,25	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	6,25/ 12,5	25,0/ 50,0	25,0/ 50,0	12,5/ 12,5	7,31/15,46

4.7. Антитуморска активност екстраката луковица *C.hederifolium* и *C.purpurascens*

МТТ тест је спроведен у циљу *in vitro* испитивања цитотоксичне активности екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* на вијабилност хуманих ћелија карцинома грлића материце (HeLa), хуманих ћелија карцинома колоне (HCT-116) и хуманих ћелија карцинома плућа (A549). Резултати су приказани на Графицима 15-26. Као контрола коришћена је цисплатина.

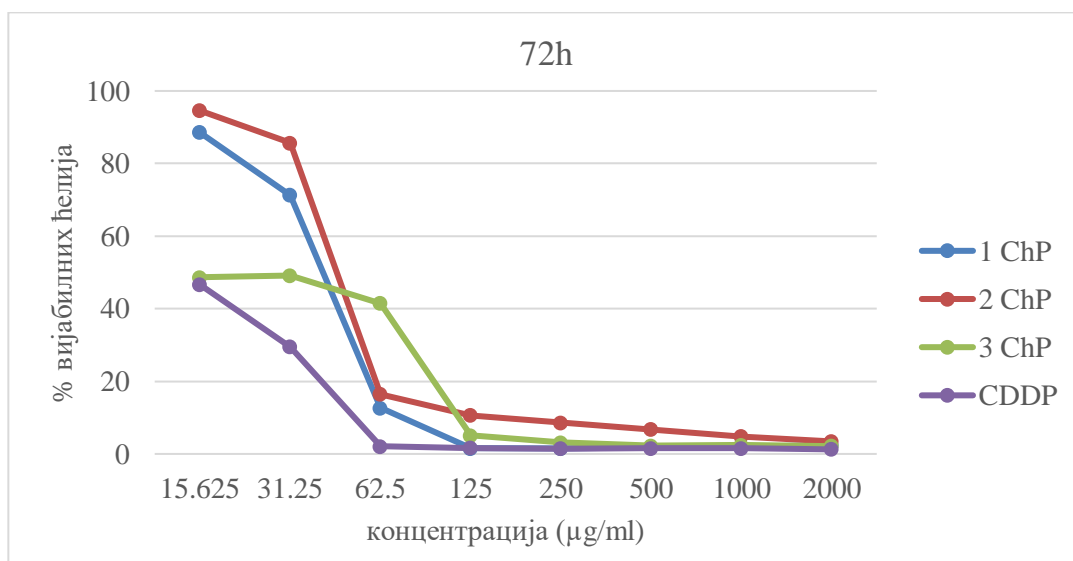
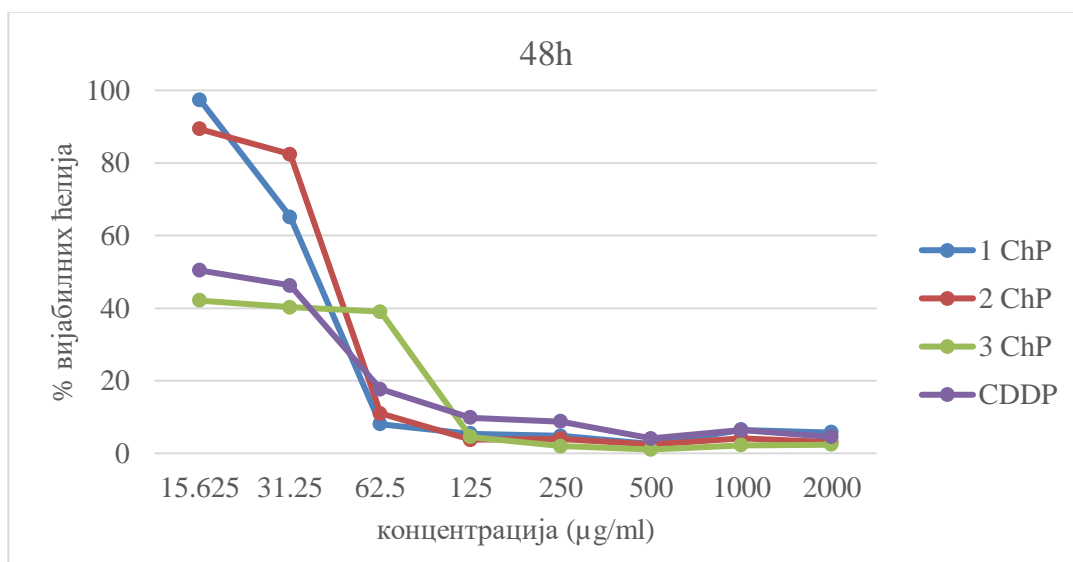
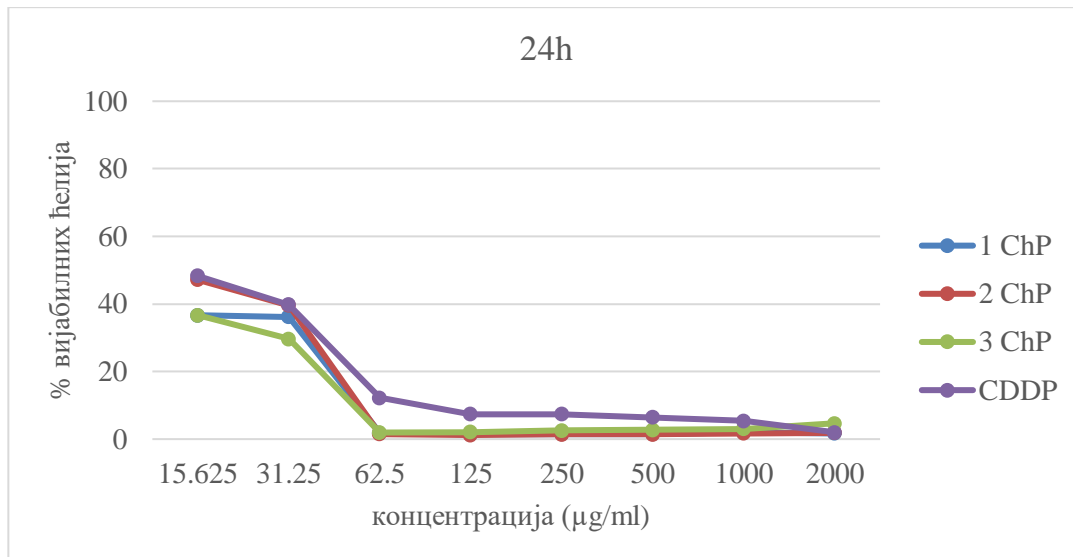


График 15. *In vitro* цитотоксичност екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће према хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), после 24, 48 и 72h инкубације

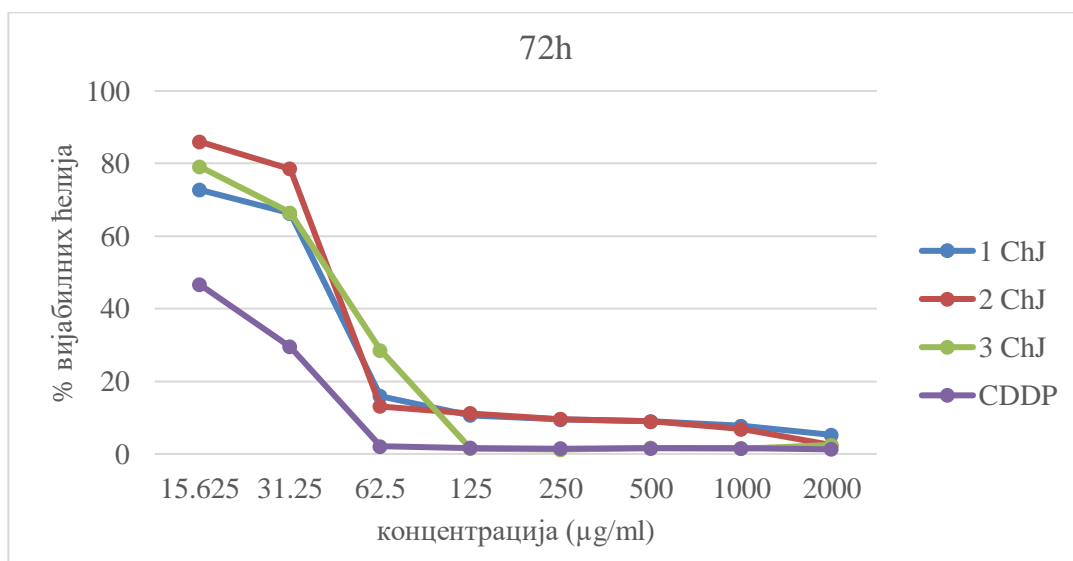
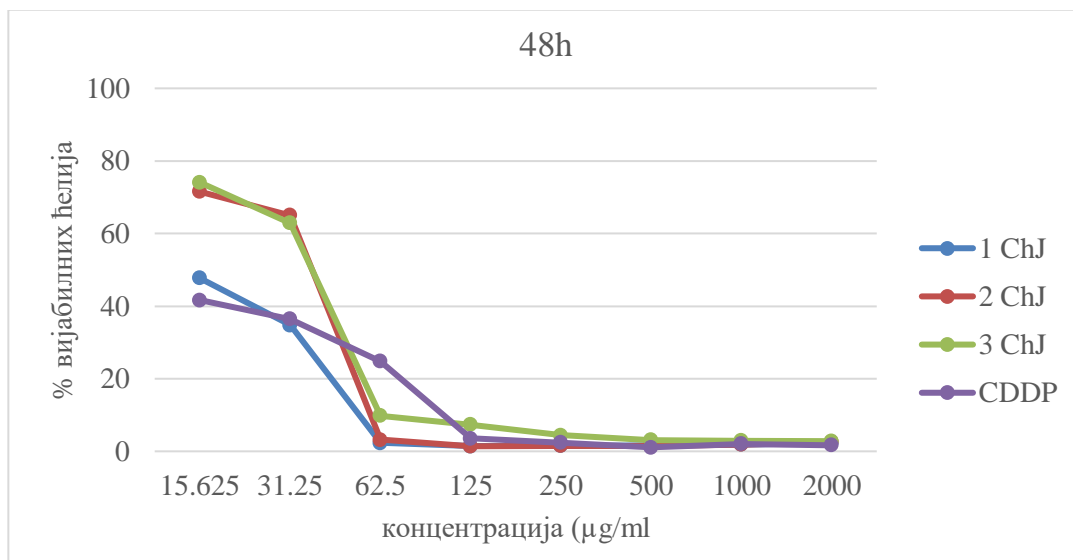
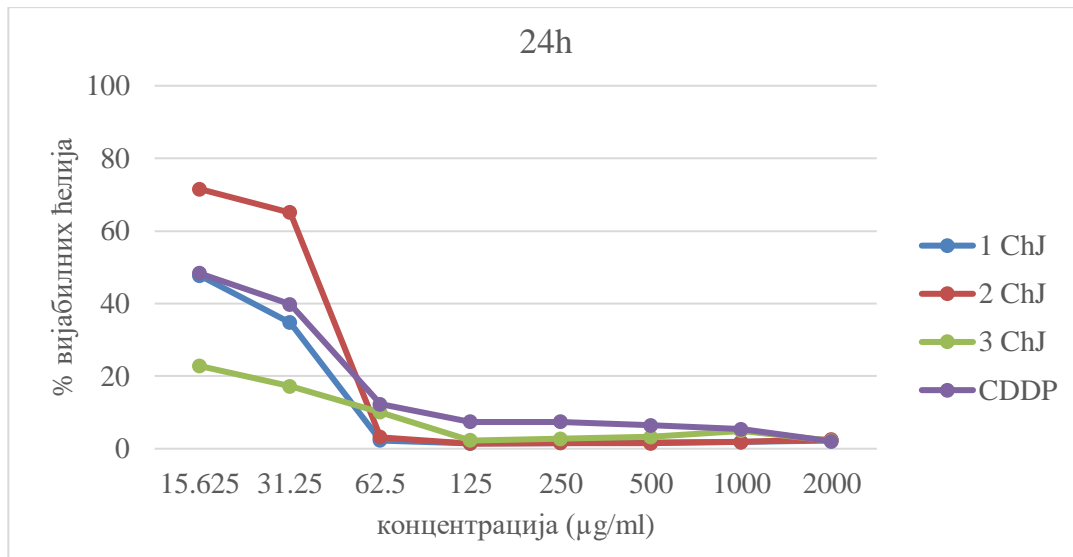


График 16. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен према хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), после 24, 48 и 72h инкубације

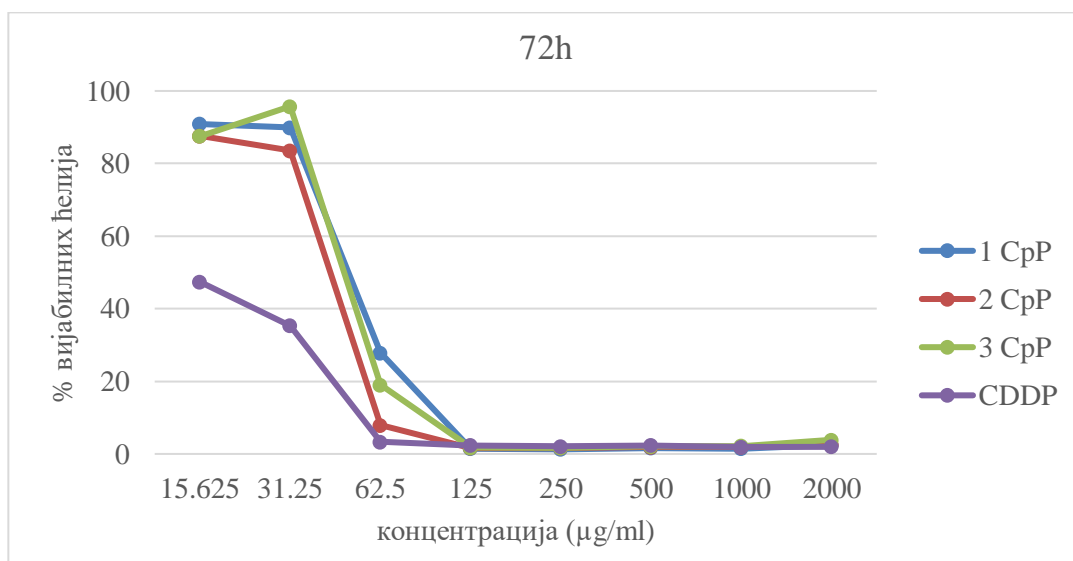
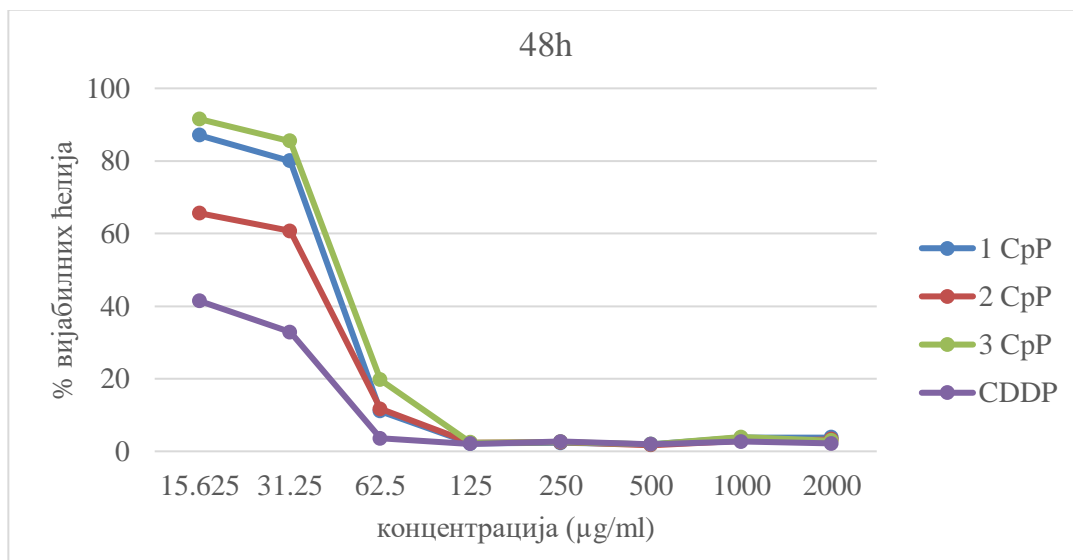
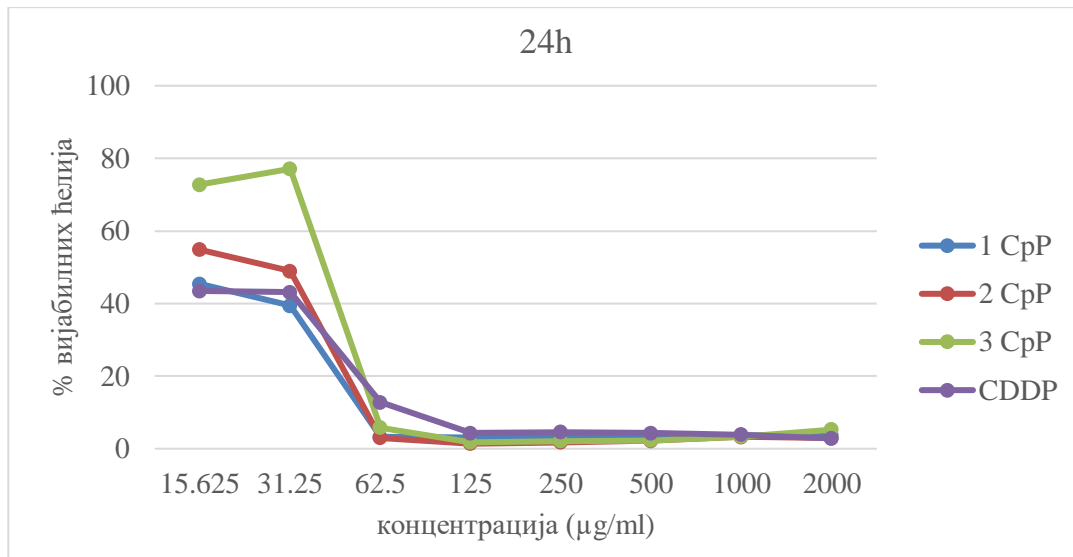


График 17. *In vitro* цитотоксичност екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће према хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), после 24, 48 и 72h инкубације

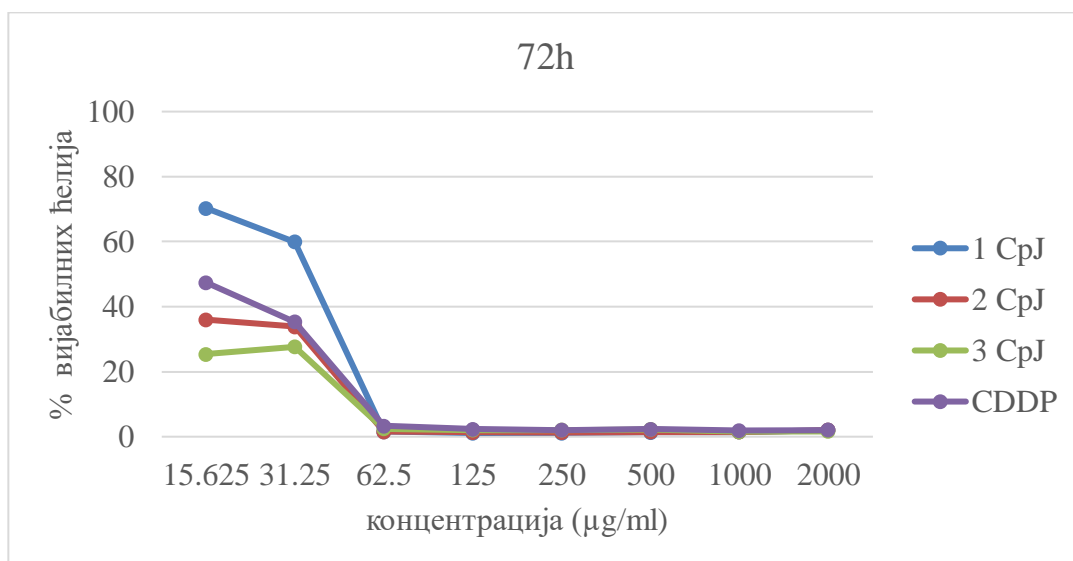
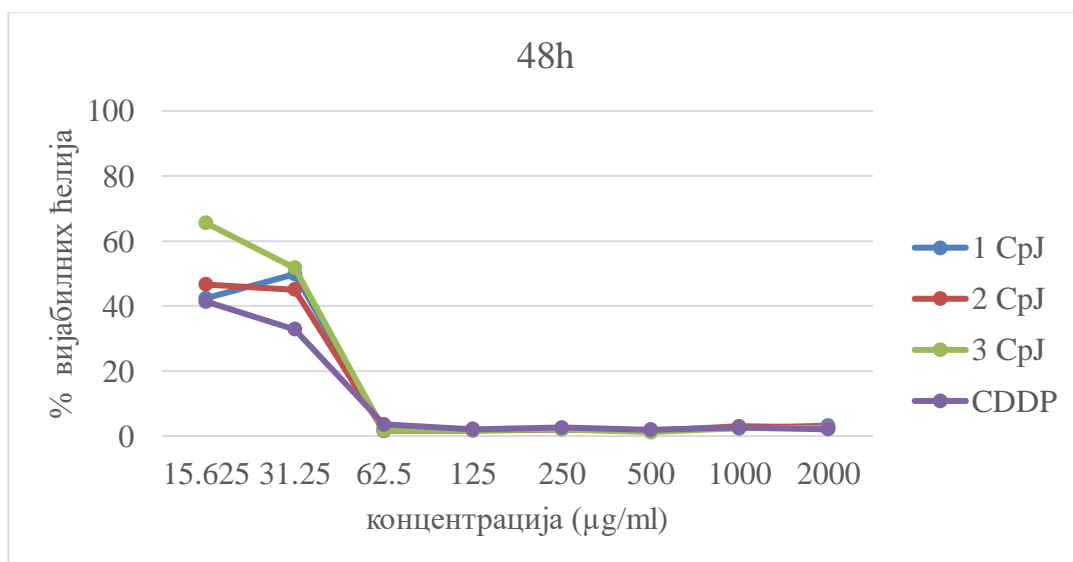
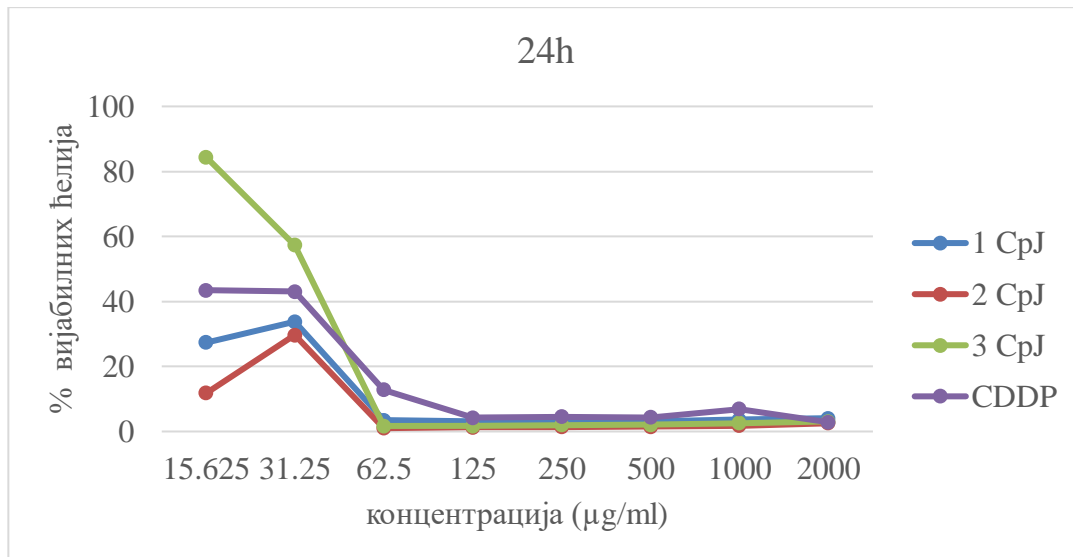


График 18. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен према хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), после 24, 48 и 72h инкубације

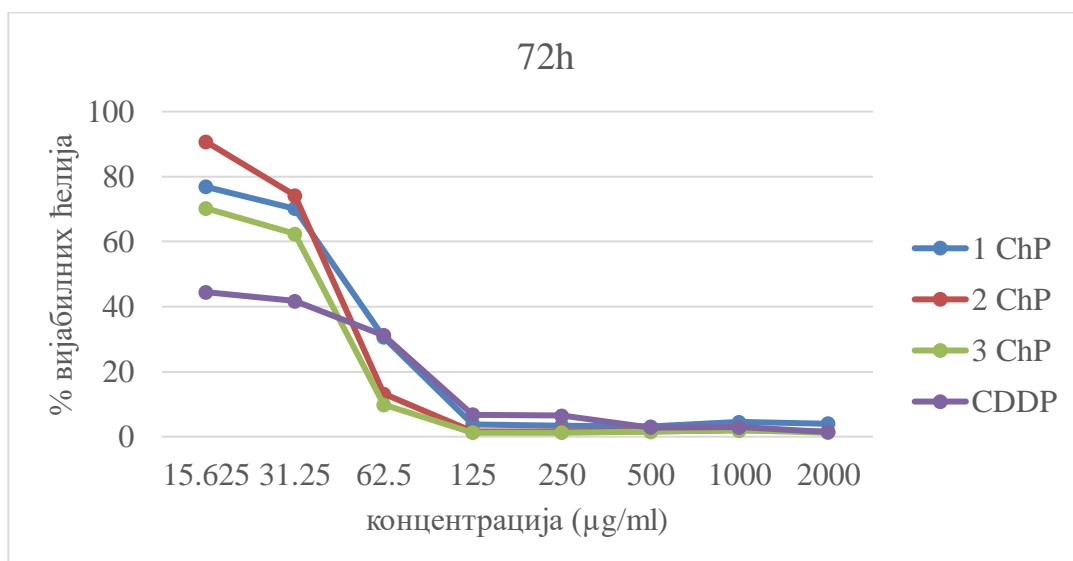
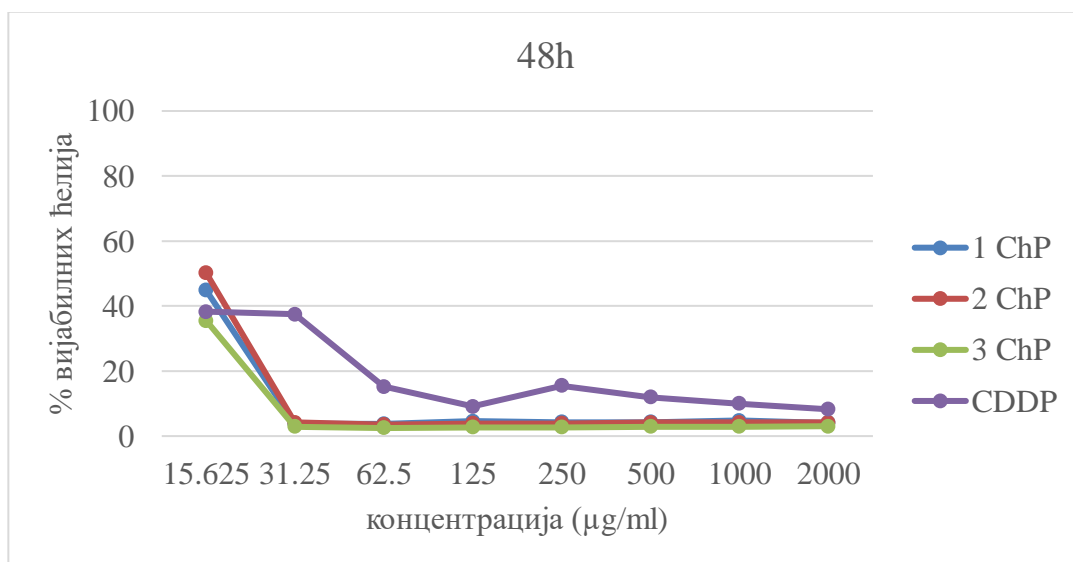
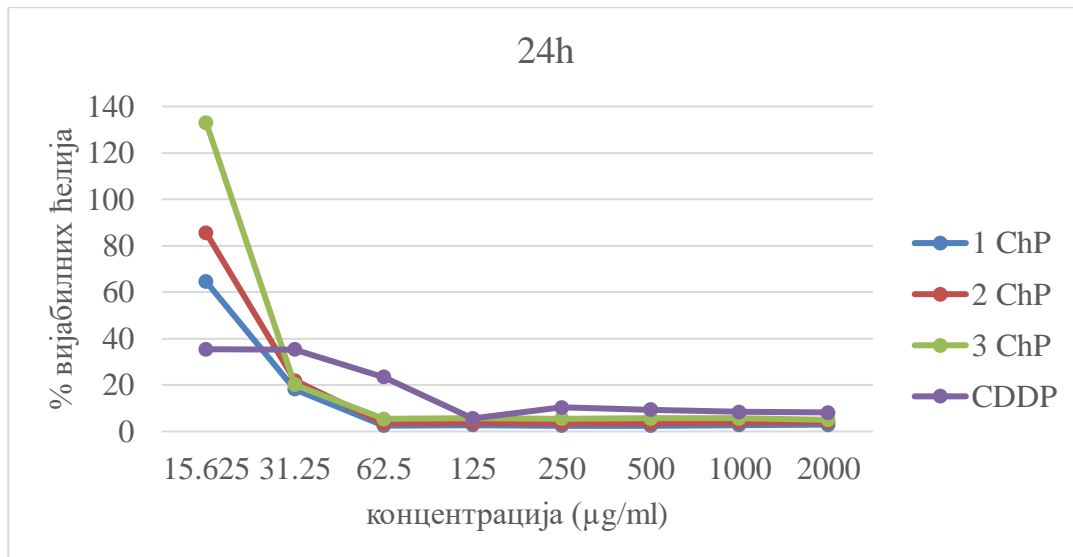


График 19. *In vitro* цитотоксичност екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће према хуманим ћелијама карцинома плућа (A549), после 24, 48 и 72h инкубације

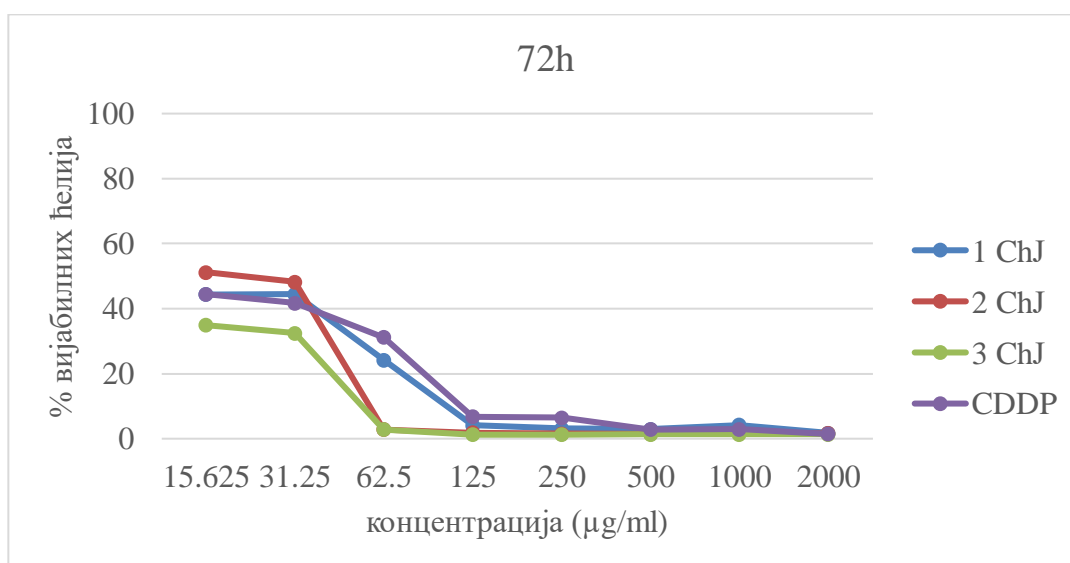
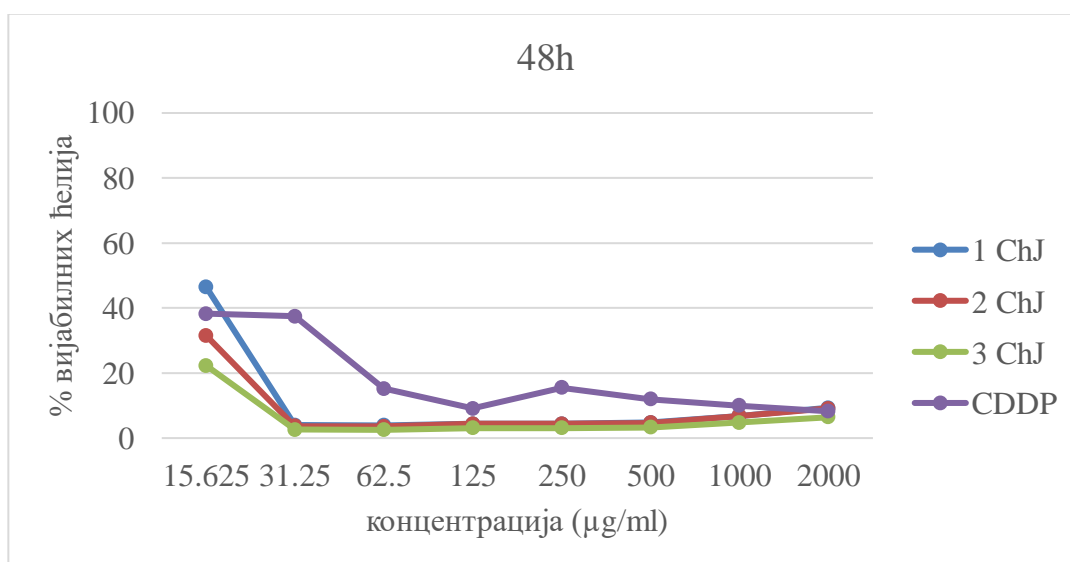
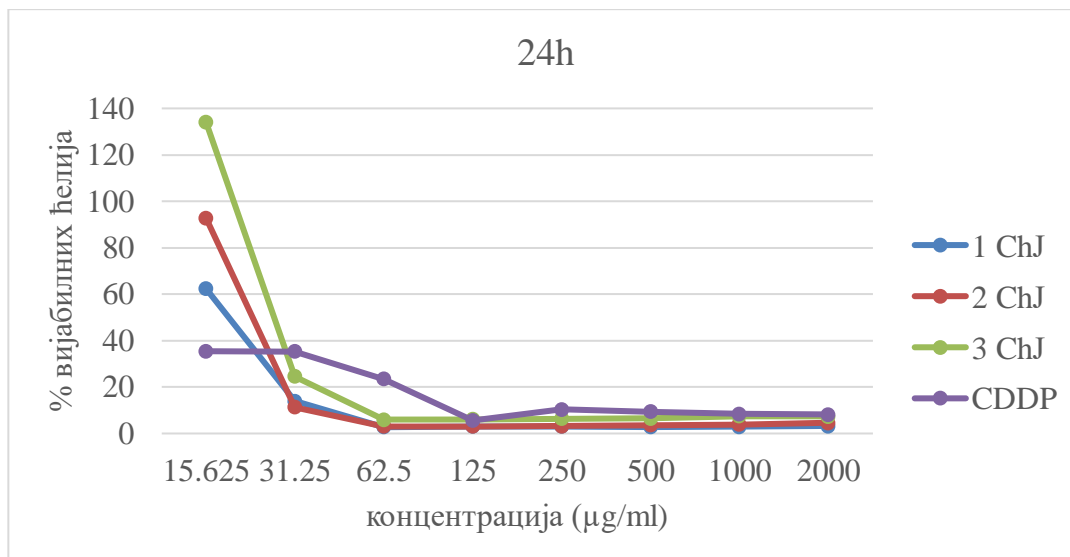


График 20. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен према према хуманим ћелијама карцинома плућа (A549), после 24, 48 и 72h инкубације

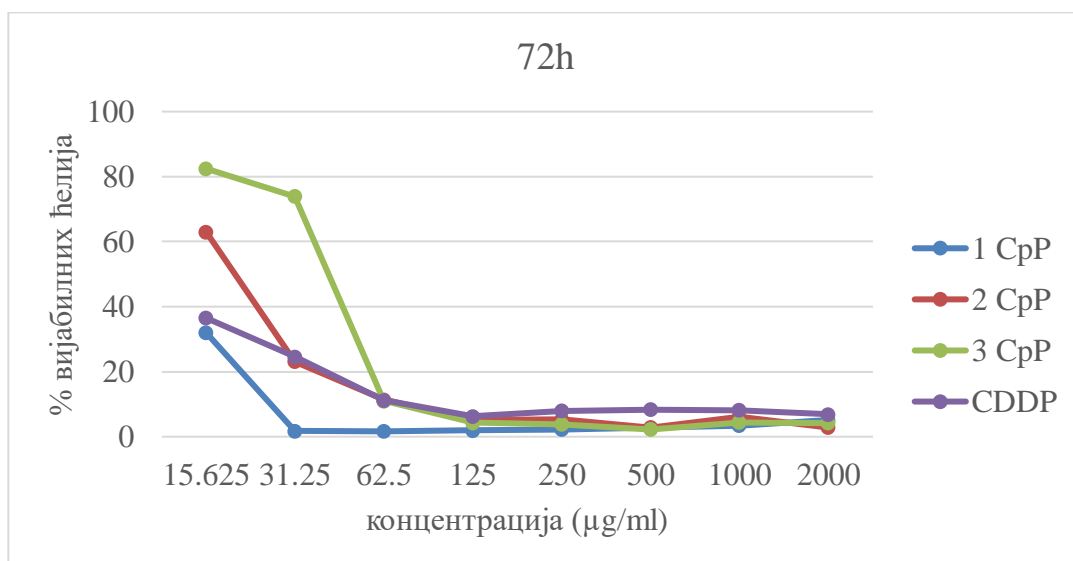
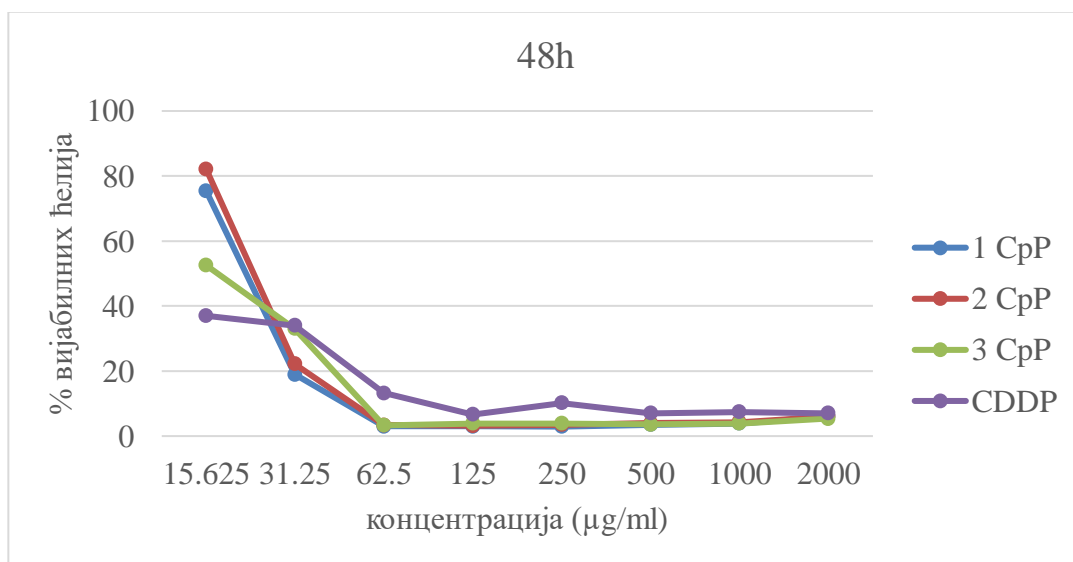
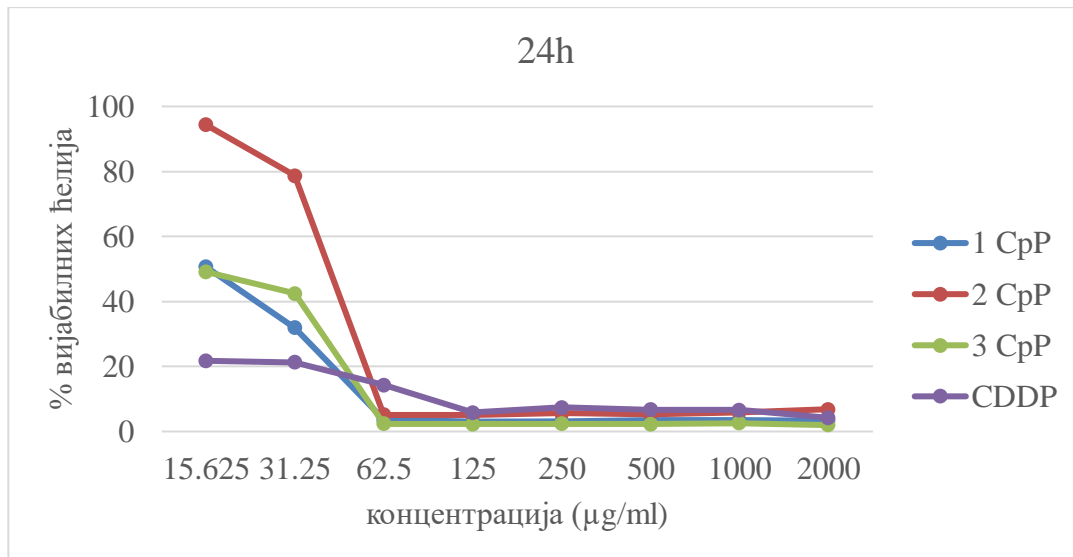


График 21. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *S. purpurascens* прикупљаних у пролеће према према хуманим ћелијама карцинома плућа (A549), после 24, 48 и 72h инкубације

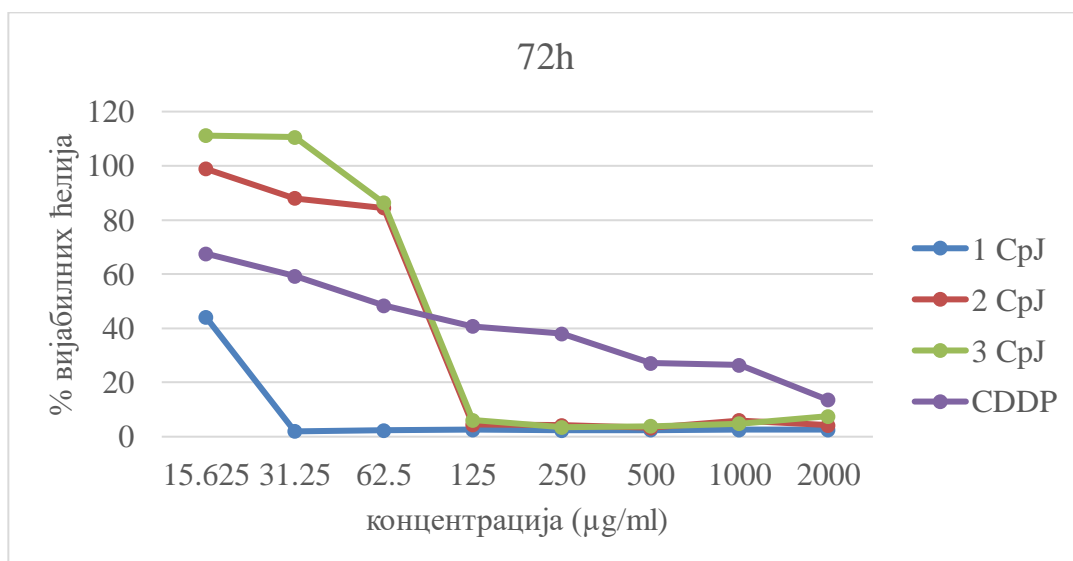
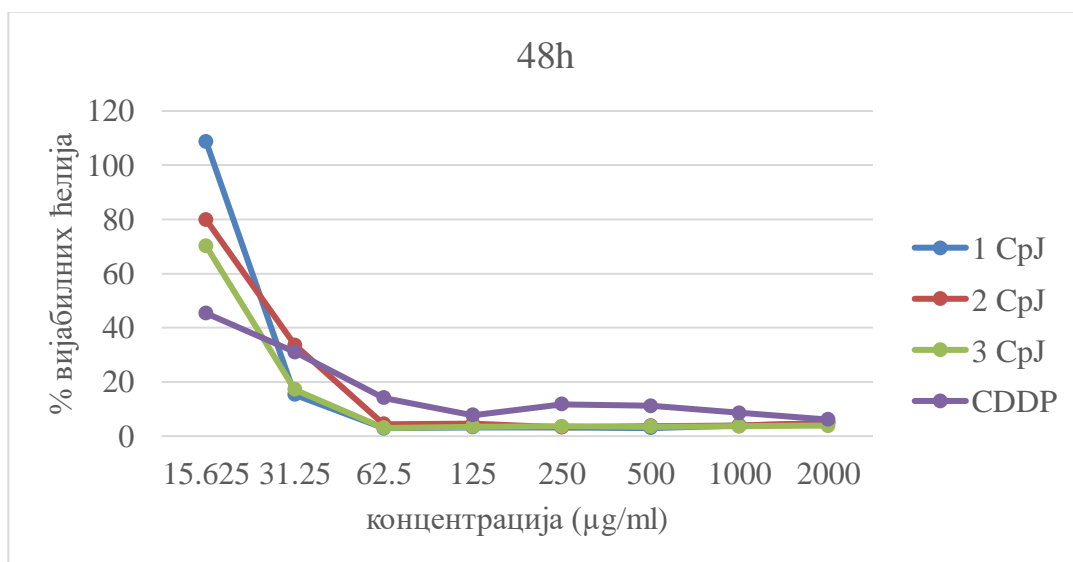
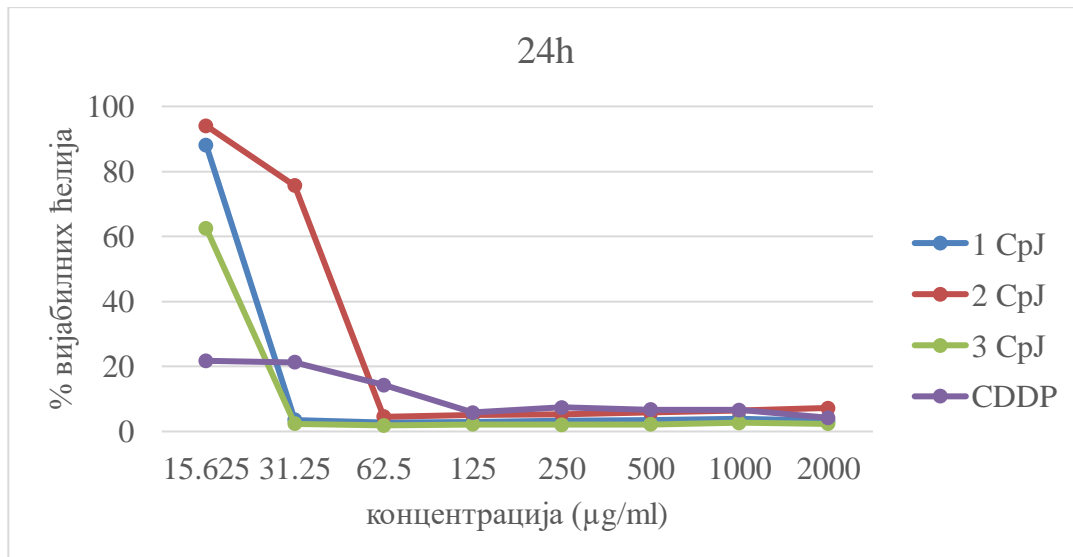


График 22. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *S. purpurascens* прикупљаних у јесен према према хуманим ћелијама карцинома плућа (A549), после 24, 48 и 72h инкубације

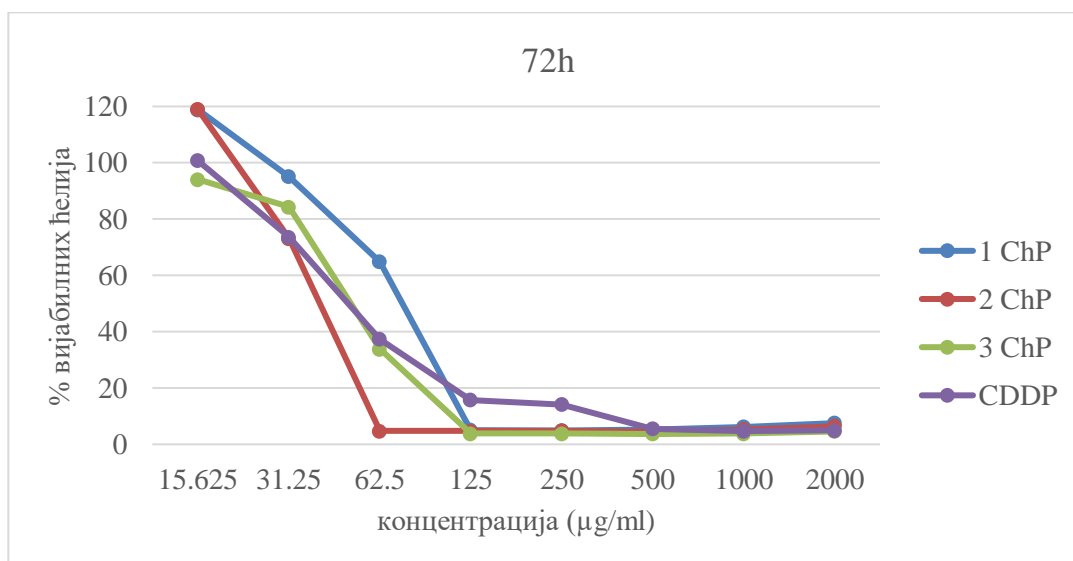
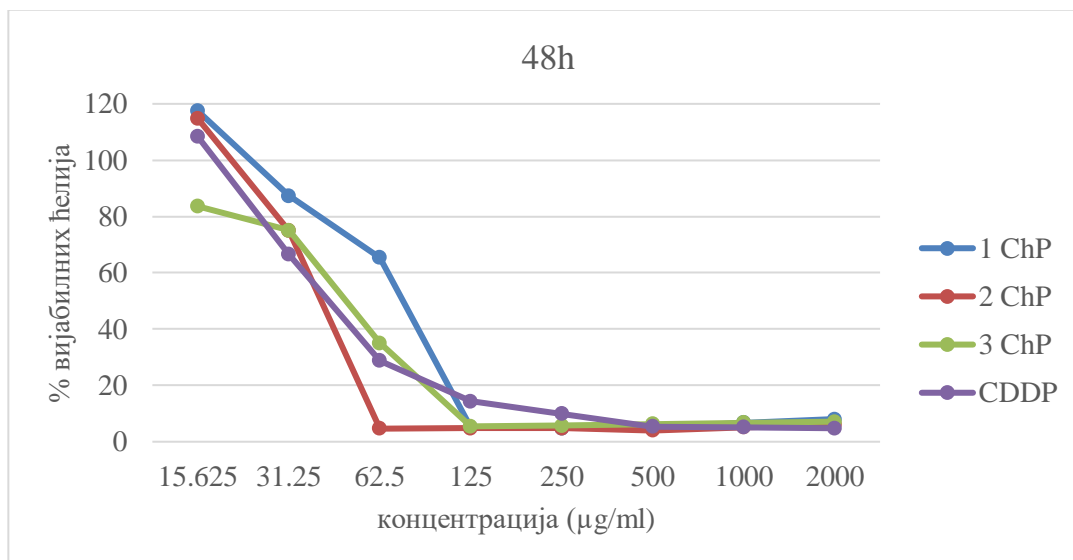
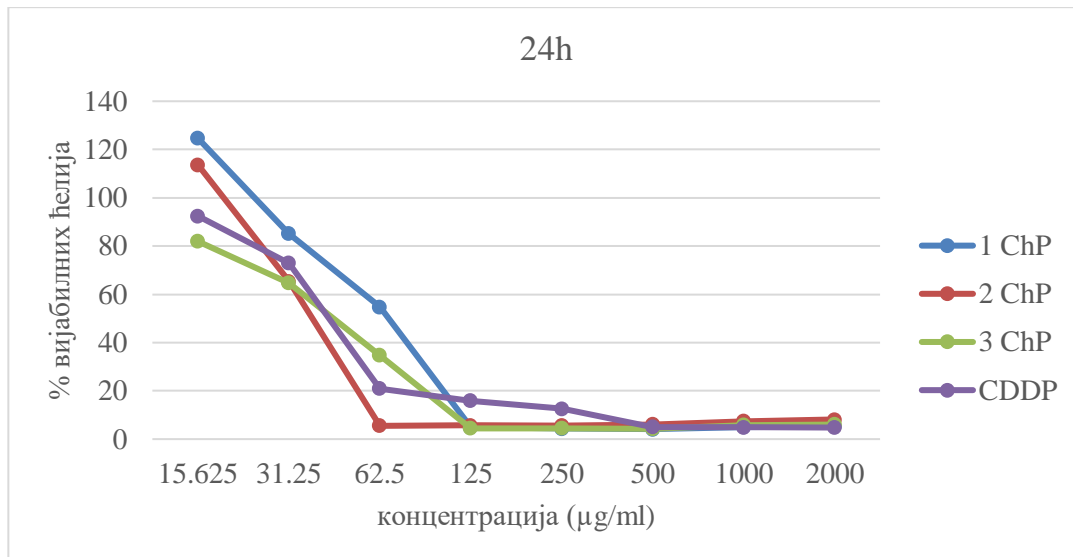


График 23. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће према хуманим ћелијама карцинома колона (НСТ-116), после 24, 48 и 72h инкубације

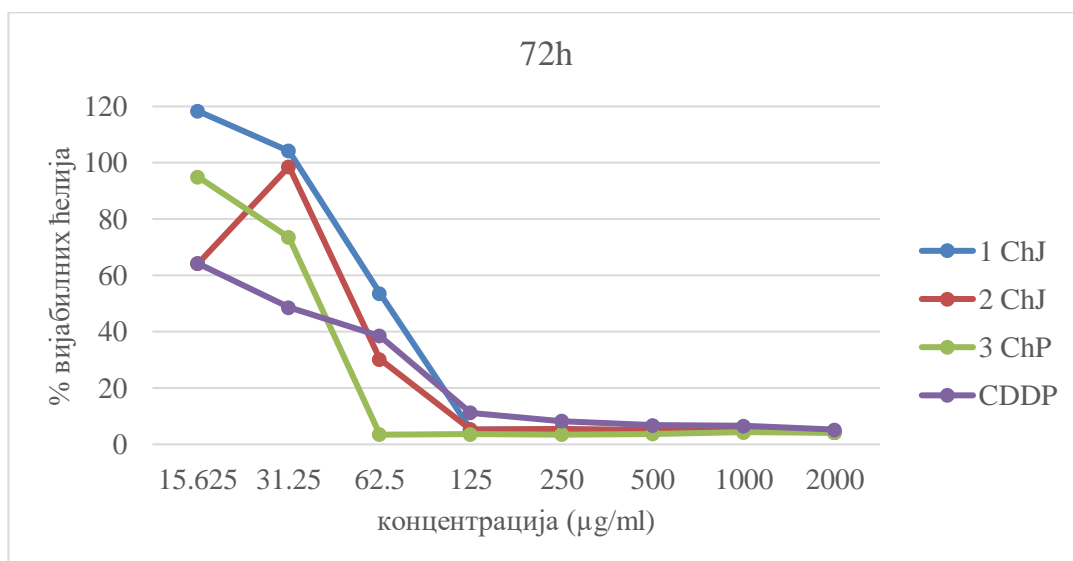
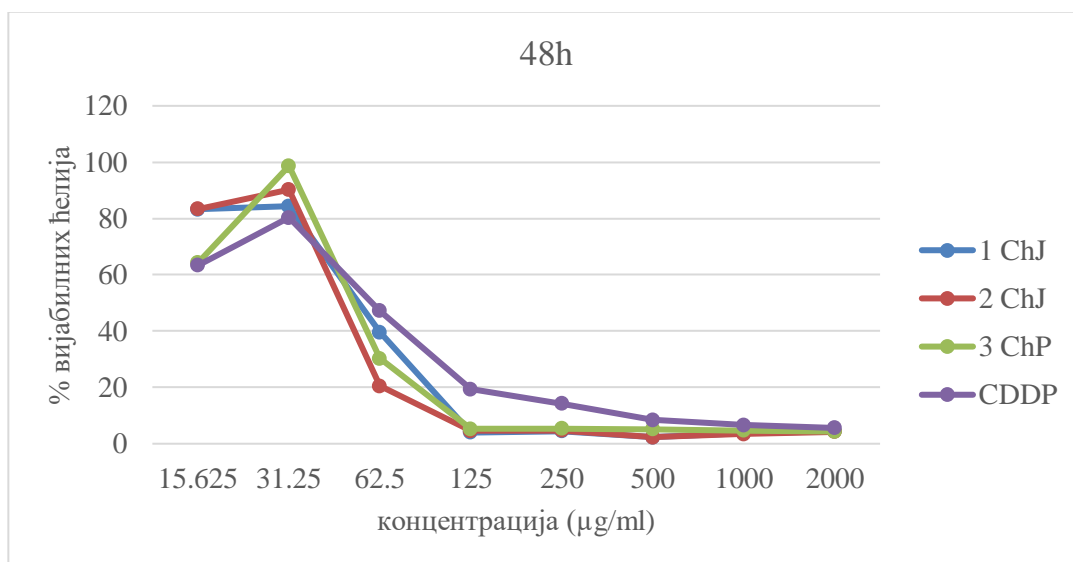
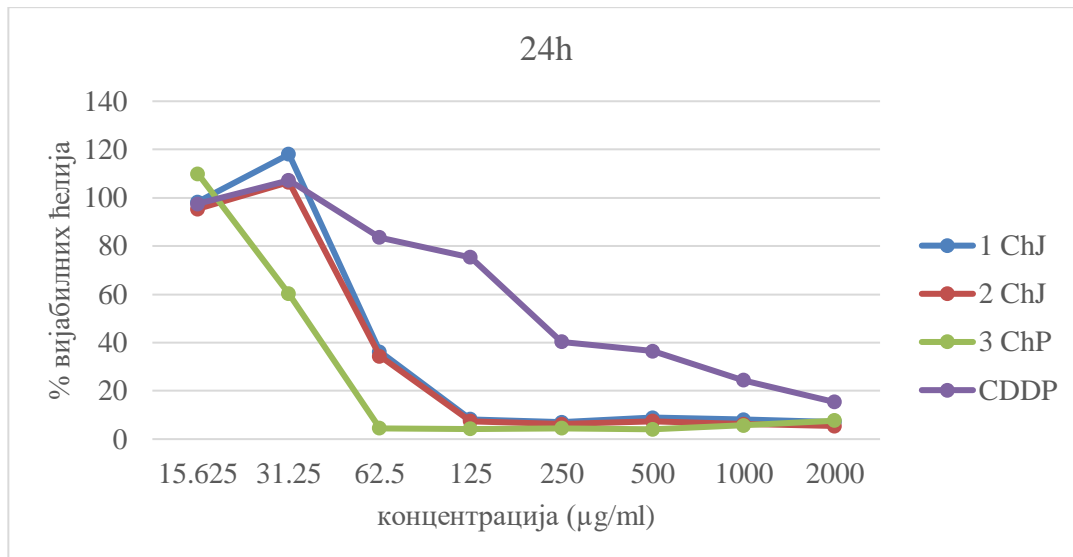


График 24. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен према хуманим ћелијама карцинома колона (НСТ-116), после 24, 48 и 72h инкубације

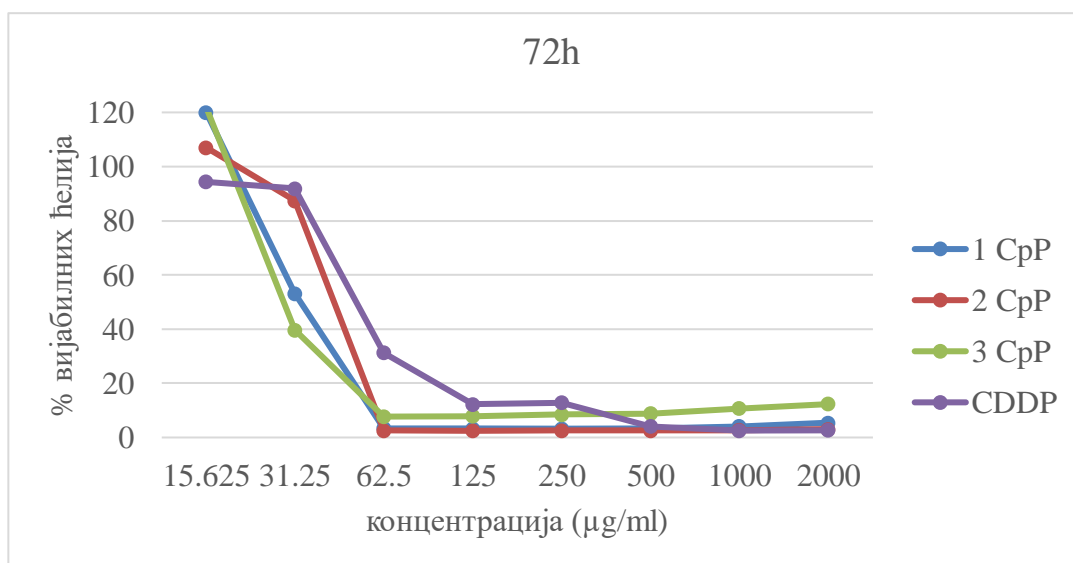
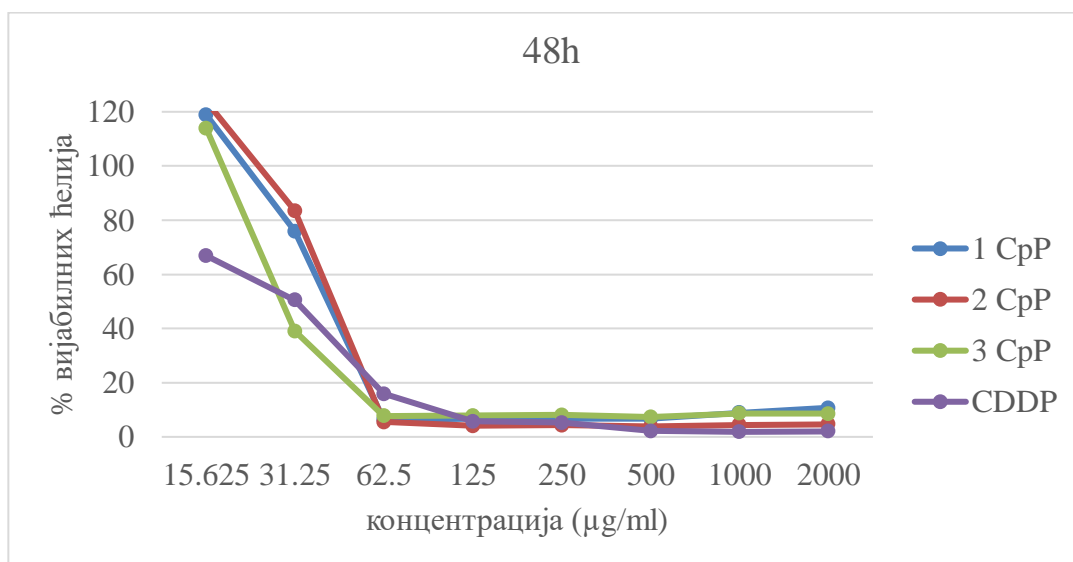
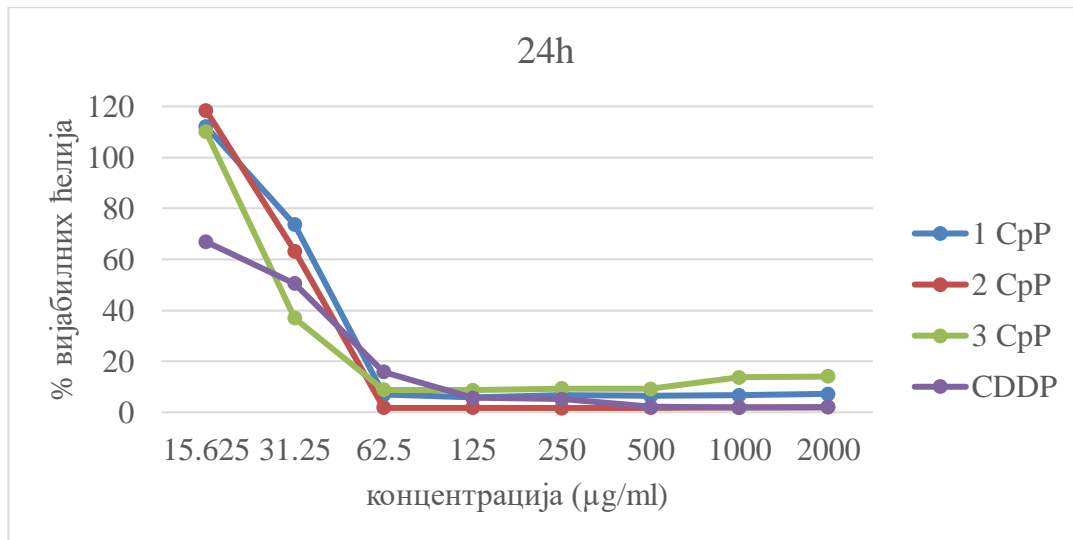


График 25. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *S. purpurascens* прикупљаних у пролеће према хуманим ћелијама карцинома колона (HCT-116), после 24, 48 и 72h инкубације

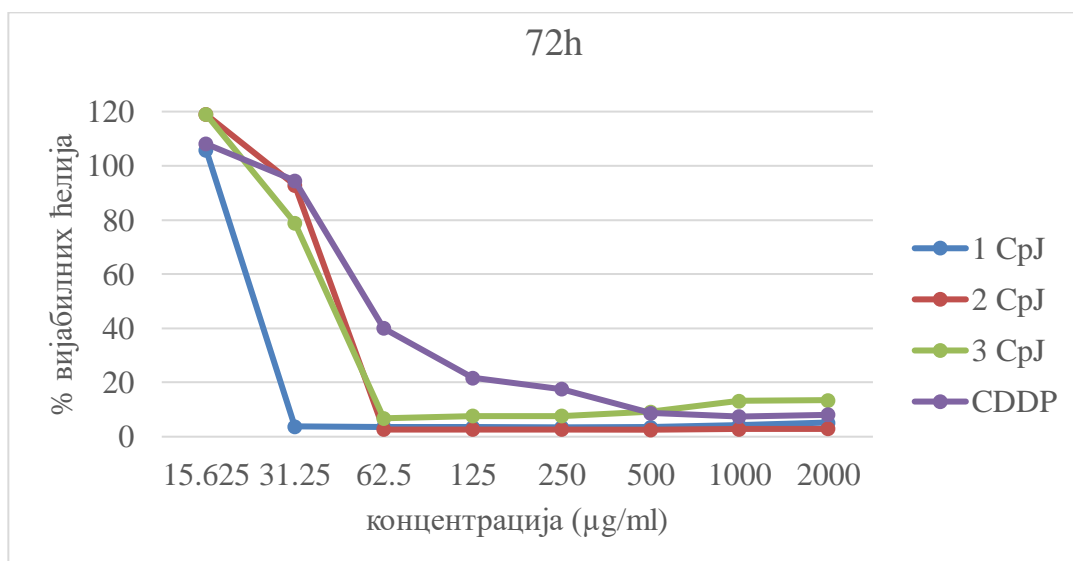
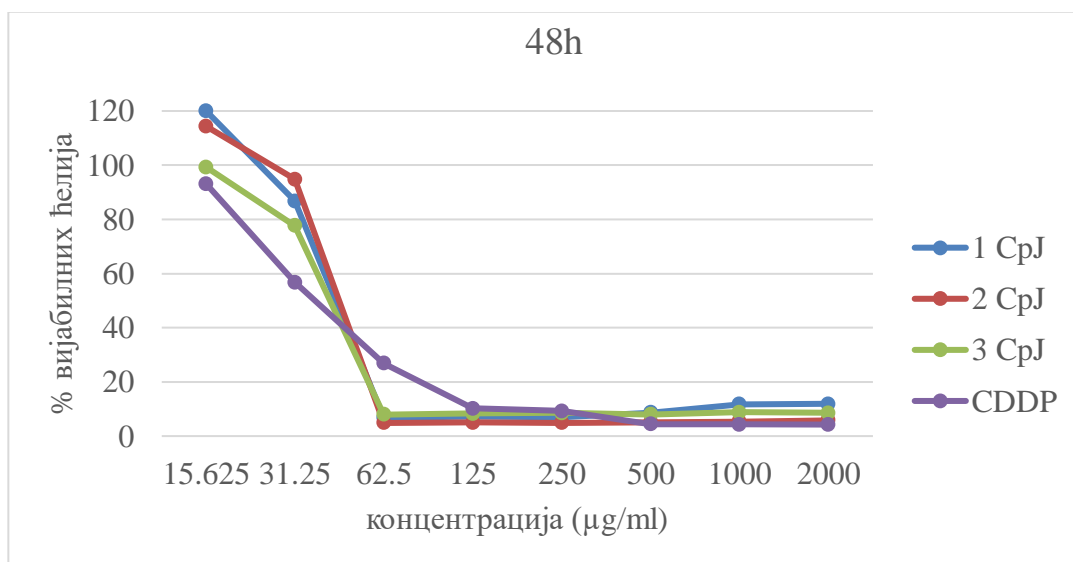
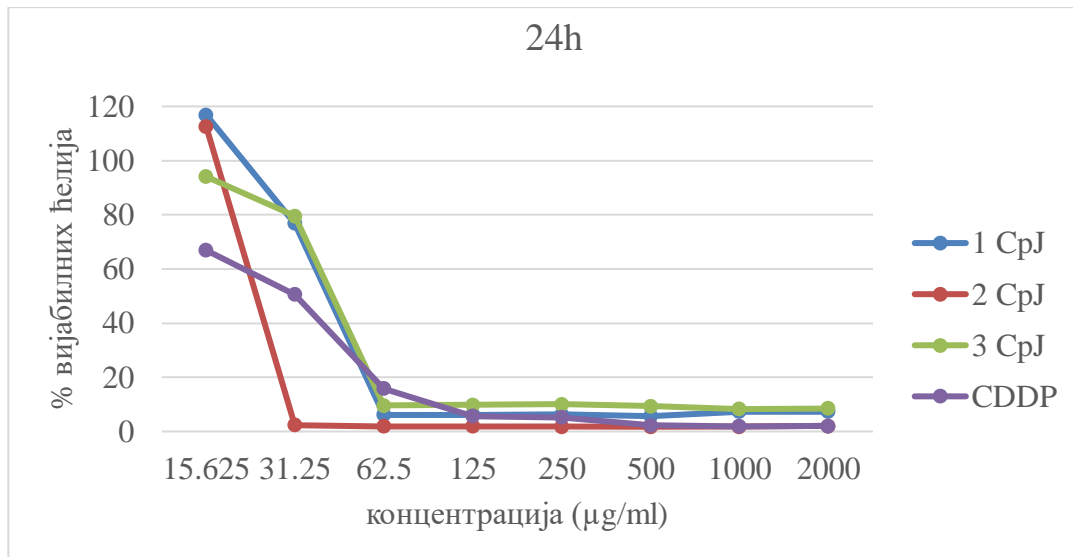


График 26. *In vitro* цитотоксичност екстракта луковица *S.purpurascens* прикупљаних у јесен према хуманим ћелијама карцинома колона (НСТ-116), после 24, 48 и 72h инкубације

5. Дискусија

Са развојем медицине, открићем штетних ефеката конвенционалне терапије и појавом резистенције микроорганизама на постојеће хемијски синтетисане лекове, појавила се потреба за проналаском агенаса који ће бити једнаке или веће ефикасности са мање нежељених последица. Један од таквих извора су биљке, за чије су активне принципе или целе екстракте доказани различити биолошки ефекти. Процес испитивања је дуг и непредвидив. У циљу издвајања и очувања активности жељених активних принципа потребно је пажљиво испланирати цео процес, од времена и места прикупљања биљног материјала, преко одабира растварача и методе екстракције, до хемијске и биолошке карактеризације (97).

Syclamen hederifolium и *Syclamen purpurascens* су одабране за предмет истраживања ове дисертације због њихове широке традиционалне употребе и потенцијалне употребе различитих врста рода *Syclamen* у савременој медицини. Како ове две врсте расту у Републици Србији и користе се у традиционалној медицини у лечењу карцинома, циљ је био хемијска и фармаколошка карактеризација воденог, етанолног и ацетонског екстракта луковица испитиваних врста прикупљаних у пролеће и јесен.

Испитиване врсте су прикупљане на различитим локалитетима у Р. Србији. Биљни материјал је осушен и уситњен како би се повећала контактна површина са растварачем. Коришћени су растварачи различите поларности – вода, 70% етанол и ацетон. У оквиру хемијске карактеризације свих испитиваних екстраката луковица *S. hederifolium* и *S. purpurascens*, извршена је анализа садржаја укупних фенола, флавоноида и сапонина референтним методама. Један део истраживања чинило је *in vitro* испитивање антиоксидационе активности које је извршено употребом пет различитих метода: DPPH, ABTS, TRP, CUPRAC и FRAP. Антимикробна активност свих испитиваних екстраката према Грам позитивним бактеријама, Грам негативним бактеријама и гљивици *C. albicans* је извршена микродилуционом методом. МТТ тестом је утврђена цитотоксична активност свих испитиваних екстраката према хуманим ћелијама карцинома грлића материце (HeLa), хуманим ћелијама карцинома колоне (HCT-116) и хуманим ћелијама карцинома плућа (A549).

5.1. Укупни феноли, флавоноиди и сапонини у екстрактима луковица *S. hederifolium* и *S. purpurascens*

Садржај активних принципа у екстракту зависи од хемијског састава биљног материјала, поларности и концентрације растварача употребљеног за екстракцију, температуре и методе екстракције. Студије су показале да су принос екстракта и активност присутних једињења из групе фенола у незанемарљивој мери повезани са поларношћу растварача употребљеног за екстракцију. Поларни растварачи су погоднији за екстракцију антиоксидационих једињења (97-99). Етанол, метанол, етил-ацетат и ацетон су растварачи којима се екстрахује највећа концентрација полифенола. За екстракцију полифенола мале молекулске масе најпогоднији је метанол, док је за екстракцију полифенола веће молекулске масе растварач избора ацетон (98).

Треба имати на уму да се растворљивост фенола и флавоноида ипак може разликовати зато што се налазе у различитим хемијским структурама у храни и

биљкама. Из тог разлога срећемо и појаву да су у неким неполарним растварачима концентрације фенола и флавоноида веће него у поларним растварачима (99).

У овој дисертацији концентрација фенола је била виша у екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* прикупљаних у јесен, у односу на екстракте луковица прикупљаних у пролеће. Концентрације фенола у екстрактима луковица прикупљаних у пролеће су биле у опсегу $15,79 \pm 0,16 \mu\text{g GAE/mg}$ до $7,91 \pm 0,19 \mu\text{g GAE/mg}$. Највећи садржај фенола имали су ацетонски екстракти обе врсте, док су најмање имали етанолни екстракт *C. hederifolium* и водени екстракт *C. purpurascens*. Посматрајући екстракте луковица прикупљаних у јесен, вода је била најпогоднији растварач за екстракцију фенола из луковица *C. hederifolium* ($31,76 \pm 2,92 \mu\text{g GAE/mg}$), а ацетон најбољи растварач за екстракцију фенола из луковица *C. purpurascens* ($16,46 \pm 0,33 \mu\text{g GAE/mg}$).

Садржај укупних флавоноида био је највећи у етанолним екстрактима луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће, нижи у ацетонским и најнижи у воденим екстрактима. У случају екстраката луковица прикупљаних у јесен, напотентнији растварач за екстракцију флавоноида за обе врсте био је ацетон.

Доступне информације о садржају укупних фенола и флавоноида у *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су оскудни. Истраживачи из Србије су испитивали *C. purpurascens* са станишта на планини Кукавици. Садржај фенола и флавоноида у воденом екстракту луковица ове врсте био је $8,27 \pm 0,132 \mu\text{g GAE/g}$ и $11,51 \pm 0,254 \mu\text{g RE/g}$ (82). У овој дисертацији детектована је већа концентрација фенола и флавоноида у воденим екстрактима у поређењу са резултатима поменуте студије - резултати су изражени у јединицама $\mu\text{g GAE/mg}$ суве масе. Претпоставка је да разлика постоји јер су у питању различита станишта, време прикупљања биљног материјала и различите методе екстракције. Услови за раст и годишње доба (вегетациони период у ком се биљка налази) значајно утичу на садржај биоактивних компоненти (100,101). У поменутој студији вршена је рефлукс екстракција, док су овој дисертацији екстракти добијени мацерацијом. Досадашња истраживања доказала су да садржај активних принципа једног екстракта зависи и од температуре, с обзиром на то да су поједина једињења термолабилна (97,99). Хемијска структура полифенола је такође један од фактора од којих зависи њихова растворљивост у растварачима (102).

C. hederifolium која расте на територији Турске је такође окарактерисана у погледу садржаја фенола и флавоноида. Испитивани су етанолни, метанолни и ацетонски екстракти надземних и подземних делова биљке. Истраживачи су дошли до закључка да надземни делови биљке имају већу концентрацију фенола и флавоноида у односу на луковице. Највеће концентрације посматраних биоактивних једињења измерене су у метанолним екстрактима надземних делова биљке, праћени етанолним и ацетонским екстрактима. Исти случај је био и са екстрактима луковица, где се метанол показао као најпотентнији растварач за екстракцију фенола и флавоноида. Ниже концентрације су детектоване у етанолним, а најниже у ацетонским екстрактима. Треба истаћи да разлике у добијеним резултатима нису велике (75). Поређење наших резултата садржаја фенола у односу на резултате наведене студије није једноставно, услед различитих јединица којима су изражени резултати.

Садржај фенола и флавоноида је испитиван у листовима и цветовима *C. hederifolium*. У поређењу са другим цикламама испитиваним у истој студији (*C. persicum* и *C. mirabile*), листови *C. hederifolium* су садржали најмање фенола, али међу

највишим концентрацијама флавоноида. Разлика у концентрацији фенола и флавоноида у цветовима *C. hederifolium* није била од статистичке значајности у односу на друге две испитиване врсте (71).

У листовима *C. hederifolium* је идентификовано пет каротиноида: неоксантин, виолаксантин, лутеин, β -каротен и цис- β -каротен. У цветовима *C. hederifolium* су идентификовани антоцијани: малвидин-3,5-ди-О-глукозид, пеонидин-рутенозид, пеонидин-3-О-глукозид, малвидин-3-О-глукозид, малвидин-рутенозид (71). У листовима *C. purpurascens* идентификовани су антоцијани: малвидин-3-5-диглукозид, цианидин-3-О-неохесперидозид, пеонидин-3-О-неохесперидозид, малвидин-3-О-глукозид, малвидин-3-О-рутинозид (103). Од флавонола присутни су: кверцетин-ди-рамнозил-хекосид 1, кверцетин-ди-рамнозил-хекосид 2, мирицетин-3-О-рутенозид, неохесперидин, кемферол-3-О-рутинозид, ларицитрин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-галактозид, мирицетин-3-О-рамнозил, изорамнетин-3-О-рутинозид, кверцетин-3-О-рамнозил кверцетин-3-О-рутинозид (103).

Сапонини су посебна врста гликозида, који се састоје од полицикличних агликона везаних за један или више бочних ланаца шећера. Агликон може бити стероидни или тритерпенски. Назива се још и сапогенином. Истраживања су показала да сапонини имају антивирусно, антимикубно, антиинфламаторно, антимутагено, цитотоксично, антиоксидативно, хемолитичко деловање итд. (59) Биолошка активност зависи од врсте и структуре сапонина. Екстракција сапонина из биљног материјала представља посебан изазов, с обзиром да су структурно врло различити и углавном присутни у ниским концентрацијама. У зависности од структуре сапонина, методе екстракције могу бити екстракција базним или киселим растворима, суперкритична екстракција, Сокслет екстракција, ултразвучно асистирана екстракција, екстракција уз рефлукс, микроталасна екстракција итд. (59,104,105). Пре екстракције потребно је прилагодити услове с обзиром да су неки сапонини термолабилни и лако подлежу ензимској хидролизи. Хидролиза се чешће дешава при екстракцији водом, док се естерификација може догодити током екстракције алкохолом. Препорука је да се у том случају екстракција врши водено-етанолним раствором пре него метанолом. Екстракција метанолом је праћена стварањем деривата који се иначе не налазе у биљци (104). Биолошка активност екстракта је резултат деловања једног или синергистичког дејства више различитих једињења. Поред изазовне екстракције, посебан напор треба уложити у планирање и изоловање појединачних активних принципа. Као методе у литератури се наводе танкослојна хроматографија, течна хроматографија под ниским, средњим или високим притиском и хроматографија на колони (104).

Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су у овој дисертацији окарактерисани у погледу укупног садржаја сапонина. Вредности сапонина у екстрактима *C. hederifolium* кретале су се у опсегу 241,62 - 401,75 mg DE/g. Највећа концентрација измерена је у воденом екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће, а најмања у воденом екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен. Садржај укупних сапонина у етанолном и ацетонском екстракту луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен био је већи у односу на садржај сапонина у екстрактима луковица прикупљаних у пролеће. Овакав тренд је примећен и код сва три екстракта луковица *C. purpurascens*. Вредности сапонина у екстрактима *C. purpurascens* кретале су се у опсегу 237,57-413,41 (mg DE/g). Највећа концентрација сапонина је измерена у ацетонском екстракту луковица *C.*

purpurascens прикупљаних у јесен, а најмања у воденом екстракту луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће.

Досадашња истраживања доказала су да су луковице циклама богате сапонинима који су одговорни за њихову биолошку активност. Истраживања спроведена на *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су се углавном бавила изоловањем појединачних сапонина и њиховом карактеризацијом, те се наши резултати не могу поредити с обзиром да то није било предмет истраживања ове дисертације. Добијени подаци су добра основа за наредна истраживања, која би требало укључити изолацију и карактеризацију активних принципа луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* са станишта у Р. Србији.

5.2. Антиоксидациона активност екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Оксидативни стрес је један од кључних фактора у индукцији патофизиолошких механизма многих хроничних и дегенеративних болести. Настаје услед поремећене равнотеже између прооксидационих и антиоксидационих молекула. За бројна једињења и целе екстракте биљака постоје докази о високој антиоксидационој активности. Како су антиоксидациони молекули различитих структура и различитим механизмима остварују своје ефекте (трансфер атома водоника или електрона, хелирање јона метала, „хватање“ слободних радикала, стабилизација реактивних хидроксил радикала, инактивација синглет кисеоника, итд.), да би се проценио и разумео укупни антиоксидациони потенцијал посматраног узорка неопходно је применити више метода. Најчешћи антиоксиданси су ензими, каротеноиди, антоцијани, феноли, флавоноиди, кофактори, витамини и деривати (102,106). Референтне методе за испитивање антиоксидационе активности су приказане у Табели 12 (106).

Табела 12. Подела *in vitro* антиоксидационих метода на основу механизма деловања

Трансфер атома водоника	Трансфер електрона	Трансфер атома водоника и електрона
Тест капацитета апсорпције радикала кисеоника (ORAC) тест	CUPRAC тест	Одређивање способности неутрализације DPPH радикала
Тест капацитета антиоксиданса хидроксилних радикала (HORAC)	FRAP тест	Одређивање способности неутрализације ABTS радикала
Тест антиоксидационих параметара за хватање радикала пероксила (TRAP)	Folin–Ciocalteu тест	
Тест укупног капацитета уклањања оксирадикалних радикала (TOSC)		

Сходно претходним сазнањима, у циљу процене потенцијалне антиоксидационог потенцијала водених, етанолних и ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, у овој дисертацији коришћено је пет различитих *in vitro* метода (DPPH, ABTS, TRP, CUPRAC и FRAP).

Резултати ове дисертације указали су да највећу способност неутралисања DPPH радикала има етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, док најнижу активност поседује водени екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће. Етанолни екстракт луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће је имао највећу способност неутралисања DPPH радикала, док је водени екстракт из истог вегетационог периода имао најнижу вредност.

Ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium*, из оба вегетациона периода, имали су већу способност неутралисања ABTS радикала у односу на остале екстракте ове врсте. У случају *C. purpurascens* највећу активност је имао етанолни екстракт луковица прикупљаних у пролеће. Највећу способност редуковања јона метала (FRAP) имао је водени екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, док је најнижу имао водени екстракт луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен. Највећу способност редуковања јона бакра има је ацетонски екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, а најнижу етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен. Постојање разлика у резултатима антиоксидационих тестова се може објаснити потенцијалним присуством једињења из других група секундарних метаболита која поседују антиоксидациону активност и међусобним синергизмом између метаболита.

Испитана је антиоксидациона активност воденог екстракта луковица *C. purpurascens* са станишта планине Кукавице. Резултати су показали антиоксидациону активност, која је била слабија од антиоксидационе активности контроле. Доказали су да водени екстракт може неутралисати DPPH радикал у концентрацијама $EC_{50}=0,413$ mg/ml и $EC_{50}=2,0$ mg/ml, а ABTS радикал у концентрацији $EC_{50}=0,743$ mg/ml (82). Резултате добијене у овој дисертацији је практично немогуће коментарисати са наведеним резултатима с обзиром да су изражени у другим јединицама.

Антиоксидациони потенцијал екстраката луковица, целог надземног дела биљке, листова и цветова *C. hederifolium* је описан у литератури. Метанолни екстракти листова и цветова *C. hederifolium* су показали способност неутралисања DPPH, способност неутралисања ABTS радикала и способност редуције јона гвожђа Fe^{3+} . Резултати наведених тестова спроведених на екстрактима листова били су $21,96\pm 0,16$ mg TE/g, $17,89\pm 0,71$ mg TE/g, $23,38\pm 0,58$ mmol Fe/g, редом. Резултати наведених тестова спроведених на екстрактима цветова били су $28,61\pm 0,16$ mg TE/g, $54,13\pm 0,78$ mg TE/g, $35,88 \pm 0,32$ mmol Fe^{II} /g, редом (71).

Етанолни, метанолни и ацетонски екстракти подземних (луковица) и надземних делова *C. hederifolium* су такође су показали способност неутралисања DPPH и ABTS радикала (75). Истраживачи су резултате приказали као IC_{50} вредности, која представља половину максималне инхибиторне концентрације. Највећу способност неутралисања ABTS радикала имали су метанолни и етанолни екстракти луковица *C. hederifolium*. Нижу активност имали су метанолни и етанолни екстракти надземних делова биљке. Најнижу активност имали су ацетонски екстракти луковица и надземних делова биљке (75). Највећу способност неутралисања DPPH радикала показали су етанолни и метанолни екстракти надземних делова *C. hederifolium*, праћени метанолним и

ацетонским екстрактима луковица. Најнижу активност имали су етанолни екстракт луковица и ацетонски екстракт надземних делова биљке (75). Иако су резултати изражени другачијим јединицама, можемо поредити активности добијене у наведеној студији са резултатима ове дисертације. Налазимо да је ацетонски екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће такође био супериорнији у неутрализацији DPPH радикала у односу на етанолни екстракт. Међутим, то није био случај са екстрактима луковица прикупљаних у јесен, где је етанолни био потентнији од ацетонског. Поређењем способности неутралисања ABTS радикала, добили смо супротне резултате, ацетонски екстракт луковица имао је већу способност неутралисања радикала од етанолног. Разлике се могу објаснити различитим локалитетима са којих су биљке прикупљене, различитој вегетативној фази и условима екстракције. Од свих наведених услова зависе квалитативни и квантитативни садржај активних компоненти у екстракту.

Истраживачи из Турске су испитивали антиоксидативно дејство етанолног екстракта луковица *C. hederifolium*. Екстракти показују дозно-зависну активност, која се зависно од методе кретала у опсегу 10~52%. У односу на остале испитиване екстракте врста *C. cilicum* и *C. pseudibericum*, *C. hederifolium* је имала најнижу антиоксидациону активност (107). И у овом случају, начин изражавања резултата је ограничење за поређење са резултатима ове дисертације.

Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су окарактерисани и индексом антиоксидационог потенцијала. Извршено је поређење индекса антиоксидационог потенцијала испитиваних екстраката и њихова корелација са садржајем фенола и флавоноида.

Поредећи екстракте луковица *C. hederifolium*, највећу вредност индекса антиоксидационог потенцијала имао је ацетонски екстракт луковица прикупљаних у јесен, а затим водени и ацетонски екстракти луковица прикупљаних у пролеће. Нижу вредност имали су етанолни екстракти луковица прикупљаних у пролеће и јесен, док је најнижу вредност имао водени екстракт луковица прикупљаних у јесен. У овој дисертацији доказана је средње јака повезаност укупних фенола и флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката луковица прикупљаних у пролеће, и јака корелација фенола и флавоноида и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката луковица прикупљаних у јесен.

Када је у питању *C. purpurascens*, ацетонски екстракт луковица прикупљаних у јесен је имао највећу вредност индекса антиоксидационог потенцијала. Ниже вредности имали су етанолни екстракти луковица прикупљаних у пролеће и јесен, а затим ацетонски и водени екстракти луковица прикупљаних у пролеће. Најнижу вредност имао је водени екстракт луковица прикупљаних у јесен. Запажена је слаба повезаност укупних фенола и индекса антиоксидационог потенцијала екстраката луковица ове врсте прикупљаних у пролеће и јака веза са екстрактима луковица прикупљаних у јесен. Садржај укупних флавоноида је показао јаку повезаност са индексом антиоксидационог потенцијала екстраката луковица прикупљаних и у пролеће и у јесен.

У овој докторској дисертацији потврђен је антиоксидациони потенцијал испитиваних екстраката *C. hederifolium* и *C. purpurascens*. Укупна антиоксидациона активност је вероватно резултат синергистичког деловања детектованих фенола и флавоноида са другим молекулима који испољавају антиоксидациону активност.

Антимикробна активност екстракта луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Биљке су богате једињењима за које је утврђено да имају антимикробна својства. То су углавном феноли, терпеноиди, есенцијална уља, алкалоиди, полипептиди и полиацетилени (108). Претпостављени механизми којима се остварује антимикробни ефекат могу бити дисрупција мембране микроорганизама, везивање за адхезине, инактивација ензима, комплексирање са ћелијским зидом, везивање за протеине, формирање дисулфидних мостова и блокада вирусне фузије (108). Антимикробна активност фенола зависи од њихове структуре, позиције алкил и хидроксилних група и њиховог броја. Механизми деловања фенола објашњени су инактивацијом ћелијских ензима, ремећењем пермеабилности и интегритета ћелијске мембране (108,109).

Резултати *in vitro* испитивања антимикробне активности водених, етанолних и ацетонских екстракта *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, разликовали су се у зависности од испитиваног екстракта и врсте микроорганизама. Доксициклин и нистатин су коришћени као позитивне контроле, док је диметилсулфоксид коришћен као негативна контрола. Антибактеријска активност циклума је у литератури углавном испитивана диск дифузионом методом, за разлику од ове дисертације где је коришћена релевантнија, микродилуциона метода (79-83).

Антибактеријска и антифунгална активност *C. hederifolium* је документована у литератури у свега пар студија. У истраживању спроведеном у Сирији, диск-дифузионом методом је потврђена антибактеријска активност петрол-етарског, хлороформског, етил-ацетатног и метанолног екстракта луковица циклуме прикупљаних у зиму (80). Ефекат је испитан на сојевима *E. coli* и *S. aureus*. Истраживачи су дошли до закључка да метанолни екстракт има највећу антимикробну активност. Етил-ацетатни и хлороформски екстракти су испољили ефекат само у концентрацији 100mg/ml. Испитиване бактерије су остале неосетљиве на дејство петрол-етарског екстракта луковица циклуме. Из наведеног можемо закључити да поларнији екстракти имају већи антимикробни ефекат, што потврђује претходна сазнања (80). Истраживачи из Италије доприносе сазнањем да етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* има добар антибактеријски ефекат против метицилин резистентног *S. aureus-a* са вредношћу $IC_{50} = 8 \mu\text{g/ml}$ (79).

Документован је и умерен антибактеријски ефекат етанолног екстракта луковица *C. hederifolium* према рибљим патогенима (107). У прилог антимикробној активности говоре и подаци PFT (poison food technique) испитивања антифунгалне активности метанолног екстракта луковица *C. hederifolium*, који је показао значајан ефекат против сојева *Aspergillus niger*, *Cladosporium cladosporioides* и *Penicillium expansum* (81).

Антимикробни ефекат метанолних екстракта листова и цветова *C. hederifolium* је испитан диск-дифузионом методом на сојевима *S. aureus*, *E. fecalis*, *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *K. pneumonia* и *C. albicans*. Екстракт цветова је инхибирао раст *E. coli*, са зоном инхибиције од 7,25 mm. Остали сојеви нису били осетљиви на дејство испитиваних екстракта (71).

Подаци о антимикробној активности *C. purpurascens* су оскудни. Познато је да водени екстракт луковица *C. purpurascens* са станишта планине Кукавица у Србији, показује антибактеријско дејство ка сојевима *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*,

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis*, и *Candida albicans*, са зоном инхибиције 13-34 mm. Најосетљивији сојеви на испитивани екстракт били су *S. aureus* и *C. albicans*, док је *Klebsiella pneumoniae* остала неосетљива (82). У овој дисертацији, водени екстракти луковица цикламе прикупљаних у пролеће су такође показали антимикуробни ефекат ка истим испитиваним сојевима, са разликом што су највећу осетљивост на испитивани екстракт имале *E. aerogenes* и *C. albicans*. Резултати студија у ком је испитиван утицај екстракта *C. europaeum* (*purpurascens*) у облику комерцијалних интраназалних препарата на симптоме хроничног риносинуситиса, показују да је ефикасан у ублажавању симптома и спречавању њихових егзацербација, било да се користи као монотерапија или додатак антибиотицима, уз чињеницу да не захтева додатно финансијско оптерећење здравственог система у односу на стандардну терапију (44-47). Сматра се да су за наведени ефекат одговорни сапонини који се налазе у луковицама циклама (46). Као што је раније поменуто, у зависности од хемијске структуре, сапонини могу различитим механизмима остваривати антимикуробни ефекат (110). Антимикуробни ефекат такође може бити последица деловања присутних фенола и флавоноида, који механизам остварују нарушавањем пермеабилности и дестабилизацијом плазма мембране или инхибицијом екстрацелуларних ензима (111). Поједина једињења из групе полифенола антифунгални ефекат остварују инхибицијом морфогенезе, нарушавањем функције мембране везивањем за ергостерол и цурењем цитоплазматског садржаја, индуковањем апоптозе и нарушавањем митохондријалне хомеостазе (112).

На основу литературних података о потврђеном антимикуробном ефекту циклама доказаним диск-дифузионом методом, испитивали смо водени и етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* на исти начин (113). С обзиром да испитивани сојеви нису били осетљиви на екстракте, у овој дисертацији смо користили микродилуциону методу и повећали број тестираних сојева микроорганизама, при чему смо потврдили антимикуробни ефекат свих екстраката испитиваних циклама.

Добијени подаци су од великог значаја са обзиром на растућу резистенцију микроорганизама на антибиотике и антигљивичне лекове. Инфекције изазване кандидом су све чешће и са собом у последње време носе велики проблем резистенције на доступне антигљивичне лекове. Посебна пажња се усмерава ка биљним екстрактима и појединачним секундарним метаболитима који могу бити алтернатива савременој терапији (114, 115).

5.3. Антитуморска активност екстраката луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens*

Претходне студије показале су да сапонини и цели екстракти различитих врста циклама испољавају цитотоксични ефекат ка различитим туморским ћелијским линијама (24,70,71,84,86,88,116). Доказано је да *Cyclamen cilicum* испољава антитуморски ефекат ка ћелијама хуманог карцинома простате (DU-145) и ћелијама хуманог карцинома дојке (MCF-7 и MDA-MB-231) (70). *Cyclamen mirabile* и *Cyclamen persicum* смањују вијабилност ћелија хуманог карцинома дојке (MDA-MB-231), док *Cyclamen persicum* и *Cyclamen libanoticum* смањују вијабилност ћелија хуманог карцинома дебелог црева (HT-29), дојке (SK-BR-3), јетре (HepG2/3A), плућа (NCI-H1299), панкреаса (BXPC-3) и карцинома простате (22RV1) (71, 84). *Cyclamen trocoperanthum* испољава антитуморски ефекат ка ћелијама хуманих карцинома дебелог црева (HT-29 и HCT116) (88). Цитотоксичност врста *C. hederifolium* и *C. purpurascens* је описана у свега пар студија. На основу података доступних у литератури, циљ је био испитати цитотоксично дејство врста циклама које расту у Р. Србији ка ћелијским линијама карцинома против којих се иначе екстракти користе као део традиционалне медицине.

Вијабилност ћелија је испитивана након излагања ћелија карцинома растућим концентрацијама екстраката, у различито време инкубације (24, 48 и 72 сата). Резултати добијени у овој дисертацији показали су да водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* које расту у Р. Србији показују временски и дозно-зависну цитотоксичну активност ка свим испитиваним ћелијским линијама (A549, HCT-116, HeLa).

Цитотоксичност екстраката луковица *C. hederifolium* према HeLa ћелијама била је највећа након периода инкубације од 24h. Са продужетком времена инкубације цитотоксични ефекат се постепено смањивао. Ове ћелије су биле најосетљивије на дејство ацетонских екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у оба годишња доба. Водени екстракти су показали нешто слабије дејство, а етанолни најслабије. Дозно-зависни ефекат примећен је за концентрације ниже од 62,5 µg/ml. При концентрацији 62,5 µg/ml за све екстракте *C. hederifolium* из оба вегетациона периода примећено је значајно смањење вијабилности ћелија. Веће концентрације од 62,5 µg/ml показале су скоро једнак цитотоксични ефекат у свим тренуцима читавања резултата (90%–100%). У односу на контролу, екстракти су показали углавном једнак или бољи ефекат, осим у тренутку читавања након 72 сата инкубације, где је ефекат цисплатине био већи у свим посматраним концентрацијама у односу на екстракте *C. hederifolium*.

Ефекат *C. purpurascens* на HeLa ћелије је био сличан. Дозно-зависни ефекат примећен је при концентрацијама нижим од 62,5 µg/ml за све екстракте из оба вегетациона периода, осим за екстракте луковица прикупљаних у пролеће у тренуцима читавања након периода инкубације 48h и 72h, где се овакав ефекат могао приметити при концентрацијама нижим од 125 µg/ml. При концентрацијама већим од наведених, екстракти су остваривали скоро једнак цитотоксични ефекат (90%–100%), као у случају *C. hederifolium*. У поређењу са ефектима контроле, ефекти испитиваних екстраката *C. purpurascens* из оба вегетациона периода у концентрацијама вишим од 125 µg/ml се готово нису разликовали.

Хумане ћелије карцинома плућа А549 су такође биле осетљиве на дејство испитиваних екстраката *C. hederifolium* и *C. purpurascens*, из оба вегетациона периода. Водени екстракт луковица *C. hederifolium* из оба вегетациона периода је био најпотентнији у инхибицији вијабилности након 24h инкубације. Нешто слабији ефекат имали су етанолни, а најслабији ефекат показали су ацетонски екстракти. Необичан ефекат је примећен при испитивању ацетонских екстраката у концентрацији 15,625 µg/ml, при којима је дошло до раста ћелија након 24h инкубације. Ћелије А549 су показале већу осетљивост на испитиване екстракте након 48h и 72h инкубације у односу на вредности након 24h. Ацетонски екстракти су били ефикаснији у смањењу вијабилности у односу на остале екстракте. У поређењу са цисплатином, интересно је да су ћелије А549 биле осетљивије на испитиване екстракте у поређењу са контролом, при концентрацијама вишим од 31,25 µg/ml након 24h и 48h инкубације, односно при концентрацијама вишим од 62,5 µg/ml након 72h инкубације, за оба вегетациона периода. При концентрацијама већим од 125 µg/ml екстракти су остваривали скоро једнак цитотоксични ефекат ка испитиваној ћелијској линији (90%–100%).

Највећи ефекат *C. purpurascens* након 24h инкубације, имали су ацетонски екстракти луковица из оба вегетациона периода, праћен воденим а затим етанолним екстрактима. Сви испитивани екстракти су показали већи цитотоксични потенцијал у односу на цисплатину у концентрацијама вишим од 62,5 µg/ml након 24h инкубације, односно 31,25 µg/ml након 48h и концентрацијама вишим од 125 µg/ml након 72h инкубације. Ћелије А549 су биле најосетљивије на дејство водених екстраката из оба вегетациона периода, чак и при најнижим испитиваним концентрацијама.

Испитивани екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* су такође испољили цитотоксично дејство ка хуманим ћелијама карцинома колона (НСТ-116). У поређењу са претходно поменутих ћелијама, ова ћелијска линија је нешто мање осетљива на концентрације употребљених екстраката. При употреби најнижих концентрација (15,625 µg/ml) водених и етанолних екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљеним у пролеће, у сва три тренутка читавања резултата, и ацетонског екстракта луковица ове врсте прикупљених у јесен, након 24h, дошло је до пораста броја ћелија. При нижим концентрацијама, етанолни екстракт луковица прикупљених у пролеће се издвајао као потентнији у инхибицији вијабилности ћелија, међутим, при концентрацијама већим од 125 µg/ml сви екстракти из пролећа су остваривали скоро једнак цитотоксични ефекат ка испитиваној ћелијској линији (90%–100%). Дозно-зависни ефекат примећен је при концентрацијама нижим од 62,5 µg/ml за етанолни екстракт, односно, при концентрацијама нижим од 125 µg/ml за водени и ацетонски екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљених у пролеће. Међу екстрактима ове врсте припремљеним од луковица прикупљених у јесен, ацетонски се издвојио као најефикаснији у смањењу вијабилности ћелија НСТ-116, у сва три тренутка мерења. Ефекат је био бољи од ефекта контроле. И у овом случају је дошло до раста ћелија при концентрацијама од 31,25 µg/ml воденог и етанолног екстракта, у сва три тренутка мерења. Дозно-зависни одговор је примећен у концентрацијама мањих од 125 µg/ml. Ефикасност свих екстраката у концентрацијама вишим од 125 µg/ml је била у опсегу 90-100%.

До пораста ћелија НСТ-116 дошло је и при употреби најнижих концентрација свих екстраката луковица *C. purpurascens*, у сва три тренутка мерења и из оба вегетациона периода. Овакав феномен није примећен једино након примене најнижих

концентрација ацетонског екстракта луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен, након 24h и 48h инкубације. Испитиване ћелије су најосетљивије на етанолни, а затим на водени и ацетонски екстракт луковица, посматрајући оба вегетациона периода. Дозно-зависни ефекат примећен је при концентрацијама нижим од 62,5 µg/ml за све екстракте из оба вегетациона периода, осим за етанолни екстракт луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен након периода инкубације 24h и водени екстракт луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен након 72h, за које се овакав ефекат могао приметити при концентрацијама нижим од 31,25 µg/ml. У поређењу са контролом, већи степен инхибиције вијабилности остваривали су етанолни екстракти из оба вегетациона периода у концентрацијама вишим од 62,5 µg/ml.

На основу добијених резултата, закључујемо да цитотоксични ефекат зависи од концентрације екстракта, поларности растварача употребљеног за екстракцију и туморске ћелијске линије. Високе концентрације свих испитиваних екстраката показале су високи цитотоксични потенцијал (90-100% мртвих ћелија). Сходно досадашњим сазнањима, резултати ове дисертације дају први извештај о цитотоксичној активности ендемских врста *C. hederifolium* и *C. purpurascens* са природних станишта Р. Србије. Резултате цитотоксичности из ове дисертације не можемо директно поредити са резултатима других студија због разлика у пореклу биљних врста, припреми биљног материјала и одабраној методологији (61,71,117).

Цитотоксична активност сапонина изолованих из метанолног екстракта луковица *C. hederifolium* описана је 2012. године. Хедерофолиозиди А-Е и ардисикренозид Д су испитивани у концентрацијама 1-50 µM на хуманим ћелијским линијама карцинома грлића материце (HeLa), карцинома плућа (H-446), карцинома дебелог црева (HT-29) и леукемијских ћелија (U937). МТТ тестом није доказано цитотоксично дејство испитиваних једињења (61).

Истраживачи из Румуније су доказали цитотоксично дејство листова и цветова *C. hederifolium* према ћелијама карцинома дојке (MDA-MB-231), која је била већа од активности *C. persicum* и *C. mirabile*. Процент вијабилних ћелија након излагања метанолном екстракту листова био је 56,71–69,35%, а након излагања метанолном екстракту цветова 40,07–41,43% (71). Потентно цитотоксично дејство *C. hederifolium* се може повезати са присуством β-каротена, цикламина и високих концентрација фенола и флавоноида. Посебно се издвајају малвидин 3,5-ди-*O*-глукозид, малвидин 3-*O*-глукозид малвидин рутенонид и цијанидин 3,5 ди-*O*-глукозид (71).

Цитотоксичност етанолних екстраката листова и луковица *C. hederifolium* испитана је и *Brine shrimp* методом. Потврђена је активност оба екстракта ка испитиваној *Artemia salina* са вредностима LC₅₀ 85,95 µg/ml (листови) и LC₅₀ 72,34 µg/ml (луковице) (117).

У нашем истраживању из 2021. доказали смо цитотоксичну активност воденог и етанолног екстракта луковица *Cyclamen hederifolium* према 4T1, HCT116, CT26, LLC1. Етанолни екстракт је био потентнији у инхибицији раста туморских ћелијских линија у односу на водени екстракт (113).

Цитотоксично дејство комерцијалног препарата екстракта *C. purpurascens* је испитано МТТ тестом на мишјој ћелијској линији фибробласта - L929. Доказано је да

високе дозе поменутог препарата имају токсичне ефекте на ћелије, утицајем на ћелијску морфологију и вијабилност (87).

За велики број сапонина постоје подаци о потврђеној цитотоксичној активности. С обзиром да су луковице циклама богате наведеним једињењима, очекује се да испоље потенцијано антитуморско дејство. Оно ипак зависи од хемијске структуре сапонина, времена прикупљања и обраде биљног материјала, методе екстракције и изоловања (118). Сапонини остварују цитотоксично дејство на више начина. Изазивају апоптозу повећањем Вах, р53, Fas, Fas1 и каспаза, нарушавањем митохондријалне мембране и омогућавањем цурења цитохрома ц и смањењем Bcl2. Смањењем експресије ciklin D, E, C-fod/c-jun, Cdk6 и повећањем експресије Cdk инхибитора инхибирају ћелијски циклус. Инхибицију инвазивности остварују утицајем на цитоскелет повећањем експресије матрикс металопротеиназа и MAP киназа (119).

6. Закључци

- ✓ **Прва хипотеза се у потпуности прихвата.** Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* сакупљаних у пролеће и јесен садрже феноле, флавоноиде и сапонине. Сви растварачи, коришћени у овом истраживању су показали способност екстракције фенола, флавоноида и сапонина, без обзира у ком вегетацијском периоду је материјал био сакупљен. Растварачи су били различите поларности и сви се могу користити за екстраховање фенола, флавоноида и сапонина из луковица обе врсте *C. hederifolium* и *C. purpurascens* у било ком периоду живота биљке.
- ✓ **Друга хипотеза се у потпуности прихвата.** Садржај укупних фенола, флавоноида и сапонина разликовао се у зависности од:

1. растварача употребљеног за екстракцију

- Вода је била најпогодни растварач за екстраховање фенола из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, флавоноида из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен и сапонина из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће.
- Етанол је био најпогодни растварач за екстраховање фенола из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, флавоноида из екстракта луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и сапонина из екстракта луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен.
- Ацетон је био најпогодни растварач за екстраховање фенола из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, флавоноида из екстракта луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен и сапонина из екстракта луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен.

2. биљне врсте - које су испитиване

- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен су били богатији фенолима у односу на екстракте луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен.
- Водени и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен су били богатији флавоноидима у односу на исте екстракте луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен.
- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен су били богатији сапонинима у односу на екстракте луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен.
- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће су били богатији фенолима у односу на екстракте луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће.

- Водени и етанолни екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће били су богатији флавоноидима у односу на екстракте луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће
- Етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће били су богатији сапонинима у односу на екстракте луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће

3. вегетацијског периода - у коме је биљни материјал прикупљен

- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен су били богатији фенолима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у пролеће.
- Водени и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен су били богатији флавоноидима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у пролеће.
- Етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен су били богатији сапонинима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у пролеће.
- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен су били богатији фенолима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у пролеће.
- Водени и етанолни екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће су били богатији флавоноидима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у јесен.
- Водени, етанолни и ацетонски екстракти луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен су били богатији сапонинима у односу на екстракте луковица ове врсте прикупљаних у пролеће.

✓ **Трећа хипотеза се у потпуности прихвата.** Сви испитивани екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испољавају антиоксидационо дејство. Постоји корелација између индекса антиоксидационог потенцијала свих испитиваних екстраката луковица обе биљне врсте и садржаја укупних фенола и флавоноида која је изражена на следећи начин:

- Утврђена је средње јака корелација између индекса антиоксидационог потенцијала свих испитиваних екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и њиховог садржаја укупних фенола и флавоноида.
- Утврђена је јака позитивна корелација између индекса антиоксидационог потенцијала свих испитиваних екстраката луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен и њиховог садржаја укупних фенола и флавоноида.
- Утврђена је релативно слаба корелација између индекса антиоксидационог потенцијала испитиваних екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и њиховог садржаја укупних фенола.
- Утврђена је јака позитивна корелација између индекса антиоксидационог потенцијала свих испитиваних екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у пролеће и њиховог садржаја укупних флавоноида.

- Утврђена је јака позитивна корелација између индекса антиоксидационог потенцијала свих испитиваних екстраката луковица *C. purpurascens* прикупљаних у јесен и њиховог садржаја укупних и фенола и флавоноида.
- ✓ **Четврта хипотеза се у потпуности прихвата.** Сви испитивани екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* испољили су антимикуробно дејство према испитиваним сојевима бактерија и гљивица.
 - Екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* добијени из воденог раствора, као и екстракт *C. hederifolium* добијен из ацетонског раствора имали су најснажније антибактеријско дејство.
 - Екстракти *C. hederifolium* и *C. purpurascens* добијени из воденог раствора имали су најснажније антифунгално дејство.
 - Екстракти обе испитиване биљне врсте припремљени од биљног материјала прикупљаног у пролеће показују снажнију антимикуробну активност у односу на екстракте припремљене од биљног материјала прикупљаног у јесен.
- ✓ **Пета хипотеза се у потпуности прихвата.** Сви испитивани екстракти луковица *C. hederifolium* и *C. purpurascens* показују цитотоксичну активност ка свим испитиваним хуманим туморским ћелијским линијама (HeLa, A549, HCT-116).
 - Највећу цитотоксичну активност ка HeLa ћелијама остварили су ацетонски екстракти луковица *C. hederifolium* из оба вегетациона периода и етанолни екстракти луковица *C. purpurascens* из оба вегетациона периода.
 - Највећу цитотоксичну активност ка A549 ћелијама остварили су водени екстракти луковица *C. hederifolium* и ацетонски екстракти луковица *C. purpurascens*, из оба вегетациона периода.
 - Највећу цитотоксичну активност ка HCT-116 ћелијама остварили су ацетонски екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у јесен, етанолни екстракт луковица *C. hederifolium* прикупљаних у пролеће и етанолни екстракти луковица *C. purpurascens* из оба вегетациона периода.

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Atanasov A, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol Adv.* 2015; 33(8): 1582–1614.
2. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia. (2010). Traditional herbal remedies for primary health care. WHO Regional Office for South-East Asia. Доступно на: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/206024>.
3. De Abreu IN, Sawaya ACH, Eberlin MN, Mazzafera P. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* 2005; 41(6): 806-11.
4. Ott J, Hofmann A. *Pharmacothoeon: Entheogenic drugs, their plant sources and history.* Natural Products Company; 1993.
5. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Bansal YK. Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2015; 9(3): 293-304.
6. WHO Technical Report Series. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Annex 1. 2018; 1010.
7. Salmerón-Manzano E, Garrido-Cardenas JA, Manzano-Agugliaro F. Worldwide Research Trends on Medicinal Plants. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(10): 3376.
8. Bahmani M, Saki K, Shahsavari S, Rafieian-Kopaei M, Sepahvand R, Adineh A. Identification of medicinal plants effective in infectious diseases in Urmia, northwest of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2015; 5(10): 858-64.
9. Mintah S, Asafo-Agyei T, Archer MA et al. Medicinal Plants for Treatment of Prevalent Diseases. *Pharmacognosy - Medicinal Plants*; 2019.
10. De Vos P. European Materia Medica in Historical Texts: Longevity of a Tradition and Implications for Future Use. *J Ethnopharmacol.* 2010; 132(1): 28–47.
11. Yesson C, Culham A. A phyloclimatic study of *Cyclamen*. *BMC Evol Biol.* 2006; 6: 72.
12. Tutin TG, Heywood WH, Burges NA., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters S.M., Webb D.A. (Eds). *Flora Europaea, III*, London, Cambridge University Press; 1972. pp. 25-6.
13. Nikolić V. Genus *Cyclamen* L In: Josifović (ed.) *Flora of SR Serbia III*. Serbian Academy of Sciences and Arts, Belgrade, Serbia. 1972; pp. 500-502. (Serbian).
14. Grey-Wilson C. *Cyclamen: a guide for gardeners, horticulturalists and botanists.* New edition. London, Batsford; 2003. pp. 224.
15. Integrated Taxonomic Information System – Report. Dostupno na: <https://www.itis.gov>.
16. Djeddi S, Mazouz W. A Biological Overview on the Genus *Cyclamen*. *Eur. J. Sci. Res.* 2013; 110(1): 7-22.
17. Curuk P, Söğüt Z, İzgü T et al. Morphological characterization of *Cyclamen* sp. grown naturally in Turkey: Part II. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus.* 2016; 15(5): 205-24.
18. Vasa Pelagić. *Lečenje lekovitim biljem.* Sesto izdanje. Narodna knjiga; 1973.
19. Fürst R, Zündorf I. Evidence-based phytotherapy in Europe: Where do we stand? *Planta Med.* 2015; 81(12/13): 962-7.
20. Guarrera PM. Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 2005; 76(1): 1–25.
21. Mohammed GJ, Hameed IH, Kamal SA. Anti-inflammatory Effects and Other Uses of *Cyclamen* Species: A Review. *Indian J Public Health Res Dev.* 2018; 9(3): 206-11.
22. Alkowni R, Jodeh S, Hussein F, Jaradat N. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Cyclamen persicum* Mill tuber extracts. *Pak J Pharm Sci.* 2018; 31(1): 187-92.

23. Shahidi Bonjar GH, Aghighi S, Karimi Nik A. Antibacterial and Antifungal Survey in Plants used in Indigenous Herbal-Medicine of South East Regions of Iran. *J. Biol. Sci.* 2004; 4(3): 405-12.
24. Yildiz M, Bozcu H, Tokgun O, Karagur ER, Akyurt O, Akca H. Cyclamen exerts cytotoxicity in solid tumor cell lines: a step toward new anticancer agents? *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(10): 5911-3.
25. Fernández-Campos F, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Jauregui O, Casals I, Calpena AC. Ex-Vivo and In-Vivo Assessment of Cyclamen europaeum Extract After Nasal Administration. *Pharmaceutics.* 2019; 11(9): 426.
26. Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Al-Shafie' JH et al. Traditional knowledge of wild edible plants used in Palestine (Northern West Bank): A comparative study. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine.* 2008; 4: 1-13.
27. Passali D, Cambi J, Passali FM, Bellussi LM. Phytoneering: a new way of therapy for rhinosinusitis. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2015; 35(1): 1-8.
28. Pfaar O, Mullol J, Anders C, Hörmann K, Klimek L. Cyclamen europaeum nasal spray, a novel phytotherapeutic product for the management of acute rhinosinusitis: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Rhinology.* 2012; 50(1): 37-44.
29. Leonti M, Staub PO, Cabras S, Castellanos ME, Casu L. From cumulative cultural transmission to evidence-based medicine: evolution of medicinal plant knowledge in Southern Italy. *Front Pharmacol.* 2015; 6: 207.
30. Marković M, Matović M, Pavlović D et al. Resources of medicinal plants and herbs collector's calendar of Pirot County (Serbia). *Biologica Nyssana.* 2010; 1(1-2): 9-21.
31. Grittner N. Agro-ekološki i ekonomski potencijal genetičkih resursa Srbije. Doktorska disertacija. 2020.
32. Integrated Taxonomic Information System – Report. Dostupno na: <https://www.itis.gov>.
33. Seebens H, Blackburn TM, Dyer EE et al. No saturation in the accumulation of alien species worldwide. *Nat. Commun.* 2017; 8(2): 14435.
34. Doorenbos J. Taxonomy and nomenclature of Cyclamen. Veenman; 1950.
35. Ishizaka H. Breeding of fragrant cyclamen by interspecific hybridization and ion-beam irradiation. *Breed Sci.* 2018; 68(1): 25-34.
36. Leupen A. Cyclamen europaeum. *Homeopathic Links.* 2010; 23(04): 247.
37. Danno K, Colas A, Terzan L, Bordet MF. Homeopathic treatment of premenstrual syndrome: a case series. *Homeopathy.* 2013; 102(1): 59-65.
38. Danno K, Colas A, Masson JL, Bordet MF. Homeopathic Treatment of Migraine in Children: Results of a Prospective, Multicenter, Observational Study. *J Altern Complement Med.* 2013; 19(2):119–23.
39. Textbook of Materia Medica by Adolph Lippe M.D. AJ.Tafel.; 1886.
40. Reus V, Weiser M. Homeopathic Treatment of Gynecological Disorders. *Int. J. Biomed.* 1999; 28(5):233–36.
41. Homeomart.com. Cyclamen Europaeum Dilution 6C, 30C, 200C, 1M, 10M [internet]. Доступно на: <https://homeomart.com/products/cyclamen-europaeum-dilution-6c-30c-200c-1m-10m>. Последњи пут посећено: 09.03.2023.
42. Fokkens W, Lund V, Mullol J. The European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps group. EP₃OS 2007: European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2007. A summary for otorhinolaryngologists. *Rhinology* 2007; 45: 97-101.
43. Rybak AA, Rybak AA, Matveeva TV et al. Effects of Sinuforte on quality of life in rhinosinusitis patients [in Russian]. *Vestn Otorinolaringol.* 2008; 3: 56-8.
44. Lopatin AS, Ivanchenko OA, Soshnikov SS, Mullol J. Cyclamen europaeum improves the effect of oral antibiotics on exacerbations and recurrences of chronic rhinosinusitis: a

- real-life observational study (CHRONOS). *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2018; 38(2): 115-23.
45. Mullol J, Crespo C, Carré C et al. Pharmacoeconomics of *Cyclamen europaeum* in the management of acute rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2013; 123: 2620-5.
 46. Jurkiewicz D, Hassmann-Poznańska E, Kaźmierczak H et al. Lyophilized *Cyclamen europaeum* tuber extract in the treatment of rhinosinusitis. *Otolaryngol Pol.* 2016; 70(1): 1-9.
 47. Ponikau JU, Hamilos DL, Barreto A et al. An exploratory trial of *Cyclamen europaeum* extract for acute rhinosinusitis. *Laryngoscope.* 2012; 122(9): 1887-92.
 48. Laccourreye O, Werner A, Laccourreye L, Bonfils P. Benefits, pitfalls and risks of phytotherapy in clinical practice in otorhinolaryngology. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2017; 134: 95–9.
 49. Bachert C. Evidence-based management of acute rhinosinusitis with herbal products. *Clin Phytosci.* 2020; 6: 85.
 50. Zalmanovici Trestioreanu A, Barua A, Pertzov B. *Cyclamen europaeum* extract for acute sinusitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018; 5(5): CD011341.
 51. Fernández-Campos F, Clares B, Rodríguez-Lagunas MJ, Jauregui O, Casals I, Calpena AC. Ex-Vivo and In-Vivo Assessment of *Cyclamen europaeum* Extract After Nasal Administration. *Pharmaceutics.* 2019; 11(9): 426.
 52. Böttger S, Hofmann K, Melzig MF. Saponins can perturb biologic membranes and reduce the surface tension of aqueous solutions: A correlation? *Bioorg. Med. Chem.* 2012; 20: 2822–8.
 53. Pagare S, Bhatia M, Tripathi N, Pagare S, Bansal YK. Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2015; 9(3): 293-304.
 54. Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman MR, Wu H. The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiol Biochem.* 2020; 148: 80-9.
 55. Zaynab M, Fatima M, Abbas S et al. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb Pathog.* 2018; 124: 198-202.
 56. Yang L, Wen KS, Ruan X, Zhao YX, Wei F, Wang Q. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. *Molecules.* 2018; 23(4): 762.
 57. Lacaille-Dubois MA, Wagner H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine.* 1996; 2(4): 363-86.
 58. Juang YP, Liang PH. Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. *Molecules.* 2020; 25(21): 4974.
 59. Sharma P, Tyagi A, Bhansali P et al. Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food Chem Toxicol.* 2021; 150: 112075.
 60. Harvala C, Hylands P. Saponins from *Cyclamen hederifolium* and *C. graecum*. *Planta Med* 1978; 33(2): 180-4.
 61. Altunkeyik H, Gülcemal D, Masullo M, Alankus-Caliskan O, Piacente S, Karayildirim T. Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry.* 2012; 73(1): 127-33.
 62. Osterc G, Mikulic Petkovsek M, Stampar F, Kiproviski B, Ravnjak B, Bavcon J. Characterization of Various Color Parameters (Anthocyanins and Flavonols) of Leaves and Flowers in Different Autochthonous Genotypes of *Cyclamen purpurascens*. *J. AMER. SOC. HORT. SCI.* 2018; 143(2): 118–29.
 63. Ishizaka H. Breeding of fragrant cyclamen by interspecific hybridization and ion-beam irradiation. *Breed. Sci.* 2018; 68(1): 25-34.
 64. Ishizaka H, Yamada H, Sasaki K. Volatile compounds in the flowers of *Cyclamen persicum*, *C. purpurascens* and their hybrids. *Sci. Hortic.* 2002; 94(1-2): 125-35.

65. Stanojević Lj, Cvetković D, Savić S, Petrović S, Cakić M. Bioactive compounds and mineral composition of the aqueous extract from wild cyclamen (*Cyclamen purpurascens* Mill.) tubers. *Adv Technol.* 2018; 7(1): 5-10.
66. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian J Clin Biochem.* 2015; 30(1): 11-26.
67. Jakubczyk K, Dec K, Kałduńska J, Kawczuga D, Kochman J, Janda K. Reactive oxygen species - sources, functions, oxidative damage. *Pol Merkur Lekarski.* 2020; 48(284): 124-27.
68. Murat T, Seçme M, Mammadov R. Antioxidant and Anti-proliferative Activities of Different Parts of *Cyclamen cilicium*. *BAUN Fen Bil. Enst. Dergisi.* 2022; 24(2): 436-47.
69. Djukić M. Oksidativni stres. *Kliničko-dijagnostički značaj. Mono i Manjana;* 2008.
70. Zengin G, Mahomoodally MF, Sinan KI et al. Chemical characterization, antioxidant, enzyme inhibitory and cytotoxic properties of two geophytes: *Crocus pallasii* and *Cyclamen cilicium*. *Food Res Int.* 2020; 133: 109129.
71. Cornea-Cipcigan M, Bunea A, Bouari CM et al. Anthocyanins and Carotenoids Characterization in Flowers and Leaves of *Cyclamen* Genotypes Linked with Bioactivities Using Multivariate Analysis Techniques. *Antioxidants.* 2022; 11(6): 1126.
72. Metin H, Aydın C, Ozay C, Mammadov R. Antioxidant Activity of the Various Extracts of *Cyclamen graecum* Link Tubers and Leaves from Turkey. *J. Chem. Soc. Pak.* 2013; 35(5): 1332-6.
73. Murat T, Mammadov R. Antioxidant, Antimicrobial, Cytotoxic, Larvicidal and Anthelmintic Activities and Phenolic Contents of *Cyclamen alpinum*. *Pharmacol Pharm.* 2018; 9(4): 100-16.
74. Sofiane G, Wafa N. Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory activities development of methanol extract of *Cyclamen africanum* B. et R., growth in Jijel – Algeria. *J. drug deliv. ther.* 2020; 10(1-s): 130-4.
75. Sak D, Turan M, Mammadov T, Mammadov R, Ili P, Davidov M. Antioxidant biochemical and larvicidal activity of *Cyclamen hederifolium* extracts. *Fresenius Environ Bull.* 2022; 31(01/2022): 283-91.
76. Caliş T, Satana ME, Yürüker A et al. Triterpene saponins from *Cyclamen mirabile* and their biological activities. *J Nat Prod.* 1997; 60(3): 315-8.
77. Sajjadi ST, Saboora A, Mohammadi P. Comparison of aglycon and glycosidic saponin extracts of *Cyclamen coum* tuber against *Candida* spp. *Curr Med Mycol.* 2016; 2(2): 40-4.
78. Shafiei M, Abdi Ali A, Shahcheraghi F, Saboora A, Akbari Noghabi K. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Using the Combination of n-butanolic *Cyclamen coum* Extract and Ciprofloxacin. *Jundishapur J Microbiol.* 2014; 7(2): e14358.
79. Quave CL, Plano LR, Pantuso T, Bennett BC. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 2008; 118(3): 418-28.
80. Mansour O, Salamma R, Abbas L. Screening of antibacterial activity in vitro of *Cyclamen hederifolium* tubers extracts. *Res J Pharm Technol.* 2016; 9(11): 1837-9.
81. Boissa NH, Yaziji M, Salame R. Screening of antifungal activity in vitro of *Cyclamen hederifolium* tubers extracts. *Res J Pharm Technol.* 2016; 9(10): 1677-80.
82. Stanojević Lj, Cakić M, Stanojević J, Cvetković D, Danilović B. Aqueous extract of wild cyclamen tubers (*Cyclamen purpurascens* L.) - a potential source of natural antioxidants and antimicrobial agents. *Quality of Life.* 2018; 9(1-2): 13-9.
83. Cornea-Cipcigan M, Pamfil D, Radu Sisea C, Paula Gavri C, Graca Campos M, Margaoan R. A review on *Cyclamen* species: Transcription factors vs. Pharmacological effects. *Acta Pol. Pharm - Drug Research.* 2019; 76(6): 919-38.

84. El Hosry L, Di Giorgio C, Birer C et al. In vitro cytotoxic and anticlastogenic activities of saxifragifolin B and cyclamin isolated from *Cyclamen persicum* and *Cyclamen libanoticum*. *Pharm Biol.* 2014; 52(9): 1134-40.
85. Zhang DM, Wang Y, Tang MK et al. Saxifragifolin B from *Androsace umbellata* induced apoptosis on human hepatoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 362(3): 759-65.
86. Karagur ER, Ozay C, Mammadov R, Akca H. Anti-invasive effect of *Cyclamen pseudibericum* extract on A549 non-small cell lung carcinoma cells via inhibition of ZEB1 mediated by miR-200c. *J Nat Med.* 2018; 72(3): 686-93.
87. Beriat GK, Akmansu H, Gurpinar OA, Onur MA, Alhan A. The Cytotoxic Effect of Nasodren Nasal Spray (*Cyclamen Europaeum* Extract) in L929 Fibroblastic Cell Culture. *Turk. Klin. J. Med.* 2011; 31(2): 287-96.
88. Mihci-Gaidi G, Ozbey S, Orhan I et al. Triterpene saponins from *Cyclamen trocoperanthum*. *Planta Med.* 2010; 76(8): 818-21.
89. Meikle D.R, Sinnott H.N. *Cyclamen L.* In: Tutin. T. G., Heywood, W. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, H., Walters, S. M., A. D. Webb, D. A. (eds.). *Flora Europaea III.* Cambridge University Press. London, United Kingdom. 1972; pp. 25,26.
90. Hossain MA, Shah MD. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. *Arab J Chem.* 2015; 8(1): 66-71.
91. Baba S, Malik S. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *JTUMED.* 2015; 9(4): 449–54.
92. Jain D, Shrivastava S. Estimation of Total Phenolic, Flavonoid and Saponin Content in Different Extracts of *Butea monosperma* Bark. *IJETSRS.* 2017; 4(7): 177-82.
93. Dimitrijevic M, Stankov Jovanovic V, Cvetkovic J, Mihajilov Krstev T, Stojanovic G, Mitic V. Screening of antioxidant, antimicrobial and antiradical activities of twelve selected Serbian wild mushrooms. *Anal Methods.* 2015; 7(10): 1-15.
94. Özyürek M, Güçlü K, Apak R. The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement. *Trends Anal Chem.* 2011; 30(4): 652-64.
95. Tomovic D, Bukonjic A, Jevtic V et al. DNA binding, antibacterial and antifungal activities of copper(II) complexes with some S-alkenyl derivatives of thiosalicylic acid. *Transit Met Chem.* 2018; 43(2): 137-48.
96. Jurisevic M, Arsenijevic A, Pantic J et al. The organic ester O,O'-diethyl-(S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(3-cyclohexyl)propanoate dihydrochloride attenuates murine breast cancer growth and metastasis. *Oncotarget.* 2018; 9(46): 28195-212.
97. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2011; 8(1): 1-10.
98. Ullah S, Hussain SA, Shaukat F, Hameed A, Yang W, Song Y. Antioxidant Potential and the Characterization of *Arachis hypogaea* Roots. *Biomed Res Int.* 2019; 2019: 7073456.
99. Nawaz H, Aslam Shad M, Rehman N, Andaleeb H, Ullah N. Effect of solvent polarity on extraction yield and antioxidant properties of phytochemicals from bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. *Braz J Pharm Sci.* 2020; 56.
100. Petropoulos SA, Fernandes Â, Vasileios A, Ntatsi G, Barros L, Ferreira IC. Chemical composition and antioxidant activity of *Cichorium spinosum* L. leaves in relation to developmental stage. *Food Chem.* 2018; 239: 946-52.
101. Elgersma A, Søgaard K. Effects of species diversity on seasonal variation in herbage yield and nutritive value of seven binary grass-legume mixtures and pure grass under cutting. *Eur J Agron.* 2016; 78: 73-83.

102. Ioki-Assanga SB, Lewis-Luján LM, Lara-Espinoza CL et al. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum*. *BMC Res Notes*. 2015; 8(1): 396
103. Osterc G, Cunja V, Mikulic-Petkovsek M, Schmitzer V, Stampar F, Bavcon J. Foliage identification of different autochthonous common cyclamen genotypes (*Cyclamen purpurascens* Mill.) using various biochemical parameters. *Sci. Hortic*. 2014; 173: 37–44.
104. Majinda R. Extraction and Isolation of Saponins. *Methods mol. biol.* (Clifton, N.J.). 2012; 864: 415-26.
105. Yi C, Xie MY, Gong XF. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. *J. Food Eng.* 2007; 81(1):162-70.
106. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(7): 3380.
107. Özay C, Uluköy G, Mammadov R, Sayin Z. Radical Scavenging Activity and Antibacterial Effect of Three *Cyclamen* L. Tuber Extracts on Some Fish Pathogens. *J. Nat. Appl. Sci*. 2018; 22(2): 562-8.
108. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*. 1999; 12(4): 564-82.
109. Bouarab-Chibane L, Forquet V, Lantéri P, Clément Y, Léonard-Akkari L, Oulahal N et al. Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative structure–activity relationship) models. *Front Microbiol*. 2019; 10: 829.
110. Dong S, Yang X, Zhao L, Zhang F, Hou Z, Xue P. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Ind Crops Prod*. 2020; 149: 112350.
111. Takó M, Kerekes EB, Zambrano C et al. Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms. *Antioxidants*. 2020; 9(2): 165.
112. Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratne CJ, Koga-Ito CY. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: A review. *Front Microbiol*. 2015; 6: 1420.
113. Kojičić K, Arsenijević A, Marković M et al. Chemical and pharmacological characterization of aqueous and ethanolic extracts of *Cyclamen hederifolium* Ait. (Primulaceae) tuber. *Vojnosanit Pregl*. 2021; 78(5): 532–41.
114. Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2006; 27(5): 359-66.
115. Pfaller M. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. *Am J Med*. 2012; 125(1 Suppl): S3-13.
116. Tian Y, Pukanen A, Alakomi HL, Uusitupa A, Saarela M, Yang B. Antioxidative and antibacterial activities of aqueous ethanol extracts of berries, leaves, and branches of berry plants. *Food Res. Int*. 2018; 106: 291–303.
117. Dusen S, Aydin C, Gul HY, Ozay C, Dusen O, Mammadov R. In vitro cytotoxic activities of *Cyclamen* L. (Primulaceae) ethanol extracts from Turkey. *Fresenius Environ. Bull*. 2016; 25(12a/2016): 6224-8.
118. Podolak I, Galanty A, Sobolewska D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem Rev*. 2010; 9: 425–74.
119. Koczurkiewicz P, Czyż J, Podolak I et al. Multidirectional effects of triterpene saponins on cancer cells - mini-review of in vitro studies. *Acta Biochim Pol*. 2015; 62(3): 383-93.

Биографија аутора

Ксенија З. Обрадовић (рођена Којичић) је рођена 22.08.1992. у Крагујевцу. Основну школу „Светозар Марковић“ у Лапову завршила је са одличним успехом. Нижу музичку школу „Божидар Трудић“, одсек клавир, завршила је 2007. године. Средњу медицинску школу „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу, смер лабораторијски техничар, завршила је као носилац Вукове дипломе 2011. године. Уписала је Интегрисане академске студије фармације на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу школске 2011/12. године. Током средње школе и студија била је стипендиста Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Звање магистар фармације је стекла 2016. године - просечна оцена 9,38 и оцена 10 на дипломском испиту. Била је учесник 56. конгреса биомедицинских наука Србије одржаног 2015. године и Првог фармакотерапијског приступа одржаног 2016. године.

Постдипломске студије је уписала школске 2016/17. године на Факултету медицинских наука у Крагујевцу на смеру Истраживања у фармацији. Положила је усмени докторантски испит 30.10.2018. године са оценом 9. Дана 19. фебруара 2020. године на седници Наставно-научног већа Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу усвојен је Извештај о научној заснованости теме докторске дисертације под називом „Карактеризација биљних врста представника рода *Cyclamen* са подручја Србије – хемијска и фармаколошка анализа“.

Поседује лиценцу Фармацеутске коморе Србије и тренутно је запослена у Апотекарској установи „БЕНУ“. Течно говори енглески језик и познаје основе немачког језика. Познаје рад у више софтвера за стратешко управљање апотекама.

Аутор је више стручних радова у домаћим и страним часописима, као и сажетака на међународним и домаћим научним скуповима.

Библиографија

1. **Kojicic K**, Arsenijevic A, Markovic M et al. Chemical and pharmacological characterization of aqueous and ethanolic extracts of *Cyclamen hederifolium* Ait. (Primulaceae) tuber. *Vojnosanit Pregl* 2021; 78(5): 532–41.
2. Pinto D, Franco SD, Silva AM, Cupara S, Koskovic M, **Kojicic K**, Soares S, Rodrigues F, Sut S, Dall'Aqua S, Oliveira B. Chemical characterization and bioactive properties of a coffee-like beverage prepared from *Quercus cerris* kernels. *Food Funct.* 2019; 10: 2050-60.
3. Cirovic T, Radovanovic Barjaktarevic A, Ninkovic M, Bauer R, Nikles S, Brankovic S, Markovic M, Jovanovic V, Ilic M, Milovanovic O, **Kojicic K**, Cupara S. Biological activities of *Sanguisorba Minor* L. extracts - in vitro and in vivo evaluations. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research.* 2020; 77: 745-58.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Карактеризација биљних врста представника
рода *Susceia* са подручја Србије - хемијска и
фармаколошка анализа

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

у Крагујевцу, 2023. године,

Ј. Срећковић
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Карактеризација биљних врста предвабних
рода Суслови са подручја Србије - хемијска и
фармаколошка анализа

истоветне.

у Крагујевцу, 2023. године,

Н. Обрадовић
потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Ксенија З. Обрадовић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Карактеризација биљних врста представника рода
Суданеи са подручја Србије - хемијска и
фармаколошка анализа

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

у Трајчевицу, 2023. године,

Кодраговски
потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>