



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Драгица Бојовић

**Анализа хемијског састава и биолошке
активности шарпланинског чаја, *Sideritis*
scardica Griseb., Lamiaceae**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2012.

Садржај

Увод.....	4
ОПШТИ ДИО	
Циљеви.....	7
Хипотезе.....	8
Уопштено о секундарним метаболитима.....	9
Пут мевалонске киселине	10
Метаболички пут шикиминске киселине.....	13
Ацетогенински пут биосинтезе	15
Биосинтеза флавоноида.....	16
Етарска уља	19
Ботанички аспект рода <i>Sideritis</i> L. (Lamiaceae).....	23
Традиционална употреба биљака из рода <i>Sideritis</i>	28
Досадашња фитохемијска и фармаколошка испитивања	
врста рода <i>Sideritis</i>	29
Фитохемијска испитивања	29
Фармаколошка испитивања врста рода <i>Sideritis</i>	41
Анти-инфламаторна активност.....	41
Антиоксидативна активност	43
Гастропротективна активност.....	45
Аналгетична активност	46
Антипролиферативна активност	46
Анти-ХИВ дејство	46
Инхибиција холинестеразе	46
Селективна модулаторна активност рецептора естрогена.....	47
Антимикробна активност.....	47

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИО

Материјал и методе.....	50
Биљни материјал.....	50
Етарско уље добијено хидродестилацијом.....	50
Наткритична екстракција угљен диоксидом	50
Екстракција растварача (СЕ).....	51
Обиљежавање екстраката:	51
Реагенси:.....	52
Референтни HPLC стандарди:	52
Приноси екстракције	53
Кинетика екстракције НКЕ-СО ₂	54
Одређивање укупног садржаја фенола	54
Садржај танина	54
Укупан садржај флавоноида.....	55
HPLC анализа	55
Гасна Хроматографија (GC-FID)	56
Гасна -Хроматографија/Масена спектрометрија (GC-MS).....	56
Одређивање антиоксидативних својстава	57
Испитивање антиинфламаторне активности - тест едема на шапи пацова изазваног у експерименту са карагеном	57
Испитивање гастропротективног дејства	58
Животиње	59
Цитотоксична активност различитих екстрата	59
Статистичке анализе.....	60
Антимикробна активност.....	60
Резултати	62
Хемијски састав испитиваних узорка	62
Антимикробна активност.....	69
Процењивање антиоксидантне активности.....	72
Процењивање анти-инфламаторног својства	77
Процењивање гастро-протективног ефекта	79
Резултат цитотоксичне активности	81
Дискусија	85
Закључци	94
Литература	97

Увод

Љековите и ароматичне биљке представљају богат извор индустријских сировина, за фармацеутску, козметичку и прехранбену индустрију. Употребљавају се у изради хербалних лијекова, козметичких и хигијенских препарата, зачина, као биљних додатака за функционалну храну и др. У литератури је доста података који се односе на састав, дјеловање и примјену љековитог биља у отклањању тегоба насталих услед поремећаја здравља. Новија истраживања у области природних љековитих сировина биљног поријекла усмјерена су првенствено на упознавање и биљних врста, до сада непознатих као љековитих, као и на изучавање активних састојака, носилаца фармаколошке активности.

Све се више проучава улога компонената које се у малим количинама налазе у биљкама, а које могу ефикасно спријечити појаву хроничних обољења. Многе биоактивне компоненте су откривене у храни биљног поријекла, а међу њима фенолна једињења, која посједују антиоксидативна својства и показују благотворан утицај на здравље, смањујући ризик од упала, рака, остепорозе, и кардиоваскуларних болести. Иако је велики број љековитих биљка које се вјековима користе у традиционалној медицини, само је мали број фитохемијски испитан, а њихова фармаколошки употреба потврђена и оправдана опсежним испитивањима. Љековите биљке и даље представљају нов и важан извор једињења која се могу примијенити за различите фармаколошке циљеве. Осим тога, секундарни метаболити биљака и њихови полусинтетски деривати представљају основу за дизајн нових лијекова.

Једна од недовољно испитаних љековитих биљака, *Sideritis scardica* Griseb. Lamiales-шарпланински чај, која се одавнина употребљава у традиционалној медицини за ублажавање различитих тегоба је тема овог истраживања.

ОПШТИ
ДИО

Велики број биљака које су се у прошлости употребљавале у традиционалној терапији, данас представљају богат извор индустријских сировина, не само за фармацеутску, већ и за козметичку и прехранбену индустрију. Употребљавају се у изради хербалних лијекова, козметичких и хигијенских препарата, зачина, као биљних додатака за функционалну храну и др. И поред опсежних испитивања која се спроводе у свим крајевима свијета само их је дјелимично фитохемијски испитано и фармаколошки потврђена и оправдана употреба. Новија истраживања у области природних љековитих сировина биљног поријекла усмјерена су првенствено на упознавање и биљних врста, до сада непознатих као љековитих, као и на изучавање активних састојака, носилаца фармаколошке активности (1,2,3).

Данас је проучавање природних производа поново у жижи интересовања гдје љековито биље и даље представља нов и важан извор једињења која се могу примијенити за различите фармаколошке циљеве. Секундарни метаболити биљака и њихови полусинтетски деривати представљају основу за дизајн нових лијекова. То се нарочито односи на једињења која би била намијењена за лијечење имуносупресивних, анти-инфективних и метаболичких обољења. Последња декада се карактерише развојем спектроскопских техника за унапређење у области имунологије и ензимологије, у дефинисању сензитивнијих биоесеја који омогућавају утврђивање важних лијекова из природних извора, као и достигнућа о области успостављања корелација између структуре једињења и њихове активности (САР студије).

Још од средњег вијека позната је употреба етарских уља у фармацеутској, козметичкој, пољопривредној и прехранбеној индустрији. Познато је да етарска уља посједују антибактеријску, антифунгицидну, антиоксидантну и анти-инфламаторну активност. Најчешћа метода изолације етарских уља је хидродестилација (ХД). Иако је ријеч о веома једноставном процесу, хидродестилација има много мана: изазива термичку деградацију, хидролизу и солубилизацију одређених конститuenta етарских уља, због чега долази до промјене њихових органолептичких својстава. Екстракција помоћу органских растварача (СЕ) се често користи за изолацију активних компонената како би се сачувале термолабилна и веома нестабилна једињења. Недостатак је употреба органских растварача и могући резидуи који остају у успитиваним узорцима етарских уља. У новије вријеме неке друге технике представљају методе избора за екстракцију, не само етарских уља, већ и неких других активних компоненти из сложених биолошких система. Таква метода је

наткритична екстракција (НКЕ) угљен диоксидом. НКЕ је поступак екстракције флуидом који се налази у наткритичном стању - на температури изнад своје критичне температуре и на притиску изнад свог критичног притиска. Када се температура и притисак којима је изложена чиста течност повећавају, приближавајући се термодинамичној критичној тачки, долази до драстичних промена њених битних карактеристика. Физичке особине флуида у наткритичном стању налазе се између особина гасова и течности, што их чини погодним растварачима. Наткритични флуиди се одликују великом густином, блиском густини течности, што погодује њиховој моћи растварања. С друге стране, дифузивност наткритичних флуида је велика и блиска дифузивности гасова, што им омогућава лакоћу продирања у биљни материјал. Најчешће употребљавани наткритични флуид је угљен диоксид (CO_2). Угљен диоксид (критични услови = 30.9°C и 73.8 бар) је јефтин, не утиче лоше на окружење и познат је као стабилан. Наткритични CO_2 (НКЕ- CO_2) је приступачан због своје високе дифузивности и има лако промјенљиву јонску јачину. Још једна предност CO_2 је да је он у гасном стању на собној температури и под нормалним притиском, што чини регенерацију и добијање анализата једноставнијим(72). Поред тога, наткритична екстракција угљен диоксидом (НКЕ- CO_2) омогућава екстракцију једињења која су термолабилна или лако оксидишу. Главни недостатак НКЕ- CO_2 је његов ниски поларитет, проблем који се може превазићи употребом поларних модификатора (корастварача) који мијењају поларност наткритичних флуида и повећавају њихову моћ растварања.

Циљеви

Циљ рада је испитивање анти-инфламаторних и гастропротективних својстава екстрата биљке *S. scardica* како би се доказала поменута традиционална употреба, успостављање везе између испитиваних фармаколошких активности и фенолских конституената екстрата, узимајући у обзир претходна испитивања која су потврдила да су флавоноиди присутни у овој биљци биолошки моћни и активне супстанце.

Значај зацртаног циља је да се на основу фармаколошких и фармакогнозијских испитивања покаже оправданост употребе самоникле врсте *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae у традиционалној медицини. Формулација препарата намијењеног унутрашњој употреби за ублажавање тегоба код гастроинтестиналних обољења је крајни циљ овог рада. (2% суви екстракт *S. scardica* у меду са високим садржајем редуктивних шећера, минералних материја, ниским садржајем сахаризе и воде, које смањују стабилнос и ензимску активност меда

Циљ овог истраживања је:

1. Карактеризација хемијског састава етарског уља, етанолно-воденог, етарског, етилацетатног и н-бутанолног екстракта надземног дијела самоникле биљне врсте *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae
2. Спровести *in vitro* експерименте за утврђивање антиоксидативне, антимикробне активности испитиваних екстраката
3. Спровести *in vivo* експерименте за утврђивање антиинфламаторног и гастропротективног дјеловања испитиваних екстраката

Хипотезе

1. Резултати испитивања указују да су фенолна једињења, поред етарског уља, главни конституенси испитиваних екстраката
2. Резултати *in vitro* и *in vivo* тестова потврђују претпостављено биолошко дјеловање
3. Успостављање везе између квалитативног и квантитативног састава испитиваних екстраката и испољене биолошке активности.
4. Резултати *in vitro* и *in vivo* тестова потврђују оправданост коришћења испитиваних врста у традиционалној медицини

Општи дио овог рада обухвата приказ досадашњих фитохемијских и фармаколошких испитивања *Sideritis* врста, као и ботанички аспекти рода *Sideritis* L. (Lamiaceae)

Експериментални дио садржи опис цјелокупног поступка фармакогнозијских и фармаколошких испитивања.

Фармакогнозијска испитивања обухватила су анализе хемијског састава осушеног надземног дијела (herbe) биљке

Биљни материјал чине надземни дјелови самоникле врсте *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae сакупљени на Шар-планини (на планинском врху Љуботен на око 1300 м) за вријеме цвјетања

Испитивани узорци:

- **ЕО**, етарско уље добијено путем хидродестилације
- **ЕО-СО₂**, поларна фракција добијена наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида. Услови екстракције 10 МПа и 40°C, проток СО₂ је 0.67 kg/h.
- **АО-СО₂**, поларна фракција добијена наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида. Услови екстракције 30 МПа, проток СО₂ је 0.32 kg/h.

- фракције које се добијају сукцесивном екстракцијом употребом екстрагенаса различите поларности: **1-** сирови екстракт добијен екстракцијом помоћу етанола, **2-** екстракт добијен екстракцијом диетил етром; **3-** екстракт добијен екстракцијом етил ацетатом; **4-** н-бутанолни екстракт.

Урађене хемијске анализе секундарних метаболита:

- одређивање укупних фенола (Folin Coacalte методом),
- одређивање танина (према Eur pH 6.0),
- анализа флавоноида (HPLC методом)
- GC и GC-MS анализа испарљивих компоненти

Фармаколошка својства активних материја у екстрактима надземног дијела *Sideritis scardica* Griseb Lamiaceae потврђена су *in vivo* и *in vitro* испитивањима кроз анализу:

- Антиоксидативне активности (DPPH тест по Blois-y)
- Антимикробне активности (изражене преко МИЦ-Минималне вриједности инхибиторне концентрације)
- Антиинфламаторне активности (модификована метода по Ouyanguia и Satoa)
- Гастропротективног дјеловања (модел акутног стрес-улкуса на Wistar пацовима)

У дијелу **Резултати и дискусија** објашњени су фармаколошки ефекти испитиваних узорака у зависности од утврђеног хемијског профила.

У **Закључцима** је сумиран преглед резултат, са посебним освртом на оно што чини овај докторат јединственим и новим у овој области.

Уопштено о секундарним метаболитима

Осим производа примарног метаболизма (угљни хидрати, бјеланчевине, масти, нуклеинске киселине, витамина, минерала) који представљају основу животних процеса, у биљном свијету се синтетишу и друга веома важна једињења названа једним именом секундарни метаболити. Производи секундарног метаболизма представљају веома важно подручје научног истраживања и извор фармаколошки активних једињења значајних за фармацеутску и прехранбену индустрију. Секундарни метаболити путеви су код биљака изузетно сложени. Најчешће обједињују више различитих механизма који се међусобно испреплећу, вишефазни су, укључујући велики број ензима, ензимских система и укупну ћелијску организацију.

Најзначајнији биосинтетски путеви секундарних метаболита обухватају:

- Пут мевалонске киселине, којим настају изопреноиди (стероиди и терпеноиди).

- Метаболички пут шикиминск киселине, којим настају фенолна једињења и ароматичне аминокиселине.
- Биосинтезу из ацетата (ацетогенински пут), којим настају масне киселине, воскови, фосфолипиди, еикосаноиди, поликетиди (антрахинони, афлатоксини, макролиди), поликетиди мјешовитог поријекла (флавоноиди).
- Дивергентне путеве биосинтезе азотних једињења (алкалоида) из аминокиселина.

Пут мевалонске киселине

Терпени, терпеноиди или изотреноиди су најзаступљенији природни секундарни метаболити. Биосинтетски сви терпеноиди настају комбинацијом два прекурсора: из активираних мевалонских киселина (3,5-дихидрокси-3-метил-валеријанске киселине) настаје изопренилпирофосфата (IPP) и његов таутомер диметилаллилпирофосфат (DMAPP) (4).

На **Слици 1** је приказана биосинтеза диметилаллилпирофосфата (DMAPP) и изопентенилпирофосфата (IPP). Биосинтеза терпена почиње Claisen-овом кондензацијом два молекула ацетил-КоА, из којих уз помоћ ензима ацетил-КоА ацетилтрансферазе настаје ацетоацетил-КоА. Кондензацијом ацетоацетил-КоА с једним молекулом ацетил-КоА- β -хидрокси- β -метил-глутарил-КоА, под дејством хидроксиметилглутарил-КоА синтазе настаје хидроксиметилглутарил-КоА, из кога потом, под дејством HMG-КоА редуктазе, преко МВА-тиохемиацетала, настаје мевалонска киселина (МВА). Фосфорисавањем мевалонске киселине, под дејством мевалонат киназе и фосфомевалонат киназе настаје мевалонат-3-фосфат-5-пирофосфат, чијом декарбоксилацијом, под дејством мевалонат-5-дифосфатдекарбоксилазе настаје изопентенил-пирофосфат (IPP), који под дејством изомеразе даје диметилаллилпирофосфат (DMAPP) (Okada и сар., 2008).

DMAPP представља почетну јединицу на коју се адира IPP. Оваквим повезивањем (глава-реп) настају фосфорисовани $(C_5)_n$ алкохоли :

- геранилпирофосфат (GPP) као прекурсор монотерпена са C_{10} атома
- фарнезилпирофосфат као прекурсор сесквитерпена са C_{15} атома
- геранилгеранилпирофосфат као прекурсор дитерпена са C_{20} атома
- геранилфарнезилпирофосфат као прекурсор сесквитерпена са C_{25} атома (5)

Класификација терпеноида извршена је на основу броја молекула уграђених јединица 2-метил-1,3-бутадиена (изопрена) на:

- монотерпене (C_{10})
- сесквитерпене (C_{15})
- дитерпене (C_{20})
- тритерпене (C_{30})
- тетратерпене (C_{40})

Монотерпени (C_{10}), састоје се из десет С атома тј. двије изопренске јединице. Дијеле се према типу скелета и на основу функционалних група на ацикличне и цикличне који могу бити испарљиви (састојци су етерских уља) и неиспарљиви (иридоиди, агликони горких хетерозида и валепотријати),

Сесквитерпени (C_{15}), састоје се из десет С атома и три изопренске групе. Садрже фуранов прстен и грубом подјелом дијеле се на испарљиве (састојци етарских уља: мирте, бергамоте, ђумбира) и на неиспарљиве у облику сесквитерпенских лактона који у свом молекулу садржи γ -лактонски прстен.)

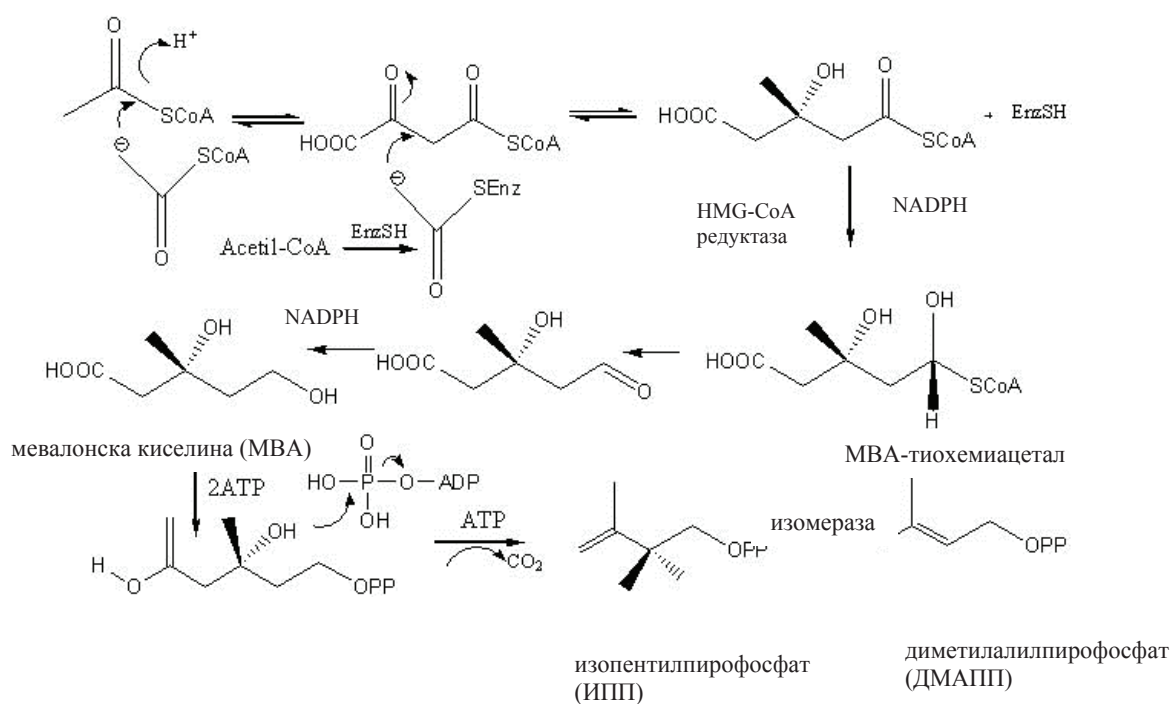
Дитерпени (C_{20}), састоје се из двадесет С атома и четири изопренске групе . Јављају се у виду : ди, три, тетрацикличних, рјеђе ацикличних једињења. Иако припадају секундарним метаболитима учествују у важним физиолошким процесима као што је регулација раста и одбрамбених механизма код биљака. Познати дитерпени : фитани, цембрани, лабдани, клеродани, пимарани, каурани, абиенани и тотарани. У биљкама се јављају као састојци смола и млечних сокова.

Тритерпени (C_{30}), састоје се из тридесет С атома и шест изопренских јединица. Све познате тритерпенске структуре биосинтетски су изведене из сквалана и сквалена гдје су 2 фарнезанске јединице повезане на начин реп-реп. Састојци су смола, јављају се као стероли, сапонини, агликони хетерозида.

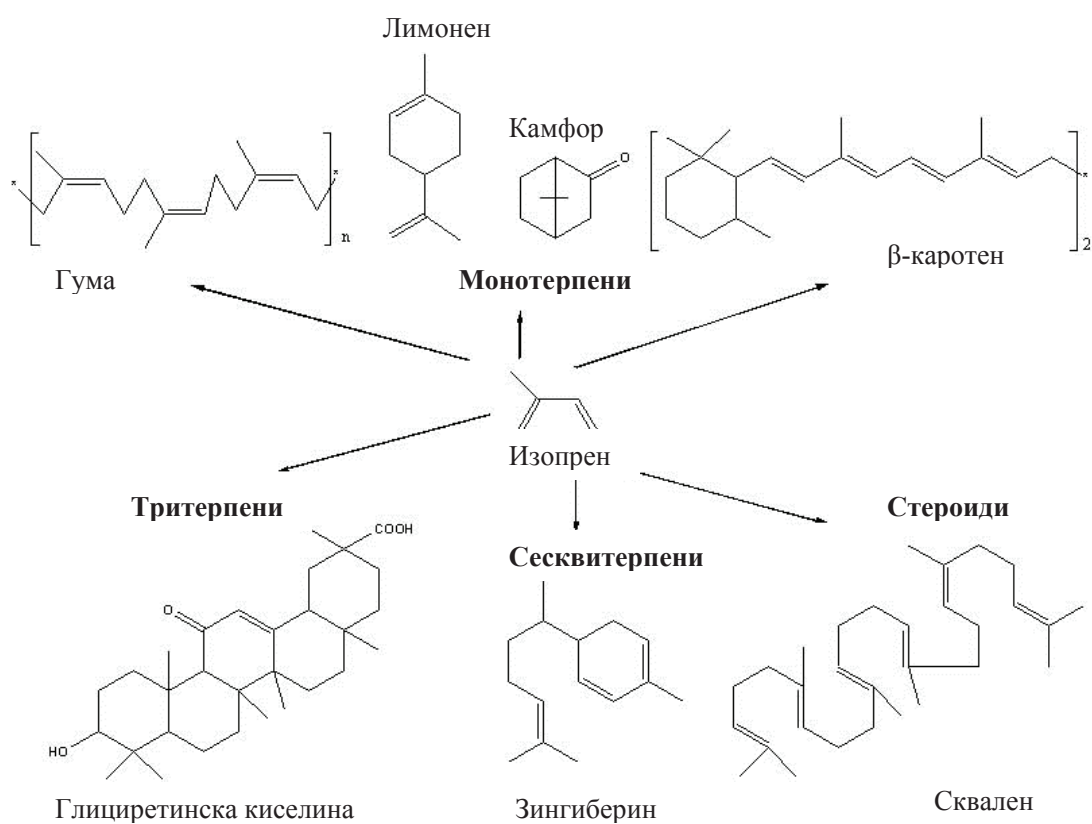
Тетратерпени (C_{40}), настали кондензацијом осам изопренских група. Најважнији представници природних тетратерпена су карденолиди, жути и наранџасти пигменти. Заједно са хлорофилом неопходни су у процесу фотосинтезе. Значајни су као провитами-ни А и природне боје.

Код основне јединице изопрена тј. молекула 2-метил 1,3 бутадиен, изопропил група представља „главу“, док етил остатак представља „реп“. Биосинтеза моно-, сескви- и дитерпена одвија се повезивањем изотренских јединица асиметрично „глава-реп“, док се три- и тетратерпени одступају од наведеног начина повезивања изопренских молекула кондезујући се симетричним везивањем „ реп-реп“.

На **Слици 2.** су приказани примјери једињења насталих биосинтетским путем мевалонске киселине, као представници различитих класа терпеноида.



Слика 1. Биосинтеза диметилаллилпирофосфата (DMAPP) из ацетил-КоА.

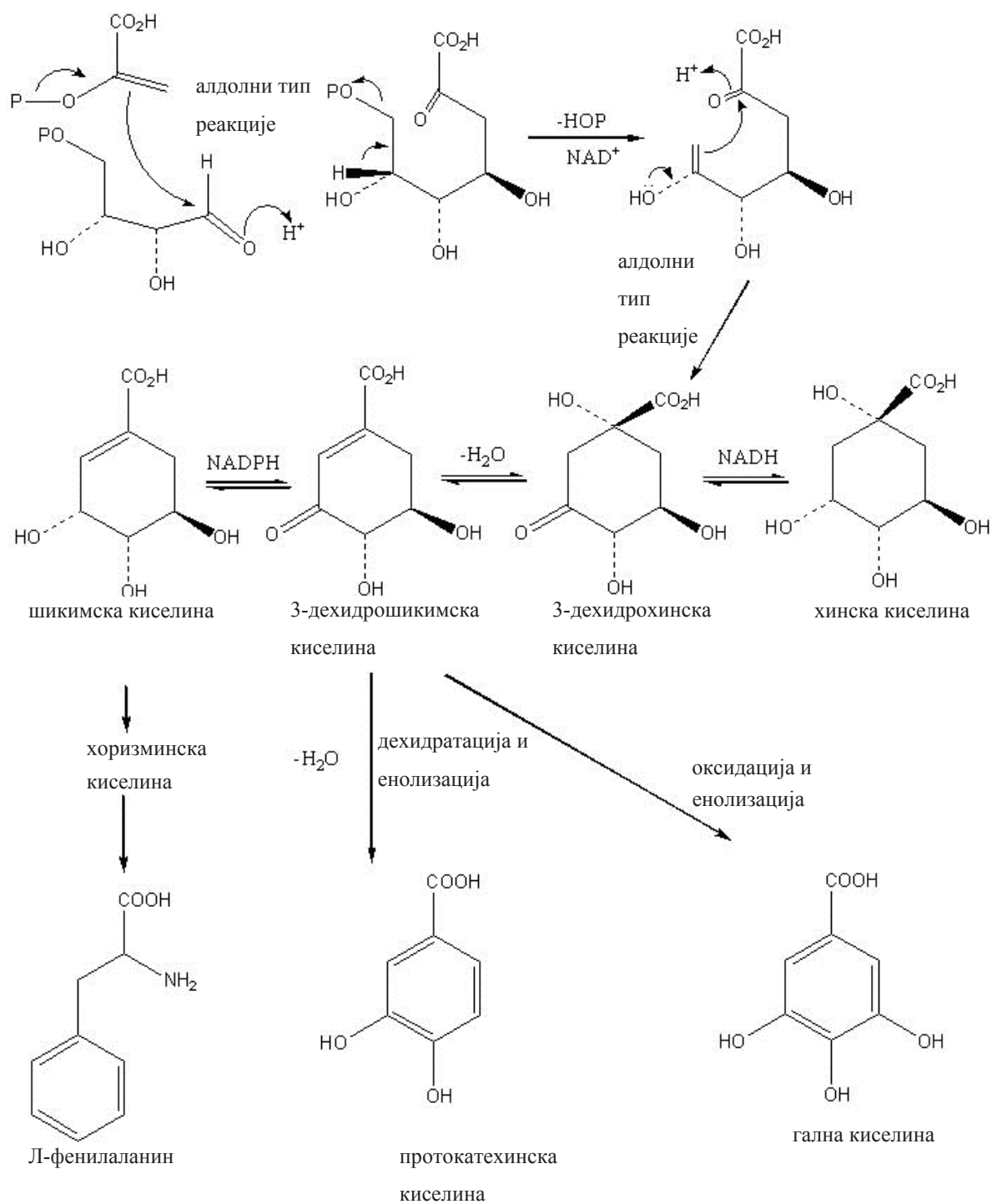


Слика 2. Примјери једињења насталих биосинтетским путем мевалонске киселине, као представници различитих класа терпеноида

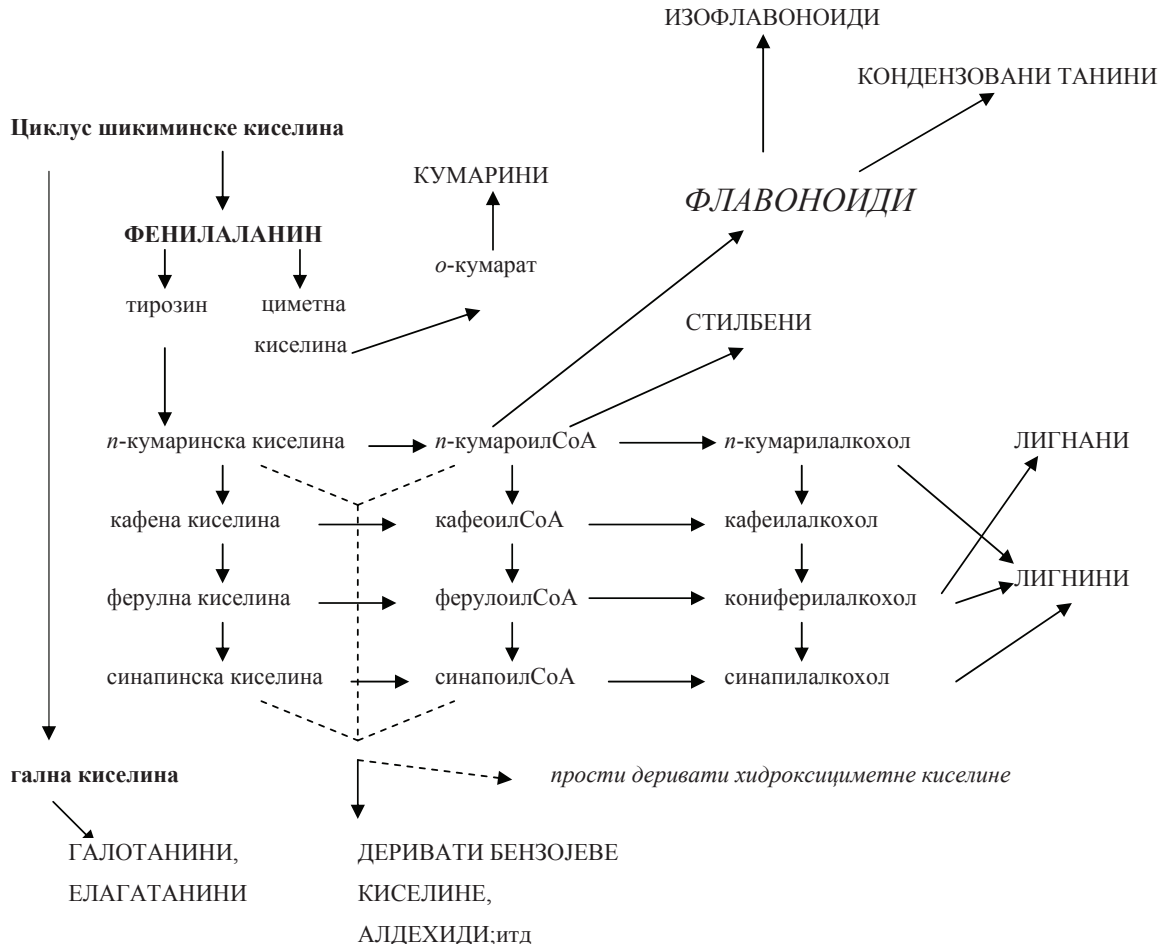
Метаболички пут шикиминске киселине

Метаболички пут шикиминске киселине представља главни хемизам биосинтезе фенолних једињења у биљкама, при чему поред настајања ароматичних аминокиселина као међупроизвода настаје гална, протокатехинска и циметна киселина (**Слика 3.**). Циклус почиње реакцијом фосфоенолпирувата (PEP) и Д-еритроза-4-фосфата у којој настаје 3-дезокси-Д-арабино-7-фосфат-хептулосонска киселина (DAHP). Низом веома сложених биохемијских реакција настаје шикиминска киселина из које настаје фенилаланин. (6)

Фенилаланин, настао током циклуса шикиминске киселине, деаминацијом у присуству фенилаланинамонијумлиазе даје циметну киселину, која се даље трансформише до осталих $C_6 - C_3$ фенилпропаноида, кумаринске, кафене, ферулне и синапинске киселине и њихових деривата. (7) (**Слика 4.**). Кумарини настају из циметне киселине преко *транс*-2 кумаринске киселине, циклизацијом која обухвата неензимску трансформацију природног *транс*-облика у *цис*-изомер. Редукцијом ферулне киселине настаје кониферил алкохол, важан прекурсор лигнина.



Слика 3. Биосинтеза фенолних једињења циклусом шикимске киселине



Слика 4. Шематски приказ поријекла различитих фенолних једињења из једноставних фенилпропаноида

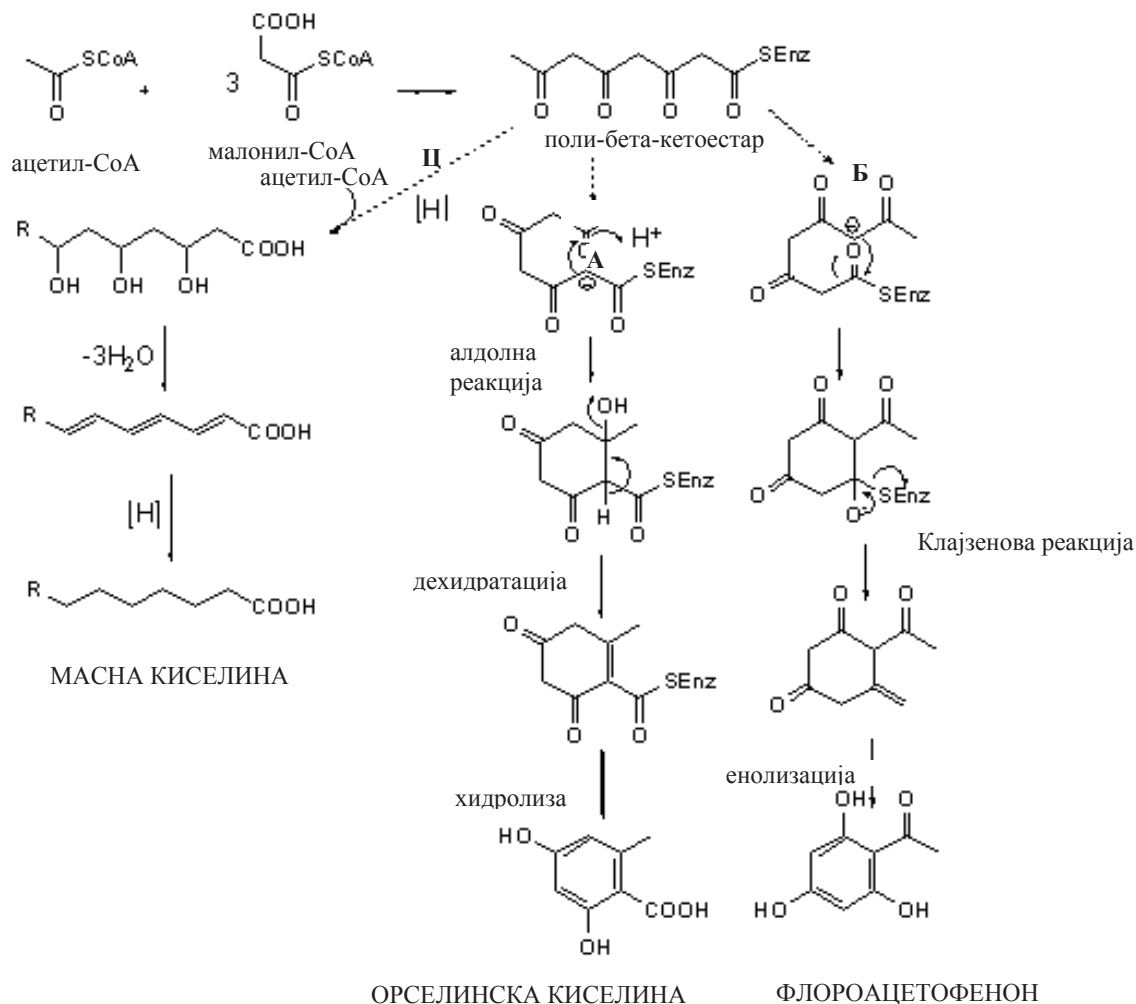
Ацетогенински пут биосинтезе

Осим поменуте двије могућности биосинтезе секундарних метаболита, фенолна једињења у биљкама могу настати и ацетогенинским путем. На овај начин настају хромони, изокумарини, орциноли, депсиди, депсидони, ксантони, хинони.

Биосинтеза почиње карбоксилацијом ацетил - CoA уз присуство ацетил- CoA карбоксилазе у малонил – CoA, након чега кондентацијом једног молекула ацетил – CoA и три молекула малонил – CoA уз присуство каталитичких ензима настаје поли-бета-кетоестар (**Слика 5.**)

Код насталог поли- β -кетоестар са четири ацетатне групе одвија се три типа реакција, А, Б и Ц. Код реакције А при алдолној реакцији гдје енолни облик алдехида или кетона реагује са карбонилним α -угљеником другог молекула у базној или киселој средини настаје преко алкохола, алкена ароматични прстен гдје даљом хидролизом настаје орселинска киселина. Код реакције Б при Клајзеновој кондензацији гдје низом реакција пре-

ко формирања β -кето естра или β -дикетона настаје флороацетофенон. Код реакције Ц поли- β -кетоестар може да се редукује до масних киселина (палмитинске, стеаринске) или коришћењем ацетата са обележеним ^{14}C -атомом настају поликетиди (антрахинони, афлатоксини, макролиди) (8)



Слика 5. Ацетогенински пут: биосинтеза орселинске киселине и флороацетофена.

Биосинтеза флавоноида

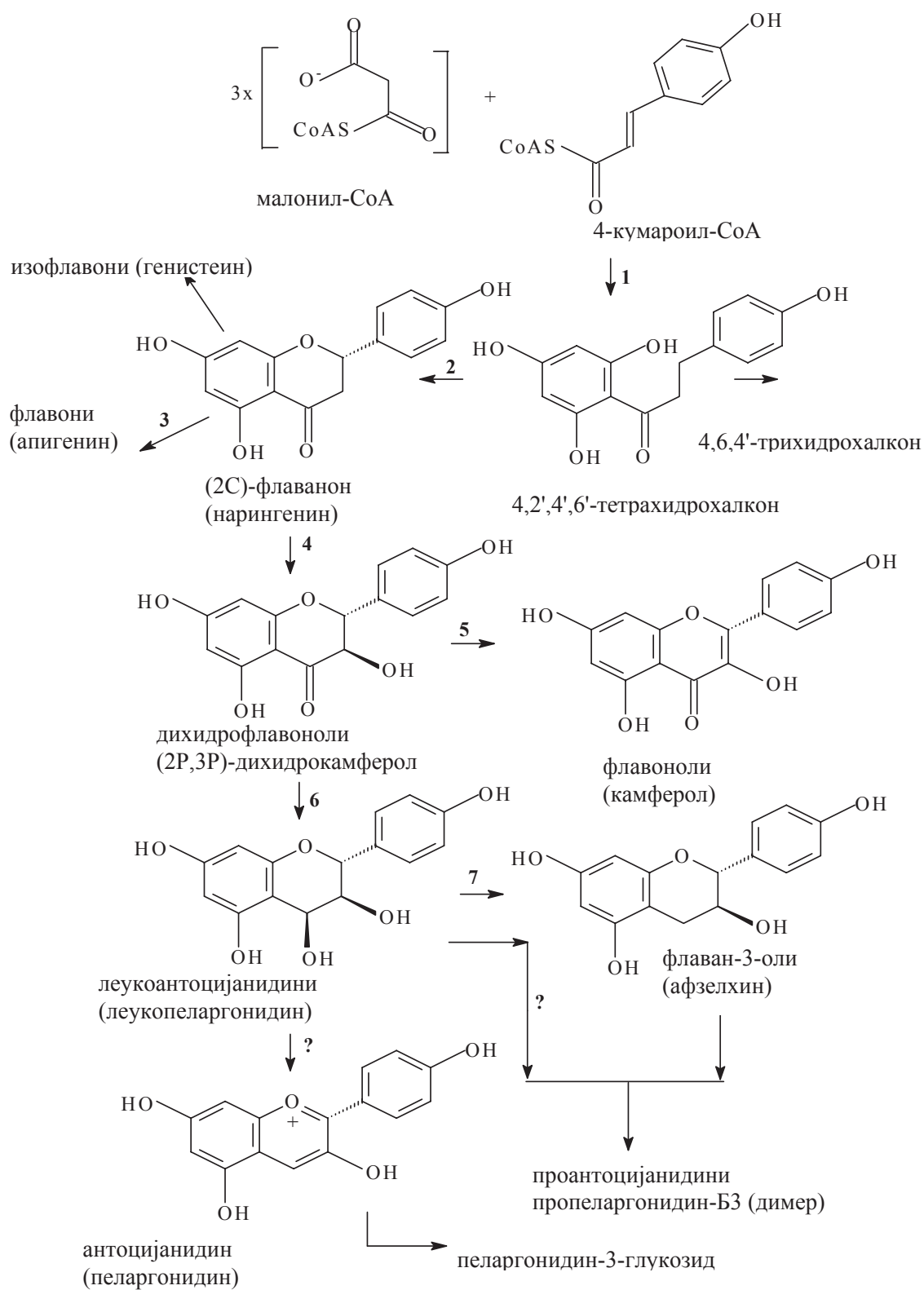
Флавоноиди су полифенолна органска једињења секундарног метаболизма биљака. Јављају се као слободна једињења или у облику хетерозида. Основни костур флавоноида састоји се од 15 C- атома који су распоређени у два ароматична, бензоева прстена (A и B) повезани мостом преко C-3 атома. На основу степена оксидације на C-3 атому настају антоцијани, флавои, флавонои, изофлавои. Сматра се да су деривати бензо- γ -пирона (хромона). Деривати 2-фенил-хромона су прави флавоноиди: флавои, флавонои, дихидрофлавои и дихидрофлавонои. Деривати 3-фенил-хромона су изофлавоноиди. **Слика 6.**

У флавоноиде у ширем смислу убрајају се и друга полифенолна једињења:

- деривати флавана: катехини (флаван-3-оли), леукоантицијанодини (флаван-3,4-диоли)
- антоцијанидини (флавилијум соли)
- халкони и аурони

Биосинтеза бензо- γ -пиронског прстена А настаје из три ацетатне јединице настале путем из малонске киселине а прстена В из циметне преко фенилаланина путем синтезе из шикиминске киселине. (9)

Структурна разноликост флавоноида резултат је бројних модификација основне скелетне структуре које су условљене реакцијама хидрогенације, хидроксилације, О-метилације хидроксилних група, димеризације, везивања неорганског сулфата и гликолизацијом хидроксилних група (О-гликозиди) или флавоноидног језгра (С-гликозиди). (10)



Слика 6. Биосинтеза флавоноида у биљкама

По физичко-хемијским особинама флавоноиди су растворљиви у води, етанолу и другим поларним органским растварачима. Имају способност флуоресценције што се може искористити за квалитативну анализу. Флавоноиди имају специфичан спектар апсорпције, најчешће са два максимума:

- Трака 1 од 300-380nm потиче од прстена В
- Трака 2 од 240-280nm потиче од прстена А

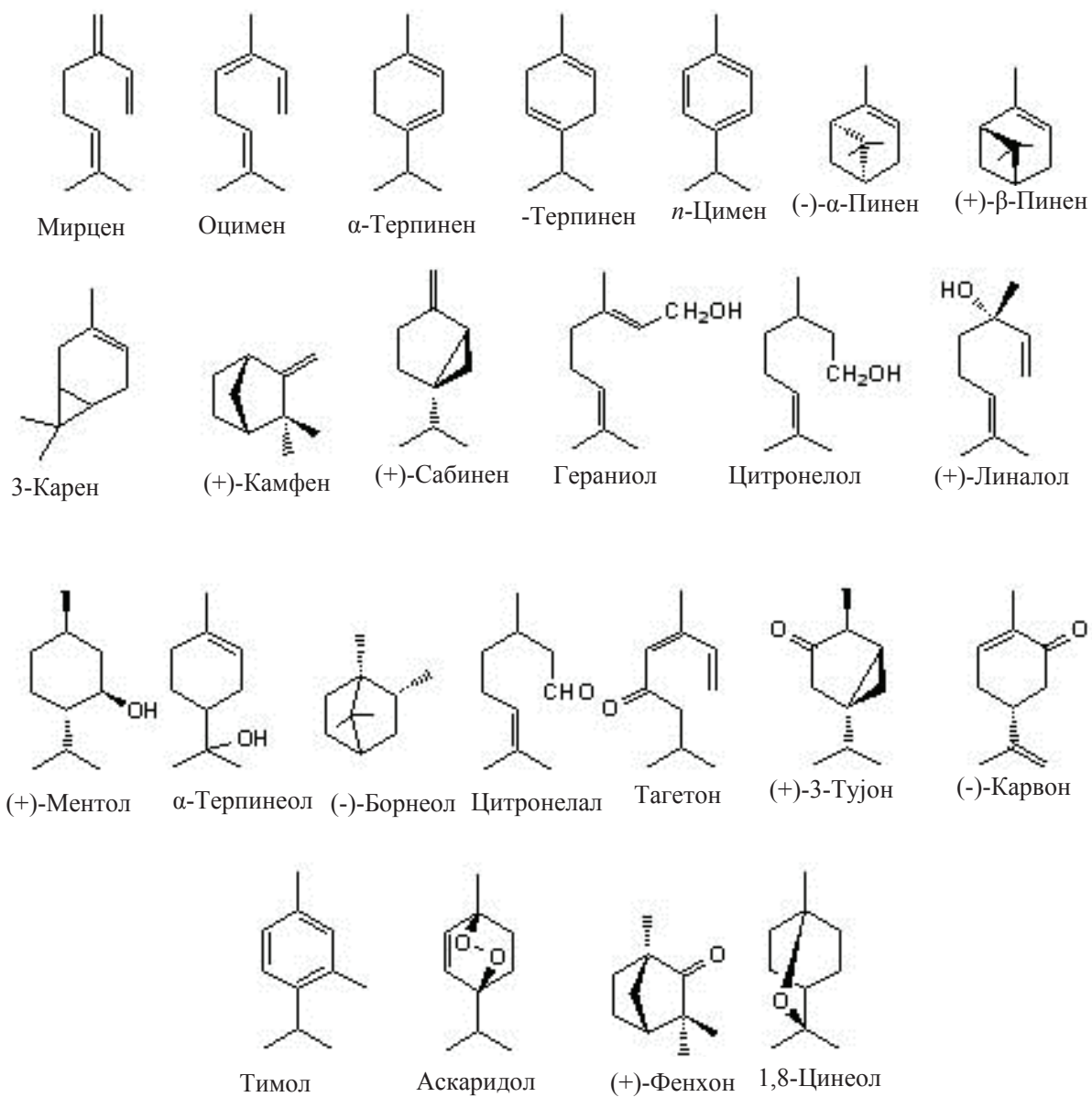
За изоловање и пречишћавање флавоноида користе се различите сепарационе технике (TLC, CC, HPLC, SE). За карактеризацију изолованих једињења користе се различите спектралне анализе (UV, MS, IR, NMR), као и одговарајуће сепарационе технике у комбинацији са стандардним супстанцама.

Флавоноиди испољавају широк спектар профилактог и терапијског дјеловања, које одавно привлачи пажњу истраживача у циљу даљег изучавања и формулисања нових фитопрепарата. Доказана њихова дјеловања су: антиинфламаторно, антимикробно, антиоксидативно, антихепатотоксично, диуретично, антитуморно и друга.

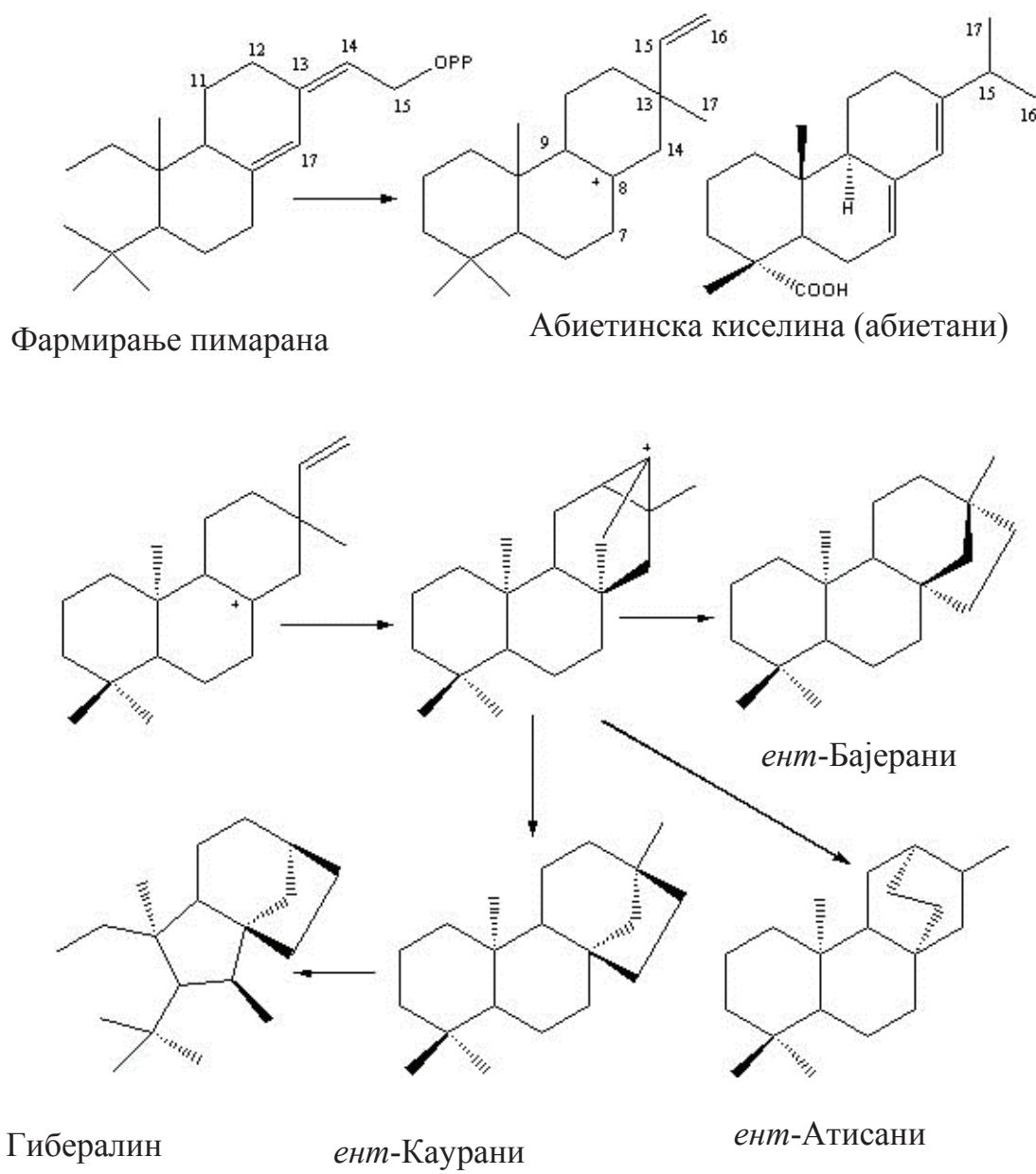
Групи полифенолних једињења припадају и танини. Хидролизирајући танини су полиестри галне киселине (или њених деривата) и молекула шећера. Гална киселина настаје из шикиминске киселине. Кондензовани или катехински танини настају метаболизмом ацетата током биосинтезе флавоноида.

Етарска уља

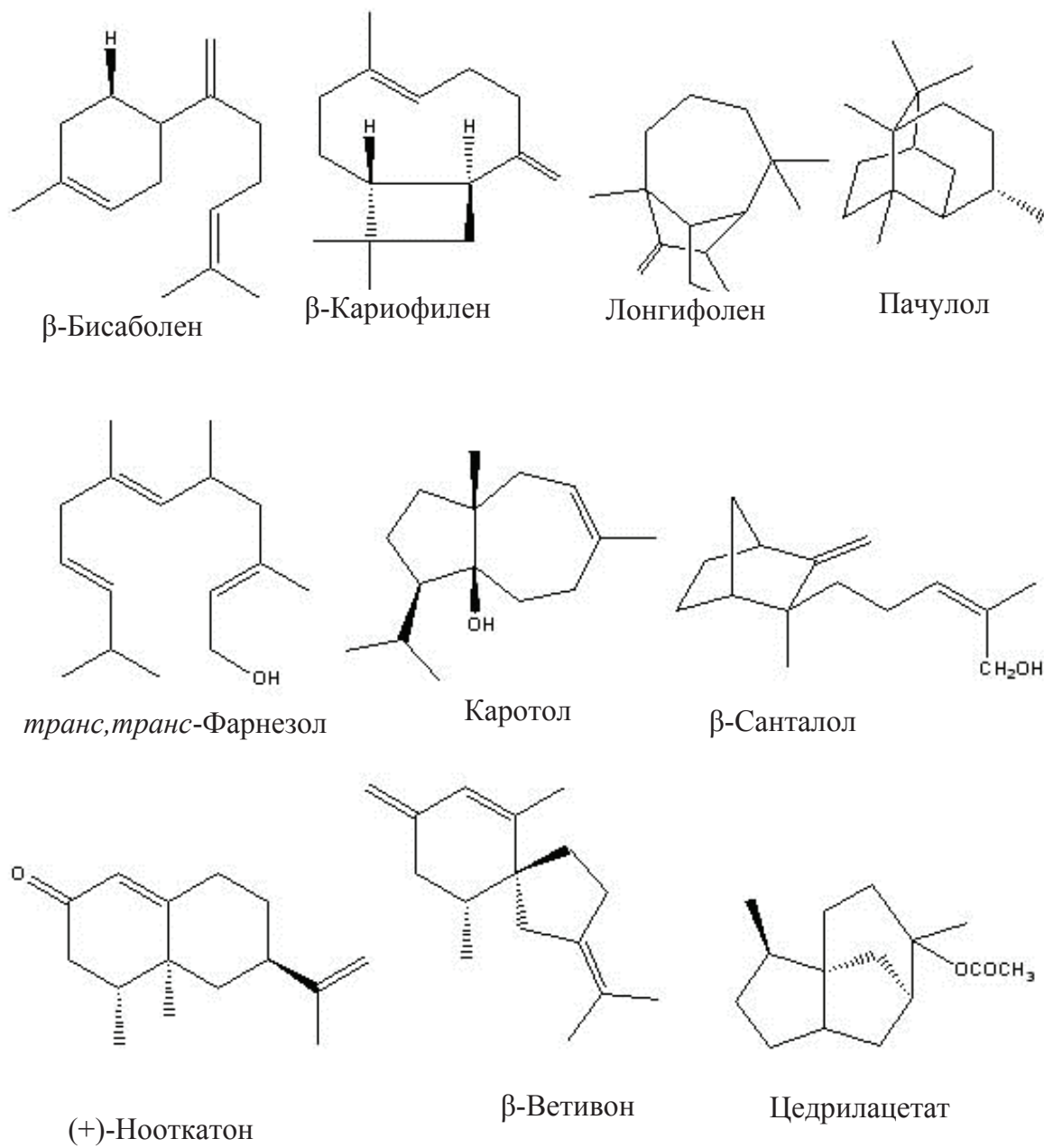
Етарска уља су продукти секундарног метаболизма углавном виших бољака. Сјмеше су двије различите класе једињења : терпена (испарљиви моно-, ди- и сесквитерпени) и фенилпропанских једињења. **Слике 7, 8 и 9.** По физичко-хемијским карактеристикама су липофилни, не растварају се у води, растварају се у неполарним органским растварачима, етанолу, мастима и масним уљима. Оптички су веома активна једињења, скрећу угао поларизоване свјетлости. Испољавају антимикробно, спазмолитичко, рубефацијентно дјеловање. (11)



Слика 7. Монотерпенски састојци етерских уља



Слика 8. Основне структуре дитерпена



Слика 9. Сесквитерпенски састојци етрских уља

Фитохемијске студије *Sideritis* врста обухватају изучавања различитих екстраката надземних дјелова, етарског уља и изолованих једињења као што су дитерпеноиди, флавоноиди или фенилпропаноидни гликозиди, као једињења која су носиоци активности. Ова истраживања омогућавају да се спровођењем фармаколошки осмишљених експеримената оправда традиционална примјена ових биљака, као и евентуална употреба ових биљака и њихових екстраката у третману неких обољења за које традиционално није позната употреба биљака овог рода. У последњих неколико година, у оквиру спроведених бројних и исцрпних истраживања, једињења као што су иридоиди, кумарини, лигнани, као и фенилпропаноидни гликозиди изоловани су и идентификовани у екстрактима ових биљака. Резултати су показали да етерска уља дјелују као добри антимикробни агенси и да дјелују на грам-позитивне и грам-негативне бактерије и гљивице. Дитерпеноиди су показали антимикробно, антиинфламаторно дјеловање, а доприносе и одбрани биљака од биљоједа. Флавоноиди дјелују као анти-улцерозни, антиинфламаторни и антиоксидативни агенси. Будућа истраживања требало би да буду усмјерена на испитивања фармаколошких активности изолованих једињења, у циљу проналажења нових активних принципа и објашњавања механизма њиховог дјеловања. Поред тога, истраживања не би требало ограничити само на потврду традиционалне употребе биљака рода *Sideritis*, већ би било занимљиво истражити могућност њихове употребе за нова индикациона подручја. Недавне студије су показале да дитерпени и неки дитерпенски деривата показују анти ХИВ дјеловање, а посједују и антипролиферативни ефекат.

Ботанички аспект рода *Sideritis* L. (Lamiaceae)

У свјетској флори, породица уснатица (Lamiaceae) је заступљена са 264 родова и преко 3200 врста, распрострањених готово по читавој земљиној кугли. Ипак, највеће богатство и диверзитет родова и врста забиљежени су у Медитерану. Врста *Sideritis scardica* Griseb., у народу позната као шарпланински чај (планински чај, грчки чај) самоникло је заступљена на локалитетима Србије, Косова, Македоније, Грчке, Италије.

Велики број врста у оквиру рода *Sideritis*, њихова изражена тенденција међусобног укрштања разлог је спровођења обимног истраживања у циљу разјашњавања контраверзних чињеница везаних за ботаничку класификацију овог рода.

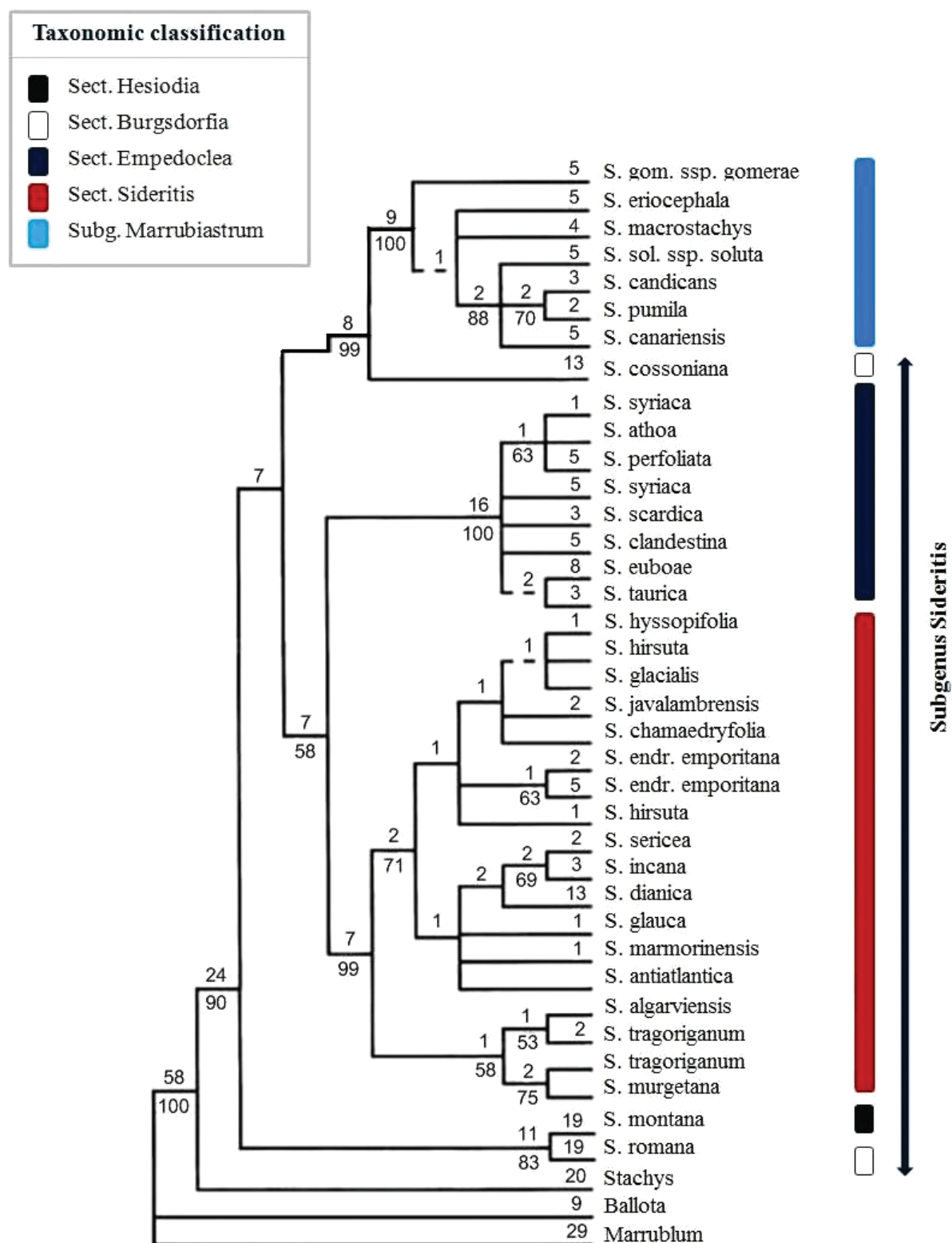
Род *Sideritis* L. (Lamiaceae) обухвата око 150 врста вишегодишњих и једногодишњих биљних врста широко распрострањених на подручју Медитерана, заједно са Канарским и Мадеира острвима, као и у умјереним зонама Азије. Генус *Sideritis* L. припада породици Lamiaceae Lindl (Labiatae Juss.) која је једна од најчешћих заступљених у биљном свијету. Родови породице Lamiaceae заступљени су на стаништима различитих надморских виси-на од Сјеверног пола, Хималајима, на североистоку Азије до Хаваја, Аустралије, Африке и Америке. Међутим, главно станиште је Медитеранска област. На основу структуре по-

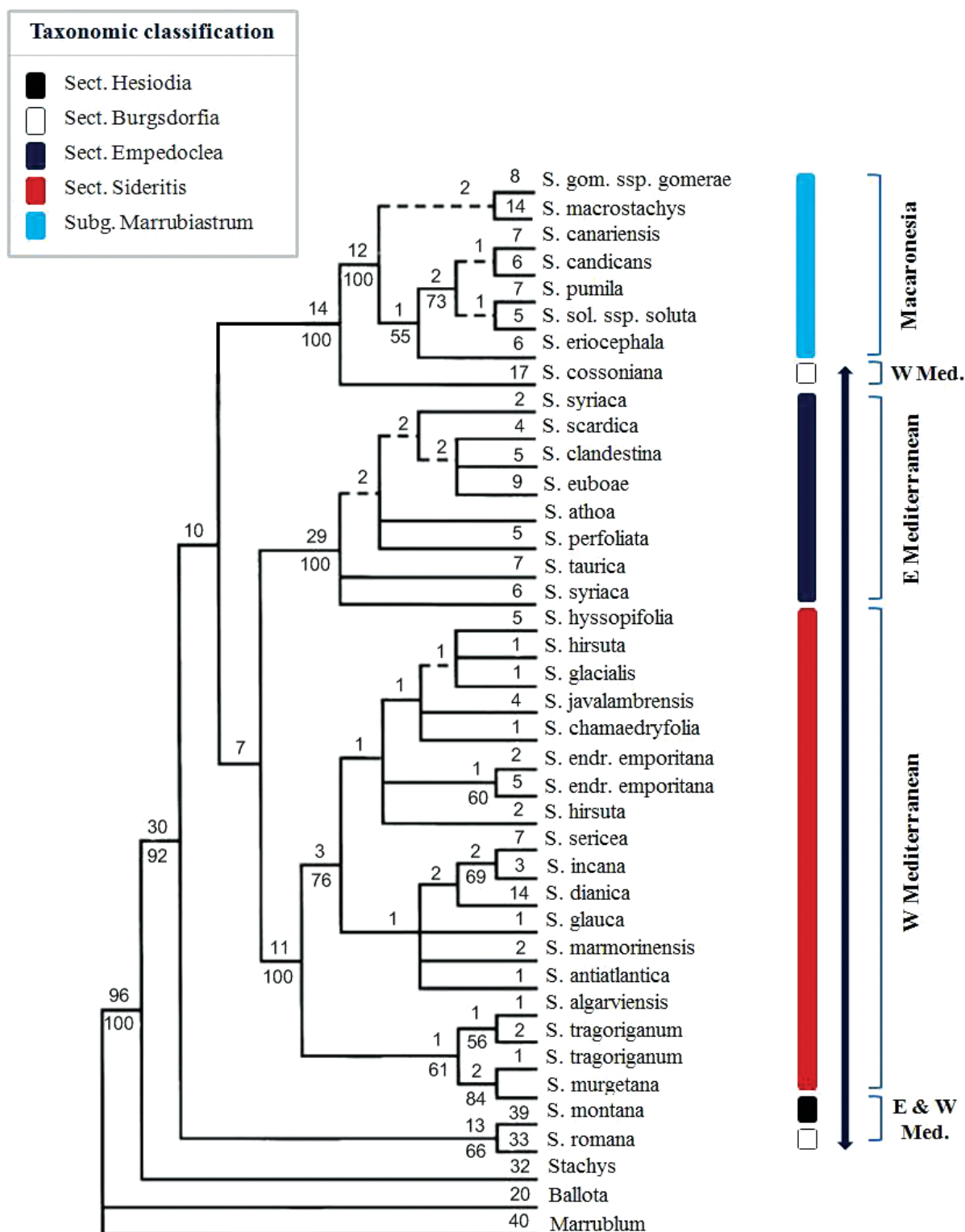
лена, Хејвуд је род *Lamiaceae* подијелио у двије подфамилије - *Lamioideae* и *Nepetoideae*. Биљке из подфамилије *Lamioideae* карактерише ниска концентрација етарских уља, недостатак розмаринске киселине и присуство иридоидних гликозида, док су биљке, сврстане у подфамилију *Nepetoideae*, богате етарским уљима, розмаринска киселина је присутна у различитим процентима и не садрже иридоидне гликозиде.

Таксономија рода *Sideritis* је прилично сложена и није ријешена на задовољавајући начин, због изражене хибридизације између врста овог рода. Овај род је подијељен на два суброда *Sideritis* и *Marrubiastrum* који се састоје од европских и макаронезијских врста. Макаронезијски флористички регион обухвата пет архипелага у Атлантском океану: Азори, Мадеира, Селваген, Канарска и Зеленортска острва и налази се између 15° и 40° сјеверне географске ширине. Док су нека од наведених острва блиска по својим географским карактеристикама са другим острвима у Пацифику, друга су сличнија континенталним областима - на пр. острво Фуертевентура само 100 км раздваја од копна Африке. Ове биљке показују широк спектар разноликости у погледу морфолошких карактеристика. Други, много већи подрод *Sideritis*, садржи око 125 врста и годишњих и вишегодишњих врста, од којих је већина цвјетница, са центром распрострањености у Медитерану и сјеверној Африци. Састоји се од четири подрода, од којих два, *Hesiodia* и *Burgsdorffia*, представљају мале групе које садрже само једногодишње врсте, распрострањене широм Медитерана и Централне Азије. Преостала два подрода, секције *Sideritis* и *Empedoclia*, садрже вишегодишње цветнице распрострањене по западном (посебно Иберијско полуострво) и источном Медитерану (Балканско полуострво, Турска, Сирија), иако је познато да се неколико врста налази и у евроазијском дијелу и на Средњем Истоку. (12,13,14)

Секција *Sideritis* садржи врсте распрострањене у западним дјеловима Медитерана јужне Европе и сјеверне Африке. Станиште врста секције *Empedoclia* су земље источног Медитерана (Грчка, Турска) и Блиског истока (Израел, Либан, Палестина, Ирак, Сирија). Морфолошки, врсте ове двије секције се разликују по назубљеним/игличастим брактејама и четвоространим поленом који карактеришу секцију *Sideritis*, насупротив цијелим брактејама и шестостраним полену код врста секције *Empedoclia*. (15)

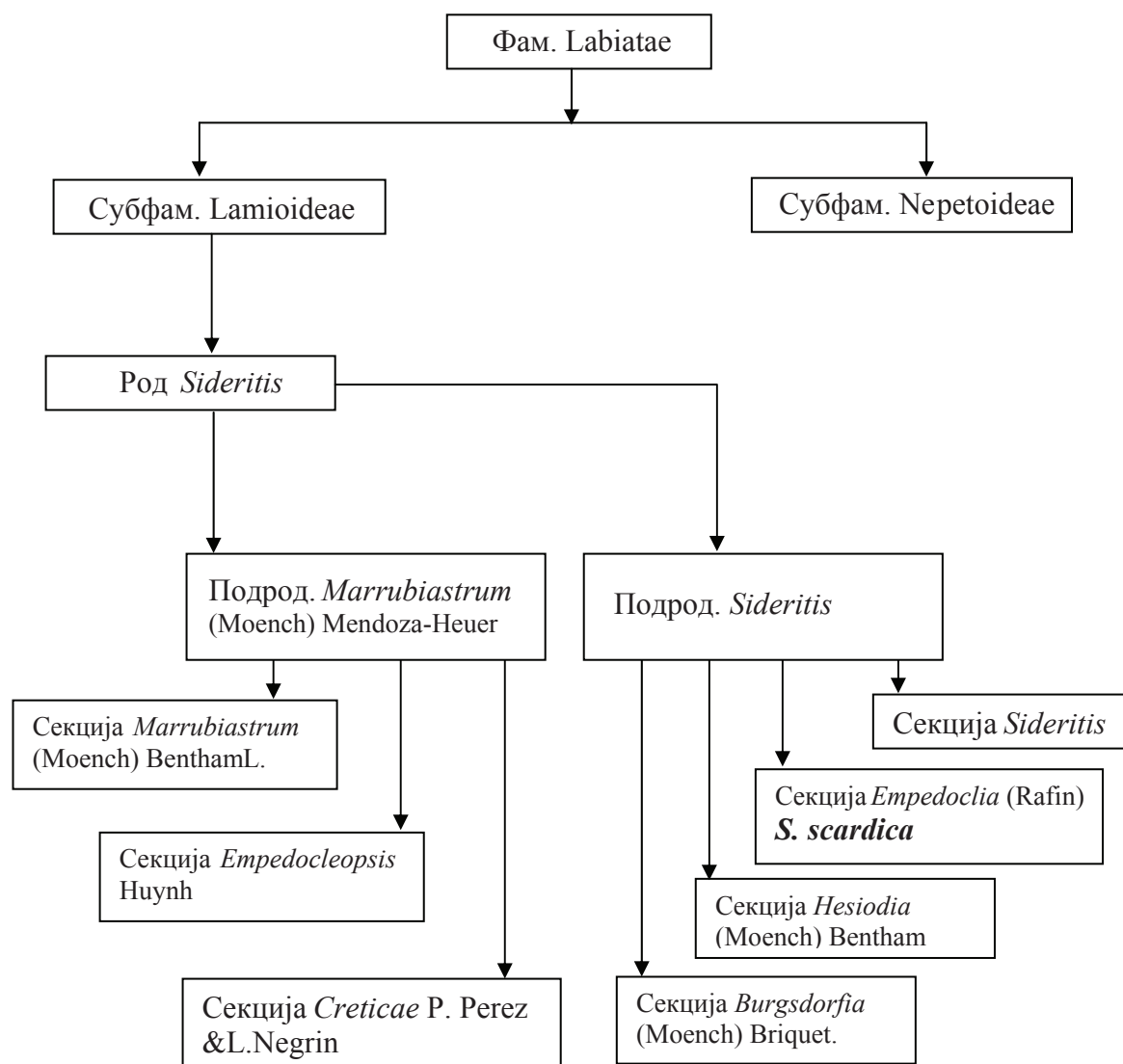
Слике 10 и 11. (Слике преузете из *Systematic Botany*, Vol. 25, No. 4 (Oct. - Dec., 2000), pp. 633-647, Janet C. Barber, Javier Francisco Ortega, Arnoldo Santos-Guerra, Aguedo Marrero, Robert K. Jansen Source.

Слика 10. Таксономска класификација рода *Sideritis*



Слика 11. Распрострањеност врста рода *Sideritis* у складу са његовом таксономском класификацијом

Род *Sideritis* садржи велики број ендемичних врста: у Турској, од 46 врста, 12 подврста и двија врста расте у Мароку, од којих је 16 ендемита. На Иберијском полуострву и Балеарским острвима распрострањено је 49 *Sideritis* врста, од којих је 36 ендемичних, а на Канарским острвима свих 19 врста су ендемскити. Од 28 *Sideritis* врста описаних у Флори Европе, 22 аутохтоно расту у Шпанији укључујући и *S. hirsuta*. Родови заступљени у Бугарској припадају генусима *Empedoclia*: *S. scardica* Griseb. и *S. syriaca* L. (*S. taurica* Steph. Ex Wild) и *Hesiodia*: *S. montana* L. и *S. lanata* L. *Sideritis scardica* је ендемична врста Балканског полуострва, заступљена је у Македонији, Бугарској, Албанији и Грчкој. Вудворд је у Флори Европе описао врсте заступљена у флори Грчке: *S. athoa*, *S. scardica*, *S. raeseri* subsp. *raeseri*, *S. clandestina*, *S. ozturkuii*, *S. euboea* and *S. syriaca*. *S. raeseri*, *S. scardica* и *S. montana* су распрострањене у флори Македоније. Положај врсте *S. scardica* у оквиру фамилије Lamiaceae и рода *Sideritis* приказан је на **Слици 12.** (16,17,18,19)



Слика 12. Положај врсте *S. scardica* у оквиру фамилије Lamiaceae и рода *Sideritis*

Традиционална употреба биљака из рода *Sideritis*

Надземни дјелови биљака из рода *Sideritis* познати су по примјени у традиционалној медицини у облику декокта или инфуза, а намијењени су унутрашњој или спољашњој употреби. Примјена *Sideritis sp.* углавном је ограничена на народну медицину, али је све веће и веће присуство *Sideritis sp.* у биљним лијековима и све је већи број рецептура које садрже *Sideritis sp.*

Традиционална медицина препознаје употребу водених припремака од биљака овог рода, припремљених као водени екстракти - чајеви (инфуз) који се употребљавају као фитопрепарати са антиоксидантним, антиинфламаторним, антиулцеративним, антимикробним, аналгетичким, антиконвулзивним и карминативним дјеловањем (20).

Региони у којима су распрострањене врсте овог рода имају специфичне називе за њих.- У Шпанији су познати као “*rabo de gato*” или “*zahare ña*”, који се односе на најстарији народни назив за врсте *S. hirsuta* или *S. arborescens*. У Турској *Sideritis* врсте су познате под називом “*dag sağı, yayla sağı*”. Код нас је одомаћен назив „планински чај“ или „шарпланински чај“ за врсту *S. scardica*, с обзиром на високопланинске области у којима расте. Различити биљни дјелови имају различит начин употребе: на примјер инфузи надземних дјелова се примењују због својих гастропротективних својстава, док декокти листова су намијењени, прије свега, за третирања инфламација и реуматских тегоба. Водени екстракти стабљике се екстерно примјењују као дезинфицијенси рана и опекотина. У земљама Балканског полуострва, надземни дјелови врста овог рода се примјењују за ублажавање гастроинтестиналних поремећаја (код болова у стомаку, поремећеног варења, гасова у стомаку), за отклањање симптома код прехлада (грип, грозница, упала грла, бронхитис), а такође се употребљавају и као тоник и диуретик. У Бугарској је позната употреба инфуза од надземних делова *S. scardica* у третману емфизема плућа и ангине пекторис (21).

На Таурусу, планини у Турској, облоге припремљене од скуваних листова *S. psidica*, јечменог брашна, ренданог лука и катрана од бора примјењују се за ублажавање болова у абдомену, а *S. syriaca* се употребљава као диуретик и средство за ублажавање кашља. У Анатолији (Турска) инфуз листова и цвјетова *S. leptoclada* се користи као експекторантни агенс. Ендемска врста *S. trojana* је једна од натраженијих и највише коришћених љековитих биљака за ублажавање тегоба које прате обољења грла, плућа и органа за варење на Иди, познатој под називом „планина Богова“ у Турској (22,23).

Инфуз од *S. candicans* (“*herva branca*” или “*selvageira*”) се у Мадеири и острву Порто Санто употребљава за лијечење бронхитиса и интестиналних обољења. Инфузи и декокти листова и цвјетова биљних врста *S. congesta*, *S. libanotica* and *S. psidica* су врло популарни у третману кашља, хипертензије и тзв. „паразита у очима“ (традиционално постоји

уверење да су болови у очима условљени присуством црва са црном главом). У Níjar-Cabo de Gata области, лоциране у југоисточној Шпанији, инфузи *S. granatensis* успјешно се употребљавају за ублажавање бола у леђима, за лијечење очних инфекција, као и за стимулисање апетита. Даље, мјешавина инфуза *S. granatensis* и тимијана, апликована са једном кашичицом уља се примјењује за лијечење јетре. У Шпанији, за ублажавање менструалних болова традиционално се употребљавају инфузи или декокти надземних дјелова *S. foetens*, сами или у комбинацији са *S. angustifolia*.

Инфузи од *S. tragoriganum*, биљне врсте која је једна од највише коришћених у Валенсији (Шпанија), су врло ефикасни у лечењу рана, гастроинтестиналних поремећаја, урогениталних инфекција, а такође је позната њихова примјена за испирање грла, очију, коже и слузокоже. Етнофармаколошка студија употребе љековитих биљака у јужној Италији, у Калабријском региону, указује да се листови *S. syriaca* употребљавају за заустављање кривављења код посјекотина.

Многе врсте овог рода, чије је станиште Западни Медитеран, посебно у Шпанији и Португалији, одавнина су проучаване у циљу да се дефинише хемијски профил, а резултати оваквих истраживања су успјешно примјењивани у хемотаксономским студијама. Са друге стране, истраживања врста који се налазе у Турској, као подручју које је на другом мјесту по величини у погледу биолошке распрострањености *Sideritis* врста, односе се само на етарска уља, док фитохемијских података има врло мало (24,25).

Присуство значајне количине фенолских и трепенских компоненти доприноси антиинфламаторној, антиреуматској, антиулкусној, дигестивној и антимикробној активности наведених врста. (26,27)

Досадашња фитохемијска и фармаколошка испитивања врста рода *Sideritis*

Фитохемијска испитивања

У врстама *Sideritis* рода идентификовани су многобројни секундарни метаболити, као терпени, флавоноиди, етарска уља, иридоиди, кумарини, лигнани и стероли. Фармаколошка активност биљних врста овог рода се приписује углавном присуству флавоноида и терпеноида.

Врсте рода *Sideritis* су познате по присуству дитерпена са израженом структуралном разноликошћу. Присуство сесквитерпена и тритерпена није уобичајено у врстама овог рода.

S. italica је врста у којој је по први пут детаљно испитивано присуство дитерпена - дитерпеноиди сидеридиол (1) и сидерол (2) који су први били изоловани и њихова струк-

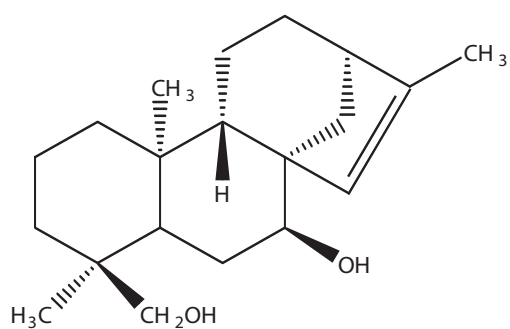
тура је одређена (слика 4). Анализа дитерпеноида допринијела је закључку да дитерпени са скелетом каурена су искључиво присутни у врстама које се јављају у Источном и Централном Медитерану (Турска, Грчка и Италија).

У врстама рода *Sideritis* које су распрострањене у Грчкој, осим каурене, јављају се и деривати изокаурена. Насупрот врстама из грчког региона, биљне врсте распрострањене у Шпанији и Канарским острвима, иако имају дитерпене са скелетом куерена, у много мањој мејри садрже изокаурене.

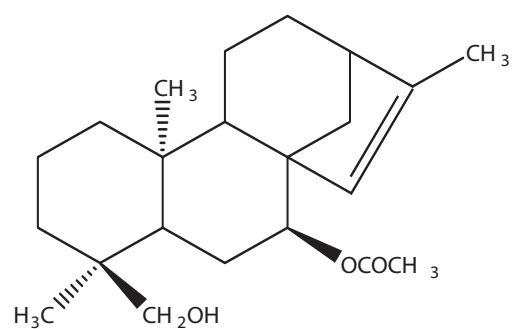
Врсте које су распрострањене у Западном Медитерану и у региону Макаронезије садрже дитерпене са другачијим угљениковим скелетом (деривате ент-каурена, лабдана, атизена, примарана, бејерана, трахилобана и розана). Литературни подаци потврђују да су деривати ент-каурена сидерол (2), линеарол (3), епи-кандикандиол (4) и фолиол (5) су присутни у врсти *S. sipylea* Boiss. Уопште, у врстама рода *Sideritis*, најчешће присутни деривати дитерпена каурена су: фолиол (5), сидол (6), линеарол, сидеридиол (1), и изолинеарол (7). Поред наведених, често је присуство и деривата лабдана (рибенол, 8, андалузол, 9), бејерана (тобарол, 10, и конхитриол, 11), розана (лагаскатриол, 12) и атизана (серациол, 13).

Дитерпени са основним скелетом ент-каурена проучавани су у реакцијама трансформације под утицајем микроорганизама, и показало се да хидроксилна група инхибира хемијске трансформације, укључујући и оксидацију на C-19 . (28)

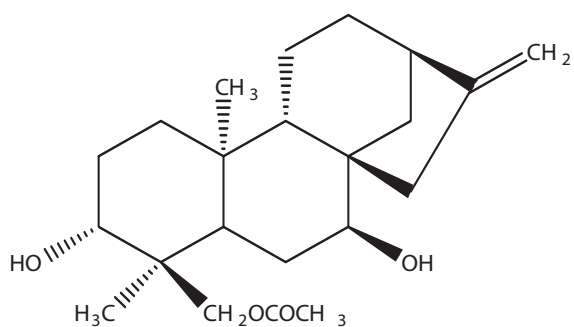
Присуство тобарола, 10, потврђено је само у малом броју проучаваних врста. Као што је и очекивано, у метанолним екстрактима, терпеноиди су присутни само у траговима. Уопште, садржај дитерпена је већи у фракцијама добијеним третирањем биљног материјала неполарнијим растварачима, рецимо, хексаном, него у метанолним екстрактима, са изузетком андалузола који је присутан у већем проценту како у хексанској, тако и у метанолној фракцији. Присуство андалузола у биљним врстама *S. pusilla* и *S. leucantha* ssp. *incana* var. *meridionalis*, који показује снажне антиинфламаторне ефекте, оправдава традиционалну употребу ових биљака као антиинфламаторних агенаса. Поред изражене фармаколошке активности, дитерпени се употребљавају и као хемотаксономски маркери. (29)



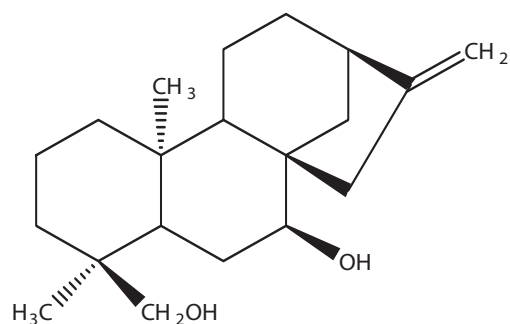
1, Сидеридиол



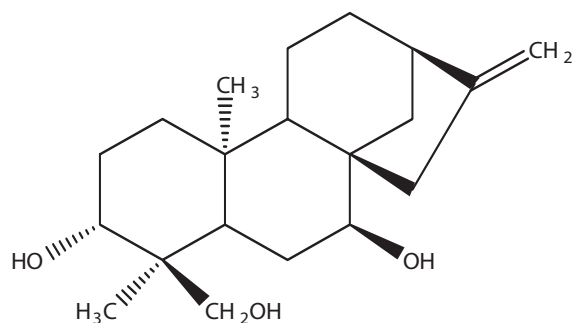
2, Сидерол



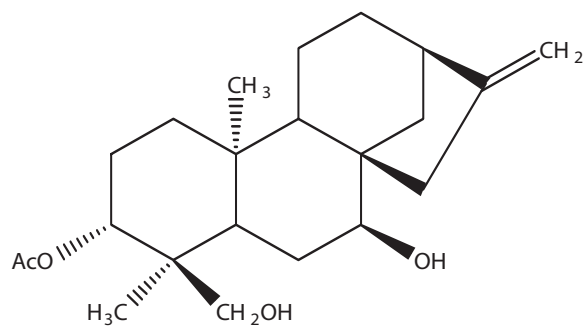
3, Линеарол



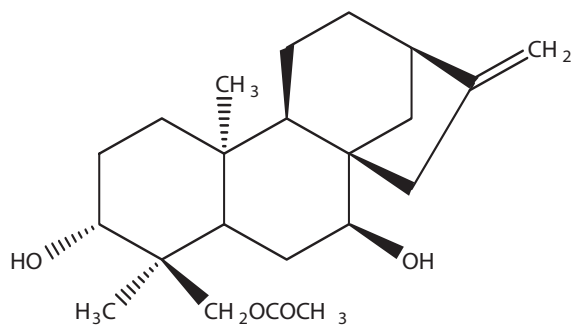
4, епи-Кандикандиол



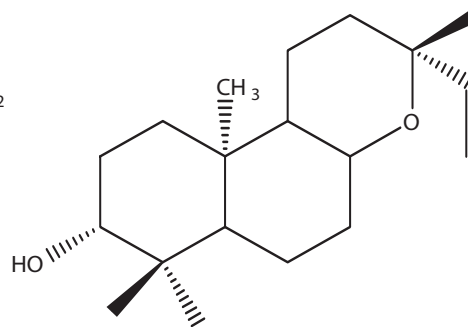
5, Фолиол



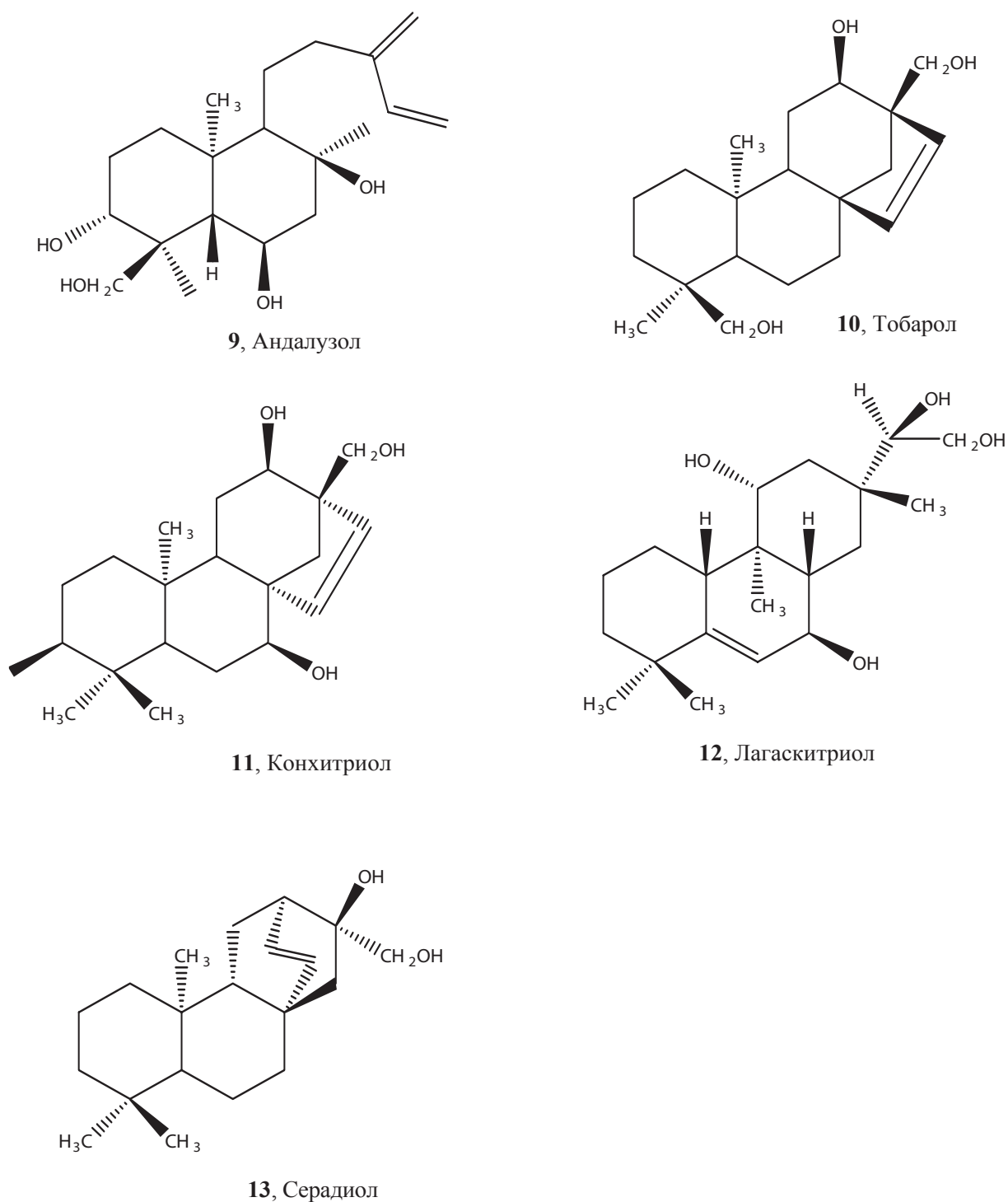
6, Сидол



7, Изолинеарол



8, Рибенол



Слика 13. Структуре једињења изолованих из неких врста рода *Sideritis* (терпени)

Сквален, ациклични прекурсор тритерпене и стерола, идентификован је у *S. argosphacelus* var. *spicata*, *S. discolor* and *S. lotsyi* var. *mascaensis*. Деривати сквалена, роиптеленон је изолован из врста *S. macrostachya*, а тритерпен роиптеленол из врста *S. candicans* var. *eriocephala*, *S. lotsyi*, *S. discolor*, *S. lotsyi* var. *mascaensis*, *S. tenoi* and *S. soluta*. Присуство мјешавине α - и β -амирина потврђено је у *S. argosphacelus* var. *spicata*,

S. discolor, *S. kuegleriana*, *S. lotsyi* var. *mascaensis* and *S. tenoi*. Одговарајуће C- 28 киселине, урсолна и олеанолна, изоловане су из *S. discolor*, *S. candicans* var. *eriocephala*, *S. lotsyi* var. *mascaensis* и *S. soluta*, а њихови ацетати из *S. kuegleriana*. Присуство других, пентацикличних тритерпена, еритодиола и лупеола, потврђено је у *S. discolor* и *S. argosphacelus* var. *spicata*. (14,30)

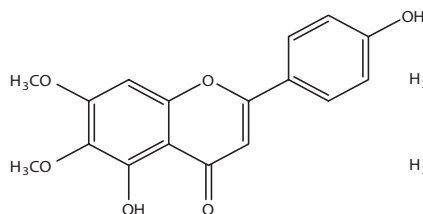
Флавоноиди у биљакама рода *Sideritis* су присутни у знатној количини. Истраживања ове групе једињења присутних у биљним врстама које припадају овом роду помогла су успостављању корелације између географског поријекла и типа флавоноида. Тако је утврђено да 5,6,7-триокси флавони (цирзимаритин [14], салвигенин [15] и непетин [16]) доминирају у врстама Макаронезијанског региона, док врсте Медитеранског подручја одликује углавном присуство 5,6,7,8-тетраокси флавона (сидеритофлакон [17], ксантомикрол [18], и гарденин-Б [19]). Распрострањеност флавоноидних гликозида у роду *Sideritis* је интересантно и са таксономског становишта. На примјер, 8-ОН флавоноидни гликозида су карактеристични за неке секције у оквиру рода *Sideritis*. Присуство 7-алозилгликозида хиполетина [20], изоскутелареина [21] и 3'-хидрокси-4'-О-метилизоскутелареина [22] установљено је у различитим *Sideritis* врстама, на пример у *S. hypsophila*, *S. javalambrensis* и *S. mugronensis*. За разлику од секција *Empedocleopsis* и *Creticae*, биљне врсте које припадају секцији *Magrubiastrum* садрже у највећем проценту 8-хидрокси флакон гликозиде.

Sideritis врсте које су распрострањене на Иберијском полуострву и у Сјеверној Африци, врсте које припадају секцији *Sideritis*, такође се карактеришу акумулацијом 7-гликозида 8-хидрокси флавона (изоскутелареин, хиполетин а њихови метил етри). Осим наведених биљних врста, присуство 6-хидрокси флавона и 7-гликозида 8-хидрокси флавона карактерише биљне врсте фамилија *Lamiaceae*, *Scrophulariaceae*, као и других блиских фамилија у погледу хемијског профила. Потврђено је, у студији која је обухватила 17 врста рода *Sideritis*, да врста *S. brevibracteata* која је садржавала у највећем проценту 8-хидрокси флакон гликозиде у односу на остале испитиване врсте, има добар анти-инфламаторни и антиоксидантни потенцијал, као и да испољава значајну инхибиторну активност према ензиму алдоза-редуктази. (31,32)

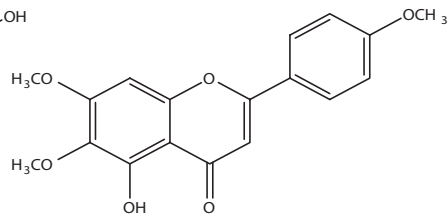
S. foetens, *S. luteola* и *S. leucanthu* var *incana* представљају врсте са већим садржајем поларних флавоноида, као што су изоскутеларин-7-гликозид и хиполетин-8-гликозид, за које је доказано да поседују анти-улкусну и анти-инфламаторну активност, као и лутеолин [23] са израженим вазодилататорним дјеловањем. (33)

Осим наведеног, недавна испитивања *Sideritis* врста (*S. scardica*, *S. raeseri*), распрострањених у Македонији, потврдила су присуство комплексног хемијског профила, подразумевајући присуство деривата хидрокси циметне киселине, гликозида фенилетаноида и ацетилованих и неацетилованих гликозида 7-О-флавоноида. Два типа 8-хи-

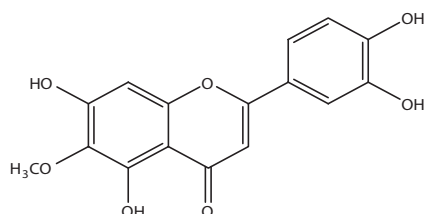
дрокси флавоноида (хиполетин и изоскутелареин и њихови метокси деривати) и 5,7-дихидрокси флавоноиди (апигенин и лутеолин) карактеришу испитиване биљне врсте. Сви гликозиди флавоноида чије је присуство потврђено представљају деривате 7-*O*-алозил-(1,2)-гликозида 5,8-дихидроксифлавона са различитим супституцијама у Б-прстену. Интересантно, уочљиве разлике у профилу фенолских једињења (деривата хидроксициметне киселине и 7-*O*-гликозида флавоноида) примијећене су између *S. scardica* и *S. raeseri*. Једино метанолни екстракт биљке *S. raeseri*, која је поријеклом из природе, садржи ферулоилкина киселину. У испитиваним екстрактима биљке *S. scardica* ово једињење није детектовано, као ни 7-*O*-дигликозиди флавоноида. (34). Специфичности у хемијском саставу флавоноида који су присутни у испитиваним врстама централног Балкана *S. scardica* и *S. raeseri* поријеклом из природе могу послужити за разликовање поменутих врста. Наиме, два типа флавона и њихових деривата, 8-хидрокси флавони - хиполетин и изоскутелареин и њихови метокси деривати у *S. raeseri*, и 5,7-дихидрокси флавони - апигенин [24] и хризериол [25] у *S. scardica* представљају основу за њихово разликовање. (35).



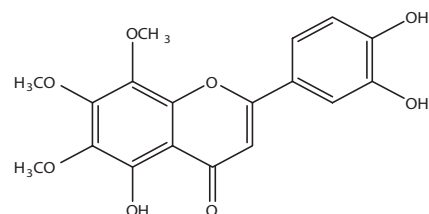
14, Хризмаритин



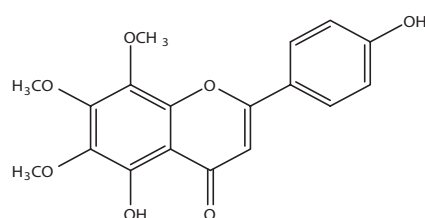
15, Салвигенин



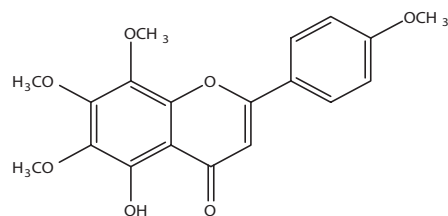
16, Непетин



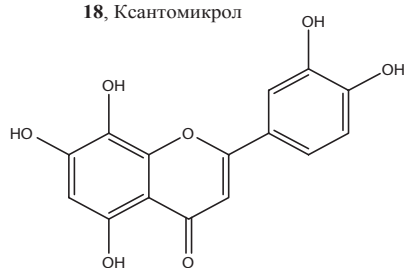
17, Сидеритофлавон



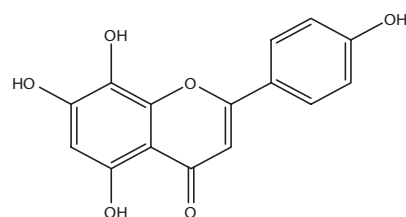
18, Ксантомикрол



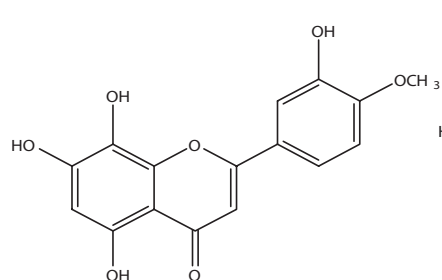
19, Гарденин-Б



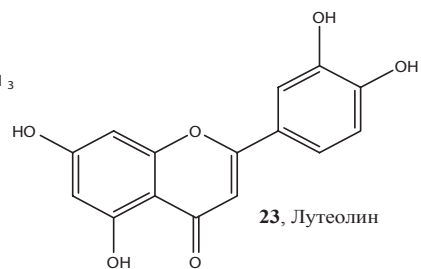
20, Хиполетин



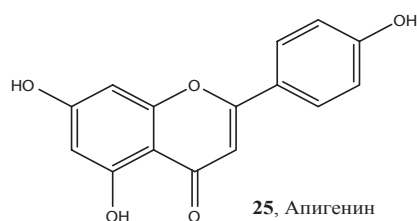
21, Изоскутеларейн



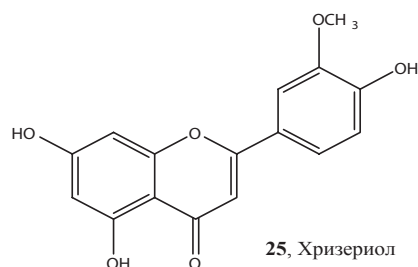
22, 3'-хидрокси-4'-О-метилизоскутеларейн



23, Лутеолин



25, Апигенин



25, Хризериол

Слика 14. Структуре једињења изолованих из неких врста рода *Sideritis* (флавоноиди)

Етарско уље различитих врста рода *Sideritis* детаљно је изучавано. Упркос чињеници да су врсте које припадају фамилији *Lamiaceae* познате због релативно високог процента етарског уља, врсте које припадају роду *Sideritis* садрже релативно мало етарског уља. Интересантна је корелација између садржаја етарског уља и садржаја главних компоненти у композицији етарског уља - уколико биљка садржи већи проценат етарског уља, утолико је већи проценат монотерпенских угљоводоника. Хемијски профил етарских уља је одређиван примјеном гасно-масене спектрометрије и гасно-хроматографских техника, односно (GC-MS) и (GC). Проучавања хемијске композиције етарског уља различитих врста рода *Sideritis* омогућила су боље разумијевање полиморфизма који је уобичајен код *Sideritis* врста, разлика које постоје између нових врста, хемијских варијетета и хибрида. Нека етарска уља карактерише присуство високог процента монотерпенских угљоводоника, међу којима су најзаступљенији α -пинен, β -пинен, сабинен, мирцен и лимонен. Важни сесквитерпенски угљоводоници, као на пример, δ -кадинен и β -кариофилен, су обично присутни у етарским уљима. Насупрот групи етарских уља која су богата угљоводоникима (монотерпенски и сесквитерпенски), етарска уља неких врста рода *Sideritis* садрже у већем проценту оксигеноване сесквитерпене, међу којима су у највећој количини заступљени α -кадинол, бисаболол или мурол-5-ен-4 β -ол. Такође, међу *Sideritis* врстама познате су оне чије етарско уље садржи дитерпенска једињења. Присуство дитерпена у етарским уљима је интересантно, с обзиром да не само *Sideritis* врсте, већ и врсте родова *Cistus*, *Wollemia*, *Juniperus* и *Helichrysum* се карактеришу присуством дитерпена као испарљиве фракције у екстрактима надземних делова. Присуство или одсуство дитерпена у *Sideritis* врстама је важно и са хемотаксономског аспекта, у циљу успостављања хемотаксономских корелација између различитих *Sideritis* врста.

Етарско уље ендемских врста поријеклом из Турске *S. bilgerana*, *S. ozturkii* и *S. cilicica* садржи у највећој количини монотерпенске угљоводонике α - и β -пинен, а *S. cilicica* садржи и значајну количину β -феландрена. (35). Оне *Sideritis* врсте које се карактеришу значајним присуством сесквитерпена, у највећем проценту садрже β -кариофилен, Д гермакрен и каламен (*S. curvidens*, *S. montana*). Оксигеновани деривати нијесу карактеристични за етарска уља *Sideritis* врста. Изузетак су *S. romana*, *S. phlomoides* и *S. taurica* у чијим етарским уљима је у највећем проценту заступљен тимол (оксигеновани монотерпени су главни састојци етарског уља *S. romana*), односно оксигеновани сесквитерпени (у етарским уљима *S. phlomoides* и *S. taurica*). У етарским уљима *S. congesta* и *S. argyrea* основни састојци су α - и β -пинен, док је у највећој количини лимонен присутан у етарском уљу *S. perfoliata*. Етарско уље добијено из надземног дела *S. condensate* садржи у великом проценту β -кариофилен and α -пинен. (36).

Етарска уља *S. perfoliata* и *S. dichotoma* карактерише присуство значајне количине дитерпена. (37).

Проучавање етарских уља *Sideritis* врста поријеклом из Грчке, као и неких ендемских из Шпаније, указала су на монотерпенске угљоводонике, као главне конситуенте. Тако, *S. ibanyezii* етарско уље садржи у највећем проценту сабинен и α -пинен. (38).

С обзиром на бројна проучавања које се односе на хемијску композицију етарских уља врста рода *Sideritis*, преглед изучаваних врста, поређаних по абecedном реду, проценат етарског уља у њима, као и компоненете које су у највећем проценту заступљене у испитиваним етарским уљима приказани су у **Табели 1**.

Табела 1. Основни састојци и проценат етарског уља у испитиваним врстама рода *Sideritis*, према литературним подаци

Биљна врста рода <i>Sideritis</i>	Садржај	Основна једињења
<i>S. angustifolia</i> Lam.	—	α -пинен (10.8–20.6%), β -бисаболол (2.5–20.2%), 1,8-цинеол (4.6–16.6%)
<i>S. argyrea</i> P. H. Davis	0.45	β -пинен (19.7%), α -пинен (13.8%)
<i>S. armeniaca</i> Bornm	0.54	β -пинен (39.3%), α -пинен (16.5%), β -феландрен (10.5%)
<i>S. bilgerana</i> P. H. Davis	0.26	β -пинен (51.2%), α -пинен (30.2%)
<i>S. brevidens</i> P. H. Davis	—	β -пинен (14.1%), епи-кубенол (13.1%), α -пинен (7.9%)
<i>S. caesarea</i> H. Duman, Z. Aytaç & K. H. C.Baser	0.02	β -кариофилен (8.3%), кариофилен оксид (7.4%)
<i>S. chamaedryfolia</i> Cav.	—	кариофилен (32.5%), кариофилен оксид (14.3%)
<i>S. clandestina</i> Hayek ssp. <i>clandestina</i>	0.26	α -пинен (20.1%)
<i>S. congesta</i> P.H. Davis & Hub.-Mor.	0.83	мурол-5-ен-4- α -ол (11.7%), мурол-5-ен-4- β -ол (33.0%)
	0.45	β -пинен (34.6%), α -пинен (24.6%)
<i>S. curvidens</i> Stapf	0.02	бициклогермакрен (20.6%), спатуленол (12.4%)
<i>S. erythrantha</i> Boiss. & Heldr. var. <i>Cedretorum</i>	0.70	мирцен (24.3%), α -пинен (12.4%)
<i>S. erythrantha</i> Boiss. & Heldr. var. <i>Erythrantha</i>	0.50	α -пинен (19.5%), сабинен (10.4%)
<i>S. flavovirens</i> (Rouy) F. Alcaraz, M.Peinado, J. M. Martínez-Parra, J. S. Carrión & P. Sánchez-Gómez	—	фенхил ацетат(12.0–27.7%), фенхон (11.9–25.3%), α -пинен (8.2–18.7%), 1,8-цинеол (1.4–13.4%), лимонен (3.4–12.7%)
<i>S. foetens</i> Benth.	—	тимол (2.3–20.0%), <i>p</i> -цимен (12.3–19.8%), сабинен (8.6–13.4%), α -пинен (5.5–11.6%)
<i>S. hirsuta</i> L.	0.44	β -феландрен (23.8%), α -феландрен (9.2%), α -пинен (8.2%)

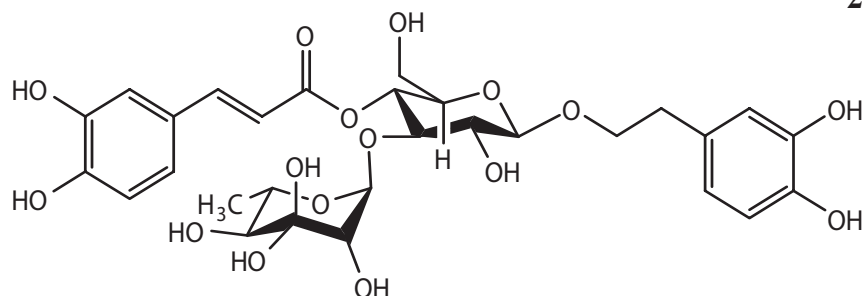
Биљна врста рода <i>Sideritis</i>	Садржај	Основна једињења
<i>S. hololeuca</i> Boiss. et Heldr. Apud Benth	0.02	β-пинен (35.5%), α-пинен (16.0%), β-феландрен (9.6%)
<i>S. ibanyezii</i> Pau	0.71	α-фенхил ацетат (16.0%), сабинен (12.8%), α-пинен (10.7%)
<i>S. lanata</i> L.	0.03	хексадеканска киселина (10.7%), спатуленол (9.5%)
<i>S. leucantha</i> Cav.	—	α-пинен (23.6–25.8%), сабинен (7.2–10.4%), фенхон (6.2–10.2%)
<i>S. montana</i> L.	0.16	гермакрен D (41.1%), бициклогермакрен (10.9%)
<i>S. montana</i> L. ssp. <i>montana</i>	0.05	гермакрен D (24.6%), бициклогермакрен (10.8%)
<i>S. montana</i> L. ssp. <i>remota</i> (D'Urv.) P. W. Ball	0.03	бициклогермакрен (13.9%), гермакрен D (10.3%)
<i>S. mugronensis</i> J. Borja	0.02	δ-кадинен (2.0– 47.0%), 1,8-цинеол (0.4–28.7%), бисаболол (3.0–27.2%), сабинен (0.6–12.6%)
<i>S. ozturkii</i> Aytaç & Aksoy	0.20	α-пинен (31.1%), β-пинен (20.2%)
<i>S. pauli</i> Pau	0.32	α-пинен (48.0%)
<i>S. phlomoides</i> Boiss. & Bal.	0.20	β-кариофилен (30.7%), α-бисаболол (16.2%)
<i>S. raeseri</i> Boiss. & Heldr. ssp. <i>attica</i> (Heldr.) Papan & Kokkini	0.37	α-пинен (24.8%), β-пинен (18.0%)
	0.17	α-пинен (28.7%), β-пинен (27.2%)
<i>S. raeseri</i> Boiss. & Heldr. ssp. <i>raeseri</i>	0.12	β-пинен (9.1%)
<i>S. romana</i> L. ssp. <i>romana</i>	0.05	тимол (24.9%), 1-октен-3-ол (12.6%), борнеол (9.2%)
<i>S. rubriflora</i> Hub.-Mor.	—	β-пинен (13.2%), α-пинен (9.9%), епикубенол(7.8%)
	0.13	β-кариофилен (18.8%), неролидол (12.1%)
<i>S. scardica</i> Griseb.	0.03	β-пинен (17.9%), карвакрол (14.8%), α-пинен (7.3%)
	0.40	ментол (8.5%), 9-еикозен (6.3%), гераниол (5.6%)
<i>S. sipylea</i> Boiss.	—	вербанон (15.2%), терпинеол (9.5%), карвакрол (81.2%), терпинен-4-ол (8.2%)
<i>S. stricta</i> Boiss. et Heldr. Apud Benth	0.40	α-пинен (35.2%)
	0.63	β-пинен (30.0%), α-пинен (12.9%)
<i>S. syriaca</i> L. (листови)	0.05	хексадеканска киселина (31.1%), епи-α-бисаболол (14.5%)

Биљна врста рода <i>Sideritis</i>	Садржај	Основна једињења
<i>S. syriaca</i> L (цвасти)	0.07	<i>епи</i> - α -бисаболол (25.7%), бензил бензоат (17.7%)
	0.12	мирцен (50.5%)
<i>S. syriaca</i> L.	—	α -пинен (19.5%), карвакрол (11.9%), тимол (7.2%)
<i>S. syriaca</i> L. ssp. <i>syriaca</i>	0.19	карвакрол (33.7%)
<i>S. taurica</i> Stephan ex Willd.	0.08	α -бисаболол (10.3%), β -пинен (9.3%)
<i>S. tmolea</i> P. H. Davis	0.33	α -кадинол (21.9%), β -кариофилен (10.6%)
	0.30	α -бисаболол (8.4%)
<i>S. tragoriganum</i> Lag.	—	α -пинен (7.8–17.7%), 1,8-цинеол (6.8–15.9%), β -кариофилен (0.3–14.6%), кариофилен оксид (10.2%), фенхон (6.1–7.8%)
<i>S. tragoriganum</i> $\times$ <i>S. leucantha</i>	—	α -пинен (50.1%), сабинен (10.6%)
<i>S. vulcanica</i> Hub.-Mor.	0.02	β -кариофилен (10.2%), хексадеканска киселина (9.7%)
<i>S. vuralii</i> H. Duman & K. H. C. Baser	0.10	β -пинен (35.3%), 1,8-цинеол (14.6%), α -пинен (14.5%)

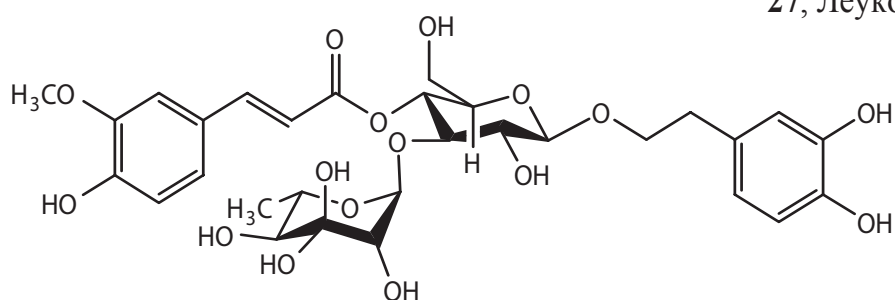
Узимајући у обзир друге конституенте, спроведена истраживања су потврдила да су иридоиди, кумарини и лигнани ријетко присутни. У уљу сјемена, у којем је потврђено присуство масних киселина, најважнији састојак је линоленска киселина.

Фенилпропаноидни гликохзиди су такође изоловани из надземних дјелова неколико *Sideritis* врста. Вербаскозид [26], леукоскептозид [27], мартинозид [28], и лавандулифолиозид [29], су најважнији предсатвници ове групе једињења, узимајући у обзир фармаколошка својства. (39,40,41,42). Доказано је да вербаскозид посједује антипролиферативна, цитотоксична, антиоксидантна и антиметастатска својства.

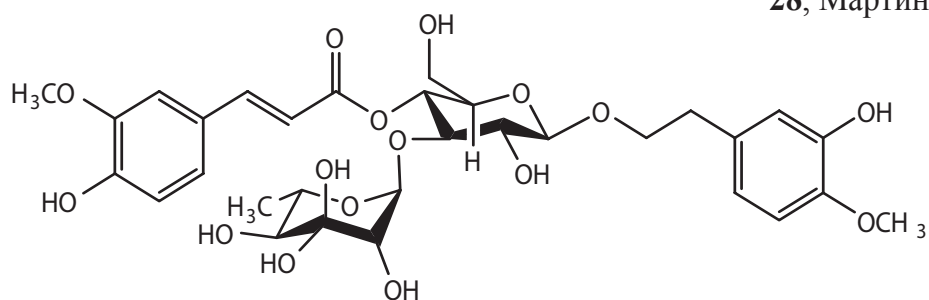
26, Вербакозид



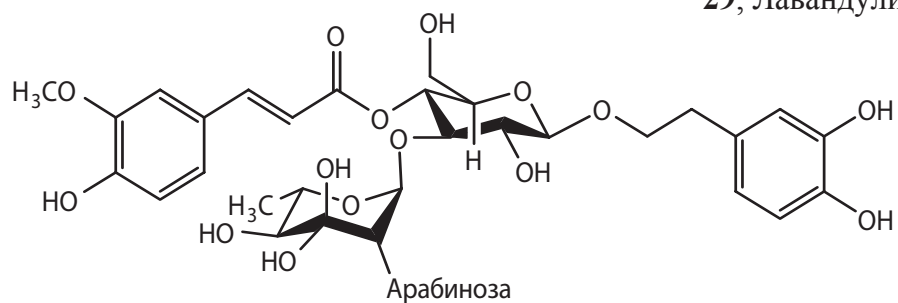
27, Леукоскептозид



28, Мартинозид



29, Лавандулифолизид



Слика 15. Структуре једињења изолованих из неких врста рода *Sideritis*
(фенилпропаноиди)

Фармаколошка испитивања врста рода *Sideritis*

Проучавања различитих *Sideritis* врста су познате у традиционалној медицини због својих разноврсних фармаколошких ефеката. Познато је да *Sideritis* врсте поседују анти-инфламаторна, хипогликемична, аналгетична, антимикробиолошка и антифунгална, имуномодулаторна својства, инхибирају макрофаге везане за NOS-2-експресију. Такође, недавна истраживања су показала да ове врсте могу да инхибирају ензиме алдоза-редуктазу и холинестеразу, да показују антипролиферативна својства и да се селективно везују за естроген рецепторе, модулирајући њихову активност.

Анти-инфламаторна активност

Врсте рода *Sideritis* су у традиционалној медицини познате по својим анти-инфламаторној активности. Бројне студије потврђена ову терапијску индикацију. Сматра се да присуство дитерпеноида у *Sideritis* врстама може довести у везу са њиховим анти-инфламаторни дјеловањем. Hernandez-Pérez и Rabanal су испитивали антиинфламаторну и аналгетичну активност етанолног и хлороформског екстракта врсте *S. canariensis* var. *ramposa* при чему наводе да су носиоци поменутих фармаколошких активности присутни дитерпени. (43,44). Слична, антиинфламаторна активност, уочена је и код биљне врсте *S. candicans* Ait. var. *eriocephala* Webb. на моделима за испитивање антиинфламаторне активности који укључују карагеном индуковану инфламацију шапице пацова и едем уха изазван локалном примјеном ТФА (12-О-третрадеканоилфорбол ацетат)

Aboutabl и сарадници указују, да, не само терпеноиди, већ и флавоноиди могу бити одговорни за антиинфламаторну активност биљних врста рода *Sideritis*. Такође, и неполарна фракција *S. javalambrensis* поседује значајно антиинфламаторно дејство, показано у наведеним моделима за испитивање антиинфламаторне активности, али је значајно нагласити разлику у дозама код оралне и локалне примјене наведеног екстракта у циљу спречавања појаве инфламације - код карагеном индукованог едема шапице пацова, потребне дозе екстракта да смање изазвану инфламацију биле су 50 и 100 mg/kg, за разлику од доза екстракта које су се кретале у количини од 0.25 - 1 mg/уху и биле су довољне да смање изазвани едем уха мишева. Ова фракција је показала и способност инхибиције ослобађања хистамина из мастоцита, а такође је условљавала NO продукцију у макрофагама. (45,46).

Друга студија са н-хексанским и метанолним екстрактом врсте *S. javalambrensis* је показала високи антиинфламаторни ефекат на карагин индукованом едему у хроничној фази, али да у акутној фази инфламације ови екстракти немају ефекта. Н-Хексански екстракти и других *Sideritis* врста такође су показали висок антиинфламаторни ефекат у току хроничне фазе едема рожњаче код зечева изазване дјеловањем кротоновог уља. *In vitro* студије су указале да су носиоци ове активности дитерпени са скелетом лабдана који

интерреагују са еикозаноидним системом, највјероватније преко инхибиције ензима фосфолипазе A2. (47,48)

Поларни екстракти других *Sideritis* врста такође поседују снажну антиинфламаторну активност, испољену током хроничне фазе инфламације, што је у складу са већ наведеним исказима.

Осим терпенске и флавоноидне фракције, којима је приписиван антиинфламаторни потенцијал, литературни преглед испитивања која су спроведена на врстама овог рода указала су да и њихови стероли поседују антиинфламаторну и имуномодулаторну активност. Неполарна фракција биљне врсте *S. javalambrensis*. као и стероли изоловани из врсте *S. foetens* кампестерол, стигмастерол и β -ситостерол имају антиинфламаторни ефекат. (49,50,51)

Сматра се да ова једињења смањују инфилтрацију неутрофила у ткиво које је захваћено инфламацијом. Осим наведених једињења, као носиоци антиинфламаторне активности помињу се још и полиметоксифлавоноиди, 5-О-деметилнобилетин изоловани из *S. tragoriganum*, који инхибирају 5-липоксигеназу (5-LOX), неутичући на експресији ензима COX-2. Познато је да липидни пероксиди утичу на повећање интензитета метаболизма арахидонске киселина, и да редокс агенси, какав је случај са дериватима фенола, могу инхибирати оксидацију арахидонске киселине путем 5-липоксигеназе; на тај начин антиоксиданси и флавоноиди који су у стању да неутралишу слободне радикале могу спријечити настајање медијатора инфламације. Из екстракта врсте *S. ozturkii* изолована је флавоноид, озтуркозид Ц, који је носилац антиинфламаторне активности овог екстракта. Поред овог јединице, проучавање различитих врста овог рода указало је на још два флавоноида која посједују антиинфламаторну активност - ријеч је о хиполетин-8-гликозиду и 5-О-деметоксилнобилетину. Хиполетин-8-гликозид је дериват лутеолина, као и озтуркозид Ц, и могуће је да овакав основни скелет представља услов посједовања антиинфламаторне активности. (52,53,54)

Носилац антиинфламаторне активности ацетонског екстракта *S. foetens* је дитерпенско једињење, дериват лабдана, андалузол, који инхибира инфламаторни процес у одмаклој, касној фази, не само последице оралне, већ и локалне примјене, инхибирајући настајање едема и инфилтрацију неутрофила. Осим тога, ово једињење утиче на функцију леукоцита и самњује ослобађање хистамина из мастоцита. Активација макрофага са проинфламаторним цитокинима и компоненте из ћелијског зида бактерија доводи до синтезе и ослободјања већих количина NO, еикозаноида и биоактивних липида, као што су простагландини и леукотриени, медијатори укључени у процес инфламације. Досадашња истраживања указују да инхибитори ензима NO-синтетазе представљају антиинфламаторне агенсе, и то прије свега због чињеница да инхибитори смањења или поремећаја синтезе NO, могу представљати трепажући значајне факторе у третману инфламација.

Улога андалузола на експресију NOS-2 у макрофагама је у *in vivo* моделима инфламације доказана, а самим тим и његова улога као антиинфламаторне супстанције. Осим тога, андалузол утиче на NF-kB активност, при чему експерименти који су спроведени, а односе са на симултану стимулацију LPS-а и IFN-g-a, указују да ово једињење поред инхибиције NF-kB, имају већи инхибиторни потенцијал на активност IFN-g. Овакава активност је карактеристична за тритерпене, а с обзиром и да андалузол показује исти механизам антиинфламаторне активности, отворене су нове могућности за испитивање терапеутске активности ових молекула.

Поред терпена који су се показали као добри антиинфламаторни агенси, и флавоноиди изоловани из различитих *Sideritis* врста посједују значајан антиинфламаторни потенцијал. Проучавања зависности флавоноидне структуре (посматрани су серије парова гликозид/агликон, прије свега хиполетин-8-гликозид и хиполетин) и уочене антиинфламаторне активности (инхибиција продукције еикозаноида преко 5-липоксигеназе и циклооксигеназе) указују да је агликон селективније и у већој мјери инхибира ензим 5-липоксигеназу него одговарајући хетерозид. (48,51)

Ако се ови резултати истраживања пореде са другим који обухватају хетерозид/одговарајући агликон парове једињења, долазимо до закључка да је шећер у хетерозидима смањује инхибиторни потенцијал. Такође, истраживања хемијске структуре флавоноида и њихове активности указала су да флавоноиди са катехолном групом у В-прстену су потентни и селективни инхибитори 5-липоксигеназе. Осим тога, флавоноиди са хидрокси супституентом који није у В-прстену, показују добру селективност према циклооксигенази. (54)

Антиоксидативна активност

У свим аеробних организама, укључујући људска бића, производња реактивне врсте кисеоника (РОС) је усклађена са одбрамбеним системом организма. Реактивни кисеоник у облику супероксид радикала, хидроксил радикала и водоник пероксида, који су продукти нормалних метаболичких процесима или егзогених фактора и агената, имају утицаја на ДНК, протеина и већину биолошких молекула које садрже у липидним компонентама полинезасићене масне киселине. Озбиљан дебаланс између производње РОС и одбрамбеног механизма у организму је одговоран за оксидативни стрес. Тако, РОС играју важну улогу у етиологији многих болести и старење. Као антиоксидативне одбрамбене супстанце који помажу организму у заштити од слободних радикала (као штетних продуката РОС-а) су се показали флавоноиди, каротеноиди, фенолна једињења, витамине и антиоксидативни ензими. Улога антиоксиданата је привукла велико интересовање у вези са њиховим заштитним дејству против слободних радикала који су се показали као узрочници многих обољења укључујући и малаигих. Добијени резултати великог броја

истаживања су показали су да су антиоксидативне активности испитиваних биљних у корелацији са високим садржајем фенолних једињења.

Tunalier и садарници су испитивали антиоксидативну активност метанолног екстракта (у концентрацијама од 0,02% до 1%) 27 *Sideritis* врста. За процјену укупне антиоксидативне активности користили су FRAP- тест који се заснива на редукцији Fe^{+3} у Fe^{+2} . Веће концентрације екстракта показале су и већу антиоксидативну активност. Код *Sideritis* врста као *S. amasiaca* и *S. germanicopolitana* ssp. *viridis*, методом DPPH (1,1-дифенил-2-пикрилхидразил) теста такође је потврђена корелација антиоксидативне активности и концентрације фенолних једињења у њиховим екстрактима. (54)

Укупна антиоксидативна активност врсте *S. sipylea* је урађена тиоцијанидном методом. У процесу липидне пероксидације добијени екстракти из ове ендемске врсте турске флоре показали су значајну антиоксидативну активност. (55) *S. syriaca* ssp. *syriaca* ендемска врста планинског дијела Крита(Грчка) са широком традиционалном употребом показала је да посједује добар антиоксидативни капацитет. Фитохемијском анализом добијених екстракта (диетилетерног, етилацетатног и бутанолног) утврђено је присуство значајне количине полифенолних једињења и флавоноида (углавном флавона) који су одговорни за антиоксидативну активност. Етил-ацетатна фракција испољила је највећу антиоксидативну активност која се приписује присуству фенолних једињења од којих се издвајају апигенин и изоскутеларин. (55,56)

Овај однос између антиоксидативне активности и садржаја фенолних компонената потврђена је и у метанолним екстрактима врста *S. ozturkii* и *S. caesarea*. Добијени резултати примјеном методе DPPH теста су $41.68 \pm 1.96\%$ и $72.47 \pm 0.73\%$, показујући да већа процентуална заступљеност има и већу инхибицију слободних радикала. Укупан садржај фенола и флавоноида био је код последње врсте. Ово указује да су екстракти тих биљака потенцијални извор природних антиоксидативних агенаса. (57).

Испитивана је антиоксидативна активност *ent*-каурена у метанолном, петролетерском и ацетонском екстракту ндземног осушеног дијела врсте *S. argita* према три методе (оксидација β -каротона, дејонизација слободних радикала и дејонизација супероксидног анјона). наведеним тестовима није показана антиоксидативна активност али методом DPPH теста антиоксидативну активност показао је дитерпен 7-епи-кандикандиол.

Антиоксидативна активност изолованих флавоноида и фенолпропаноидних гликозида из метанолног, етарског, бутанолног и воденог екстракта врсте *S. perfoliata* subsp. *perfoliata* потврђена је методама DPPH и ТБА (тиобарбитурна киселина) испитивање способности инхибиције липидне пероксидације. (28)

Такође екстракти врста *S. javalambrensis* и *Sideritis libanotica* subsp. *linears* са фенолпропаноидним гликозидима су показали значајну антиоксидативну активност. (28,58,59)

У Грчкој, биљке *Sideritis* рода се користе као зачин и конзерванс у маслиновом уљу. Од разних флавоноида који су идентификовани у *Sideritis* врстама познато је да имају високу антиоксидативна активност, сматра се чак да врста *S. euboea* може да се користи као извор природних антиоксиданата у производњи хране што би било од економске користи, посебно за Грчку. (59). Антиоксидативна активност метанолног екстракта врсте *S. raeseri* Boiss et Heldr. subsp. *raeseri* процијењена је методама: 2-дезоксирибо-за тест уз коришћење Co(II)/EDTA и неутрализације DPPH радикала. Антиоксидативна активност се доводи у везу 5- и 8-*O*-дисубституисаних флавона. Добијени резултати су били IC₅₀ 1.63 mgмјешавине/ mg DPPH и EC₅₀ 8.3 µg/mL, односно њихове активности су биле умјерене у односу на антиоксидансе кверцетин и тролокс. Једињења детектована у метанолној субфракцији *S. raeseri*, испитивани су 7-*o*-(β-алопиранозил-(1→2)-β-d-глюкопиранозил су деривати 5,8-дихидроксифлавонона са различитим супституентима на В-прстену. (21)

Очекивано је да је антиоксидативна активност ових једињења, као што је случај са 7,8-дихидроксифлавоном, слична оној који показује кверцетин, иако није имала било какву супституицију на В прстену и на 3-позицији. Значајна антиоксидативна активност би се могло очекивати за ова једињења, као што је пријављено да је. У 4',5,8-трихидрокси-6,7-диметокси флавоне, побољшана антиоксидативна активност је вероватно због хидрокси и два метокси група у прстену А. Дакле, очигледно је да за флавоне са 5,8-дихидрокил супституент у прстену А буде замијењен хидроксилном групом на C4. (27,28)

Гастропротективна активност

Од давнина биљке рода *Sideritis* су употребљаване у традиционалној медицини за отклањање тегоба органа за варење, а нарочито као гастропротективни агенси. Наиме ове биљке представљају извор различитих једињења чија је активност као антиулцерогених супстанција потврђена у многим *in vivo* and *in vitro* тестовима. Испитивани флавоноиди, а међу њима хиполетин-8-глюкозид, могу да умањују лезије у желуцу истовремено повећавајући продукцију мукуса и смањујући ацидитет и пептички улкус. На основу проучавања структуре флавоноида који су изоловани из проучаваних врста рода *Sideritis*, а показују ову активност, пирокатехолна група у положају 3',4' флавоноидног скелета утиче на повећавање антиулкусне активности. (60)

Надземни делови биљака *S. incana* var. *virgata*, *S. funkiana* ssp. *funkiana* и *S. funkiana* ssp. *talaverana* примењени у *in vivo* тесту оралне апликације код улкуса који изазван индометацином показали су значајан антиулкусни ефекат, док су екстракти надземног дела *S. hirsuta* показали знатно бољи ефекат смањујући гастроинтестинална оштећења код улкуса који је изазвана стресом. Такође, *in vivo* испитивања *S. caesareae* показала су анализирани екстракти посједују значајан потенцијал у отклањању етанолом индукованог улкуса код пацова. Осим тога, испитивања биљних врста *S. leucantha*, *S. mugronensis*, *S.*

angustifolia и *S. saetabensis* показала су да је за испољени гастропротективни ефекат одговорни флавоноидно једињење хиполетин-8-О-β-D-глюкозид. (61,62). Поред тога, снажна дозно-зависна активност против *Helicobacter pylori* је установљена за етарско уље биљне врсте *S. italica*, у концентрацијама које се крећу од 5 - 25 μg/mL. (26)

Аналгетична активност

Испитивања *S. brevibracteata* у тесту спроведеном на мишевима са *p*-бензохиноном (РВН) као изазивачем болних констрикција у абдомену указала су да бутанолни екстракт надземних делова ове биљке показује висок степен аналгетичне активности. Наведени резултати су у потпуној сагласности са традиционалном употребом *Sideritis* врста, као гастропротективних и аналгетичних агенаса. Сматра се да је бутанолна фракција богата флаваноидима који могу бити носиоци ове активности Анти-ноцицептивна активност водених, етанолних, хлороформских и петролетарских екстраката биљних врста *S. lhotskyi* var. *mascaensis*, *S. ozturkii* и *S. taurica*, у одговарајућим тестовима за одређивање аналгетичног дејства, била је изражена и приписана је пре свега флаваоноидним једињењима. Ниво наведене активности је упоређиван са ацетилсалицилном киселином. (27,31,35,51)

Антипролиферативна активност

Демиртас и сарадници (2009) указали су својим истраживањима да екстракти надземних делова биљне врсте *S. libanotica* ssp. *linearis* испољавају значајну антипролиферативну активност према хуманим ћелијским линијама коришћеним у експериментима Vero и HeLa ћелијама. (63)

Анти-ХИВ дејство

In vitro испитивања на Н9 лимфоцитима у циљу одређивања анти-ХИВ активности линеарола и 26 полусинтетских деривата ент-каурена указала су да линеарол нема наведену активност.(64)

Инхибиција холинестеразе

Петролетарски и ацетонски екстракт целе биљке *S. congesta* P.H. Davis & Hub.-Mog. али и изоловани дитерпенски деривати са основним скелетом ен-каурана (епокси-изолинеарол, сидероксол, сидеридиол, сидерол, 7-епикандикандиол, линеарол и сидол) показују слабу инхибицију ензима холинестеразе. Међутим интересантно је да сви наведени дитерпени, али у највећој мјери сидероксол и 7-епикандикандиол испољавају знатно већу инхибиторну активност према бутирилхолинестерази. (65)

Селективна модулаторна активност рецептора естрогена

Традиционално употребљавани терапеутски агенси са селективном модулаторном активношћу према рецепторима естрогена (**SERM**, биофосфонати, калцитонин) могу имати изражене нежељене ефекте, па чак могу бити и контраиндиковани у појединим случајевима. Биолошки есеји спроведени у циљу одређивања профила активности водених екстраката биљних врста *S. euboea*, *S. clandestine* указали су да је ријеч о потенцијално активним модулаторима естрогенске активности (**SERM**) Њихова способност да стимулишу диференцијацију и минерализацију ћелиске културе остеобласта, да активирају као антиестрогени, везни протеин-фактор раста инсулина 3 (IGFBP3) у ћелијама канцера дојке и да не изазивају пролиферацију цервикалног аденокарцинома (HeLa ћелије) указују на посједовање наведене, естроген модулаторне активности. (66)

Антимикробна активност

Етарска уља *Sideritis* врста поседују антимикробну активност. Испитивања микробиолошке активности етарских уља врста *S. perfoliata* и *S. trojana* према *Escherichia coli* (NRRL B-3008), метицилин резистентном соју *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterobacter aerogenes* (NRRL 3567), *Salmonella typhimurium* (NRRL B-4420), *Bacillus cereus* (NRRL B-3711), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) и *Candida albicans* указала су наведене етарска уља поседују умерено дејство, при чему је етарско уље *S. trojana* показивало већу активност у односу на *S. perfoliata*. Сматра да већи проценат моно- и сесквитерпенске фракције у етарском уљу *S. trojana* је одговоран за бољу антимикробну активност. (35,65)

Осим тога, етарска уља биљних врста пореклом из Шпаније, *S. angustifolia*, *S. funkiana*, *S. javalambrensis*, *S. leucantha*, *S. mugronensis* и *S. tragoriganum* инхибирају раст Грам-позитивних бактерија, као и гљивице *Candida albicans*, али не показују значајну активност према Грам-негативним бактеријама. Сличан резултат је добијен и за етарска уља биљних врста *S. curvidens* и *S. lanata*. (68,69)

Насупрот овим резултатима, етарска уља биљака *S. cilicica* и *S. bilgerana* показују значајну антимикробну активност према Грам-негативним (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) и Грам-позитивним бактеријама (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*), са МИЦ вредностима између 0.125 и 0.5 mg/mL. Такође инхибирају раст и гљивица - *Candida albicans* (МИЦ 0.03 mg/mL). Оваква антимикробна активност је највероватније условљена присуством α -пинена и β -пинена као главних конституената етарских уља обе врсте. (70) Такође, и етарско уље *S. italica* инхибира раст и Грам-негативних и Грам-позитивних бактерија, а нарочито је изражена антимикробна активност према *Pseudomonas aeruginosa*. (26)

Не само етраска уља испитиваних *Sideritis* врста, већ и њихови екстракти поседују значајну антибактеријску активност. Метанолни екстракти *S. ozturkii* и *S. caesarea*, у студији спроведеној према 15 микроорганизама *Aeromonas hydrophila* ATCC 7965, *Bacillus brevis* FMC 3, *B. cereus* FMC 19, *B. subtilis* ATCC 6630, *B. subtilis* var. *niger* ATCC 10, *E. coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* FMC 5, *Morgenella morganii*, *Mycobacterium smegmatis* RUT, *Proteus mirabilis* BC 3624, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 28213, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Candida albicans* ATCC 1223 и *Saccharomyces cerevisiae* BC 5461, испољили су значајну амтимикробну кативност.(56). Наведено је да се претпоставља да су линеарол, фолиол, епикандикандиол и сидерол, као саставни конституенти испитиваних екстраката одговорни за антимикуробну активност. У односу на наведене диетерпене, епикандикандиол је испољио највећи антимикуробни ефекат према *E. co*Ацетонски и метанолни екстракти *S. tmolea* Р. Н. Davis нису показали значајну антимикуробиолошку нити антитуберкулоустатску активност.(68,71)

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДИО

Материјал и методе

Биљни материјал

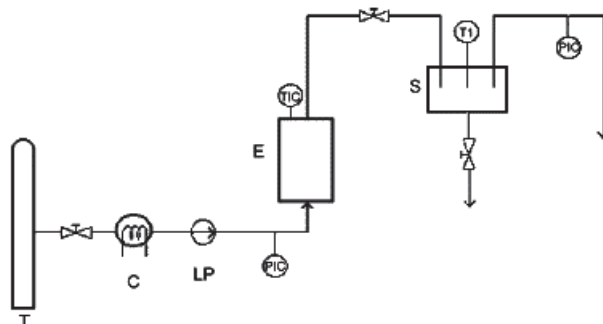
Самоникле врсте *Sideritis scardica* Griseb., Lamiaceae су сакупљене на планини Шари (на планинском врху Љуботен на око 1300 м) за вријеме цвјетања. Биљни материјал је осушен на собној температури, упакован у папирне кесе и чуван у мрачном и хладном месту до анализе. Биљни материјал се самеле у блендеру 60 с и одмах се подвргне дестилацији (ХД) или наткритичној екстракцији CO₂ (НКЕ-CO₂), као и екстракцији растварачима. Просјечна величина честица самлевог биља је 0.40 mm (за све урађене екстракције у овом раду).

Етарско уље добијено хидродестилацијом

Осушено и самлево биље (50 g) биљке *S. scardica* се дестилује уз помоћ 700 mL дестиловане воде према стандардном Клавенџеровом методу (4h), при чему се добија жуто вискозно етарско уље балзамичног мириса. Добијено етарско уље (Узорак ЕО) се чува у затвореној флашици на 4°C. Принос (w/w) етарског уља је 0.03% (у односу на суву дрогу).

Наткритична екстракција угљен диоксидом

Наткритична екстракција угљен диоксидом (НКЕ CO₂) се изводи у опремљеној лабораторији, на Autoclave Engineers SCE Screening Systemu са судом за екстракцију од 150 cm³ који је претходно описан у раду Жижовић и сарданици(66) и приказан на слици 7.



Слика 16. Шематски приказ Autoclave Engineers SCE Screening Systemu – T: CO₂ танк за складиштење; C: криостат; LP: пумпа за обезбеђивање високог притиска; E: суд за екстракцију; S: суд за сепарацију.

Биљни материјал (41.4 г) је самљевен и просијан. Дио са просјечним дијаметром од 0.4 мм (скупни између сита од 0.2 мм и 0.6 мм) и користи се за експерименте. Наткритична екстракција угљен диоксидом се изводи парцијално. Притисак и температурни услови за екстракцију првог дијела су 10 МПа и 40°C док је проток CO₂ 0.67 kg/h (на тај начин се добија узорак **ЕО-CO₂**). Пошто се исцрпи биљни материјал, притисак се повећа на 30 МПа и следи екстракција другог дијела. Мјера протока CO₂ је 0.32 kg/h (добијени узорак **АО-CO₂**). Комерцијални угљен диоксид (чистоће 99%) који је обезбиједила фирма Техногас (Мессер-Техногас, Србија) се користи за НКЕ CO₂, и дихлорометан и алкохол (GC чистоће, Sigma-Aldrich, Немачка) се користе за растварање добијених екстракта прије GC-FID-MS анализа.

Екстракција растварача (СЕ)

Надземни дјелови *S. scardica* (600 g) који су сушени у хладу и самљевени, екстраховани су 70% (V/V) етанолом. Екстракт (груби екстракт **1**) је филтриран кроз Витман филтер папир N⁰2, а онда упарен до сува. Принос екстракције је био 16.7%. Нерафинисани етанолни екстракт (**1**) се поново раствара у дестилованој води, јако се протресе и екстракује са 600 mL диетил етара у лијевку за одвајање. Горњи слој се уклони, и растварач се упари у вакуумском ротационом упаривачу (45 °C, 90 rpm, и 300 mbar вакуум). Добијена количина етарског екстракта је била 2.8 г (диетилетар екстракт, **2**). Преостали водени слој је екстракован у лијевку за одвајање са 600 mL етил ацетата. Слој етил ацетата је уклоњен, а растварач је упарен у вакуумском ротационом упаривачу (60 °C, 90 rpm, и 250 mbar вакуум). Послије сушења, одмјерен је етилацетатни екстракт - 1.3g (етил ацетат екстракт, **3**). Преостали водени слој се у лијевку за одвајање екстракује са 600 ml н-бутанола засићеног водом. Органски слој је уклоњен, а растварач је упарен у вакуумском ротационом упаривачу (80°C, 90 rpm, и 150 mbar вакуум). Послије сушења, добијен је н-буртанолни екстракт 4.4 г (н-бутанол екстракт, **4**). Добијене количине наведених екстракта су 16.7, 7.5 и 26.3 % у односу на почетни, сирови екстракт, или 0.46, 0.21 и 0.73% суве биљке.

Узимајући у обзир да је фракција 1 добијена екстракцијом помоћу органског неселективног раставарача (етанола), наведена фракција је, у циља добијања фракција које садрже по својој поларности различите конституенте, подвргнута сукцесивној екстракцији растварачима различите поларности. На тај начин су добијене фракције: 2 (диетил етарска фракција), 3 (етил ацетатна фракција), и 4 (н-бутанолна фракција).

Обиљежавање екстраката:

- **ЕО** - етарско уље добијено путем хидродестилације
- **ЕО-CO₂**, - поларна фракција добијена наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида на 10 МПа и 40°C;

- **АО-СО₂**, - фракција добијена наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида при притиску, 30МПа и 40°С и која садржи једињења са већом молекулском масом;

Фракције које се добијају сукцесивном екстракцијом употребом екстрагенаса различите поларности:

1. сирови екстракт добијен екстракцијом помоћу етанола
2. екстракт добијен екстракцијом диетил етром;
3. екстракт добијен екстракцијом етил ацетатом;
4. екстракт добијен екстракцијом н-бутанолом

Реагенси:

- 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT, stepen čistoće $\geq 99.8\%$),
- etar,
- petrol,
- dimetil sulfoksid (DMSO),
- etil acetat, *n*-butanol (BuOH),
- aceton, i potpuni ethanol (96%, v/v),
- купљени су код Merck-а у Дармштату у Немачкој.
- DPPH (α, α -difenil- β -pikrilhidrazil) (stepen čistoće - аналитички),
- тролокс ($\geq 99.0\%$)

су купљени код Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Немачка).

- Ацетонитрил (MeCN),
- вода и метанол,

ХПЛЦ чистоте, купљени су код Merck-а у Дармштату у Немачкој.

Референтни HPLC стандарди:

- п-кумаринска киселина [3-(4-хидроксифенил)-2-пропенска киселина (99%),
- протокатехолна киселина [3,4-Дихидроксидезојева киселина чистоте $\geq 99.0\%$],
- ванилна киселина (4-хидрокси-3-метоксибензојева киселина, чистоте $\geq 95.0\%$],
- хлорогенска киселина [(1*S*,3*R*,4*R*,5*R*)-3-{[(2*Z*)-3-(3,4-дихидроксифенил)проп-2-еноил]окси}-1,4,5-трихидроксициклохексанкарбонска киселина;
- 3-О-кафеоилхинска киселина],

- кафена киселина (3-(3,4-дихидроксифенил)-2-пропанска киселина, чистоте $\geq 90.0\%$],
- ферула киселина [(E)-3-(4-хидрокси-3-метокси-фенил) проп-2-енолна киселина, чистоте $\geq 99.0\%$],
- сиригична киселина [4-хидрокси-3,5-диметоксибензојева киселина, чистоте $\geq 95.0\%$] киселина, лутеолин-7-*O*- β -глукозид [2-(3,4-дихидроксифенил)-5-хидрокси-7-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-трихидрокси-6-(хидроксиметил) оксан-2-ил] оксихромен-4-он; чистоте $\geq 98.0\%$],
- апигенин-7-*O*- β -глукозид [5-хидрокси-2-(4-хидроксифенил)-7-[(2*S*,3*R*,4*S*,5*S*,6*R*)-3,4,5-трихидрокси-6-(хидроксиметил)оксан-2-ил]оксихромен-4-он; чистоте $\geq 99.0\%$],
- лутеолин [2-(3,4-Дихидроксифенил)-5,7-дихидрокси-4-хроменон; чистоте $\geq 99.0\%$],
- хризериол [5,7-дихидрокси-2-(4-хидрокси-3-метоксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он; чистоте $\geq 99.0\%$] и апигенин [5,7-Дихидрокси-2-(4-хидроксифенил)-4*H*-1-бензопиран-4-он; чистоте $\geq 99.0\%$]

су купљени од Sigme, Sv. Luis, MO, или од Extrasynthese (Genay, Француска). Рани-
тидин, чистоте $\geq 95.0\%$ (ампуле Ранисана) су купљене од фирме Здравље –Ацтавис Ле-
сковац, Србија).

Приноси екстракције

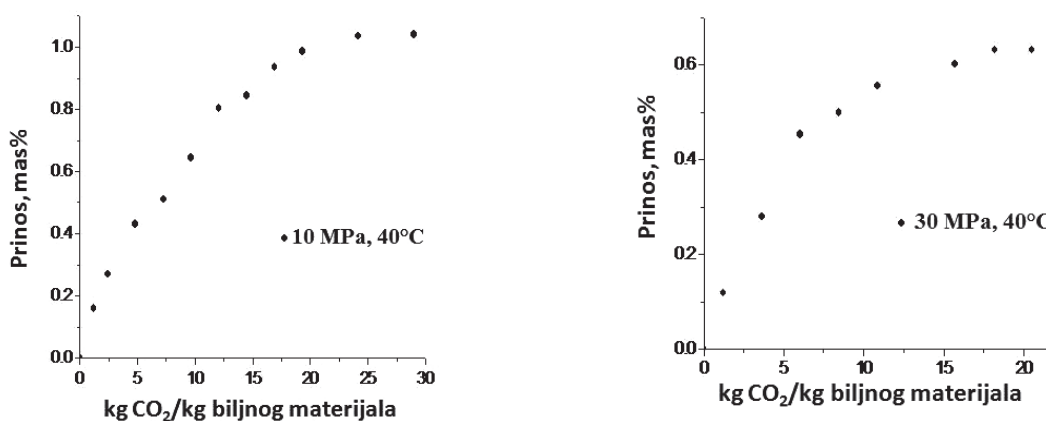
Приноси спроведених екстракција су приказани у **Табели 3**. Резултати су у складу са очекивањем, указујући да је неселективни органски растварач употребљен за добијање узорка 1 условио и екстракцију са највећим приносом.

Табела 3. Приноси, изражени као вриједност екстраката у поређењу са укупном масом чврстог, полазног материјала на почетку процеса екстракције за наткритичне (ЕО- CO_2 , АО- CO_2) и конвенционалне (ЕО, 1, 2, 3, и 4) екстракте биљке *S. scardica*.

Спроведене екстракције	Принос екстракција (%)
ЕО	0.03
ЕО- CO_2	1.04
АО- CO_2	0.63
1	16.70
2	0.50
3	0.20
4	0.70

Кинетика екстракције НКЕ- CO_2

Кинетика екстракционих процеса је приказана на **Слици 17**. Принос је приказан као функција потрошње CO_2 за НКЕ. Резултати показују да је укупна потрошња CO_2 1200 g за први, и 870 g за другу екстракцију. Кинетика оба експеримента је очигледно слична. Међутим, први дио садржи углавном испарљиве компоненте са релативно малом молекулском масом, а које улазе у састава етарских уља, док се други дио (који се дефинише као неиспарљиви) састоји углавном од компонената које карактерише већа молекуларна тежина.



Слика 17. Резултати експеримента за наткритичну екстракцију из *S. scardica* на 10 MPa и 40 °C (лијево), и 30 MPa и 40 °C (десно).

Одређивање укупног садржаја фенола

Укупан садржај фенола се одређује помоћу Folin- Ciocalteu metode (84) 100 μL MeOH раствора испитиваних сувих екстраката **1**, **2**, **3** и **4** (15.75, 31.5 и 63; 27.75, 55.5 и 138.75; 7.28, 14.56 и 19.13; и 7.06, 14.13 и 28.25 $\mu\text{g/mL}$ припремљене количине) се помеша са 0.75 mL Folin- Ciocalteu реагенса (претходно разблажен 10 пута дестилованом водом) и остављен на одстоји 5 минута на 22°C. Затим се дода 0.75 mL раствора натријум-бикарбоната (60 g/L) Након стајања од 90 мин на 22°C, мјери се апсорпција на 725 nm. Гална киселина (0-100mg/L) се користи за калибрацију стандардне криве. Калибрациона крива показује линеарну регресију на $r > 0.99$ и резултати се изражавају у mg галне киселине која је еквивалентна са грамом тежине сувих екстрата биљке (mg GAE/g DW). Тро-струка мјерења су извршена и подаци су приказани као мјера $\pm$ стандардне девијације (SD).

Садржај танина

Процентуални садржај танина се рачуна помоћу методе која је описана у Европској Фармакопеји Ph. Eur. 6.0 (85) Укратко, раствори испитиваних екстрата, се излажу фосфомолбдоволфрамовом реагенсу у алкалном медијуму, третирајући га са кожним пра-

хом. Филтрираном раствору мјери се апсорпција на UV-VIS Спектрофотометра HP 8453 (Agilent Technology USA), на $\lambda_{\max}$ 760 nm. Из разлике у апсорбанцији укупних полифенола и полифенола који се не адсорбују на кожни прах, израчунава се процентуални садржај танина изражен преко пирогаала (% w/w), уз помоћ формуле:

$$\frac{62,5 \cdot (A_1 - A_2) \cdot m_2}{A_3 \cdot m_1}$$

m_1 - маса узорка који се испитује, у грамима,

m_2 - маса пирогалолола у грамима.

Резултати представљају средњу вриједност три одређивања $\pm$ SD.

Укупан садржај флавоноида

Процентуални садржај флавоноида изражен је преко хиперозида, методом описаном у DAB 10 (4) Укратко, узорак се екстракује мешавином ацетона/HCl уз повратни хладњак; $AlCl_3$ комплекс флавоноидног дијела екстракује се етил-ацетатом; интензитет његове апсорбанције се одредјује UV-VIS спектрофотометром (HP 8453) на 425 nm. Процентуални садржај флавоноида се изражава преко хиперозида, представљен као средња вредност $\pm$ SD (стандардна девијација) три одређивања.

HPLC анализа

HPLC анализа екстрата и квантификација познатих једињења урађена је на апарату HPLC. (Agilent Tehnologija 1200). Детекција је спроведена на $\lambda = 260$ nm DAD детектором и хроматограми су снимљени на $\lambda = 260$ nm (за протокатехинску и сиригичну киселину), 280nm (за хлорогенска, ванилна, п- коумаринску и кафену киселину), 325 nm (ferula kiselinu), и 360 nm за флавоноиде. HPLC раздвајање компонената се постиже коришћењем колоне Licrospher 100 RP 18e (5 μ m), 250 $\times$ 4 mm и.d. са брзином протока 1mL/мин и мобилном фазом А (500 mL H_2O + 9.8 mL 85% H_3PO_4 (w/w)), В (MeCN), елуирање представља комбинацију градијентног мода: 90-75% А, 0-25 мин, изократски 75% А, 25-30 мин; 75-55% А, 30-46 мин. Узорак се спрема тако што се раствори 118.6, 49.4, 9.4 и 53.0 mg екстрата **1**, **2**, **3** и **4** (добijenih на начин који је већ описан) у 10 mL MeOH. Прије анализе сваки екстракт се профилира кроз 0.2 μ m PTFE филтер. Запремина испитиваног узорка је 4 μ L. Стандардни раствори за одређивање флавоноида и полифенолиних киселина су припремљени у финалној концентрацији од 0.01 mg/mL (протокатехинска, п-кумаринска, ванилна, ферула киселина, као и лутеолин и хризериол), 0.05 mg/mL (хлорогенска и кафена киселина и апигенин) или 0.12 mg/mL апигенин-7-О-гликозид и лутеолин-7-О-гликозид) у метанолу. Како би се фенолна једињења идентификовала и одредила у испитиваним екстрактима, три стандардне смјесе су припремљене, са већ

споменутим концентрацијама - мјешавина стандарда 1 (M1) садржи кафену киселину апигенин-7-*O*-гликозид и апигенин; мјешавина стандарда 2 (M2) садржи хлорогенску киселину, лутеолин-7-*O*-гликозид, лутеолин, хрисериол. Мјешавина стандарда 3 (M3) која садржи остатак испитаних фенолских једињења. Запремина је 4 μL , иста као и код испитиваног екстрата. Идентификација је урађена на основу поређења ретенционих времена стандардних супстанци и одговарајућих једињења у испитиваним екстрактима, као и на основу спектралних карактеристика и сличности стандардних супстанци и одговарајућих једињења у испитиваним екстрактима. Када је поклапање спектра успјешно, резултати су потврђени уз помоћ постављених стандарда а све у циљу постизања комплетне идентификације помоћу чистоће пика. Они пикови који не испуњавају ове захтјеве, нијесу узимани у обзир. Квантификација је урађена методом екстерног стандарда.

Гасна Хроматографија (GC-FID)

Анализа екстракта гасном хроматографијом се изводи на GC апарату HP-5890 Серије II [Hewlett-Packard, Waldbronn (Немачка)], опремљеним split-splitless ињектором и аутоматским семплером, који је повезан на HP-5 колону (25m x 0.32 mm, 0.52 μm) и опремљен детектором јонизирајућег пламена (FID). Протока гаса носача (H_2) је 1 mL/min, са split-односом 1:30, температуре ињектора 250 $^{\circ}\text{C}$, температуре детектора 300 $^{\circ}\text{C}$, док је промјена температуре колоне линеарно програмирана од 40 до 260 $^{\circ}\text{C}$ (са брзином раста од 4 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), а онда се подешавају изотермални услови на 260 $^{\circ}\text{C}$ током 10 мин. Раствори узорка од 1 μL у дихлорометану или алкохолу се узастопно убризгавају. За квантификациону анализу користила се стандардна обрада хроматограма која се односи на корелацији процентне заступљености и површине испод пика.

Гасна -Хроматографија/Масена спектрометрија (GC-MS)

Исти аналитички услови као они споменути за GC-FID се користе за анализе GC/MS заједно са колоном HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm дебљина филма), уз користећење HP G 1800C Серија II GCD System [Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, SAD]. Нелијум се користи као гас носач. Линија трансфера се загреје на 260 $^{\circ}\text{C}$. Масени спектри се добијају у EI моду (70eV); у опсегу од 40-450 m/z. Количина апликованих узорака (растворених у алкохолу или дихлорометану) је 0.2 μL . Компоненте уља су идентификоване упоређивањем масених спектра са оним који се налазе у бази података Wiley 275 и NIST/NBS базе, уз кориштење разних претраживача. Идентификација компонената се постиже упоређивањем њихових ретенционих индекса и масених спектра са онима који су пронађени у литератури (75) и допуњени уз помоћ аутоматске масене спектралне анализе и софтверског система за идентификацију (AMDIS ver. 2.1), GC-MS базе (76) Експерименталне вриједности за индексе ретенције се одређују кориштењем калибрисаног аутоматског масеног спектра деконволуције и системског софтвера за идентификацију (AMDIS

ver. 2.1), GC-MS базе (76) у поређењу са оним из доступне литературе (Adams 2007) (75) Проценат конституената етарских уља се израчунава примјеном нормализације површине одговарајућег пика, а сви релативни фактори одговора су узети као један. (75,76)

Одређивање антиоксидативних својстава

Важну улогу за антиоксидативно дјеловање фенолних једињења има присуство хидроксилне групе у њиховој структури. Поуздана, брза и једноставна метода за испитивање способности уклањања слободних радикала је DPPH тест. Стабилни DPPH (α, α -difenil- β -pikrilhidrazil) радикал се често користи за процјену антирадикалане способности различитих једињења. DPPH (α, α -difenil- β -pikrilhidrazil) тест се спроводи према процедури коју је описао Blois (94) уз неке измјене. Принцип овог теста (у реакцији елиминације слободних радикала) је редукција љубичастог DPPH (α, α -difenil- β -pikrilhidrazil) до жуто обојеног difenilpikrilhidrazina. Ова промјена боје је мјера јачине елиминације слободних радикала и одређује се спектрофотометријски.

Различите концентрације узорака се помијешају са 900 mL од 0.04 mg/ mL метанолног раствора DPPH-a.. UV спектри су забиљежени на UV-VIS спектопометру HP 8453. на таласној дужини од 517 nm.. Проценат инхибиције DPPH радикала се израчунава према следећој формули:

$$I = \frac{A_c - A_s}{A_c} \cdot 100$$

гдје је

I - проценат инхибиције,

A_c - је апсорпција негативне контроле (која садржи 100 μ L MeOH умјесто узорака),

A_s - је апсорпције узорака.

Синтетички антиоксиданс, тролокс је употребљен као позитивна контрола. Проценат инхибиције изражава се концентрацијом узорака и IC₅₀ вриједностима (концентрација узорка која доводи до 50% неутрализације DPPH радикала), које се одредјују уз помоћ анализе линеарне регресије која представља средњу вредност три мерења $\pm$ SD стандардна девијација.

Испитивање антиинфламаторне активности - тест едема на шапи пацова изазваног у експерименту са карагеном

Тест едема на шапи пацова изазваног карагеном се користи као експериментални модел за одређивање анти-инфламаторних својстава испитиваних екстраката, према модификованом моделу Ouanaguia i Satoa (95). Екстракти су дати орално у дозама 50, 100

и 200 mg/kg. Индометацин, растворен у DMSO, се користи као референца, у дози од 4mg/kg орално (доза која доводи до 50% смањења едема на шапи пацова). Експерименти су спроведени на одраслим женкама Wistar пацова које су најмање 18 сати пре почетка огледа биле лишаване хране, уз слободан приступ води. Екстракти су растворени у DMSO и давани гастричном сондом један сат прије ињекције 0,5%-ног раствора карагенина (0,1 mL) у стражњу десну шапицу пацова. Лијева шапица, у коју је ињектован исти волумен физиолошког раствора служила је као контрола. Три сата послје ињекције карагенина, животиње су жртвоване, шапице су им ампутиране и вагане на аналитичкој ваги. Разлика у тежинама шапица (десна - лева) служила је као мјера величине насталог едема. Као референтни лијек коришћен је индометацин, снажни нестероидни антиинфламаторни лијек, у дози у којој за око 50% смањује интензитет запаљења, тј. величину карагенином изазваног едема шапице.

У свакој експерименталној групи било је од 5 до 10 животиња.

Проценат анти-инфламаторног ефекта се израчунава из израза:

$$\text{Анти-инфламаторни ефекат (\%)} = \frac{\Delta_k - \Delta_e}{\Delta_k} \cdot 100$$

где је:

Δ_k - разлика у тежини шапе у контролној групи

Δ_e - је разлика у тежини шапе у лијеченој групи.

Испитивање гастропротективног дејства

Гастропротективно дејство припремљених екстраката испитано је на моделу акутног стрес-улкуса изазваног примјеном апсолутног етанола код пацова. И у овом огледу коришћене су одрасле женке Wistar пацова које су најмање 18 сати пре огледа гладовале, уз слободан приступ води. Животињама су гастрочном сондом апликовани екстракти, претходно растворени у DMSO, у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg. Један сат послје примјене екстраката, животињама је на исти начин дато по 1 ml апсолутног етанола, а један сат по апликацији етанола, оне су жртвоване, желудац им је вађен, отворан по великој кривини, испиран водом и посматран под лупом у циљу процјене интензитета лезија. Промјене су бодоване према модификованој Адамијевој скали (Adami и сарадници 1964):

0 - без промјена

0,5 - блага хиперемија или ≤ 5 петехија

1 - 5 ерозија ≤ 5 мм у дужини

1,5 - ≤ 5 ерозија ≤ 5 мм у дужини и много петехија

2 - 6–10 ерозија ≤ 5 мм у дужини

- 3 - 5–10 ерозија >5 мм у дужини
- 3,5 - 10 ерозија >5 мм у дужини
- 4 - 1–3 ерозије ≤ 5 мм у дужини и 0,5-1 мм у ширини
- 4,5 - 4–5 ерозија ≤ 5 мм у дужини и 0,5-1 мм у ширини
- 5 - 1–3 ерозије >5 мм у дужини и 0,5-1 мм ин ширини
- 6 - 5 лезија степена 4 или 5
- 7 - ≥ 5 лезија степена 6
- 8 - потпуна лезија мукозе са хеморагијама

На исти начин вршена је процјена лезија изазваних апсолутним етанолом код не-третираних животиња (уместо екстракта добиле су исти волумен растварача - DMSO), као и оних које су 1 сат прије примјене етанола добиле једнократну дозу ранитидина (Ранисан[®] ампуле, «Здравље», Лесковац) од 20 mg/kg *per os* (тзв. позитивна контрола). Ова доза ранитидина изабрана је као гастропротективна на основу претходно извршеног пилот-експеримента у којем је истестиран гастропротективни ефект неколико перорално датих доза ранитидина.

Животиње

За процјену антиинфламаторне активности (тест карагенином индуковани едем шапце пацова) и гастропротективне активности (модел акутног улкуса изазваног апсолутним етанолом) етанолних екстраката *S. scardica* коришћени су одрасли мужјци Wistar пацова који теже 200-300 г У свакој експерименталној групи било је од 6-10 животиња. Животиње нијесу узимале храну у року од 18-20 сати прије почетка експеримента али су имале слободан приступ води.

Ова студија је извршена по одобрењу локалног Института за бригу о животињама и спроведена у складу са одредбама Европске Уније о третирању животиња током експеримената. (број одобрења 86/609/ЕЕЦ, 31. 01. 2008.)

Цитотоксична активност различитих екстрата

Цитотоксична активност биљних екстрата је процењена на хуманим туморским ћелијама HeLa (human cervix carcinoma cells - хумане ћелије карцинома цервикса), FemX (human melanoma cells - хумане ћелије меланоме) и B16 (mouse melanoma - ћелије меланом код миша). Наведене ћелијске линије су одржаване као једнослојне културе у медијуму Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 nutrient medium (Sigma Chemicals Co, USA). RPMI 1640 хранљиви медијум је припремљен у стерилној јонизованој води, додат је пеницилин (192 U/mL), стрептомицин (200 µg/mL), 4-(2-хидроксиетхил) пиперазин-1-етансулфонска киселина (HEPES) (25 mM), L-глутамин (3 mM) и 10% топлотом инактиви-

вирани серум телета (FCS) (pH 7.2). Ћелије су држане у условима на температури од 37°C у 5% CO₂, у атмосфери засићеној влагом.

Статистичке анализе

Статистички значај посматраних разлика су изанализирали уз помоћ Mann-Whitney U -теста и Kruskal–Vallisovog теста (у тестовима за анти-инфламаторне и гастропротективне активности), или помоћу b-теста или ANOVE после које је уследио Student-Njuman-Keulsov test. Вриједност теста од $p < 0.05$ је сматрана значајном.

Антимикробна активност

Истраживање антибактеријске активности испитиваних ЕО, ЕО-CO₂, АО-CO₂, 1, 2, 3, и 4 фракција се изводи на Грам-позитивним и Грам-негативним врстама бактерија. У овом раду су тестирани микроорганизми, Грам-позитивне бактерије, *Streptococcus piogenes*, *Streptococcus canis*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, -Метицилин отпорне *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Enterococcus faecalis*, као и Грам-негативне бактерије *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida* и *Haemophilus sp.*, и гљивица *Candida albicans*. *Pseudomonas aeruginosa* представља медицински и ветеринарски проблем због своје отпорности на многе антибиотике и дезифицијенсе и могућност развијања резистенције на сваки такозвани „антипсеудомонични антибиотик“ укључујући карбапанеме и уреидопеницилине (80,81). Инфекције које изазива бактерија *Candida albicans* су обично хроничне и тешке за лијечење, нарочито код дјете због јаких нефротоксичних и хепатотоксичних нежељених последица неких антифунгицида, на пример кетоконазола (82,83). С друге стране стафилококе и стрептококе према статистици најчешћи су узрок честих инфекција коже код људи и животиња (82). За разлику од стрептокока, које су обично осетљиве на пеницилине, стафлококе се тешко лијече због могућности да развију резистенцију на антибиотике и дезифицијенсе (83,84). У исто вријеме стафилококе су често и агенси који узрокују секундарне инфекције коже, нарочито након уједа инсеката или алергија тако да, у свим случајевима антистафилококна терапија је потребна (82) Остали испитивани микроорганизми само су понекад агенси који изазивају инфекције, углавном код имунокомпромитованих пацијената.

Испитивани узорци су узети са коже и брис из грла људи и животиња са симптомима инфекције. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 и референтни сојеви (MRSA ATCC 43300) бактерије *Staphylococcus aureus* који су отпорни на метицилин купљени су од Becton Dickinson, SAD. Изолација је направљена из клиничког материјала добијеног са Одсека за микробиологију, Факултета за ветеринарску медицину, Универзитета у Београду. Уобичајене микробиолошке методе су примењене у циљу изолације и идентификације, а крвни агар колумбијских оваца ((bioMerieux), MacConkey agar (bioMerieux), CNA agar

са колистинском киселином и налидинском киселином (Becton Dickinson) и нутрицио-ни производ (BioLab) су употребљени као одговарајуће подлоге. За изоловање *Candida albicans* је употребљен *Sabouraud dextrose agar* (BioLife). Идентификација изолованих сојева се изводи са BBL Crystal Грам-позитиве ID kit, *BBL Crystal enteric/nonfermenter ID kit* (Becton Dickinson), API 32 STAPH, API 20 NE и API 20 C AUX (bioMerieux). За утврђивање антибактеријске активности и одређивање МИЦ вриједности испитиваних узорка примијењена је микродилуциона метода у складу са CSLI прописима за тестирање антимикуробне осетљивост (89,92) У ту сврху се користи катјонски подешена Mueller Hintonova II подлога (CAMHB, Becton Dickinson) са додатком 1.6 % љубичастог бром крезол (Merck) у концентрацији од 0.2mL/200mL за Грам-позитивне и 1% црвеног фенола (Merck) у концентрацији од 1 mL/200mL за Грам-негативне. Љубичасти Бром крезол и црвени фенол се додају како би се добио уочљиви раст бактерије. Течна *Sabouraud dextrose agar* (BioLife) се користи за квасце без додавања индикатора. За стрептококе се у CAMHB подлози додаје говедји серум (Sigma) у концентрацији од 5%. За испитиване узорке користи се диметил сулфоксид (DMSO, Merck). као растварач. Испитиване концентрације проучаваних узорка су 2560, 1280, 640, 320, 160, 80, 40, 20, 10, 5, 2,5 и 1,25 изражено у $\mu\text{g/mL}$.

У 1mL DMSO се раствара испитивани узорак тако да се добије концентрација 25.600 $\mu\text{g/mL}$, затим се направи разблажење са CAMBH у размери од 1:10. Титрација се обави у ерленмајерима док се не добије жељена концентрација као што је претходно описано (89,92) Крајња густина бактеријског инокулума је 5×10^5 CFU/mL а постиже се додавањем 5 μL од $1-2 \times 10^7$ CFU/mL суспензије испитиваних сојева у ерленмајерима са 100 μL претходно додатог CAMHB-а. Ерленмајери се инкубирају 18-24 h на 37°C. МИЦ вриједности представљају ону концентрацију испитиваног узорка која доводи до спречавања очигледног бактеријског раста.

Резултати

Хемијски састав испитиваних узорака

Садржај и хемијски профил истраживаних конвенционалних и НКЕ екстракта биљке *S. scarduca*: **ЕО**, етарско уље добијено путем хидродестилације; **ЕО-СО₂**, поларна фракција која се добија наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида на 10 МПа и 40°C; **АО-СО₂**, фракција која се добија наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида при притиску, 30МПа и 40°C и која садржи једињења са већом молекулском масом; и фракције које се добијају сукцесивном екстракцијом употребом екстрагенаса различите поларности: **1**- сирови екстракт добијен екстракцијом помоћу етанола, **2**- екстракт добијен екстракцијом диетил етром; **3**- екстракт добијен екстракцијом етил ацетатом; **4**- н-бутанолни екстракт, одређени су уз помоћ GC и GC-MS метода, са циљем да се утврде могуће корелације хемијског састава, начина екстракције и антимикуробиолошке активности испитиваних екстраката (**Табеле 2 и 3, Слике 17 и 18**)

Хемијска анализа испарљивих састојака испитиваних узорака је урађена примјеном GC и GC-MS метода. Укупно је идентификовано 133 једињења (Табела 2) у испитиваним узорцима ЕО, ЕО-СО₂, АО-СО₂, 1, 2, 3 и 4, представљајући 89.12, 87.69, 98.12, 99.98, 90.30, 96.09 и 79.74% у односу на укупни садржај.

Садржај и хемијски профил екстракта биљке *S. scarduca* добијени хидроизолацијом, наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида и сукцесивном екстракцијом реагенаса различите поларности приказани су у **Табели 2**

Битне разлике су утврђене између хемијских профила етарских уља која су добијена путем ХД и НКЕ СО₂ примјењујући притисак од 10 МПа при температуре од 40°C –услови екстракције (узорци ЕО и ЕО- СО₂). Наиме, масне киселине са својом естрима, као и дитерпенска једињења представљају главне групе код ЕО-СО₂ једињења са 41.16 % и 33.75 %, (**Слика 18**). Главне компоненте су хексадеканолска киселина, дихидроксил дериват сандаракопимар-8(14),15-диена, (Е)- ферругинол ацетат и етил хексадеканоат (18.59, 14.89, 11.82 и 11.73%).

Табела 2. Хемијски састав НКЕ (ЕО- CO_2 , АО- CO_2) и конвенционалних (ЕО, 1, 2, 3 и 4) испитиваних екстракта биљке . *S. Scardica*

No	Тип екстракције		ХД	НКЕ CO ₂		СЕ			
	Једињења	К.И. ^a	ЕО	ЕО- CO ₂	АО- CO ₂	1	2	3	4
1.	α-тујен	925.5	0.30	-	-	-	-	-	-
2.	2,4(10)-тујадиен	953.0	-	1.33	-	-	-	-	-
3.	сабинен	967.3	0.05	-	-	-	-	-	-
4.	мирцен	967.4	1.25	0.24	-	-	-	-	-
5.	n-декан	985.5	0.07	-	-	-	-	-	-
6.	β-феландрен/лимонен	1021.7	0.05	-	-	-	-	-	-
7.	1,8-цинеол	1023.2	0.08	-	-	-	-	-	-
8.	γ-терпинен	1052.8	0.11	-	-	-	-	-	-
9.	изобутил ацетоацетат	1084.9	0.31	-	-	-	-	-	-
10.	линалол	1095.3	1.53	-	-	-	-	-	-
11.	β-тујон	1097.8	0.45	-	-	-	-	-	-
12.	α-тујон	1098.7	0.56	-	-	-	-	-	-
13.	транс-пинокарвеол	1130.8	0.34	-	-	-	-	-	-
14.	камфор	1134.8	0.88	-	-	-	-	-	-
15.	транс -вербенол	1138.8	t	-	-	-	-	-	-
16.	изоментон	1145.8	1.75	-	-	-	-	-	-
17.	борнеол	1157.7	1.46	-	-	-	-	-	-
18.	ментол	1165.6	4.90	-	-	-	-	-	-
19.	4-трпинол	1169.8	0.42	-	-	-	-	-	-
20.	α-терпинеол	1186.2	0.27	-	-	-	-	-	-
21.	миртенал	1190.8	0.42	-	-	-	-	-	-
22.	миртенол	1191.2	0.64	-	-	-	-	-	-
23.	транс -дихидрокарвон	1199.5	0.07	-	-	-	-	-	-
24.	β-циклоцирал	1214.0	0.09	-	-	-	-	-	-
25.	неоизодихидрокарвеол	1224.5	0.08	-	-	-	-	-	-
26.	метил етар тимол	1228.4	0.19	-	-	-	-	-	-
27.	пулегон	1233.4	0.80	-	-	-	-	-	-
28.	метил етар карвакрол	1235.5	0.36	-	-	-	-	-	-
29.	д-карвон	1242.1	0.37	-	-	-	-	-	-
30.	пиперотон	1250.7	0.27	-	-	-	-	-	-
31.	(Z)-хризантенил ацетат	1257.8	-	-	-	-	-	1.63	4.58
32.	изоборнил ацетат	1277.5	1.10	-	-	-	-	-	-

Табела 2. (Наставак)

No	Тип екстракције		ХД	НКЕ CO ₂		СЕ			
	Једињења	К.И. ^a	ЕО	ЕО- CO ₂	АО- CO ₂	1	2	3	4
33.	(E)-анетол	1281.4	2.89	-	-	-	-	-	-
34.	ментил ацетат	1286.4		-	-	-	-	-	-
35.	тимол	1291.1	1.97	-	-	-	-	-	-
36.	карвакрол	1300.5	2.05	-	-	1.94	0.48	0.82	1.88
37.	(E)-диетокси цитрал	1341.0	-	-	-	1.62	-	-	-
38.	3'-метокси ацетофенон	1343.0	0.02	-	-	-	-	-	-
39.	α-кубене	1345.0	0.02	-	0.05	-	-	-	-
40.	α-терпенил ацетат	1342.3	0.03	-	-	-	-	-	-
41.	деканска киселина	1364.0	-	-	-	-	-	0.10	5.47
42.	α-копаен	1365.6	0.11	0.34	-	-	-	-	-
43.	β-бурбонен	1374.3	0.04	-	-	-	-	-	-
44.	транс-β-демасценон	1376.9	0.21	-	-	-	-	-	-
45.	децил ацетат	1407.0	-	-	-	-	-	2.66	12.54
46.	α-дихидројонон	1389.0	0.27	-	-	-	-	-	-
47.	β-фунебрел	1395.2	0.30	-	-	-	-	-	-
48.	транс-β-кариофилел	1408.0	0.60	1.39	-	-	-	-	-
49.	2,5-диметил-п-цимен	1417.4	0.07	-	-	-	-	-	-
50.	транс-α-бергамотел	1425.9	0.06	-	-	-	-	-	-
51.	α-хумулел	1442.4	0.10	-	-	-	-	-	-
52.	(E)-β-фарнезел	1449.2	0.21	-	-	-	-	-	-
53.	(2E)-додеканал	1464.0	0.10	-	-	-	-	-	-
54.	гермакрел Д	1470.3	0.52	-	-	-	-	-	-
55.	(E)-β-јонон	1478.0	1.15	-	-	-	-	-	-
56.	(E)- 4(14),5- муроладиел	1482.2	0.03	-	-	-	-	-	-
57.	валенсел	1484.8	0.35	-	-	-	-	-	-
58.	α-муролел	1490.2	0.33	-	-	-	-	-	-
59.	β-бисаболел	1499.3	0.19	0.41	-	-	-	-	-
60.	χ-кадиел	1503.1	0.13	0.89	-	-	-	-	-
61.	7-епи-α-селиел	1520.0	0.66	0.94	-	-	-	-	-
62.	(E)-каламенел	1521.0	0.36	-	-	-	-	-	-
63.	миристициел	1522.0	5.23	-	-	-	-	-	-
64.	δ-кадиел	1522.0	0.10	-	-	-	-	-	-
65.	италикан етар	1531.1	t	-	-	-	-	-	-
66.	α-калакорел	1532.7	1.31	-	-	-	-	-	-

Табела 2. (Наставак)

No	Тип екстракције		ХД	НКЕ CO ₂		СЕ			
	Једињења	К.И. ^a	ЕО	ЕО- CO ₂	АО- CO ₂	1	2	3	4
67.	β-калакорен	1553.3	1.21	-	-	-	-	-	-
68.	(E)-неролидол	1557.1	0.06	-	-	-	-	-	-
69.	додеканска киеслина	1565.0	-	-	-	17.05	6.96	25.56	35.78
70.	спатуленол	1577.0	1.97	-	-	-	-	-	-
71.	кариофилен оксид	1582.0	4.84	2.44	0.07	-	-	-	-
72.	видифлорол	1592.0	1.23	-	-	-	-	-	-
73.	каротол	1593.5	t	-	-	-	-	-	-
74.	ледол	1594.3	0.99	-	-	-	-	-	-
75.	диепи-α-цедренепоксид	1607.0	t	-	-	-	-	-	-
76.	хумулен епоксид II	1608.0	0.56	-	-	-	-	-	-
77.	леден	1613.0	0.32	-	-	-	-	-	-
78.	(E)-изолонгифоланен	1618.8	0.56	-	-	-	-	-	-
79.	α-колокален	1622.0	0.14	-	-	-	-	-	-
80.	4,10(14)-муроладиен-1-β-ол	1630.0	0.61	0.21	-	-	-	-	-
81.	4(12),8(13)-кариофиладиен-5-β-ол	1639.0	0.51	-	-	-	-	-	-
82.	τ-муролол	1640.6	3.62	-	-	-	-	-	-
83.	α-муролол	1645.7	0.19	-	-	-	-	-	-
84.	α-11-селинен-4-ол	1658.1	1.65	-	-	-	-	-	-
85.	(E)-каламенен-10-ол	1668.2	1.45	-	-	-	-	-	-
86.	валеранон	1674.4	2.15	1.06	-	-	-	-	-
87.	каделен	1675.0	1.51	-	-	-	-	-	-
88.	α-4(15),5,10(14)-гермакратриен-1-ол	1685.3	1.21	-	-	-	-	-	-
89.	α-бисаболол	1685.7	0.32	0.27	-	-	-	-	-
90.	акоренон	1692.0	0.26	-	-	-	-	-	-
91.	2-(E)-тридеканолацетат	1703.0	2.50	0.65	0.19	-	-	-	-
92.	(E)-кониферил алкохол	1735.6	-	-	-	-	-	11.81	18.69
93.	бензил бензоат	1761.8	0.02	-	-	-	-	-	-
94.	β-бисаболена	1768.9	0.22	-	-	-	-	-	-
95.	β-бисаболенол	1786.1	1.40	0.53	-	-	-	-	-
96.	(2Z,6E)-фарнзил ацетат	1821.0	-	0.44	-	-	-	-	-
97.	циклопентадеканолид	1826.6	-	-	-	4.01	0.34	15.35	-
98.	(Z)-ланцеол ацетат	1858.0	-	0.66	-	-	-	-	-
99.	хексадеканола	1878.8	-	-	-	-	-	0.63	0.42
100.	(5E,9E)-фарнезил ацетон	1907.9	0.45	-	0.12	-	-	-	-

Табела 2. (Наставак)

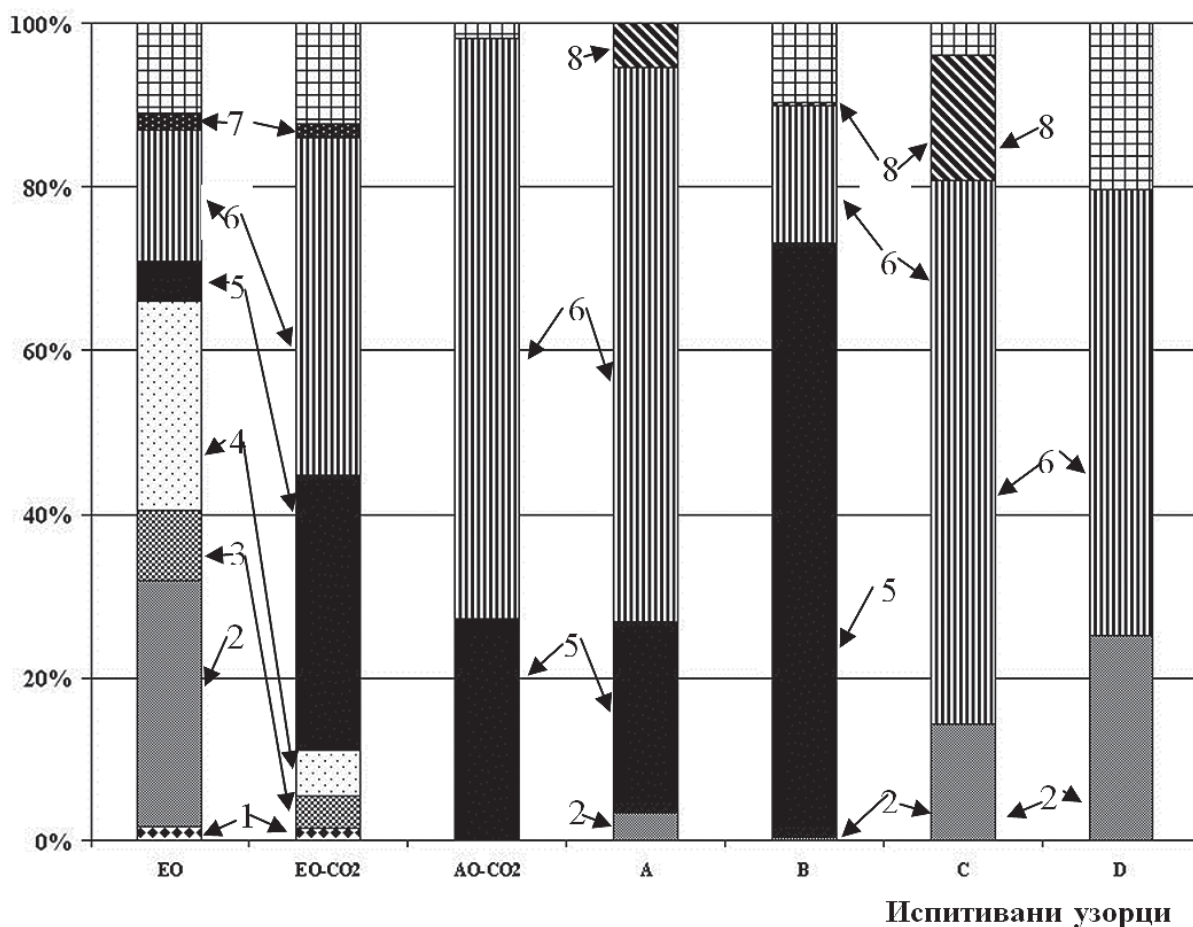
No	Тип екстракције		ХД		НКЕ CO ₂		СЕ			
	Једињења	К.И. ^a	ЕО	ЕО- CO ₂	АО- CO ₂	1	2	3	4	
101.	метил хексадеканат	1922.0	-	-	0.27	-	-	-	-	
102.	ент-15-розадиен	1933.9	0.15	-	-	-	-	-	-	
103.	пимарадиен	1948.8	0.05	1.52	2.84	-	-	-	-	
104.	хексадеканска киселина	1966.6	12.92	18.59	43.22	46.57	8.53	29.89	0.38	
105.	етил хексадеканат	1992.0	0.20	11.82	-	4.13	1.23	7.64	-	
106.	15-куарен	1997.0	1.88	0.55	-	-	-	-	-	
107.	13-епи-манол оксид	2009.9	0.62	-	-	-	-	-	-	
108.	манол	2041.7	0.54	-	-	-	-	-	-	
109.	13-епи-манол	2059.0	0.53	-	-	-	-	-	-	
110.	октадеканол	2077.0	0.21	6.20	1.84	t	t	-	-	
111.	метил линолеат	2095.0	0.01	1.34	0.11	-	-	-	-	
112.	метил олеат	2104.0	-	-	0.18	t	-	-	-	
113.	линолна киселина	2132.0	0.12	0.71	24.80	-	t	-	-	
114.	олеинска киселина	2141.0	-	0.80	-	-	-	-	-	
115.	фитол ацетат	2170.6	-	-	0.46	-	-	-	-	
116.	уганденсодиал	2190.0	-	-	-	1.36	-	-	-	
117.	7α-хидрокси манол	2237.0	0.41	0.61	-	-	-	-	-	
118.	3β-сандаракопимардиенол	2269.0	0.20	-	-	t	t	-	-	
119.	сандаракопимаринол	2269.0	0.37	1.26	1.26	-	-	-	-	
120.	трикозан	2300.0	0.38	0.40	-	-	t	-	-	
121.	изопимарол	2310.4	0.22	1.49	-	-	-	-	-	
122.	(E)-феруинол ацетат	2357.0	-	11.73	11.22	8.25	65.47	-	-	
123.	метил стриктат	2387.0	-	1.70	-	-	-	-	-	
124.	9-октадеценол	2396.4	-	1.05	-	-	-	-	-	
125.	(Z)-феруинол ацетат	2406.0	-	-	-	4.26	1.04	-	-	
126.	пентакозан	2486.0	0.41	1.23	-	-	-	-	-	
127.	8(14),15-дихидроксисандарко пимардиен ^b	2506.0	-	14.89	11.49	10.79	6.25	-	-	
128.	хексакозан	2600.0	-	t	-	-	-	-	-	
129.	хептакозан	2700.0	1.28	t	t	-	-	-	-	
130.	октакозан	2800.0	-	t	t	-	-	-	-	
131.	нонакозан	2900.0	-	t	-	-	-	-	-	
132.	триаконтан	3000.0	0.08	-	-	-	-	-	-	
133.	дотриаконтан	3200.0	0.01	-	-	-	-	-	-	

Табела 2. (Наставак)

Збирни резултат	89.12	87.69	98.12	99.98	90.30	96.09	79.74
<i>Монотерпенски угљоводоници</i>	1.83	1.57	-	-	-	-	-
<i>Оксигеновани монотерпени</i>	30.01	-	-	3.56	0.48	14.26	25.15
<i>Сескви терпенски угљоводоници</i>	8.63	3.97	0.05	-	-	-	-
<i>Оксигеновани сесквитерпени</i>	25.54	5.61	0.19	-	-	-	-
<i>Дитерпени</i>	4.97	33.75	26.81	23.30	72.76	-	-
<i>Масне киселине, естри, алдехиди, алкохоли</i>	15.96	41.16	71.07	67.75	16.72	66.48	54.59
<i>Угљоводоници</i>	2.16	1.63	t	-	t	-	-
<i>Остала једињења</i>	0.02	-	-	5.37	0.34	15.35	-

^a К.И.-Ковачев Индекс; t = мале количине (мање од 0.01%);

^b MW 304, пикови на m/z 121 и 133 указују на сандаракопимара-8(14),15-диен дитерпенску структуру, а фрагменти 286[M - H₂O]⁺ (100), 268 (30) указују на хидроксилне групе; положај хидроксилних група није утврђен.



- 1, Монотерпенски угљоводоници
- 2, Оксидовани монотерпени
- 3, Сесквитерпенски угљоводоници
- 4, Оксидовани сесквитерпени
- 5, Дитерпени
- 6, Масне киселине, естри, алдехиди, кетони
- 7, Угљоводоници
- 8, Друга једињења

Слика 18. Прегледан приказ различитих група једињења (монотерпенски угљоводоници, оксидовани монотерпени, сесквитерпенски угљоводоници, оксидовани сесквитерпени, дитерпени, масне киселине и њихови естри, алдехиди и алкохоли, угљоводоници и остала, неклассификована једињења) у испитиваним екстрактима који су добијени путем хидродестилације-НД (ЕО), наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида - НКЕ CO_2 (ЕО- CO_2 и IO- CO_2) и сукцесивне екстракције органским растварачима СЕ (1, 2, 3 и 4).

Друга фракција АО-СО₂ добијена путем екстракције НКЕ СО₂ на истој температури, али са повећаним притиском на 30 МПа (садржи једињења веће молекулске масе), карактерише се такође присуством масних киселина и дитерпена, (71.07 и 26.81%). Главне компоненте су хексадеканолска и линолеинска киселина (43.22 и 24.80%), и дитерпени и дихидрокси дериват сандаракопимар-8(14),15-диена и (Е)-феругинол ацетат (11.49 и 11.22%). Поред тога, у свим другим испитиваним екстрактима масне киселине и њихови естри су представљали главне компоненте, осим у 2 фракцији која је изузетак, с обзиром да су дитерпени представљали више од 70% у односу на укупни садржај. Узорци АО-СО₂ и 1 су имали релативно сличан профил конституената, масне киселине и дитерпени су били у највећем проценту заступљени. У узорку 1 чинили су 67.75 и 23.3%. Хексадеканолска и додеканска киселина (46.57 и 17.05%) и дитерпени дихидрокси дериват сандаракопимар-8(14),15-диена, (Е)-феругинол ацетате и (З)-феругинол ацетат (10.79, 8.25 и 4.26%) су представљали доминирајуће конституенте.

Као што је горе поменуто, фракција 2 углавном садржи дитерпене, који нијесу детектовани у екстрактима 3 и 4. Главне компоненте у 2 су (Е)-феругинол ацетат и дихидрокси дериват сандаракопимар-8(14),15-диена, (65.47 и 6.25%). Фракције 3 и 4 су обилловале масним киселинама и њиховим естрима (66.48 и 54.59%) са разликама у типу масних киселина и њихових естара присутних у највећој количини- као што је одређено, хексадеканолска и додеканска киселина су главне компоненте у 3 (29.89 и 25.56) док додеканска киселина и децил ацетат (35.78 и 12.54%), су биле најобимније у 4.

Поред тога оба узорка 3 и 4, садрже оксидовани монотерпен (Е)-кониферил алкохол у значајном проценту (11.81 и 18.69%) док је узорак 3 садржао циклопентадеканолид (15.35%). Компаративни преглед идентификованих једињења у свим истраживаним узорцима, класификованих у одговарајуће хемијске групе, представљен је на **Слици 18**.

Антимикробна активност

Минималне вриједности инхибиторне концентрације (МИЦ у вриједности од 40 до $\geq 2,560$ $\mu\text{g/mL}$) испитиваних *S. scardica* екстракта, приказаних у **Табели 4**, показују антибактеријску активност од јаке ка умјереној. Испитиване Грам-позитивне бактерије су осјетљивије у поређењу са истраживаним Грам-негативним бактеријама изузимајући *Pasteurella multocida* и *Haemophilus sp.* Испитивани екстракти су показали малу разлику у својој антимикробној активности, али заједничка карактеристика за све је изражена активност на Грам-негативне бактерије *Pasteurella multocida* и *Haemophilus sp.* и Грам-позитивне бактерије *Corynebacterium pseudotuberculosis* (МИЦ у вриједности 40–640 $\mu\text{g/mL}$). Најјача антибактеријска активност је показана против *Haemophilus sp.* за екстракте 3 и 4 са МИЦ вредностима од 40–80 $\mu\text{g/mL}$. Исти екстракти су показали антимикробну активност против *Corynebacterium pseudotuberculosis*, са МИЦ вриједностима од 80 $\mu\text{g/mL}$. Етарско уље које се добија методом НД показало је најјачу активност против

Corynebacterium pseudotuberculosis, и *Haemophilus sp.* са МИЦ вредношћу од 640 µg/mL, док је умјерена вриједност показана за *Staphylococcus pyogenes*, *Moraxella catarrhalis* и *Pasteurella multocida*. Што се тиче НКЕ CO₂ екстракта (ЕО-CO₂ и АО-CO₂) практично сви тестирани сојеви су показали исту осјетљивост са најбоље добијеним резултатима против *Corynebacterium pseudotuberculosis* (МИЦ вредност је 320 µg/mL) за оба екстракта. Сви екстракти добијени методом СЕ (1, 2, 3 и 4) показали су умјерено јаку или јаку антибактеријску активност против свих испитиваних Грам-позитивних бактерија, са МИЦ вредностима од 80 до 2,560 µg/mL. Занимљиво је да су екстракти 3 и 4 показали умерену активност против МРСА са МИЦ вриједностима од 640 µg/mL. Испитивани сојеви бактерија *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* су показали да су најотпорнији на примијењену концентрацију свих испитиваних екстракта са МИЦ вредностима 2,560 µg/mL.

Сви испитивани екстракти успорили су раст сојева бактерије *Candida albicans* и *Pseudomonas aeruginosa* при концентрацији од 2,560 µg/mL, са изузетком 2 и 3 (МИЦ ≥ 2,560 µg/mL).

Табела 4. Резултати испитивања антимикуробиолошке активности на Грам-позитивне, Грам-негативне бактерије и гљивице испитиваних S. scardica екстракта (ЕО-СО₂, АО-О₂, ЕО, 1, 2, 3, и 4)

	МИЦ ВРИЈЕДНОСИ µg/mL							Гента-мицин
	ЕО	ЕО- CO ₂	АО- CO ₂	А	В	С	Д	
Грам (+) бактерије								
<i>Streptococcus pyogenes</i> 1, брис крајника	1280	640	640	1280	640	1280	1280	≤4
<i>Streptococcus pyogenes</i> 2, брис крајника	1280	640	640	1280	1280	1280	2560	≤4
<i>Streptococcus canis</i> , брис крајника	2560	2560	2560	2560	2560	2560	>2560	≤4
<i>Moraxella catarrhalis</i> , брис крајника	1280	2560	2560	1280	1280	1280	2560	≤4
<i>Staphylococcus aureus</i> , ATCC 25923	>2560	>2560	>2560	1280	1280	1280	1280	≤4
<i>Staphylococcus aureus</i> , CI, брис крајника	>2560	2560	2560	1280	1280	640	1280	≤4
MRSA ATCC 43300	>2560	2560	2560	1280	1280	640	640	≤4
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> , брис крајника	640	320	320	160	320	80	80	≤4
<i>Enterococcus faecalis</i> , брис крајника	2560	2560	2560	>2560	>2560	>2560	1280	≤4
Грам (-) бактерије								
<i>Escherichia coli</i> , ATCC 25922	2560	>2560	>2560	2560	>2560	>2560	2560	≤4
<i>Escherichia coli</i> , CI, брис са коже	>2560	>2560	>2560	2560	>2560	>2560	2560	≤4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , брис крајника	2560	2560	2560	2560	>2560	>2560	2560	≤4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , брис крајника	>2560	>2560	>2560	2560	>2560	>2560	2560	≤4
<i>Pasteurella multocida</i> брис крајника,	1280	1280	1280	640	640	320	320	≤4
<i>Haemophilus sp.</i> , брис из носа	640	640	640	320	320	40	80	≤4
Гљивице								
<i>Candida albicans</i> , брис крајника	2560	2560	2560	2560	>2560	>2560	2560	-

Сви узорци узети од људи, осим где је означено. CI –клинички изоловани.

Даља испитивања се односе на анти-инфламаторна и гастропротективна својства разних екстрата **(1-4)** планинског чаја, али је и наглашена могућност испитивања и анти-туморног својства планинског чаја. Сваки екстракт је фитохемијски анализиран. Садржај укупних полифенола варира од 84.2 до 345.6 мг еквивалената галне киселине/г масе сувих биљних екстрата, садржај флавоноида изрежен у процентима хиперозида, који варирају од 0.4 до 1.1, док се садржаја танина креће од 0.5 до 5.7 (подаци сумирани у **табели 5**). Квантитативна анализа укупног садржаја фенола, флавоноида, и садржаја танина, који су приказани у **табели 5**, указују на релативно висок садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима. Садржај укупних фенола код сировог етанолског екстрата 1 био је мањи у поређењу са метанолским екстратом *S. condensata* Boiss. & Heldr. и *S. erythrantha* var. *erythrantha* Boiss. & Heldr.(86), али екстракти 3 и 4, су садржавали зназно веће количине укупних фенола (**Табела 5**). Садржај укупних фенола у *S. scardica* метанолном екстракту према резултатима које су објавили Tunalier и сар.(50) је упоредљив са нашим резултатима. HPLC методом, развијеном за анализу фенолних једињења, указала је да је фенолкарбонска киселина - ферула киселина доминантна компонента у свим истраживаним узорцима и према анализи HPLC оне чини 0,36, 2,34 и 2,92% екстрата **2, 3 и 4**. Идентификована једињења су приказана у **табели 6**, и приказана су према ретенционом времену. Изгледа да је екстракт 2 обилнији у флавоидним агликонима у поређењу са поларнијим екстрактима 3 и 4. Остале идентификоване компоненте су протокатехолна киселина, **(1)**, хлорогенска киселина **(2)**, ванилна киселина, **(3)**, кафена киселина, **(4)**, сиригична киселина **(5)**, п-Кумарна и ферула **(6)** киселина, luteolin -7-*O*- β -гликозид **(8)**, apigenin-7- *O*- β -гликозид **(9)**, luteolin **(10)**, hristeriol **(11)** и apigenin **(12)** (**Табела 6, Слике 19 и 20**)

Процењивање антиоксидантне активности

Антиоксидантска активност испитиваних екстрата биљке *S. scardica* је одређена методом јонизације слободних радикала DPPH-а. (DPPH test). Резултати су показали да тестирани екстракти посједују значајну антиоксидантну активност. Када су екстракти примјењивани у концентрацијском опсегу од 466.0-27.5 $\mu\text{g/mL}$, њихова DPPH слободно-радикална јонизирајућа активност је приближно варирала од 20-90% са вредностима IC_{50} од 147.0 до 5.7 $\mu\text{g/mL}$ (**Табела 5**). Тролокс и ВНТ познати као јаки антиоксиданси, су послужили у позитивној контроли. У поређењу са позитивним контролама *n*-Бутанолни екстракт **(4)** је показао највећу антиоксидантску активност.

Табела 5. DPPH активност, садржај укупних фенола, флавоноида и танина у етанолном екстракту (1), диетилетром (2), етил ацетатном (3) и н-бутанолном. (средња вриједност $\pm$ SD је резултат три мјерења.

Екстракт	DPPH активност $IC_{50} \pm SD$ (μ g/ml)	Укупни феноли $\pm SD$ (mg GAE/ g DW)	% флавоноида $\pm SD$	% танина $\pm SD$
1 (Етанол)	31.5 $\pm$ 0.4	188.5 $\pm$ 12.9	0.4 $\pm$ 0.0	5.7 $\pm$ 0.0
2 (Диетил етар)	147.3 $\pm$ 1.8	84.2 $\pm$ 7.3	0.4 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
3 (Етил ацетат)	20.1 $\pm$ 0.4	345.6 $\pm$ 21.7	1.1 $\pm$ 0.0	1.5 $\pm$ 0.0
4 (н-Бутанол)	5.7 $\pm$ 0.4	300.3 $\pm$ 13.4	0.5 $\pm$ 0.0	3.2 $\pm$ 0.0
trolox	5.9 $\pm$ 0.3	-	-	-
BHT	6.0 $\pm$ 0.3	-	-	-

Садржај деривата хидроксициметне киселине (2, 4, 6 и 7) и деривата 4-хидроксибензојеве киселине (1, 3 и 5), флавоноида (8-12) у екстрактима су били различити. (Подаци сажети на Слици 21).

Табела 6. HPLC анализа укупних фенола у метанолном екстракту *S. scardica*

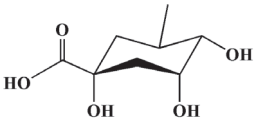
^a Редни бројеви једињења се односе на идентификована једињења приказана на ХПЛС графику

R_T^b - етенционо вријеме идентификованих једињења у испитиваним екстрактима

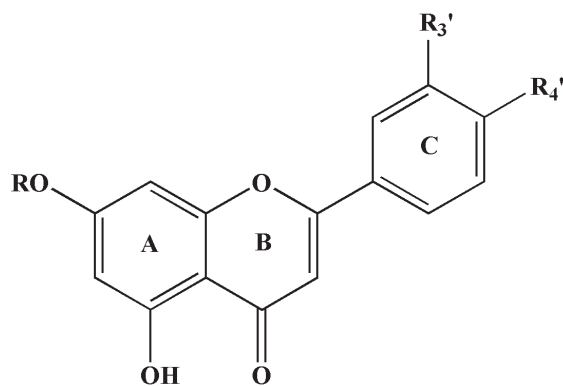
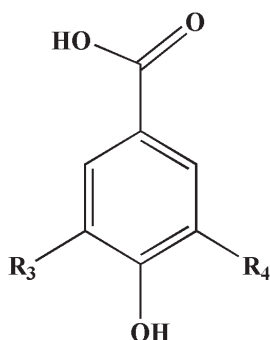
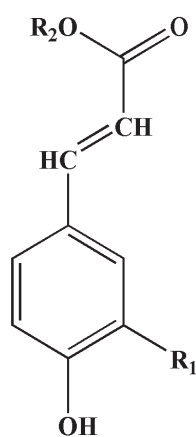
R_T^c - Ретенционо вријеме стандарда

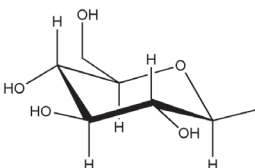
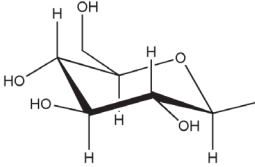
λ_{max} - таласна дужина идентификованих супстанци (nm)

Бр. ^a	Једињење	Процентуални садржај (%)				R_T^b/R_T^c	λ_{max} идентификованих једињења (nm)
	Екстракт	1	2	3	4		
1.	Протокатехинска киселина	-	0.05	0.05	-	5.90/6.43	218, 260, 294
2.	Хлорогенска киселина	-	0.52	1.62	1.70	8.90/8.90	218, 238, 298sh, 324
3.	Ванилична киселина	-	0.04	-	-	10.15/9.99	218, 260, 292
4.	Кафена киселина	-	0.17	-	0.54	11.18/11.17	218, 238, 298sh, 324
5.	Сирингична киселина	-	-	0.16	-	11.22/11.25	218, 274
6.	<i>p</i> -Кумарна киселина	-	0.12	-	0.19	17.21/17.02	226, 298sh, 366
7.	Ферула киселина	-	0.36	2.34	2.92	22.78/22.06	218, 236, 298sh, 324
8.	Лутеолин-7-О-гликозид	-	0.03	0.13	0.32	23.85/23.89	254, 266sh, 348
9.	Апигенин-7-О-гликозид	-	0.08	0.67	0.61	28.98/29.09	266, 336
10.	Лутеолин	-	0.21	-	-	40.65/40.83	254, 268sh, 348
11.	Хризериол	-	-	-	0.03	44.38/44.27	250, 266sh, 292sh, 348
12.	Апигенин	-	0.32	-	-	45.47/45.49	266, 338

Бр	Једињење	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄
1.	Протокатехинска киселина	на*	на	Н	ОН
2.	Хлорогенска киселина	ОН		на	на
3.	Ванилична киселина	на		Н	OCH ₃
4.	Кафена киселина	ОН	Н	на	на
5.	Сирингична киселина	на	на	OCH ₃	OCH ₃
6.	<i>p</i> -Кумарна киселина	Н	Н	на	на
7.	Ферула киселина	OCH ₃	Н	на	на

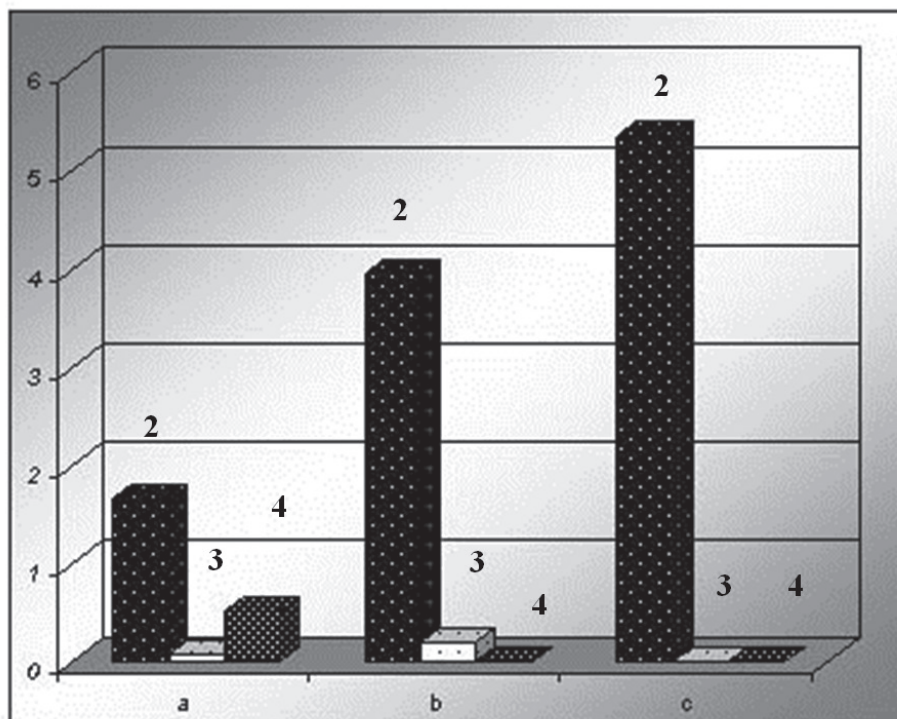
* није применљиво



Бр	Једињење	P ₃	P ₄	P
8.	Лутеолин-7-О-гликозид	ОН	ОН	β-глюкозил 
9.	Апигенин-7-О-гликозид	Н	ОН	β-глюкозил 
10.	Лутеолин	ОН	ОН	Н
11.	Хризериол	OCH ₃	ОН	Н
12.	Апигенин	Н	ОН	Н

Слика 19. Идентификована једињења: деривати хидроксициметне киселине (2,4,6 и 7), деривати хидроксибензојеве киселине (1,3 и 5), флавоноиди (8-12)

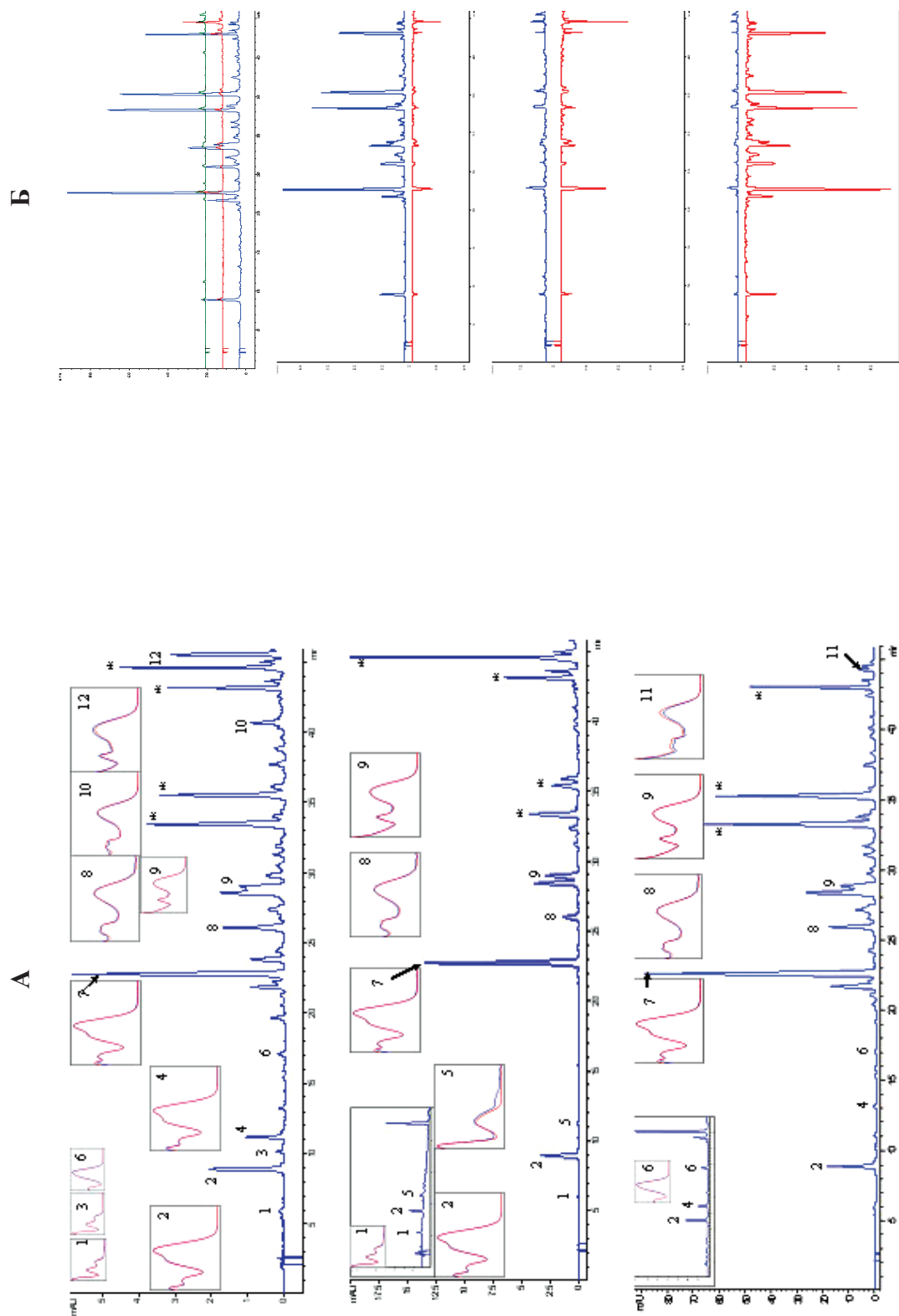
Процентуални
садржај
(%)



- 2, Фракција диетиетра
- 3, Фракција етилацетата
- 4, Фракција н-бутанола
- а, Деривати хидроксициметне киселине
- б, Деривати хидроксибензојеве киселине
- с, Флавоноиди

Слика 20. Процентна заступљеност идентификованих једињења: деривати хидроксициметне киселине (2,4,6 и 7), деривати хидроксибензојеве киселине(1,3 и 5), флавоноиди (8-12)

Слика 21. ХПЛС хроматограм испитиваних екстракта *S. Scardica*, (дио А), забиљежен на 360 и 280 nm, Упоредије са UV спектром референтних супстанци (дио Б)



Процењивање анти-инфламаторног својства

Истраживани екстракти који се примјењују у дозама од 50, 100 и 200 mg/kg знатно су смањили едем шапе изазваног карагеном. Диетил етар екстракт, **2**, имао је најјача анти-инфламаторна својства, показујући дозно-зависан ефекат. Смањење едема је постигнуто уз помоћ доза од 100 и 200 mg/kg, што је статистички значајно, и на нивоу упоредивим са позитивном контролом, индометацина променљивог у дозама од 4 mg/kg који је смањио интензитет запаљења за око 50%. (Табела 7, Слика 13)

Табела 7. Антиинфламаторни ефект испитиваних екстракта

Третман	Величина едема (mg) /Интензитет инфламаторног одговора (%)		
	Дозе екстракта (mg/kg p.o.)		
	200	100	50
Контрола (DMSO)		412,67±90,91 (100±22,03%)	
Индометацин (4 mg/kg p.o.)		205,8±30,54 ^{a3} (49,87±7,4%)	
1 (Етанолни))	283,33±34,3 ^{a2} (68,66%±8,3%)	307,0±31,94 ^{a1} (74,39±7,74%)	290,0±41,98 ^{a1} (70,27±10,17%)
2 (Диетилетер)	191,4±59,41 ^{a3} (46,38±14,4%)	211,86±26,41 ^{a3} (51,34±6,4%)	334,0±70,75 (80,94±17,14%)
3 (Етилацета)	360,83±24,58 (87,44±5,96%)	256,43±34,73 ^{a2} (62,14±8,42%)	241,0±24,6 ^{a3} (58,4±5,96%)

a1,a2,a3 – p< 0,05; 0,01; 0,001 према контролној групи

Поређење унутар исте групе, између појединих доза:

Етанолни	нема значајних разлика
Диетилетер	200:50 - p< 0,05 100:50 - p< 0,05
Етилацета	200:100 - p< 0,05 200: 50 - p< 0,05
n-Бутанол	200:50 - p< 0,05 100:50 - p< 0,01

Поређење унутар исте дозе, између различитих група:

200 mg/kg

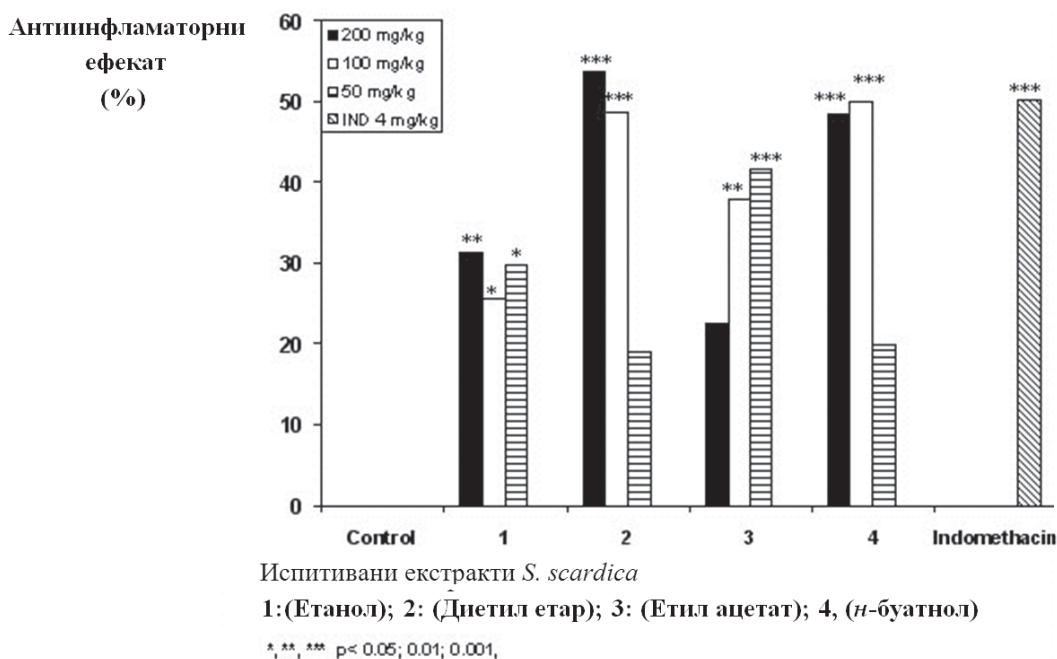
Етанолни, Диетилетер	p< 0,01	Диетилетер, Етилацета	p< 0,001
Етанолни, Етилацета	p< 0,01	Етилацета,n-Бутанол	p< 0,001
Етанолни, n-Бутанол	p<0,05		

100 mg/kg

Етанолни, Диетилетер	p< 0,001
Етанолни: n-Бутанол	p< 0,001

50 mg/kg

Диетилетер, Етилацета	p< 0,05
Етилацета: , n-Бутанол	p< 0,05



Слика 22. Ефекат испитиваних екстраката (1,2,3,4) и референтне супстанце (индометацина) на едем шапице пацова изазбаног кагеном

Процењивање гастро-протективног ефекта

Сви тестирани екстракти су показали значајну гастропротективну активност, а доказано је да је екстракт *n*-бутанола најефикаснији, 4, у дози 100 mg/kg је био много бољи од ранитидина, који је служио као позитивни контролор. У статистичкој обради резултата коришћен је Kruskal-Wallis-ов тест. (Табела 8, Слика 14)

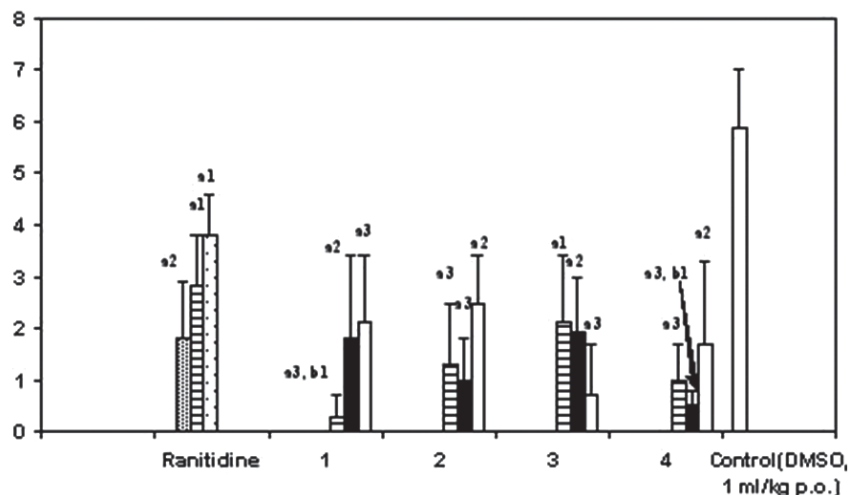
Табела 8. Гастропротективно дејство испитиваних екстракта (тест акутног стрес-улкуса изазваног апсолутним етанолом код пацова)

Третман	Интензитет гастричних лезија		
	Дозе екстракта (mg/kg p.o.)		
	200	100	50
Контрола (DMSO)		5,9±1,14	
Ранитидин (20 mg/kg p.o.)		1,77±1,108 ^{a2}	
1 (Етанолни)	0,3±0,45 ^{a3,b1}	1,65±2,03 ^{a2}	2,1±1,34 ^{a3}
2 (Диетилетер)	1,3±1,2 ^{a3}	1,0±1,0 ^{a3}	2,5±1,9 ^{a2}
3 (Етилацета)	2,1±2,27 ^{a1}	1,9±2,07 ^{a2}	0,7±1,04 ^{a3}
4 (<i>n</i> -Бутанол)	0,95±1,72 ^{a3}	0,5±0,35 ^{a3,b1}	1,7±1,68 ^{a2}

^{a1,a2,a3} – $p < 0,05; 0,01; 0,001$ према контролној групи

^{b1} $< 0,05$ према групи третираној ранитидином

Оштећење желуца, према
скали поменутој у тексту



Испитивани екстракти *S. scardica*

1: (Етанол); 2: (Диетил етар); 3: (Етил ацетат); 4, (н-буатнол)

Слика 23. Ефекат екстраката (1,2,3,4) и референтне супстанце(ранитидин) на
желудачне лезије

Испитивање активности етанолних екстраката (1) биљке *S. scardica* планинског чаја, и диетил етра (2), етил ацетате (3) и н-бутанола (4) екстраката урађено је због познате употребе шарпланинског чаја у народу. Овим *in vivo* испитивањем су потврђена анти-инфламаторна и гастропротективна својства. Испитивана су и цитотоксична својства наведених екстрата, такође. Како би се успоставила корелација измедју доказаних анти-инфламаторних и гастропротективних својстава и цитотоксичног потенцијала и присутних полифенолских компонената, одређиван је укупан садржај полифенола. као и анти-оксидантна својства испитиваних екстраката. Поред тога, анализа HPLC-а је омогућила идентификацију 12 фенолних једињења присутних у испитиваним екстрактима.

Антиоксидантно једињење, које може да успори или “зароби” реактивне слободне радикале, може да спријечи оксидацију других молекула и тако има повољно дејство на здравље у спречавању дегенеративних болести. Наиме, сматра се да слободни радикали играју важну улогу у бројним хроничним болестима као што су, између осталог, упале, кардиоваскуларне болести као и тумори различите етиологије, а такође учествују у процесу старења ћелија. Стога, екстракти су испитивани у погледу способности да онемогуће негативне ефекте које би слободни радикали могли да имају на ћелије. У овом тесту, DPPH радикали служе као супстрат, који подлеже редукцији до хидразинских деривата, у присуству антиоксидантског једињења, донирајући водоник.

Анти-оксидантна активност екстрата тестираних методом DPPH, је изражена параметром IC_{50} , што је количина антиоксиданса потребна да се смањи почетна концентрација DPPH за 50%. Уколико је нижа вриједност, ефикаснији је антиоксиданс. (Табела 5). Анти-оксидантно својство тестираних екстрата ваздушних делова биљке *S. scardica* може

се приписати садржају фенолне фракције. Успостављена је добра корелација између садржаја фенолних једињења и анти-оксидантне активности (Табела 5).

Мада је садржај фенолних једињења послужио као поуздани индикатор цјелокупног антиоксидантског потенцијала екстракта, активност у појединим огледима зависи од квантитета и својстава специфичних фенола присутних у тестираним екстрактима. Фенолне супстанце су у могућности да јонизирају реактивна водонична једињења (O^{-2} и OH^{-}) и понашају се као донори водоника. Апигенин и апигенин глукозиди су антиоксиданти због киселе 4'-хидроксилне групе (99) Штавише, присуство хидроксицинамичних киселина доприноси повећању антиоксидантних својства. $-CH=CH-CO-$ група омогућава донацију водоника и тако појачава антиоксидантни капацитет. (100). Испитивани екстракти показују да су богати по садржају хидрокси деривата циметне киселине, које су, у погледу идентификованих конституената, најдоминантнија група фенолних једињења у свим истраживаним екстрактима (Табела 15 Слика 21. Приказани резултати су у добром складу са подацима показаним у литератури (58)

Резултат цитотоксичне активности

Цитотоксични ефекти испитиваних екстракта биљке *S. scardica* су одређивани Kanacid Blue R dye методом везивања (Clothier, R. H. The FRAME cytotoxicity test. Methods in Molecular Biology, 43 (1995), 109-118). Цитотоксични ефекат је мјерен на основу промјене укупних протеина ћелије. HeLa ћелије (2000c/w), FemX (2000c/w) и B16 (2000c/w) су постављене у специфичне плоче са 96-мјеста за ћелијске културе (NUNC) у хранљивом медијуму RPMI 1640 и остављене да се развијају 24х. Матични раствори етанолног (Екстракт 1), етил-ацетатног (Екстракт 3) и н-бутанолног екстракта (Екстракт 4) биљке *S. scardica* су направљени у DMSO, а затим на одговарајући начин разблаживани хранљивим медијумом до одређене, жељене финалне концентрације (до 100 μ g/ml). Раствори различите концентрације испитиваних екстракта додати су у предвиђена удубљења, изузет у контролном гдје је само хранљива подлога додата. Сви експерименти су три пута поновљени. Хранљиви медијум са агенсом одговарајуће концентрације, али без циљних ћелија коришћен је као бленк, такође у трипликату. Ћелије су инкубиране 48 и 72 сати са испитиваним екстрактима на 37°C са 5% CO₂ у атмосфери засићеној влагом.

Послије инкубације, медијум је одстрањен и ћелије су испране два пута у фосфатном пуферу pH 7,4 (PBS). Затим 100 μ L фиксатива (1% глацијалне сирћетне киселина, 50% EtOH, 49% дестиловане воде) додато је сваком мјесту на плочи. Послије 20 мин, фиксатив је уклоњен, а 100 μ L Kanacid Blue боје (0,04% Commassie Brilliant Blue R-250 у 25% EtOH и 12% глацијалне сирћетне киселине) је додато и инкубирано 2-3 х. Затим је боја одбачена и ћелије су испране три пута са раствором за испирање (Washing solution - 10% EtOH, 5% глацијалне сирћетне киселине, 85% дестилована вода). Потом је додато 150 μ L тзв.

„desorbing” раствора (1M Na acetat, 70% EtOH). Након 2х мјерена је абсорбанција на ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) читачу, на таласној дужини 570 nm. Концентрације IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) су биле дефинисане као концентрације тестираних екстраката које су условиле 50% инхибицију одржавања ћелија. Наведене вриједности су одређиване на основну дијаграма ћелијског преживљавања (Слике 24,25 и 26, Табела 9)

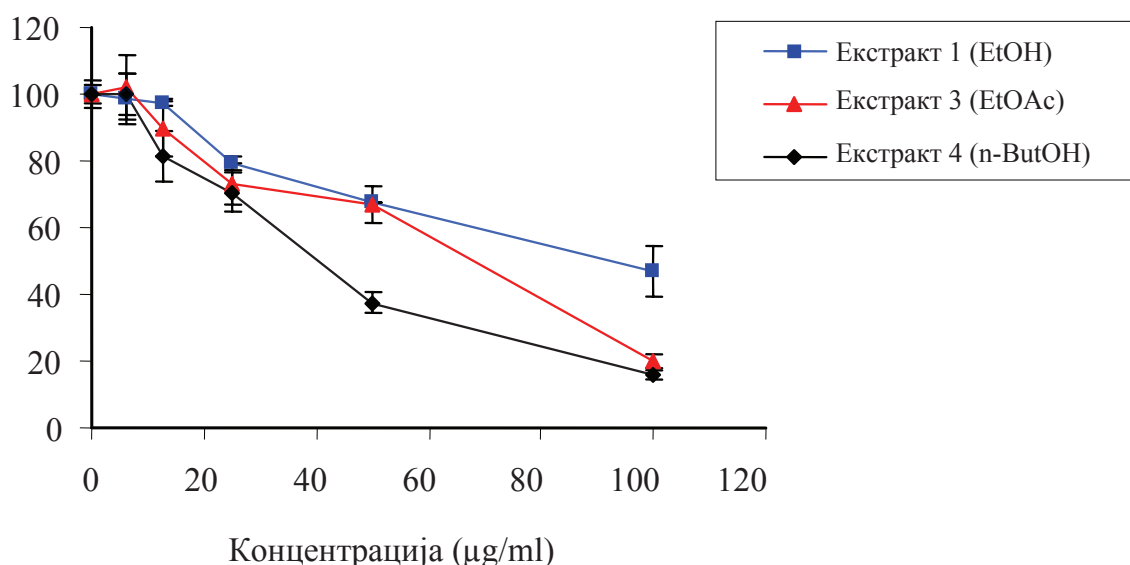
Табела 9. Резултати цитотоксичне активности испитиваних екстраката током 48 и 72h

	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)					
	HeLa		B16		FemX	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
Екстракт 1 (EtOH)	86.50 $\pm$ 3.28	93.59 $\pm$ 1.33	>100	>100	>100	77.96 $\pm$ 6.96
Екстракт 3 (EtOAc)	67.65 $\pm$ 0.99	68.25 $\pm$ 0.56	35.03 $\pm$ 6.34	91.70 $\pm$ 2.14	57.16 $\pm$ 5.46	46.51 $\pm$ 0.5
Екстракт 4 (n-ButOH)	>100	41.99 $\pm$ 2.01	>100	>100	>100	37.73 $\pm$ 1.36

а (Резултати су представљени као вриједности IC_{50} , одређивани на основу дијаграма одрживости ћелија. IC_{50} вриједности су средње вриједности три одређивања, при чему је сваки експеримент рађен у три репликата).

HeLa ћелије (72 h инкубација)

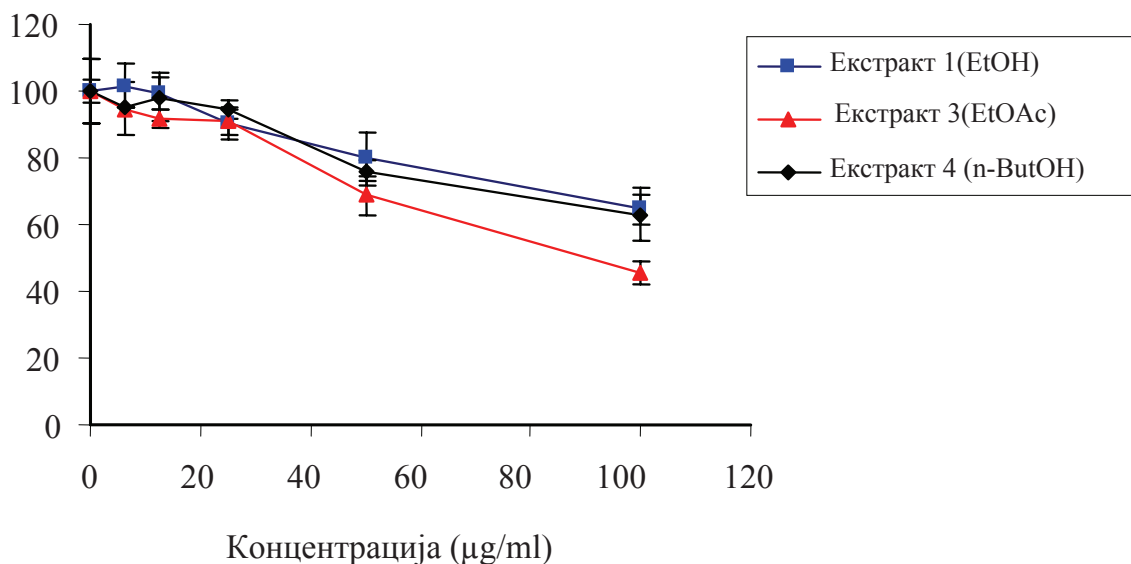
Валијабилитет ћелија (%)



Слика 24. Дијаграми одрживости ћелија HeLa после 72 h континуалне инкубације у присуству екстраката *S. scardica*. Резултати представљају један експеримент од урађена три са стандардном девијацијом

B16 ћелије (72 h инкубација)

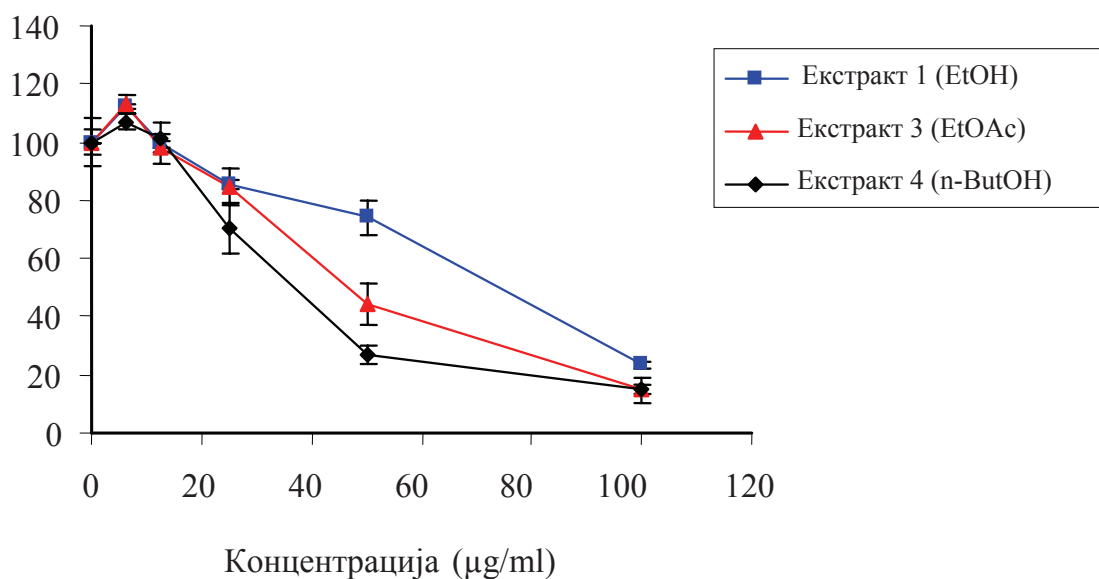
Валијабилитет ћелија (%)



Слика 25. Дијаграми одрживости ћелија HeLa после 72 h континуалне инкубације у присуству екстракта *S. scardica*. Резултати представљају један експеримент од урађена три са стандардном девијацијом

FemX ћелије (72 h инкубација)

Валијабилитет ћелија (%)



Слика 26. Дијаграми одрживости ћелија FemX после 72 h континуалне инкубације у присуству екстракта *S. scardica*. Резултати представљају један експеримент од урађена три са стандардном девијацијом

IC₅₀ вриједности током 48 и 72 сата континуалног праћења активности испитиваних екстраката одређене су на основу дијаграма одрживости ћелија (**Слике 24,25 и 26**) и представљени у **Табели 9**.

Резултати индицирају, као што је приказано IC₅₀ вриједностима, да екстракт 3 посједује највећу дозно-зависну цитотоксичну активност на HeLa и FemX ћелијским линијама после продуженог времена инкубације. Етанолни екстракт је био најмање активан према испитиваним ћелијским линијама.

Дискусија

Многе студије до сада показале су значајно присуство секундарних метаболита у роду *Sideritis* као укупних фенола, флавоноидних агликона и хетерозода, фенолних киселина, ди и три терпеноида, масних киселина, кумарина, иридоидних гликозида (11, 19, 20, 22, 23, 24, 46, 78). Доказана су и фармаколошка својства рода *Sideritis* која се углавном приписују фенолским једињењима. У скорије вријеме се појавило неколико чланака који говоре о повезаности измедђу фенолских конституената и фармаколошких својстава код разних врста *Sideritis* (19,31).

Риос и сарадници (49) указују да су флавоноиди редукциона средства који могу међусобно да дјелују са слободним радикалима (што је у вези са антиоксидантним механизмом) и могу да спријече настанак упалних процеса. Немијски састав етарских уља врста *Sideritis* рода су такође детаљно проучавана (26,38). У Србији род *Sideritis* има само једну врсту: *S. montana* L. (87), јер због њених про-оксидантских особина није употребљавана у традиционалној медицини (88).

S. scardica Griseb. (планински чај) је ендемска биљка на Балканском полуострву која припада групи *Empedoclea*. Надземни дјелови планинског чаја су у традиционалној медицини познати по својим својствима која имају против упала, микроба, бактерија, реуме, а имају и гастропротективна својства. *S. scardica* се користи и код бронхитиса и бронхијалне астме, прехладе, емфизема плућа. Користи се код лијечења упала, гастроинтестиналних поремећаја, кашља, као и активни конституент додатака храни за спречавање анемије (89).

Специфични секундарни метаболити, који карактеришу одређене биљке или групе биљака, интересантни су због својих, показаних, фармаколошких активности. На примјер, флавоноиди су велика група секундарних биљних метаболита, чија је улога да штите биљку од стреса, штетних радикала (РОС), и биљоједа. Разноврсне и многобројене студије о флавоноидима указују да је ријеч о једињењима која имају антиканцерогена својства (90). Штавише, неке студије су показале да је најбоље коришћење ових једињења као хемијских додатака у антиканцерогеним терапијама које се тренутно користе (91).

Узимајући у обзир разлике између примијењених метода екстракције (које се погледају у степену биорасположивости активних компоненти, а самим тим и инетзитета фармаколошке активности), циљ овог дијела студије је одређивање хемијског састава и процена антимикробних својстава екстракта биљке *S. scardica* Griseb., добијених

примјеном конвенционалних метода екстракције, и наткритичне екстракције угљен диоксидом. Испитивани екстракти су: **ЕО**, етарско уље добијено путем хидродестилације; **ЕО- CO_2** , поларна фракција која се добија наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида на 10 МПа и 40°C; **АО- CO_2** , фракција која се добија наткритичном екстракцијом помоћу угљен диоксида при притиску, 40МПа и 40°C; и фракције које се добијају сукцесивном екстракцијом употребом екстрагенаса различите поларности: **1**- сирови екстракт добијен екстракцијом помоћу етанола, **2**- екстракт добијен екстракцијом диетил етром; **3**- екстракт добијен екстракцијом етил ацетатом; **4**- н-бутанолни екстракт. Немијски састав испарљиве фракције испитиваних екстракта се одређује уз помоћ GC и GC-MS метода. Поред тога, процењивана су антимикробиолошка својства у *in vitro* условима поменутих екстракта на Грам- позитивне и Грам- негативне бактерије и квасце који су од медицинске важности примјеном микродилуционе методе. Papaefstathiou и сарданици су испитивали НКЕ- CO_2 *S. raeseri* (28), али у доступној литератури нема података који се односе на испитивање хемијског састава и антимикробиолошке активности екстракта НКЕ- CO_2 који су изоловани из биљке *S. scardica*. (73).

Хидродестилација и екстракција органским растворчима су класичне технике за добијање етарских уља, али и других конституената из ароматичних биљака. Наткритична екстракција угљен диоксидом се користи као алтернативна метода и показала се као повољна за добијање различитих биљних екстракта.

У ЕО узорку, оксидовани монотерпени су главни конституенти, али је такође присутна значајна количина оксидованих сесквитерпена и масних киселина и њихових естера (30.01, 25.54 и 15.96%). Иако су монотерпенски угљеводоници у претходним истраживањима етарског уља ове биљке, као и других врста овог рода означени као главни конституенти (69) у нашем узорку ЕО монотерпенски угљеводоници су затупљени са само 1.83%. Према претходно објављеним подацима, у етарском уљу биљке *S. scardica* поријеклом из Македоније, најзаступљеније једињење је α -кадинол, док су у уљу врсте из Бугарске главне компоненте дитерпенска једињења и октадеканол (преко 20%) (78) Код нашег узорка дитерпени се налазе у највећем проценту; док су октадеканолни заступљени са само 0.21%. Најзаступљенија једињења су хексадеканолска киселина, миристицин, ментол, кариофилен оксид, и τ -мууролол (12.92, 5.23, 4.90, 4.84 и 3.62%), (77,78).

Хемијски састав етарских уља биљне врсте *Sideritis* су проучавани од стране многобројних истраживача користећи GC-MS и GC технике. Упркос чињеници да је породица Lamiaceae веома позната по садржају етарских уља, *Sideritis* врсте се не сматрају богатим у садржају етарских уља. Ипак, корелација измједу садржаја етарских уља и главне групе конституената је успостављена; наиме, што је већи садржај етарског уља, већи је садржај монотерпенских угљеводоника. Велики број студија о етарским уљима *Sideritis* вјеројатно може да објасни полиморфизам измједу популација и постојања нових врста, хемијске разноврсности и хибрида. Неколико етарских уља биљке *Sideritis* се каракте-

ришу по високом садржају монотерпенских угљоводоника са α -пиненом, β -пиненом, сабином, мирценом или лимоненом као главним компонентама (77,78). Присуство важних сесквитерпенских угљоводоника, нарочито δ -кадинена и β -кариофилен, је обично потврдјено.

Испитивања етарских уља различитих *Sideritis* врста, указала су на присуство релативно великих количина оксидованих сесквитерпена, као што су α -кадинол, бисабол или *murol-5-en-4 β -ol* као главних конституената, али и дитерпенских једињења. Присуство дитерпена као испарљивих једињења описано је и код других родова као што су: *Cistus*, *Wollemia*, *Juniperus* и *Helichrysum*, не само *Sideritis* Ендемске врсте из Турске, *S. bilgerana*, *S. ozturkii* и *S. cilicica* су богате монотерпенимским угљоводонцима α и β -пиненима. Етарско уље *S. cilicica* садржи у великој мери β -феландрен (35) Етарска уља врста *Sideritis* које су богате сесквитерпенима, главни пронађени конституенти су β -кариофилен, D гермакренен и каламен (*S. curvidens*, *S. montana*). Оксидовани деривати нијесу уобичајени главни конституенти у етарским уљима врста *Sideritis*. Оксидовани монотерпени, заједно са тимолом, су карактеристичне конституенте код биљке *S. Romana*. Оксидовани сесквитерпени преовлађују у етарским уљима биљака *S. phlomoides* and *S. taurica*. Главни конституенти етарских уља биљака *S. congesta* и *S. argyrea* су α - и β -пинене, док је лимонен главни састојак у етарском уљу биљке *S. perfoliata*. Врста *S. condensata* садржи етарско уље са високим процентом β -кариофилена и α -пинена (36) Етарска уља *S. perfoliata* и *S. dichotoma* су богата дитерпенима (37). Монотерпенски угљоводонци су означени као главне конституенте код врста *Sideritis* које расту у Грчкој као и код неких врста у Шпанији. Код етарских уља шпанских ендемских врста *S. Ibanyezii*, нађени су сабинени и α -пинени као главне компоненте (34,35). Исти монотерпенски угљоводонци, као и фенхон и цинеол су главни конституенти етарског уља *S. pusillafrom* на Иберијском полуострву (79)

Према датим подацима, хемијски састав анализираних узорака етарског уља и испарљивих конституената анализираних фракција биљке *S. scardica* указао је на другачији хемијски профил у поређењу са хемијским профилем наведене врсте испитиване од стране других аутора (77,78) Наиме, дитерпени и масне киселине и њихови деривати представљају значајне групе једињења у нашим узорцима насупрот другим који указују да су монотерпенски угљоводонци или оксидовани сесквитерпени доминантна група једињења. У овом раду етарска уља испитиване врсте *S. scardica* која су добијена дестилацијом садржала су оксидоване монотерпене у највећем проценту.

Постоји неколико података о антимикробној вредности етарских уља *Sideritis*. Антимикробна активност етарских уља *S. perfoliata* и *S. trojana* је тестирана против *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, која је отпорна на метицилин, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* и *Candida albicans*. Резултати антимикробног теста показали су да су *E. coli*, метицилин резистент-

на *S. aureus*, *E. aerogenes*, *B. cereus*, и *C. albicans* умјерено осјетљиви на третман етарским уљем *S. trojana*, али етарско уље *S. perfoliata* показало јаку инхибиторну активност на раст бактерије *S. epidermidis*. Већи садржај оксидованих деривата моно- и сесквитерпена (20%) у етарском уљу *S. trojana* може бити одговорно за бољу антимикуробну активност (35,67) Поред тога, постоје подаци о антимикуробној активности етарских уља шпанских врста *Sideritis*, *S. angustifolia*, *S. funkiana*, *S. javalambrensis*, *S. leucantha*, *S. mugronensis* и *S. tragoriganum* која значајно успоравају раст Грам-позитивних бактерија, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium phlei* и раст гљивице *Candida albicans*, али не показују практично никакву активност на Грам-негативне бактерије. Слични резултати су постигнути код истраживања етарских уља *S. curvidens* и *S. lanata*, која нису имале значајан ефекат на Грам-негативне бактерије али су показала значајну активност на Грам-позитивне бактерије (68,69).

Насупрот томе, етарска уља од *S. cilicica*, и *S. bilgerana* су испољила значајно инхибиторно дејство против неколико Грам-негативних (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) и Грам-позитивних (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*) бактерија са МИЦ вриједношћу од 0.125 до 0.5 mg/mL као и против *Candida albicans* (МИЦ 0.03 mg/mL). Ова антибактеријска активност је могућа због присуства α -пинена и β -пинена као главних конституената код обје врсте.(70)

Такође, етарско уље биљке *S. italica* је интересно због свог већег антимикуробног ефекта на Грам-негативне него Грам-позитивне бактерије, а нарочито против *Pseudomonas aeruginosa*. Овај налаз је интересантан због тога што је наведена бактерија одговорна за јаке опортунистичке инфекције и веома често отпорна на уобичајене антибиотик (26). Поред тога, доказана јака инхибиторна активност против *Helicobacter pylori* оправдава етнофармаколошко коришћење биљке *S. italica* као антиулкусног агенса.

Не само етарска уља, већ и различити екстракти биљке *Sideritis* имају значајну антибактеријску активност. Према студији коју су обавили Sagdic и сарадници (56) метанолни екстракти биљке *S. ozturkii* и *S. caesarea*, имају значајну антимикуробну активност. Антибактеријска активност линеарола, фолиола, епикандикандиола и сидерола који су пронађени у екстрактима врста *Sideritis* су испитане, и показано је да епикандикандиол има највећи антимикуробни ефекат на *E. coli*. Ацетонски и метанолни екстракти биљке *S. timolea* Р. Н. Davis су тестирани против стандардних бактеријских сојева. Као резултат студија активности, откривено је да метанолни и ацетонски екстракти *Sideritis* врста нијесу показали значајну антимикуробну или антитуберкулозну активност, али инхибиција раста *C. albicans*-а отпоране на клотримазол, неких *Sideritis* врста из Турске је пријављено. (17,85)

Студије *in vitro* су такође показале да *ент*-маноил оксиди из *S. varoi* и његови деривати добијени синтезом спречавају раст *Leishmania donovani* (86). Утврђена антими-

кробна активност испитиваних екстракта у овом раду може се приписати присуству разних врста терпеноида. Поред установљеног антимикробног потенцијала монотерпена, дитерпени су недавно привукли посебну пажњу. Наиме, дитерпени (нарочито пимарански тип) су познати по посједовању важних биолошких активности, укључујући антимикробну активност (87). Такође, указана антимикробна активност може се приписати и присуству разних једињења присутних у испитиваним екстрактима, али нису идентификована примијењеним аналитичким методама.

Нема података о референтним МИЦ вредностима екстракта биљаке, који би послужили као апсолутна референца у циљу категоризације јачине антимикробне активности према испитиваним микроорганизмима (осетљивих или отпорних). Обично се јачина антимикробне активности биљних екстракта процењује упоређивањем МИЦ вредности биљних екстракта са МИЦ вредностима антибиотика. Научна основа ове праксе није јасна и с микробиолошке и фармаколошке стране ово је погрешан приступ због различитих фармакокинетики и метаболизма биљних екстракта и антибиотика. Другим ријечима, веће вриједности МИЦ-а биљних екстракта не морају декларисати слабу антимикробну активност (90,91). У циљу одређивања МИЦ вриједности антибиотика или биљних екстракта, испитивани узорци морају бити растворени како би се нашла најнижа концентрација при којој они показују антимикробну активност (90-93). Што се тиче спроведених тестова, принцип је да се екстракти прво разблаже како је описано у експерименту. Растварање се врши тако што се дода 25.6 μL (0.0256 mL) испитиваног узорка у 1 mL DMSO. Измјерена запремина испитиваних екстракта је веома мала и са микробиолошке тачке гледишта МИЦ вредности од 1,280 $\mu\text{g/mL}$ и 2,560 $\mu\text{g/mL}$ могу означавати слаб микробиолошки потенцијал.(88) Насупрот томе, према Aligiannis и сар. (39) антимикробна активност испитиваних етарских уља *S. sipyle*, *S. clandestine* и *S. raeseri* је окарактерисана од јаке ка умереној, са МИЦ вриједностима које варирају од 650 до 9,900 $\mu\text{g/mL}$, и знатно је већа у поређењу са оним који су поменути у овом раду.

Метод екстракције утиче на принос и хемијски састав утврђен примјеном GC и GC-MS анализа испитиваних екстракта биљке *S. scardica*. Хемијски профили испитиваних екстракта уз помоћ GC-MS анализе су указали на разлике у погледу садржаја различитих група једињења- монотерпенских и сесквитерпенских угљоводоника, оксидованих монотерпена и сесквитерпена, дитерпена и масних киселина и њихових естара. Пошто су посматране разлике у хемијским једињењима испитиваних екстракта изражене, алтернативне НКЕ CO_2 екстракције не могу да замене оне уобичајене без обзира на бољи принос екстракције. Што се литературе тиче, нема података о хемијском саставу НКЕ- CO_2 екстракта из *S. scardica* на 10 MPa и 30 MPa на 40 °C, нити о антимикробној активности екстракта или етарских уља биљке *S. scardica*. Антимикробна активност је слична за све испитиване екстракте са добијеним МИЦ вредностима од 40-2,560 $\mu\text{g/mL}$. Најниже МИЦ вредности су код екстракта који су добијени екстракцијом органским растварачима. Екстракти добијени наткритичном екстракцијом угљен диоксидом, показали су веће или исто дејство против скоро свих испитиваних микроорганизма у поређењу са етар-

ским уљем које се добија путем хидродестилације. Упркос разликама у методама које се примењују приликом екстракције, и разлика у хемијском профилу једињења испитиваних екстракта биљке *S. scardica*, нема значајне разлике у погледу антимикуробних својстава испитиваних екстраката. Могуће је да комбинација дитерпена и масних киселина и њихових деривата може бити макар делимично одговорна за показане активности, али присуство других једињења која нијесу детектована помоћу примијењених техника не треба игнорисати.

Анти-инфламаторна активност је до сада утврђена експериментално код различитих врста екстрата биљке *Suderitis* (51,101,102) У садашњој студији, резултати (**Табела 7, Слике 22 и 23**) показују да етил етар екстракт, **2** биљке *S. Scardica* посједује најизраженија анти-инфламаторну својства, док је н-бутанол екстракт, **4** испољио најизраженију гасро-протективну активност. Ови резултати су у добром складу са већ назначеном употребом овог рода (31) Неколико флавоноида показују изражену анти-инфламаторну активност. У скорије вријеме, потврђено је да апигенин, лутеолин и кверцетин имају значајну анти-инфламаторну активност (103) Присутна фенолна једињења у екстрактима који су тестирани могу бити дјелимично одговорни за показана анти-инфламаторна и гастропротективна својства као што је показано у тестовима едема шапе коју је изазвао караген као и код акутног желудачног оштећења које је изазвао етанол. Наиме, караген који је убризган у шапу пацова производи акутну локалну инфламаторну реакцију која се састоји из две фазе. Сматра се да у раној фази (сат времена након убризгавања карагена) многе вазоактивне супстанце (прг. хистамин, 5-хидрокситриптамин, брадикининс и простагландинис) се ослобађају. Насупрот томе, друга фаза је у вези са инфилтрацијом неутрофила, као и са наставком стварања метаболита арахидонске киселине (104-106). Познато је да у другој фази акутне инфламације (коју је изазвао караген) активирани полиморфону-клеарне ћелије које производе велику количину слободних радикала које могу да додатно оштете ткиво које је захваћено упалом. Бројна истраживања су показала да многи активни конституенти лековитих биљака, нарочито флавоноиди и фенолкарбонске киселине, које спречавају инфилтрацију неутрофила у упалној зони и неутрализирајућих слободно-радикалних врста, играју улогу анти-инфламаторних агенаса (107). Што се тиче DPPH-дејонизирајућег капацитета тестираних екстрата биљке *S. Scardica* и укупног високог садржаја фенолних једињења, може се претпоставити да његов анти-инфламаторни ефекат код модела акутне упале коју је изазвао караген, је макар делимична последица, присутних флавоноида и фенолкарбонских киселина. На основу поменутих истраживања, претпоставља се да су фенолна једињења потенцијални носиоци анти-инфламаторног својства испитиваних екстрата.

Резултати садашње студије су показали да су испитани екстракти биљке *S. scardica* пружили значајну заштиту против улцерогених ефеката код пацова и да је овај ефекат

био веома близу оном који је до сада добијен уз помоћ познатог лека против чира, рани-
тидина.

Познато је да је чисти етанол штетан за желудац и да лоше утиче на површински слој желучане слизнице уништавајући њен интегритет и тако изазива повратну дифузију водоничних јона, која доводи до некрозе. Значајна микроваскуларна промена се дешава као резултат поремећаја рада баријере гастричне мукозе (брза и јака вазоконцентрација коју прати брза и јака артеријална дилатација). Као последица исхемије, долази до даљег повређивања слузнице желуца услед промена оксидоредукционог статуса, а затим долази и до перфузије. Кисеонични радикали су директни учесници у том механизму тако да би њихово уклањање стимулисало излечење желудачних лезија које је изазвао етанол. (108) Многе студије су показале да супстанце са антиоксидантским својствима (полифенолска једињења као што су флавоноиди и фенолне киселине) могу да заштите од желудачних штетних ефеката чистог етанола. Неки скорашњи извештаји показују да многи флавоноиди садрже анти-улцерогена својства. С обзиром да екстракти биљке *S. scardica* тестира-
ни у овој студији садрже феноличне компоненте (**Табела 5 и 6, Слика 20**). и показали су антиоксидативна својства, може се претпоставити да значајан гастропротективни ефекат код екстрата (слично њиховим анти-инфламаторном ефекту) би могли делимично бити последица постојања феноличких једињења у овом екстрату. У данашње време, канцер је постао један од највећих узрока смртности широм света. Откривање и спречавање канце-
ра су главни изазов здравственог система у развијеном свету. Исхрана на биљној бази која обилује фитохемикалијама је дуго сматрана да има знаћајну улогу у превенцији канцера. Многе студије су показале да флавоноиди-распрострањене хемикалије имају јака антиту-
морна својства против разних врста канцера. (109,110)

Претходни резултати указују да неки флавоноиди (апигенин, кверцетин) спречавају раст меланомичних ћелија Б16 и метастатички потенцијал *in vivo* (111). Истовремено, су урађени експерименти на суспензији ћелијских линија леукемије HL-60 и на људским нормалним ћелијама PBMC. Механизми њихових цитотоксичних активности, очигледно обухватају индукцију смрти апоптотичних ћелија које карактерише појављивање фосфа-
тидилсерина и DNK фрагментације, која је у корелацији са индукцијом стварања ROS-а. Превелико стварање ROS-а праћено је оксидативним стресом , изазивајући смрт ћелије (111). и може бити важно за цитотоксичну активност флавоноидних састојака.

У данашње време, канцер је постао један од највећих узрока смртности широм све-
та. Откривање и спречавање канцера су главни изазов здравственог система у развијеном свету. Исхрана на биљној бази која обилује активним супстанцијама природног поријекла је сматрана је основом у превенцији канцера. Многе студије су показале да флавоноиди-
распрострањене хемикалије имају јака цитотоксична својства против разних врста кан-
цера.(109,110).

Цитотоксична активност биљних екстрата је процењена на хуманим туморским ћелијама HeLa (human cervix carcinoma cells - хумане ћелије карцинома цервикса), FemX (human melanoma cells - хумане ћелије меланома) и B16 (mouse melanoma - ћелије меланом код миша) методом везивања Kenacid Blye R dye.

Резултати већ спроведених испитивања, до којих су други истраживачи дошли, указују да неки флавоноиди (апигенин, кверцетин) спречавају раст меланомичних ћелија и метастатички потенцијал *in vivo* (110). Механизам цитотоксичне активности може се заснивати на индукцији смрти апоптотичних ћелија које карактерише појављивање фосфатидилсерина и DNK фрагментације, што је у корелацији са индукцијом стварања ROS-а. Превелико стварање ROS-а које је праћено оксидативним стресом су сви познати фактори који могу да изазову смрт ћелије и могу бити важни за цитотоксичну активност испитиваних екстраката и флавоноидних састојака (111).

Апигенин и лутеолин су показали да заустављају протеазоме и изазивају апоптозу код леукемијских ћелија код људи (112). Инхибитори протеазома изазивају акумулацију протеазомских циљних протеина и пратећа је активација каспаза, а цијепање полимеразе поли-ADP рибозе на крају доводи до апоптозе код трансформисаних, али не и нормалних ћелија (113). Показано је да флавоноиди могу директно да се вежу за неке протеинске киназе укључујући Akt, Fin, Janus kinazu 1, митоген-активирану протеин киназу (MAPK) киназу 1, MAPK киназу 4, фосфоиноситиде 3-кина, Raf1, мијењајући њихово фосфорилационо стање током процеса канцерогенезе (114-116).

Начин умирања туморских ћелија може да буде значајан у смислу одређивања утицаја на терапеутски одговор на употребељене цитотоксичне агенсе. Иако већина анти-канцерогених љекова поспјешује апоптотичну смрт ћелије, отпор према апоптози коју је изазвала хемотерапија изгледа да је обиљежје најубичајенијих одговора третираних туморских ћелија (117). Некротичне туморне ћелије омогућују антитуморни одговор *in vitro* у ком су макрофаги посредници док се код апоптосе јавља супротан ефекат (118).

Некротичка смрт ћелије игра улогу важног стимулуса за индукцију и одржавање дјелотворног имуног одговора код кога су посредовале дендритичке ћелије (119). Бројни подаци који описују имуностимулаторна својства смрти некротичке ћелије, подржавају хипотезу да некроза може бити делотворнија од апоптозе код изазивања регресије тумора. Стога, способност биљног екстрата да изазове некротичну смрт ћелије могла би бити повољност за класичне антитуморне агенсе и потенцијално веома корисна додатна терапија у код лијечења канцера. Било би интересантно испитати допринос некрозе антиканцерогеној активности испитиваних екстрата и његових фенолских, односно флавоноидних компонената.

Доказани цитотоксични ефекти флавоноида заслужују пажњу и даља испитивања у циљу оправданости додавања флавоноидних једињења антиканцерогеним лековима.

Исхрана базирана на биљкама, богата фенолним компонентама, сматра се да има важну улогу у превенцији канцера. Многе студије су показале да флавоноиди као широко распрострањене природна једињења, имају јака антитуморна својства против разних врста канцера (109). Биљке богате флавоноидима, које се вјековима користе у традиционалној медицини, могу бити веома добар извор у обезбјеђивању одговарајућег дневног уноса флавоноидних једињења као јефтина и једноставна средства у превенцији канцера. Подаци који су овдје представљени су у складу са даљим истраживањем флавоноида као хемотерапеутских и хемопревентивних агенса.

Закључци

1. Хемијска анализа испарљивих састојака у испитиваним узорцима (ЕО, ЕО-СО₂, АО-СО₂, 1, 2, 3 и 4) примјеном GC и GC-MS метода идентификовано је 133 једињења.
2. У ЕО узорку, оксидовани монотерпени су главни конституенти, али је такође присутна значајна количина оксидованих сесквитерпена и масних киселина и њихових естера (30.01, 25.54 и 15.96%). Иако су монотерпенски угљоводоници у претходним истраживањима етарског уља ове биљке, као и других врста овог рода означени као главни конституенти у нашем узорку ЕО монотерпенски угљоводоници су заступљени са само 1.83%.
3. Код нашег узорка дитерпени се налазе у највећем проценту; док су октадеканולי заступљени са само 0.21%. Најзаступљенија једињења су хексадеканолска киселина, миристицин, ментол, кариофилен оксид, и τ -мууролол (12.92, 5.23, 4.90, 4.84 и 3.62%).
4. Битне разлике су утврђене између хемијских профила етарских уља која су добијена путем НД и НКЕ-СО₂, услови екстракције притисак од 10 МПа и 40 °С, проток СО₂ 0.67 kg/h. (узорци ЕО и ЕО-СО₂). Наиме, масне киселине са својом естрима, као и дитерпенска једињења представљају главне групе код ЕО-СО₂ једињења са 41.16 % и 33.75 %. Главне компоненте су хексадеканолска киселина, дихидроксил дериват сандаракопимар-8(14),15-диена, (Е)- ферругинол ацетат и етил хексадеканоат (18.59, 14.89, 11.82 и 11.73%).
5. Поларна фракција АО-СО₂ добијена путем екстракције НКЕ СО₂ на истој температури, али са повећаним притиском на 30 МПа (садржи једињења веће молекулске масе), карактерише се такође присуством масних киселина и дитерпена, (71.07 и 26.81%). Главне компоненте су хексадеканолска и линолеинска киселина (43.22 и 24.80%), и дитерпени и дихидрокси дериват сандаракопимар-8(14),15-диена и (Е)-ферругинол ацетат (11.49 и 11.22%).
6. У свим другим испитиваним екстрактима масне киселине и њихови естри су представљали главне компоненте, осим у 2 фракцији која је изузетак, с обзиром да су дитерпени представљали више од 70% у односу на укупни садржај. Узорци АО-СО₂ и 1 су имали релативно сличан профил конституената, масне киселине и дитерпени су били у највећем проценту заступљени. У узорку 1 чинили су

67.75 и 23.3%. Хексадеканолска и додеканска киселина (46.57 и 17.05%) и дитерпени дихидрокси дериват сандаракопимар-8(14),15-диена, (Е)-феругинол ацетате и (З)-феругинол ацетат (10.79, 8.25 и 4.26%) су представљали доминирајуће конститuentе.

7. Урађена је хемијска анализа етерског уља методама ХД и НКЕ. У нашим узорцима НКЕ методом најзаступљеније идентификоване компоненте су дитерпени и масне киселине и њихови деривати. Према хемијском саставу анализираних узорака етарског уља и испарљивих конституената врсте *S. scardica* указао је на другачији хемијски профил у поређењу са хемијским профилом наведене врсте од стране других аутора, који указују да су монотерпенски угљоводоници или оксидовани сесквитерпени доминантна група једињења. У овом раду етарска уља испитиване врсте *S. scardica* која су добијена хидродестилацијом садржала су оксидоване монотерпене у највећем проценту
8. Садржај укупних полифенола варира од 84.2 до 345.6 мг еквивалената галне киселине/g масе сувих биљних екстрата. Садржај флавоноида изрежен у процентима хиперозида, који варирају од 0.4 до 1.1, док се садржаја танина креће од 0.5 до 5.7. Квантитативна анализа укупног садржаја фенола, флавоноида, и садржаја танина, указују на релативно висок садржај фенолних једињења у испитиваним екстрактима. Према анализи NPLS методе утврђује се да су доминантне фенолне компоненте деривати хидроксициметне киселине (хлорогенска, кафена, ферула и р-кумаринска киселине) и деривата 4-хидроксибензојеве киселине (протокатхинска, ванилинска и сирингинска киселина).
9. Антимикробна активност испитиваних *S. scardica* екстракта, мјерењем минималне вриједности инхибиторне концентрације (МИЦ у вриједности од 40 до $\geq 2,560 \mu\text{g/mL}$) показују антибактеријску активност од јаке до умјерене.
10. Антиинфламаторна активност приписује се присутним флавоноидима и фенолкарбонским киселинама. Сматра се да они спречавају инфилтрацију неутрофила у упалној зони и неутрализирајућих слободно-радикалних врста, играјући улогу анти-инфламаторних агенаса. Анализа поларних екстраката указује да је ријеч о биљци са значајним антиинфламаторним потенцијалом који се може мјерити са синтетским антиинфламаторним агенсом индометацином.
11. Сви тестирани екстракти су показали значајну гастропротективну активност, а доказано је да је екстракт n-бутанола најефикаснији. У дози 100 mg/kg је био много бољи од ранитидина, који је служио као позитивна контрола. У народу је позната као биљка која отклањања тегобе органа за варење. На овај начин је потврђена оправданост надземног дијела биљке *S. Scardica* у традиционалној употреби.

12. Цитотоксична активност биљних екстрата је процијењена на хуманим туморским ћелијама HeLa (human cervix carcinoma cells - хумане ћелије карцинома цервикса), FemX (human melanoma cells - хумане ћелије меланоме) и B16 (mouse melanoma - ћелије меланом код миша) методом. Резултати већ спроведених испитивања, до којих су други истраживачи дошли, указују да неки флавоноиди (апигенин, кверцетин) спречавају раст меланомичних ћелија и метастатички потенцијал ин виво. Резултати индицирају, приказано IC₅₀ вриједностима, да екстракти посједују дозно-зависну цитотоксичну активност на HeLa и FemX ћелијским линијама после продуженог времена инкубације. Етанолни екстракт је био најмање активан према испитиваним ћелијским линијама.
13. Карактеризација хемијског профила испитиваних екстраката указује на присуство фенолних и флавоноидних једињења који су се показали као цитотоксичне супстанце, што отвара могућност испитивања екстраката надземног дијала *S. scardica* као могућих антитуморних агенаса.

Литература

1. Туцаков, Ј.; *Лечење биљем*, Рад, Београд, 1984.
2. Горуновић М. Лукић П. *Фармакогнозија*. Фармацеутски факултет у Београду, Београд 2001.
3. *Лековите биљке Србије*, САНУ, Београд 1989
4. Okada K., Kasahara H., Yamaguchi S., Kawaide H., Kamiya Y., Nojiri H., Yamane H. (2008) Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* , 49(4), 604-616
5. Zhang L., Demain A. L. (Eds.) (2005) *Natural Products: Drug Discovery and Therapeutic Medicine*, Humana Press Inc., Totowa, New York, USA.
6. Dewick P.M. (2002) *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Second Edition, John Wiley & Sons, New York, pp 121-123.
7. Parr A.J., Bolwell, G.P. (2000) Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J Sci. Food Agric.* 80, 985-1012
8. Shen B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7(2), 285-295.
9. Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G, Hagers, Handbuch der Pharmazeutischen Praxis, 5. Aufl., Bde 4-6 Drogen, Springer-verlag, Berlin-Heidelberg, New York, 1992.
10. Mimica-Dukić N. (1992) Ispitivanje sekundarnih biomolekula u nekim vrstama roda *Mentha*, Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
11. Горуновић М. Лукић П. *Фармакогнозија*. Фармацеутски факултет у Београду, Београд 2001.
12. Weißdornblätter mit Blüten. In *Deutsches Arzneibuch, Band 2, Monographien R-Z*; Amlitche Ausgabe Deutscher Apotheker Verlag, Govi-Verlag GmbH: Stuttgart, Frankfurt, 1991
13. Barber JC, Ortega JF, Santos-Guerra A, Marrero A, Jansen RK. *Taxonomists evolution of endemic Sideritis (Lamiaceae) in Macaronesia: Insights from a chloroplast DNA restriction site analysis*. Syst Bot 2000; 25: 633-47

14. Fraga BM, Hernández MG, Fernández C, Santana JMH. *A chemotaxonomic study of nine Canarian Sideritis species*. Phytochemistry 2009; 70: 1038-1048)
15. Martinl* E, Hayri D, Fatma Ü, *Karyological studies on section Empedoclia of Sideritis (Lamiaceae) from Turke*, CARYOLOGIA 2009, Vol. 62, no. 3: 180-197
16. Morales, R., Quintanar, A., Cabezas, S., Pujadas, A.J., Cirujanos, S. (Eds.), *Flora Ibérica XII plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*, Real Jardín Botánico Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, 2010, pp. 1–56.
17. Çarikçi, S., Çöl, Ç., Kiliç , T., Azizöglu, A., *Diterpenoids from Sideritis timolea* P.H Davis. Records of Natural Product 2007. 1, 44–50.
18. Rivas, F., Socorro, O., *Ent-kauranoid derivatives from Sideritis moorei*, 2005. Phytochemistry 66, 1492–1498.
19. Kilic T., Boiss. & Heldr, *Isolation and Biological Activity of New and Known Diterpenoids From Sideritis stricta*, Molecules 2006, 11, 257-262
20. Gabrieli CN, Kefalas PG, Kokkalou EL. *Antioxidant activity of flavonoids from Sideritis raeseri*, J Ethnopharmacol 2005; 96: 423–8
21. Ivancheva S, Stantcheva B. *Ethnobotanical inventory of medicinal plants in Bulgaria*. J Ethnopharmacol 2000; 69: 165–72.
22. Kargioglu M, Cenkci S, Serteser A, Evliyaoglu N, Konuk M, Samil Kök M, Bagci Y. *An ethnobotanical survey of Inner-West Anatolia, Turkey*. Human Ecol 2008; 36: 763–77
23. Çelik S, Karabacak E, Uysal I. *Plants have been collected from mythological Kazdagi (Mt. Ida) National Park, West Turkey by turkmens and their folk, cultural and social uses*. Eur J Scien Res 2008; 19: 835–43)
24. Sahin FP, Ezer N, Calis I, *Terpenic and Phenolic Compounds from Sideritis stricta*, Turk J Chem 2006; 30: 495 – 504
25. Logoglu E, Arslan S, Öktemer A, Takıyan I. *Biological Activities of Some Natural Compounds from Sideritis sipylea Boiss*. Phytother Res 2006; 20: 294–7)
26. Basile A, Senatore F, Gargano R, Sorbo S, Del Pezzo M, Lavitola A, Ritieni A, Bruno M, Spatuzzi D, Rigano D, Vuotto ML. *Antibacterial and antioxidant activities in Sideritis italica (Miller) Greuter et Burdet essential oils*. J Ethnopharmacol 2006; 107: 240-8
27. Charami M, Lazari D, Karioti A, Skaltsa H, Hadjipavlou-Litina D, Souleles C. *Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Sideritis perfoliata subsp. perfoliata (Lamiaceae)*. Phytother Res 2008; 22: 450-4
28. Ertaş A, Öztürk M, Boga B, Topçu G. *Antioxidant and anticholinesterase activity evaluation of ent-kaurane diterpenoids from Sideritis arguta*. J Nat Prod 2009; 72: 500-2).

-
29. Gomez-Serranillos, Carretero E, Slowing K, Palomino OM, Villarrubia AI, Villar A. *HPLC Quantitative Analysis of Diterpenoids in Sideritis (Labiatae) Species*. *Phytother Res* 1998; 12: S101–S103).
 30. Alipieva KI, Kostadinova EP, Evstatieva LJN, Stefova M, Bankova VS. *An iridoid and a flavonoid from Sideritis lanata L.* *Fitoterapia* 2009; 80: 51-3
 31. Güvenç A, Okada Y, Küpeli Akkol E, Duman H, Okuyama T, Çalis I. *Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from Sideritis brevibracteata*. *Food Chem* 2010; 118: 686-92
 32. Petreska J, Stefova M, Ferreres F, Moreno DA, Thomas-Barberan FA, Stefkov G, Kulevanova S, Gil-Izquiere A. *Potential bioactive phenolics of Macedonian Sideritis species used for medicinal "Mountain tea"*. *Food Chem* 2011; 125: 13-20
 33. Palomino OM, Gomez-Serranillos P, Carretero E, Villar A. *High-performance liquid chromatography of flavonoids from Sideritis species*. *J Chromatog A* 1996; 731: 103-8.
 34. Janeska B, Stefova M, Alipieva K. *Assay of flavonoid aglycones from the species of genus Sideritis (Lamiaceae) from Macedonia with HPLC-UV DAD*, *Acta Pharm.* 2007; 57: 371–7
 35. Kirimer N, Baser KHC, Demirci B, Duman H., *Essential oils of Sideritis species of Turkey belonging to the section Empedoclia*, *Chem Nat Compd* 2004; 40: 19–23
 36. Ezer N, Vila R, Caiquiguerland S, Adzet T., *Essential oil composition of four Turkish species of Sideritis*, *Phytochemistry* 1996; 41: 203-5.
 37. Baser KHC., *Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey*, *Pure App Chem* 2002; 74: 527–45
 38. Palá-Paúl J, Pérez-Alonso MJ, Velasco-Negueruela A, Ballesteros MT, Sanz J., *Essential oil composition of Sideritis hirsuta L. from Guadalajara Province, Spain*. *Flavour Frag J* 2006; 21: 410-5
 39. Aligiannis N, Kalpoutzakis I, Chinou B, Mitakou S. *Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece*. *J Agricul Food Chem* 2001; 49: 811–15
 40. Ertan A, Azcan N, Demirci B, Baser KHC. *Fatty acid composition of Sideritis species*. *Chem Nat Comp* 2001; 37: 301–3
 41. Ezer N, Sakar MK, Rodríguez B, De la Torre MC. *Flavonoid glycosides and a phenylpropanoid glycoside from Sideritis perfoliata*. *Internat J Pharmacognosy* 1992; 30: 61–5
 42. Pinar S, Ezer N, Çalis I. *Three acylated flavone glycosides from Sideritis ozturkii Aytac & Aksoy*. *Phytochemistry* 2004; 65: 2095–99
-

-
43. Hernández-Pérez M, Rabanal RM. Evaluation of the antiinflammatory and analgesic activity of *Sideritis canariensis* var. *pannosa* in mice. J Ethnopharmacol 2002; 81: 43-7
 44. Hernández-Pérez M, Sánchez-Mateo CC, Montalbetti-Moreno Y, Rabanal RM. *Studies on the analgesic and anti-inflammatory effects of Sideritis candicans Ait. var. eriocephala* Webb aerial part. J Ethnopharmacol 2004; 93: 279-84
 45. Aboutabl EA, Nassar MI, Elsakhawy FM, Maklad YA, Osman AF, El-Khrisy EAM. *Phytochemical and pharmacological studies on Sideritis taurica* Stephan ex Wild. J Ethnopharmacol 2002; 82: 177-84
 46. Godoy A, de las Heras B, Vivas JM, Villar A. Anti-inflammatory properties of a lipid fraction obtained from *Sideritis javalambrensis*. Biol Pharm Bull 2000; 23: 1193-97
 47. de las Heras B, Navarro A, Díaz-Guerra MJ, Bermejo P, Castrillo A, Boscá L, Villar A. *Inhibition of NOS-2 expression in macrophages through the inactivation of NF- κ B by andalusol*. Br J Pharmacol 1999; 28: 605-12
 48. Villena C, Vivas JM, Villar AM. *Suppression of croton oil-induced rabbit corneal edema by Sideritis javalambrensis*. J Ethnopharmacol 2000; 71: 301-5
 49. Navarro A, de Las Heras B, Villar A. Anti-inflammatory and immunomodulating properties of a sterol fraction from *Sideritis foetens* Clem Biol Pharm Bull 2001; 24: 470-3
 50. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult RS. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. J Pharm Pharmacol 1988; 40: 787-92
 51. Küpeli E, Şahin FP, Çalış I, Yeşilada E, Ezer N. Phenolic compounds of *Sideritis ozturkii* and their in vivo anti-inflammatory and antinociceptive activities. J Ethnopharmacol 2007; 118: 356-60
 52. Tunalier Z, Kosar M, Ozturk N, Baser KHC, Duman H, Kirimer N. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. Chem Nat Comp 2004; 40: 206-10
 53. Nakiboglu M, Ozturk Urek R, Kayali HA, Tarhan L. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. Food Chem 2007; 104: 630-5
 54. Plioukas M, Termentzi A, Gabrieli C, Zervou M, Kefalas P, Kokkalou E. Novel acylflavones from *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca*. Food Chem 2010; 123: 1136-41
 55. Armata M, Gabrieli C, Termentzi A, Zervou M, Kokkalou E. Constituents of *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca* (Lamiaceae) and their antioxidant activity. Food Chem 2008; 111: 179-86
 56. Sagdic O, Aksoy A, Ozkan G, Ekici L, Albayrak S. Biological activities of the extracts of two endemic *Sideritis* species in Turkey. Innov Food Sci Emerg Technol 2008; 9: 80-4
-

-
57. Rios JL, Manez S, Paya M, Alcaraz MJ. Antioxidant activity of flavonoids from *Sideritis javalabrensis*. *Phytochemistry* 1992; 31: 1047-50
 58. Tunalier Z, Kosar M, Ozturk N, Baser KHC, Duman H, Kirimer N. Antioxidant properties and phenolic composition of *Sideritis* species. *Chem Nat Comp* 2004; 40: 206–10
 59. Tsaknis J, Lalas S, Extraction and identification of natural antioxidant from *Sideritis euboea* (Mountain Tea). *J Agric Food Chem* 2005; 53: 6375-81
 60. Alcaraz MJ, Tordera M. Studies on the gastric anti-ulcer activity of hypolaetin-8-glucoside. *Phytother Res* 1988; 2: 85–8
 61. Zarzuelo A, Garcia E, Jiménez J, Ocete MA, Utrilla P, Socorro O. Antiinflammatory and anti-ulcerative activity of various species of the genus *Sideritis* from the Alpujarra region of Spain. *Fitoterapia* 1993; 64: 26–30
 62. Gürbüz I, Özkan AM, Yesilada E, Kutsal O. Anti-ulcerogenic activity of some plants used in folk medicine of Pinarbasi (Kayseri, Turkey). *J Ethnopharmacol* 2005; 101: 313–8
 63. Demirtas I, Sahin A, Ayhan B, Tekin S, Telci I. Antiproliferative effects of the methanolic extracts of *Sideritis libanotica* Labill. subsp. *Linearis*. *Rec Nat Prod* 2009; 3: 104-9
 64. Bruno M, Rosselli S, Pibiri I, Kilgore N, Lee K-H. Anti-VIH agents derived from the ent-kaurene diterpenoid linearol. *J Nat Prod* 2002; 65: 1594–7
 65. Topçua G, Ertas A, Öztürk M, Dinçel D, Kılıç T, Halfon B. Ent-kaurane diterpenoids isolated from *Sideritis congesta*. *Phytochem Lett* 2011 doi: 10.1016/j.phytol.2011.05.001
 66. Kassi E, Papoutsis Z, Fokialakis N, Messari J, Mitakou S, Moutsatsou P. Greek plant extracts exhibit selective estrogen receptor modulator (SERM)-like properties. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 6956-61
 67. Kirimer N, Demirci B, Iscan G, Baser KHC, Duman H. Composition of the essential oils of two *Sideritis* species from Turkey and antimicrobial activity. *Chem Nat Comp* 2008; 44: 121-3
 68. Üğur A, Varol O, Ceylan O. Antibacterial activity of *Sideritis curvidens* and *Sideritis lanata* from Turkey. *Pharmaceut Biol* 2005; 43: 47–52
 69. Villar A, Recio MC, Ríos JL, Zafra-Polo MC. Antimicrobial activity of essential oils from *Sideritis* species. *Pharmazie* 1986; 41: 298–99
 70. Iscan G, Kirimer N, Kurkcuglu M, Baser KHC. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two endemic species from Turkey: *Sideritis cilicica* and *Sideritis bilgerana*. *Chem Nat Comp* 2005; 41: 679–82
 71. Çarıkç S, Çöl Ç, Kılıç T, Azizoglu A. Diterpenoids from *Sideritis tmolea* P. H. Davis. *Rec Nat Prod* 2007; 4:44-50.
-

-
72. Reverchon, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluid.* **1997**, *10*, 1–37.
73. Papaefstathiou, G.; Polychronopoulos, P.; Aligiannis, N.; Skaltsounis, A.L.; Mitaku, S. Comparative study of accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction of total phenolics and flavonoids from *Sideritis raeseri* subsp. *attica* and study of antioxidant activity. *Planta Med.* **2008**, *74*, 1122–1122.
74. Zizovic, I.; Stamenic, M.; Orlovic, A.; Skala, D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: Mathematical modeling on the micro-scale. *J. Supercrit. Fluids.* **2007**, *39*, 338–346.
75. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 2007.
76. Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System software (AMDIS ver. 2.1 National Institute of Standards and Technology (NIST), Standard Reference Data Program, Gaithersburg, MD, USA, 2005.
77. Krimer, N.; Tabanaca, N.; Özek, T.; Tümen, G.; Başer, K.H.C. Essential oil of annual *Sideritis* species growing in Turkey. *Pharm. Biol.* **2000**, *38*, 106–111.
78. Kostadinova, E.; Nikolova, D.; Alipieva, K.; Stefova, M.; Stefkov, G.; Evstatieva, L.; Matevski, V.; Bankova, V. Chemical constituents of the essential oils of *Sideritis scardica* Griseb. and *Sideritis raeseri* Boiss and Heldr. from Bulgaria and Macedonia. *Nat. Prod. Res.* **2007**, *21*, 819–213.
79. Rodriguez-Garcia, I.; Munoz-Dorado, M.; Gomez-Mercado, F.; Garcia-Maroto, F.; Guil-Guerrero, J.L. Essential oil composition of *Sideritis pusilla* (Lange) Pau ssp. *J. Essent. Oil Res.* **2004**, *16*, 535–538.
80. Aloush, V.; Navon-Venezia, S.; Seigman-Igra, Y.; Cabili, S.; Carmeli, Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob. Agents Ch.* **2006**, *1*, 43–48.
81. Livermore, D. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *34*, 634–640.
82. Quinn, P.; Markey, B. *Concise Review of Veterinary Microbiology*, 1st ed.; Blackwell Publishing: Oxford, UK, 2003; pp. 8–10.
83. Winn, W.; Allen, S.; Janda, W.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.; Woods, G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, MD, USA, 2006; pp. 945–1021.
84. Brooks, G.; Butel, J.; Morse, S. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, 21st ed.; Appleton & Lange: Stamford, CT, USA, 1998; pp. 145–177.
-

-
85. Dulger, B.; Gonuz, A.; Aysel, V. Inhibition of clotrimazole-resistant *Candida albicans* by some *Sideritis* species from Turkey. *Fitoterapia* **2006**, 77, 404–405.
 86. Tomas-Barberan FA, Lopez-Gomez C, Villar A, Tomas-Lorente F. Inhibition of lens aldose reductase by Labiate flavonoids. *Planta Med* 1986; 52: 239-40
 87. Diklić N. Genus *Sideritis* L. In: Flora of Serbia. Josifović M, editor. Serbian academy of Science and Art; 1974. Vol. IV: p. 371-372
 88. Koleva I, Linssen JPH, van Beek TA, Evstatieva LN, Kortenska V, Handjieva N. Antioxidant activity screening of extracts from *Sideritis* species (*Labiatae*) grown in Bulgaria. *J Sci Food Agric* 2003; 83: 809-819
 89. Đorđević S, Blagojević S, Sekulović D, Sekešan V, Runjaić-Antić D. The analysis of mineral content in active components and the preparation of phytopreparations for anemia prevention. *Arh Pharm* 1993; 43: 225-231.
 90. Lui Z, Tao X, Zhang C, Lu Y, Wei D. Protective effects of hyperoside (Quercetin-3-O-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydro-peroxide. *Biomed Pharmacother* 2005; 59: 481–490
 91. (Scheck AC, Perry K, Hank NC, Clark WD. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. *BMC Complement Alternat Med* 2006; 6: 1-9 (doi:10.1186/1472-6882-6-27
 92. Velioglu YS, Mazza Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 4113-4117
 93. Determinations of tannins in herbal drugs. In: European Pharmacopoeia 6.0, edition no. 6. Strasbourg: Council of Europe; 2004. Vol. no. 1, p 255
 94. Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958; 181: 1199-1200
 95. Oyanagui, Y.; Sato, S. Inhibition by nifedipine of ischemic and carrageenan paw oedema as well as of superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. *Arzneim. Forsch./Drug Res.* 1991, 41, 469-474
 96. Touhey S, Heenan M. Cell Culture in Essential cell biology, Ed. John Davey and Mike Lord, Oxford University Press, 2003
 97. Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, Miljkovic D, Harhaji L, Vuckovic O, Stosic-Grujicic S, Mostarica Stojkovic M, Trajkovic V. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 589–598
 98. Badovinac V, Trajkovic V, Mostarica-Stojkovic M. Nitric oxide promotes growth and major histocompatibility complex-unrestricted cytotoxicity of interleukin-2-activated rat lymphocytes. *Scand J Immunol* 2000; 52: 62–70
-

-
99. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Bio Med* 1996; 20: 933-956
 100. Cuvelier ME, Richard H, Berset C. Comparison of the antioxidant activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Biosci Biotechnol Biochem* 1992; 56: 324-325
 101. Alcaraz MJ, Jimenez MJ, Ververde S, Sanz J, Rabanal RM, Villar A. Anti-inflammatory compounds from *Sideritis javalambrensis* n-hexane extract. *J Nat Prod* 1989; 52: 10088-10091
 102. Barberán FAT, Manez, S, Villar A. Identification of anti-inflammatory agents from *Sideritis* species growing in Spain. *J Nat Prod* 1987; 50, 313-314
 103. Raj Narayana K, Sripal Reddy M, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 2001; 33: 2-16
 104. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Path* 1971; 104: 15-29;
 105. Dawson J, Sedgwick AD, Edwards JC, Lees PA. Comparative study of the cellular, exudative and histological responses to carrageenan, dextran and zymosan in the mouse. *Int J Tissue React* 1991; 13: 171-185
 106. Boughtin-Smith NK, Deakin AM, Follenfant RL, Whittle BJR, Coarland LG. Role of oxygen radicals and arachidonic acid metabolites in the reverse passive arthus reaction and carrageenin paw oedema in the rat. *Br J Pharmacol* 1999; 110: 896-902
 107. Maleki N, Garjani A, Nazemiyeh H, Nilfouroushan N, Eftekhari Sadat AT, Allameh Z, Hasannia N. Potent anti-inflammatory activities of hydroalcoholic extract from aerial parts of *Stachys inflata* in rats. *J Ethnopharmacol* 2001; 75: 213-218
 108. Salim AS. Removing oxygen-derived free radicals stimulates healing of ethanol-induced erosive gastritis in the rat. *Digestion* 1990; 47: 24-28
 109. Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. *Pharm Res* 2010; 27: 962-978.
 110. Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595-600.
 111. Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999; 18: 7719-7730
-

112. Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP. Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol.* 2005 May 15; 69:1421-32
113. Chen D, Chen MS, Cui QC, Yang H, Dou QP. Structure-proteasome-inhibitory activity relationships of dietary flavonoids in human cancer cells. *Front Biosci.* 2007 Jan 1;12:1935-1945
114. Takahashi T, Kobori M, Shinmoto H, Tsushida T. Structure-activity relationships of flavonoids and the induction of granulocytic- or monocytic-differentiation in HL60 human myeloid leukemia cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998; 62: 2199-2204
115. Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a Tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71: 1306-1312
116. Hou DX, Kumamoto T. Flavonoids as protein kinase inhibitors for cancer chemoprevention: direct binding and molecular modeling. *Antioxid Redox Signal* 2010; 13: 691-719
117. Ng CP, Bonavida B. A new challenge for successful immunotherapy by tumors that are resistant to apoptosis: two complementary signals to overcome cross-resistance. *Adv Cancer Res* 2002; 85: 145-174
118. Reiter I, Krammer B, Schwamberger G. Cutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cells on macrophage antitumor activities. *J Immunol* 1999; 163: 1730-1732
119. Sauter B, Albert ML, Francisco L, Larsson M, Somersan S, Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells.