

1. Doktorska disertacija_Tijana Micovic.pdf

By: Tijana Micovic

As of: May 24, 2022 12:34:26 PM
35,782 words - 153 matches - 79 sources

Similarity Index

9%

Mode: Similarity Report ▼

paper text:

UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET PODGORICA Studijski program Farmacija dr pharm. Tijana Mićović Farmakognosijska ispitivanja herbe izopa, Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije - Doktorska disertacija - Podgorica, 2022. godine UNIVERZITET CRNE GORE MEDICINSKI FAKULTET PODGORICA Studijski program Farmacija dr pharm. Tijana Mićović Farmakognosijska ispitivanja herbe izopa, Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije -

Doktorska disertacija - Podgorica, 2022. godine **UNIVERSITY OF MONTENEGRO FACULTY OF MEDICINE PODGORICA** **Study program**

21

Pharmacy dr pharm. Tijana Mićović Pharmacognostic investigation of aerial parts of Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) from Montenegro and Serbia - Doctoral Dissertation - Podgorica, 2022.

PODACI O DOKTORANDU, MENTORU I ČLANOVIMA KOMISIJE DOKTORAND Ime i prezime: Datum rođenja: Naziv završenog studijskog programa i godina završetka

18

: Tijana Mićović 15.09.1990. godine Farmaceutski fakultet (Univerzitet Crne Gore), petogodišnje studije (300 ECTS kredita), 2009-2014. godine

MENTOR Prof. dr Zoran Maksimović, redovni **profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet**

6

(Katedra za Farmakognoziju)

KOMISIJA ZA OCJENU PODOBNOSTI DOKTORSKE TEZE I KANDIDATA: Prof. dr Zorica Potpara, vanredni **profesor**, Univerzitet **Crne Gore**, Medicinski **fakultet**

63

Podgorica (Studijski program Farmacija)

Prof. dr Zoran Maksimović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski **fakultet**
(Katedra za farmakognoziju) **Prof. dr Danijela Stešević, redovni profesor, Univerzitet**

7

Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet Podgorica (Studijski program Biologija)

KOMISIJA ZA OCJENU DOKTORSKE DISERTACIJE KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

37

DATUM ODBRANE: _____._____._____. godine

Zahvalnica Želim da zahvalim institucijama koje su doprinijele da se ova doktorska disertacija desi i realizuje: Institutu za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore, Medicinskom fakultetu u Podgorici Univerziteta Crne Gore, Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu (Katedra za Farmakognoziju, Botaniku, Fiziologiju i Mikrobiologiju), Centru za ekotoksikološka ispitivanja Crne Gore, Fakultetu Medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, Institutu farmaceutskih nauka (Katedra za farmakognoziju) Univerziteta u Gracu, Institutu za informacione tehnologije Univerziteta u Kragujevcu. Zahvalna sam što sam na putu doktorskih studija, koje predstavljaju jedan cijeli život u malom, pored savladavanja naučnih izazova, upoznala mnogo dragih kolega, saradnika i prijatelja. Veliku zahvalnost dugujem prije svega mentoru, prof. dr Zoranu Maksimoviću, na ogromnoj pomoći tokom cijelog puta na studijama, usmjeravanjima, stručnim savjetima, diskusijama, profesionalizmu, pomoći pri oblikovanju disertacije i velikoj podršci u svim onim trenucima kada je bilo najpotrebnije. Takođe veliko hvala prof. dr Danijeli Stešević, jer je pomogla u pronalaženju i sakupljanju biljnog materijala na terenima u Crnoj Gori, bez čega nikakvi dalji eksperimenti ne bi bili mogući. Isto tako veliko hvala i gospođi Miri Živković i biologu Vasiliju Buškoviću, za pomoć oko sakupljanja biljnog materijala iz Pive i Kuča (Crna Gora). Hvala mnogo prof. dr Danilu Stojanoviću na pomoći i savjetima oko botaničke analize prikupljenog biljnog materijala. Veliko hvala dragom kolegi, dr sc. pharm. Stevanu Samardžiću, na pomoći oko LC- DAD-MS analize i ispitivanja antioksidativne aktivnosti, kao i na brojnim savjetima, diskusijama, razumijevanju i podršci. Najtoplije hvala prof. dr Vladimiru Jakovljeviću i njegovoj ekipi saradnika: prof. dr Marini Tomović, mr pharm. Sanji Matić, prof. dr Dejanu Baskiću, doc. dr Jovani Bradić i dr sc. med. Suzani Popović na velikoj podršci, saradnji i pomoći oko ispitivanja citotoksične aktivnosti i antiinflamatorne aktivnosti (in vivo). Najiskrenije i najljepše hvala dr Jeleni Katanić Stanković i kolegama, prof. dr Rudolfu Baueru, dr Xuehong-u Nöst-u, prof. dr Zoranu Markoviću i dr Dejanu Milenkoviću, na velikoj podršci, saradnji i pomoći oko ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti in vitro i in silico. Prof. dr Dijani Topalović, prof. dr Ladi Živković i prof. dr Biljani Spremo- Potparević, veliko hvala na pomoći, savjetima i diskusijama oko ispitivanja geno/antigenotoksične aktivnosti, a prof. dr Marini Milenković puno hvala na pomoći oko ispitivanja antimikrobne aktivnosti. Najljepše hvala kolegici, Danijeli Šuković i kolegi Vladimiru Živkoviću, koji su omogućili da u laboratorijama CETI-ja odradim izolaciju etarskih ulja i ekstrakata prikupljenog biljnog materijala, kao i kolegici prof. dr Dragici Bojović na podršci. Neizmerno hvala i svim dragim ljudima, koji su bili uz mene, roditeljima prije svega, a posebno majci Oliveri, na osloncu, ogromnoj podršci, razumijevanju i ljubavi, od koje sve kreće. Tijana Mićović

PODACI O DOKTORSKOJ DISERTACIJI Naziv doktorskih studija: Doktorske studije Univerziteta Crne Gore

36

Medicinski **fakultet** u Podgorici **Studijski program** Farmacija Naziv **doktorske disertacije**: Farmakognosijska ispitivanja herbe izopa, *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije**Datum prijave doktorske teze** : 16.09.2019. **godine Datum sjednice Senata** UCG **na kojoj je**

37

prihvaćena teza

: 12.03.2020. godine Rezime/Izvod iz teze: Uvod Izop (*Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae) je aromatična i ljekovita biljka, čija se ljekovita svojstva koriste u tradicionalnoj medicini od davnina. Uprkos podacima o tradicionalnoj primjeni, još uvijek nema podataka o zvaničnoj primjeni herbe izopa u terapijske svrhe, što stvara potrebu za daljim, farmakognosijskim istraživanjima ove vrste. Pregledom dostupne literature, definisani su glavni ciljevi istraživanja u onim djelovima gdje nedostaje podataka ili su oskudni. Preliminarno je procijenjena opravdanost tradicionalne primjene i potencijalno novih mogućnosti za primjenu ispitivanih preparata herbe izopa, a sve u vezi sa njihovim hemijskim profilom. Cilj Glavni ciljevi disertacije su bili da se ispituju antioksidativna, antimikrobna, genotoksična, antigenotoksična, citotoksična i antiinflamatorna svojstva hemijski okarakterisanih etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa. Biljni materijal je sakupljen na pet različitih prirodnih lokaliteta u Crnoj Gori, a korišćen je i komercijalni uzorak, koji se sastojao od uzoraka sakupljenih na prirodnim staništima biljke sa juga Srbije. Metodologija Hemijski sastav je ispitan primjenom gasne hromatografije u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (GC-MS), za etarska ulja, odnosno za ekstrakte - tačnom hromatografijom sa diodnim i masenim detektorom (eng.

liquid chromatography with diode array and mass spectrometry, LC-DAD-MS

1

). Antioksidativna aktivnost je ispitana primjenom testa neutralizacije DPPH radikala (

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) i FRAP testa (**eng. ferric** reducing/ **antioxidant power**

70

test); za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćena je mikrodiluciona i checkerboard metoda; genotoksična i antigenotoksična aktivnost je ispitana primjenom Komet testa; dok je citotoksičnost procijenjena

MTT testom (3-(4,5-dimetiltiazol- 2-il)-2,5-difenil tetrazolijum bromid

10

reagens), na tumorske ćelijske linije (SW480, MDA-MB 231, HeLa), kao i na zdravu, netransformisanu ćelijsku liniju humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Antiinflamatorna svojstva preparata herbe izopa (etarskog ulja i metanolnih ekstrakata) su procijenjena in vivo, in vitro i in silico. Za in vitro ispitivanje etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa, korišćeni su ciklooksigenaza-1 (COX-1) i ciklooksigenaza-2 (COX-2) enzimski testovi. In vivo antiinflamatorni potencijal ekstrakata (

u dozama 50, 100 i 200 mg/kg) je procijenjen **na** modelu karagenanom izazvane **inflamacije**

13

šape pacova. Molekularni doking je korišćen za in silico ispitivanje inhibitorne aktivnosti hlorogenske (eng. chlorogenic acid, CA) i rozmarinske kisjeline (eng. rosmarinic acid, RA), kao dominantnih jedinjenja u ispitivanim metanolnim ekstraktima, prema enzimima COX-1 i COX-2. Rezultati i diskusija Rezultati su pokazali da su ispitivana etarska ulja herbe izopa bogata monoterpenskim ugljovodonicima (npr. limonen; 7.99%-23.81%), oksidovanim monoterpenskim jedinjenjima (1,8-cineol; 38.19%-67.1%) i fenilpropanoidima (metil eugenol; 0.00%-28.33%). Kvantitativno dominantna jedinjenja u ekstraktima su bila - rozmarinska (3.53– 17.98 mg/g) i hlorogenska kisjeline (23.35– 33.46 mg/g). Metanolni ekstrakti herbe izopa su pokazali slabu do srednje jaku antioksidativnu aktivnost (

DPPH IC50 = 56.04–199.89 µg/mL, FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe2+/g

1

). Pokazalo se da postoji određeni potencijal preparata herbe izopa da djeluju antimikrobno, posebno na gljivicu *Candida albicans* (nešto bolju aktivnost protiv *C. albicans* su pokazali ekstrakti). Preparati izopa su značajno redukovali oštećenja DNK u ćelijama pune krvi, koja su prethodno izazvana vodonik peroksidom. Metanolni ekstrakti su pokazali selektivnu, i moćnu, dozno i vremenski zavisnu, aktivnost protiv HeLa tumorske ćelijske linije. Značajna inhibitorna aktivnost je pokazana u COX-2 testu i to kada su u pitanju ekstrakti. Naime, svi analizirani ekstrakti, pri koncentraciji 20 µg/ml su dali procenat inhibicije COX-2 enzima (54.04 - 63.04%) koji se nije stratistički značajno razlikovao od pozitivne kontrole, celekoksiba (61.60%), pri koncentraciji 8.8 µM. U in vivo ispitivanju svi metanolni ekstrakti herbe izopa, u najvišoj ispitivanoj dozi od 200 mg/kg u trećem i četvrtom satu, nakon primjene karagenana, su pokazali statistički značajan ($p < 0.05$) inhibitorni efekat na povećanje edema šape pacova u odnosu na kontrolu. Ova aktivnost je uporediva ili veća u odnosu na referentnu supstancu, indometacin pri koncentraciji 8 mg/kg. Preliminarni in silico rezultati sugerišu da ispitivana jedinjenja (RA i CA) pokazuju bolju inhibitornu aktivnost prema COX-1 i COX-2 od standardnog nesteroidnog antiinflamatornog lijeka (NSAIL), ibuprofena, što se vidi iz slobodne energije vezivanja (ΔG_{bind} u kJ mol⁻¹). Naime, vezivna energija ispitivanih jedinjenja prema COX-1 i COX-2 je bila u opsegu od -48.2 do -50.8 kJ mol⁻¹. Ibuprofen, kao NSAIL, za ista receptorska ciljna mjesta, je pokazao značajno višu energiju vezivanja ($\Delta G_{bind} =$

31.3 kJ mol⁻¹ za COX-1 i $\Delta G_{bind} =$ 30.9 kJ mol⁻¹ za COX-2

44

). Zaključak Definisana su dominantna jedinjenja, kao potencijalni markeri kvaliteta biljne droge Hyssopi herba. Dobijeni rezultati, demonstriraju značajan ljekoviti potencijal *H. officinalis*, opravdavaju primjenu u tradicionalnoj medicini, otvaraju nova vrata i pozivaju na dodatna in vivo istraživanja naročito ekstrakata herbe izopa, kako bi se istražili molekularni mehanizmi antigenotoksične, citotoksične (prema HeLa ćelijskoj liniji) i antiinflamatorne aktivnosti u živim sistemima i kako bi se u budućnosti možda razvio neki novi lijek ili suplement. Ključne riječi: *Hyssopus officinalis*; antioksidativna aktivnost; antigenotoksična aktivnost; Komet test; citotoksična aktivnost; HeLa ćelijska linija; GC-MS; LC-DAD-MS; antiinflamatorna aktivnost; in silico studije. Naučna oblast: Farmacija Uža naučna oblast: Farmakognozija UDK broj: DATA ON THE

DOCTORAL DISSERTATION Name of doctoral studies: Doctoral studies at the University of Montenegro

36

Faculty of Medicine Podgorica **Study** program Pharmacy **Doctoral thesis title**

: Pharmacognostic investigation of aerial parts of *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae) from Montenegro and Serbia Thesis application date: 16.09.2019. Thesis acceptance date (UoM Senate Session): 12.03.2020. Abstract/Thesis Overview:

Introduction

Hyssop (*Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae) is a medicinal and aromatic plant, whose medicinal properties have been used in traditional medicine since ancient times

2

. Despite the data on traditional use, there is still no data on the official use of hyssop herb for therapeutic purposes, which creates the need for further, pharmacognosy research of this species. A review of the available literature has defined the main objectives of the research in those parts where data are lacking or scarce. The justification of the traditional application and potentially new possibilities for the application of the tested hyssop herb preparations were preliminary assessed, all in connection with their chemical profile. Aim of the study The main aims

of this study were **to assess the antioxidant**, antimicrobial, **genotoxic, antigenotoxic**, cytotoxic **and** anti-inflammatory **properties of characterized hyssop essential oils and methanol extracts**. Plant material **was**

1

collected from five localities in the territory of Montenegro. In addition a commercial sample was used, which consisted of samples collected at natural localities from southern Serbia. Methodology Chemical composition of

essential oils and extracts was analyzed by gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) and liquid chromatography with diode array detection and mass spectrometry (LC-DAD-MS), respectively. Antioxidant

1

activity was examined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and ferric reducing/antioxidant power (FRAP) tests ; microdilution and checkerboard methods were

used to test antimicrobial activity;

genotoxic and antigenotoxic activity were examined by the comet assay, while cytotoxicity was evaluated by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide dye (MTT) test against tumor cell lines (SW480, MDA-MB 231, HeLa) and non- transformed human lung fibroblast cell lines (MRC-5

1

).

Anti-inflammatory potential of hyssop herb preparations (essential oil and methanol extracts) was evaluated in vivo, in vitro and in silico. For in vitro testing of essential oils and extracts of hyssop herb, the cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2) enzyme assays were used. In vivo anti-inflammatory potential of the extracts (at doses of 50, 100 and 200 mg/kg) was assessed using the carrageenan-induced rat paw edema test. Molecular docking was used for in silico testing of the inhibitory activity of chlorogenic (CA) and rosmarinic (RA) acids, as the dominant compounds in the tested methanol extracts against COX-1 and COX-2 enzymes. Results

2

and discussion

The essential oils were rich in monoterpene hydrocarbons (e.g., limonene; 7.99%– 23.81%), oxygenated monoterpenes (1,8-cineole; 38.19%–67.1%) and phenylpropanoids (methyl eugenol; 0.00%–28.33%). In methanol extracts, the most abundant phenolics were chlorogenic and rosmarinic acid (23.35–33.46 and 3.53–17.98 mg/g, respectively). Methanol extracts expressed moderate to weak antioxidant activity (DPPH IC50 = 56.04–199.89 µg/mL, FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe2+/g

1

). It has been shown that there is a certain antimicrobial potential of hyssop herb preparations, especially on the Candida albicans species (and slightly better activity against C. albicans was shown for extracts).

Hyssop preparations significantly reduced DNA damage in human whole blood cells, induced by pretreatment with hydrogen peroxide. Methanol extracts exhibited selective and potent dose- and time-dependent activity against the HeLa cell line

1

Significant inhibitory activity was shown in the COX-2 test regarding extracts (essential oils did not exhibit any significant activity). Namely, all analysed extracts, at a concentration of 20 µg/ml, showed a percentage of inhibition of COX-2 enzyme (54.04 - 63.04%), which did not indicate a statistically significant difference from the positive control of celecoxib (61.60%) at a concentration of 8.8 µM. In vivo testing showed that all methanol extracts of hyssop herb, at the highest test dose of 200 mg/kg in the third and fourth hours, after carrageenan administration, exhibited a statistically significant ($p < 0.05$) inhibitory effect on the increase in rat paw edema in relation to control. This activity is comparable or higher in relation to the reference substance, indomethacin, at a concentration of 8 mg/kg. The preliminary in silico results suggest that investigated compounds (RA i CA) show better inhibitory activity against COX-1 and COX-2 than standard non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID), ibuprofen, as evident from the free binding energy (ΔG_{bind} in kJ mol⁻¹). The binding energies of the docked compounds to COX-1 and 2 were found to be in the range between -48.2 and -50.8 kJ mol⁻¹. Ibuprofen, as the one NSAID, for the same receptors targets, showed remarkably higher binding energy ($\Delta G_{bind} = -31.3$ kJ mol⁻¹ to COX-1, and $\Delta G_{bind} = -30.9$ kJ mol⁻¹ to COX-2). Conclusion

2

Dominant compounds have been defined as potential markers of the quality of the herbal drug *Hyssopi herba*. The obtained results demonstrate the significant healing potential of *H. officinalis*, justify the use in traditional medicine,

open the door to and the need for further in vivo testing of extracts in order to further examine the molecular mechanism of

2

antigenotoxic, cytotoxic (against HeLa cell line) and

anti-inflammatory activity in living systems and possibly develop a new anti-inflammatory drug or supplement. Keywords: **Hyssopus officinalis**; antioxidant **activity**

2

; antigenotoxic activity; Comet assay; cytotoxic activity; HeLa cell line; GC-MS; LC-DAD-MS; anti-inflammatory activity; in silico studies. Scientific field: Pharmacy Narrow scientific field: Pharmacognosy UDC number: PREDGOVOR "Onaj kome je poznat način liječenja ljudi – neka ne čuva to samo za sebe, nego neka sve izloži i drugima u punoj mjeri" Parafraza sv. Kirila Farmakognozija je nauka o prirodnim ljekovitim proizvodima, u koje između ostalog spadaju svi oni proizvodi

koji kao aktivan (ili na drugi način dominantan) sastojak sadrže biljne droge ili preparate

62

biljnih droga. Farmakognosijska ispitivanja za cilj imaju definisanje i praćenje parametara opšteg i specifičnog kvaliteta prirodnih ljekovitih proizvoda, odnosno biljnih droga i njihovih preparata, kao sirovina za primjenu u farmaceutskoj industriji. Pored toga, farmakognosijskim ispitivanjima je obuhvaćena i evaluacija etnofarmakoloških indikacija za primjenu biljnih ljekovitih supstanci (droga) i preparata, primjenom adekvatnih in vitro i in vivo testova, radi ocjene efikasnosti njihovog djelovanja i bezbjednosti primjene. Znanja iz farmakognosije primjenu u praksi, između ostalog, nalaze i u fitoterapiji, koja predstavlja sistem liječenja zasnovan na primjeni biljnih ljekovitih sirovina (droga) i njihovih preparata. Fitoterapija pripada i tradicionalnoj (narodnoj) medicini, iz koje i vuče korijene, komplementarnoj i alternativnoj medicini, kao i farmakoterapiji i konvencionalnoj medicini, koje se zasnivaju na konceptu racionalne fitoterapije. Koncept racionalne fitoterapije podrazumijeva primjenu biljnih ljekovitih proizvoda zasnovanu na dokazima (eng. evidence-based phytotherapy). Uprkos brojnim podacima o tradicionalnoj primjeni izopa, *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae, još uvijek nema podataka o zvaničnoj primjeni ove biljne vrste u terapijske svrhe.

Relevantne institucije i udruženja (Evropska agencija za lijekove - EMA, Evropsko naučno udruženje za fitoterapiju – ESCOP, Komisija E njemačkog ministarstva

6

zdravalja i Svjetska zdravstvena organizacija – WHO)) do sada nisu objavile zvanične podatke (monografije) kojima bi bila uređena primjena biljnih ljekovitih proizvoda na bazi *Hyssopus officinalis*. Takođe, do sada nema definisanih zvaničnih podataka o specifičnom kvalitetu biljnih droga vrste *H. officinalis*, odnosno nema oficinalnih droga. U vezi sa navedenim i u konceptu racionalne fitoterapije, farmakognosijska ispitivanja herbe izopa predstavljaju neophodan korak ka racionalnoj primjeni ove biljne droge koja se koristi u tradicionalnoj medicini mnogih naroda.

SADRŽAJ 1. UVOD

6

| | |
|--|--------------------------------------|
| | 1 1.1. |
| Familija Lamiaceae - Usnatice | 1 1.2. Rod <i>Hyssopus</i> L. |
| | 2 1.3 |

| | | |
|---------------------------------------|---|--|
| . <i>Hyssopus officinalis</i> L. | 3 1.4. Sekundarni metaboliti familije usnatice (Lamiaceae) i glavni biosintetski putevi | 7 1.5. Sekundarni metaboliti <i>H. officinalis</i> |
| | 14 1.6. Farmakološka aktivnost <i>H. officinalis</i> | |
| | 21 1.7. Istraživanja vrste <i>H. officinalis</i> u Crnoj Gori | |
| | 29 1.8. Tradicionalna primjena <i>H. officinalis</i> | 30 |

| | | | |
|--|----|---|----|
| 1.9. Savremena primjena H. officinalis | 31 | 1.10. Oficinalne droge H. officinalis | 31 |
| 3.2. CILJEVI I HIPOTEZE | 33 | | |

| | | |
|--|----|--|
| 3. MATERIJALI I METODE | 34 | 3.1. Biljni materijal 6 |
| 3.2. Makroskopska i mikroskopska analiza | 34 | |

| | | | |
|---|----|--|----|
| herbe izopa | 36 | 3.3. Izolacija etarskog ulja | 36 |
| 3.4. Postupak pripreme metanolnih ekstrakata | 37 | 3.5. GC-MS analiza etarskih ulja | 37 |
| 3.6. LC-DAD-MS analiza ekstrakata | 38 | 3.7. Ukupni fenoli | 39 |
| 3.8. Antioksidativna aktivnost ekstrakata herbe izopa | 41 | 3.8.1. DPPH test | 42 |
| 3.8.2. FRAP test | 43 | 3.9. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa | 45 |
| 3.10. Ispitivanje genotoksične i antigenotoksične aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa | 47 | 3.10.1. Ispitivanje genotoksične aktivnosti | 47 |
| 3.10.2. Ispitivanje antigenotoksične aktivnosti | 47 | 3.10.3. Komet test | 48 |
| 3.11. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata herbe izopa | 49 | 3.11.1. Čelijske linije i kulture | 49 |
| 3.11.2. Priprema ekstrakata za analizu | 50 | 3.11.3. MTT test | 50 |
| 3.11.4. Parametri citotoksičnosti | 51 | 3.12. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa | 52 |
| 3.12.1. In vitro ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa (test inhibicije enzimske aktivnosti ciklooksigenaze-1 i 2) | 52 | 3.12.2. In vivo ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa | 53 |
| 3.12.3. In silico - studije molekularnog dokinga | 54 | 3.13. Statistička analiza | 56 |

| | | |
|---|----|---|
| 4. REZULTATI I DISKUSIJA | 58 | 4.1. Rezultati 6 |
| preliminarne makroskopske i mikroskopske analize | | |

| | | | | | |
|--|----|--|----|--|----|
| herbe izopa | 58 | 4.2. GC-MS analiza etarskih ulja | 65 | 4.3. Hemijska analiza metanolnih ekstrakata i sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka | 75 |
| 4.4. Antioksidativna aktivnost | 80 | 4.5. Antimikrobna aktivnost | 83 | 4.6. Genotoksična i antigenotoksična aktivnost | |

| | | |
|---|--|---|
| 88 | 4.6.1. Genotoksična aktivnost | 88 |
| 4.6.2. Antigenotoksična aktivnost | 88 | 4.7. Citotoksična aktivnost |
| 92 | 4.8. Antiinflamatorna aktivnost..... | 108 |
| 108 | 4.8.1. Efekti metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa na aktivnost enzima COX- 1 i COX-2 | 109 |
| 109 | 4.8.2. Rezultati in vivo ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa na modelu karagenanom izazvane inflamacije šape pacova | 113 |
| 113 | 4.8.3. Rezultati studije molekularnog dokinga | 116 |
| ZAKLJUČAK | 120 | LITERATURA |
| | 123 | BIOGRAFIJA |
| | 138 | 1. UVOD 1.1. Familija Lamiaceae – Usnatice Familija |

usnatica, Lamiaceae (Labiatae), kao jedna od najraznovrsnijih i najbrojnijih familija, rasprostranjena je širom svijeta, sa oko 240 rodova i preko 7200 vrsta, dominantno u oblastima sa tropskom i umjerenom klimom [1,2]. U flori Balkanskog poluostrva, zastupljeno je oko 370 vrsta [3]; u flori Crne Gore oko 150 vrsta i podvrsta iz ove familije [4,5] i približno isto toliko u flori Srbije [2]. U familiju usnatica spadaju jednogodišnje i višegodišnje biljke, raznovrsnih formi (zeljaste biljke, žbunovi, rjeđe drveće), pri čemu su najzastupljenije višegodišnje zeljaste biljke i žbunovi [2,6]. Stablo je četvrtasto; listovi su obično prosti, naspramni; cvjetovi su zigomorfni, najčešće dvopolni i uglavnom grupisani u cimozne, dihazijalne cvasti, sakupljene u pršljenove, koji mogu biti razmaknuti ili sabijeni, pa grade glavičaste ili klasolike agregate [2,7]. Cvjetni omotač (perijant) je simpetalan i petočlan; krunica je zigomorfna, simpetalna, dvousnata (gornja usna ima dva, a donja tri režnja), po čemu je ova familija i dobila ime. Andreceum čine 4 ili rjeđe 2 prašnika,

dok je gineceum sinkarpan , sa **dva oplodna listića. Plod je merikarpijum** i raspada **se na 4** 61
orašice

[2,7]. Većina predstavnika ove familije su aromatične biljke, zbog prisustva etarskog ulja koje se proizvodi u žljezdanim dlakama. Primjenu nalaze u prehrambenoj, kozmetičkoj industriji, industriji parfema, kao dekorativne vrste [2], a ono što je značajno sa aspekta farmacije i farmakognoze, jeste njihova primjena kao ljekovitih sirovina, gdje takođe zauzimaju značajnu poziciju. Kada je u pitanju morfologija i hemijski sastav vrsta unutar familije Lamiaceae, ali i hemijski sastav u okviru jedne vrste, karakteriše ih velika raznolikost, što je važno i sa teorijskog, ali i praktičnog aspekta. Varijabilnost u sastavu etarskog ulja može npr. promijeniti gastronomsku vrijednost začina, ali i modifikovati farmakološke efekte biljke u slučaju medicinske upotrebe. Iz tog razloga kompleksna istraživanja sastava i farmakološke studije aktivnih sastojaka predstavnika familije usnatica sve više dobijaju na važnosti [8]. 1.2. Rod *Hyssopus* L. Rod *Hyssopus* L. (Lamiaceae) obuhvata 13 prihvaćenih biljnih vrsta, sa rasprostranjenjem prvenstveno u umjerenom klimatskom pojasu Evroazije, od Sredozemlja, preko srednje Azije do Mongolije (Slika 1.1.) [9]. Slika 1.1. Rasprostranjenost vrsta roda *Hyssopus* L. Preuzeto iz: Anon. *Hyssopus* L. in GBIF Secretariat (2019) [9]. Rod obuhvata aromatične višegodišnje zeljaste biljke ili polugrmove. Vrste se uglavnom gaje, ali se mogu naći i u divljini [8]. Listovi su lancetasti; cvjetovi na vrhu grana grade jednostrane prividne klasove. Cvjetovi su modri ili crvenkasti (vrlo rijetko bijeli) [6]. Čašica je cjevasto-zvonastog oblika, sa 5 približno jednakih zubaca i 15 nerava, gola sa

unutrašnje strane. Krunica je karakteristično dvousnata (gornja usna ravna, na vrhu usječena, donja trorežnjevita (srednji režanj dijeljen u dva manja)); krunična cijev prava. Četiri didinamična prašnika, vire izvan krunice. Plodići su jajasto trouglasti [3]. Rod je u Crnoj Gori i Srbiji monotipski – javlja se samo jedna vrsta *Hyssopus officinalis* L. i to subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (sin. subsp. *pilifer* (Gris. ex Pant.) Murb.). Vrsta je rasprostranjena prije svega u mediteranskoj oblasti, a nalazišta u Srbiji predstavljaju jednu od najsjevernijih tačaka njenog areala [3]. 1.3. *Hyssopus officinalis* L. *Hyssopus officinalis* L. (narodna imena: izop, isop, ižop, hisop, miloduh, milodun, blagovanj, glagoran, crkvinjak, osipant, sipan, šipant, šatrajka, pravi vrisak, mindrak, veljen, veljenduh, vusak, vuzak; (hyssope (

fr.), ysop (njem.), issopo (ital.), hisopo (špan.), jufa (sansk./ind.), az-zufa (arap.), zufa (pers

58

)) [9-15] je porijeklom iz južne Evrope, Srednjeg Istoka i regiona koji okružuje Kaspijsko more [9]. Od davnina je poznat kao ljekovita, začinska biljka, prijatnog mirisa [13]. Grčka riječ *hyssopos* potiče od hebrejske riječi *ezob*, što znači sveta biljka, jer je korišćen za pročišćavanje hramova, kao i u ritualima čišćenja od lepre [14]. U Bibliji, u Starom zavjetu se navodi: "Pokropi me isopom i očistiću se; umij me i biću bjelji od snijega" – Psalm 51:7 [16]. Vjeruje se da bi ovi navodi mogli da se odnose na žalfiju, origano ili majoran, mada novija istraživanja sugerišu da bi upravo izop mogao biti biljka na koju se odnosi ovaj Biblijski stih, budući da je ustanovljeno da na njegovim listovima može da raste gljiva koja proizvodi penicilin. Ovim bi se mogla objasniti dobra antibiotska zaštita kod oboljelih od lepre koji su se kupali u izopu [14]. U Starom zavjetu, se izop pominje još na nekim mjestima npr.: Druga Knjiga Mojsijeva (12:22), Treća knjiga Mojsijeva – Čišćenje gube na ljudima i kućama (14:4, 6, 49, 51, 52), Četvrta knjiga Mojsijeva (19:6, 18), Prva knjiga o carevima – Solomunovi pristavi; njegova moć i mudrost (4:33): "Govorio je o drveću, od kedra na Livanu do isopa koji niče iz zida..." [16]. U Novom zavjetu, izop se pominje u poslanici Jevrejima sv. Apostola Pavla (9:19): "Jer kad Mojsije izgovori sve zapovijesti po zakonu svemu narodu, onda uze krvi jarčije i teleće, s vodom i vodom crvenom i isopom, te pokropi i knjigu i sav narod" [16]. M. Grieve u knjizi *A Modern Herbal*, piše o izopu, kao sredstvu koje pomaže kod slabosti želuca. Izopovo vino, nazvano *hyssopites*, pominje se od strane Plinija Starijeg u prvom vijeku nove ere. Benediktinski monasi su koristili herbu izopa u likerima, u desetom vijeku [14]. Izop (Slika 1.2.) je višegodišnja biljka (polužbun), sa vretenastim, višeglavim i veoma razgranatim korijenom drvenastog vrata. Stabljike su brojne (visine 20 do 60 (80) cm), razgranate, uspravne ili polegle pa se uzdižu, pri zemlji odrvenjele, sa mrkom korom, a iznad zeljaste. Izdanak je blijedo-zelenkast, pokriven kratkim somotastim dlakama, sa mnogobrojnim utisnutim žljezdama i karakteristično prijatno miriše. Listovi su naspramni, sjajni, čvrsti, kožasti, tamnozeleni, cijelih ivica, linearno-kopljasti. Dužina listova je oko 1-3 (4) cm, širina 2-8 (10) mm. Na obje strane lista su gusto utisnute žljezdane dlake sa etarskim uljem. Bazalni listovi mogu biti sa kratkom lisnom drškom, gornji su sjedeći. Cvjetovi se grupišu, obično po 3 do 9 u pazuhu listova, u gornjem dijelu stabljike, formirajući duguljaste klasolike cvasti (Slika 1.2.), orjentisane na jednu stranu. Čašica je cjevasta (3-5 mm), manje- više gusto pokrivena dlakama, obično ljubičasta, sa 15 nerava i 5 gotovo identičnih čašičnih zubaca. Krunica je tamnoplava, rjeđe ružičasta ili bijela, dvousnata. Gornja usna je kratka, urezana na vrhu oboda, spolja pokrivena kratkim dlakama, donja usna je duža, sa tri režnja i širokim, urezanim i nazubljenim srednjim režnjem. Prašnika ima 4, od kojih su dva duža, a svi vire iz čašice za 3-4 mm. Režnjevi žiga su jednaki, dok stubić nadrasta prašnike. Plod je tamna ili crno-smeđa orašica, izduženo-jajastog oblika, zašiljena na vrhu, veličine 2-2.5 mm [3,13]. Slika 1.2. *H. officinalis* L. U okviru vrste *H. officinalis* L. prepoznato je pet podvrsta:

subsp. canescens (DC.) Nyman; subsp. montanus (Jord. & Fourr.) Briq.; subsp

74

. aristatus (Godr.) Nyman; subsp. officinalis i subsp. austro-oranensis Maire [9]. Izop raste na suvom, kamenitom, krečnjačkom tlu. Generalno nije zahtjevan kada su u pitanju uslovi za rast, dobro podnosi zimu i mrazeve, kao i sušu ljeti; međutim preferira dobro osvijetljena područja, suvo, rastresito zemljište, na kom nema konkurencije drugih vrsta [3,13]. Cvjeta od sredine ljeta do oktobra, prijatnog je mirisa.

Kao droga se koristi nadzemni dio biljke u cvijetu (herba). U narodu se

72

cvjetne gančice izopa nazivaju i "sveta jevrejska trava". Izop je medonosna, začinska i ljekovita biljka, a koristi se i u dekorativne svrhe [2,11,12]. Najviše je rasprostranjen u mediteranskim zemljama do Centralne Azije. Samoniklo raste i u Americi, kao i u Indiji na Himalajima (od Kašmira do Kumaona) (Slika 1.3.). U srednjoj i južnoj Evropi se dosta i gaji. Na jednom mjestu može da se gaji preko deset godina. Žetva se obavlja u fazi punog cvjetanja, jer je tada sadržaj etarskog ulja najveći. Ručno ili mašinski se kosi cijela stabljika, na oko 10 cm iznad zemlje. Sušenje se odvija vještačkim putem u sušnicama ili prirodnim, po šupama, tavanima, koševima ili drugim mjestima bez prisustva sunca [13,14,17]. Slika 1.3. Rasprostranjenost vrste *Hyssopus officinalis* L. Preuzeto iz: Anon. *Hyssopus* L. in GBIF Secretariat (2019) [9]. U Crnoj Gori, kao i u Srbiji se samoniklo javlja samo subsp. *aristatus*, čiji je izdanak go. Listovi u gornjem dijelu stabljika i brakteje se završavaju osastim šiljkom (dužine 2 do 3 mm). Cvjetovi su grupisani u pazuhu listova u prividne pršljenove, a svi zajedno grade rastresite, prividne klasove na vrhu. Pricvjetni listovi su manje više dugački kao i čašica [3]. Rasprostranjenost navedene podvrste u svijetu je prikazana na Slici 1.4. Slika 1.4. Rasprostranjenost *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (sin. subsp. *pilifer* (Gris. ex Pant.) Murb.) Preuzeto iz: Anon. *Hyssopus* L. in GBIF Secretariat (2019) [9]. Prema literaturnim podacima u Crnoj Gori je registrovan na sljedećim lokalitetima: "Ad Vučje Gornje pr. Gvožd Han sub monte Vojnik; inter Tušina et Bijela distr. Drobunjaci; Krivača, Radoljev vrh et Bjelice pr. Njeguši; Kokoti distr. Lješanska nahija; Goransko et Šarišnik supra coenob. Piva, Borkovići distr. Piva; Jasenovo polje sub monte Vojnik" [4]. U Srbiji se nalazi u jugoistočnom dijelu zemlje (Sičevačka klisura, Basara, Sarlak, Belava, Stol, Rakoš, Kamenica, Matejevci, Suva planina). Može da se javi i kao podivljala, od gajenih vrsta u nekim djelovima zemlje, npr. Deliblatska peščara [3]. Prema Pravilniku

o bližem načinu i uslovima sakupljanja, korišćenja i prometa nezaštićenih divljih vrsta, životinja, biljaka i gljiva koje se koriste u komercijalne svrhe

17

(„Službeni list CG” broj 51/08), izop u Crnoj Gori spada u nezaštićene biljne vrste [18]. Kada je u pitanju Srbija,

prema Pravilniku o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva

49

(Sl. glasnik RS br. 5/2010, 47/2011, 32/2016 i 98/2016

; Prilog II), spada u zaštićene divlje biljne vrste [19]. 1.4. Sekundarni metaboliti familije usnatice (Lamiaceae) i glavni biosintetski putevi U okviru familije Lamiaceae je veliki broj vrsta, koje se koriste kao ljekovite u tradicionalnoj medicini naroda širom svijeta, kod različitih poremećaja/bolesti. Sve ovo zahvaljujući posebnoj, složenoj mješavini biološki aktivnih jedinjenja (sekundarnih metabolita), pri čemu svako jedinjenje doprinosi ukupnoj aktivnosti određene vrste. Glavni sekundarni metaboliti koji doprinose biološkoj aktivnosti i u krajnjem primjeni mnogih vrsta iz ove familije u ljekovite svrhe su fenolna jedinjenja, u prvom redu flavonoidi i fenolkarboksilne (fenolne) kisjeline, kao i isparljivi sastojci (etarska ulja). Mnogi autori daju podatke o antioksidativnim, antimikrobnim i antiinflamatornim svojstvima, tj. aktivnostima Lamiaceae vrsta, koje uglavnom potiču od navedenih grupa sekundarnih metabolita [20]. Fenolkarboksilne (fenolne) kisjeline, su fenolna biljna jedinjenja; derivati benzoee (C6-C1) ili cimetine kisjeline (C6-C3) (Slika 1.5.) [21]. Slika 1.5. Fenolne kisjeline (struktura benzoee, cimetine kisjeline i njihovih derivata). Preuzeto i prilagođeno iz: Marchiosi i sar. (2020) [22]. Osnovni biosintetski put u kojem nastaju biljna fenolna jedinjenja, pa samim tim i fenolne kisjeline je put šikiminske kisjeline, koji je zastupljen još i kod bakterija i gljiva. Malonatni biosintetski put je važan izvor fenolnih jedinjenja kod gljiva i bakterija, ali kod viših biljaka je manje značajan. Šikimatni put započinje spajanjem fosfoenolpiruvata iz glikolitičkog puta i D-eritroza 4-fosfata (iz puta pentozna fosfata) i nastavlja se nizom od sedam enzimskih koraka preko šikimata ka horizmatu, koji je zajednički prekursor za aromatične aminokisjeline (fenilalanin, tirozin i triptofan) koje nastaju u šikimatnom biosintetskom putu [22]. Većina jednostavnih fenola nastaje od aminokisjeline fenilalanina. Fenilalanin i tirozin predstavljaju osnovu za C6-C3 fenilpropanske jedinice (fenilpropanoidni put), koje se nalaze u mnogim biljnim jedinjenjima (kod cimernih kisjelina, između ostalog, ali i npr. kod kumarina, lignana i flavonoida). Fenilpropanoidni put započinje tako što enzim fenilalanin amonijum-liaza (PAL) katalizuje dezaminaciju fenilalanina da bi se formirala trans-cimetna kisjeline (Slika 1.6.). U sledećem koraku, t-cimetna kisjeline se hidroksiluje na C4 položaju aromatičnog prstena dejstvom cinamat 4-hidroksilaze (C4H), formirajući p-kumarnu kisjelinu. Alternativno, kod trava, p-kumarna kisjeline se takođe može formirati iz tirozina dejstvom enzima tirozin amonijum-liaze (TAL), zaobilazeći reakciju koju katalizuje C4H. Ostale cimetine kisjeline nastaju daljnim reakcijama hidroksilacije i metilacije [22,23]. Slika 1.6. Biosinteza fenil-propanskih (cimernih kisjelina); E1-fenilalanin amonijum-liaza (PAL); E2-tirozin amonijum-liaza (TAL); E3-

cinamat 4-hidroksilaza (C4H); E4- p-kumarat 3-hidroksilaza ; E5- kafena kisjeline O-
metiltransferaza

35

; nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH); S-adenozilmetionin (SAM). Preuzeto i prilagođeno iz: Dewick (2009) [23]. Derivati benzoee kisjeline, mogu nastati direktno u šikimatnom putu ili cijepanjem derivata cimetine kisjeline [23]. Najzastupljenije fenolne kisjeline u familiji Lamiaceae su kafena i rozmarinska kisjeline, a od značajna je i hlorogenska kisjeline [20]. Fenolne kisjeline se mogu naći u različitim organima biljke (slobodne ili konjugovane), a osnovna uloga im je

zaštitna, budući da štite biljku od različitih stresora, kao 8 što su patogeni, povrede i štetan uticaj hemikalija iz okruženja (ozon, sumpordioksid i sl.) [21]. Fenolne kisjeline i

njihovi heterozidi su rastvorne **u polarnim rastvaračima i slabo baznim rastvorima**

15

[24].

Flavonoidi su najveća grupa biljnih **fenolnih jedinjenja, sa zajedničkom** karakterističnom dvoprstenom **strukturuom** i mostom **od**

32

tri C atoma između (C6-C3-C6). U biljci se nalaze slobodni ili u obliku heterozida, u različitim količinama, u zavisnosti od vrste, dijela biljke, stadijuma razvoja i uslova rasta. Heterozidi su rastvorni u vodi i polarnim rastvaračima (nalaze se rastvoreni u vakuolama biljnih ćelija), dok su aglikoni nepolarni i kao takvi rastvorni u nepolarnim rastvaračima (mogu da se jave kao praškasta prevlaka na površini listova i cvjetova). Ovakav raspored doprinosi zaštiti biljke od UV zračenja. Pored ove uloge, imaju i brojne druge (npr. u rastu i razvoju biljke, kao dio enzimskih sistema učestvuju u metaboličkim procesima; zaštitna uloga od brojnih fitopatogena, oksidativnog stresa; nazivaju se i biljnim pigmentima, jer daju boju cvjetovima, listovima, plodovima, ali i sjemenima, privlačeći na taj način oprašivače i raspršivače sjemena) [24,25,26]. Glavne podrupe flavonoidnih jedinjenja su (ako se posmatra struktura C-3 mosta): - flavonoidi u užem smislu: ? derivati hromona (benzo- γ -pirona): flavoni (žuti) i flavonoli (bezbojni do blijedožuti pigmenti); flavanoni (dihydroflavoni) i flavanonoli (dihidriflavonoli), koji su bezbojni; ? derivati 3-fenil hromona: izoflavonoidi - flavonoidi u širem smislu: flavan-3-oli (katehini) i flavan-3,4-dioli (leukoantocijanidini), koji su bezbojni, antocijanidini (crveni do ljubičasti pigmenti), halkoni (intenzivno žuto obojeni), auron i proantocijanidini ili kondenzovani tanini (Slika 1.7.) [24,25,26]. Slika 1.7. Primjeri glavnih podgrupa flavonoidnih jedinjenja. Preuzeto i prilagođeno iz: Falcone Ferreyra i sar. (2012) [25]. Možemo reći da su flavonoidi proizvod mješovitog biosintetskog puta (šikimatno- acetatnog). Naime, para-kumaroil-koenzim A (p-kumaroil-CoA, sin. 4-kumaroil-CoA), koji je derivat cimetne kisjeline, nastao u fenilpropanoidnom biosintetskom putu (kom prethodi šikimatni put), se uključuje u acetatni (poliketidni) biosintetski put i produžava u reakciji sa tri molekula malonil-CoA, koji služe kao kondenzacione jedinice. Biosintezu flavonoida katalizuje enzim halkonat sintaza (CHS) i nastaje žuto obojeno jedinjenje, halkon. U većini biljnih vrsta, halkoni nijesu krajnji proizvodi i put se nastavlja kroz nekoliko enzimskih koraka, do drugih klasa flavonoida (Slika 1.8.) [26,27]. Slika 1.8. Biosinteza flavonoida (pojednostavljeni šematski prikaz sa glavnim enzimima). Preuzeto i prilagođeno iz: Weston i Mathesius (2013) [27]. Etarska ulja su lako isparljive, mirisne, uljaste tečnosti, bezbojne, žućkaste do žutozelene boje ili rijetko specifično obojene, koje proizvode aromatične biljke. Mogu se naći u različitim djelovima biljke, endogeno (npr. sekretorne šupljine, kanali...) ili egzogeno (žljezdane dlake), kao kod članova porodice Lamiaceae. Sastav etarskog ulja kod iste biljke, u različitim djelovima, može biti sličan, ali se može i značajno razlikovati [21,24]. Etarska ulja imaju brojne funkcije u biljci: zaštita od patogena, biljojeda, uloga u signalizaciji među biljkama, olakšavanju rasijavanja sjemena i oprašivanja, uloga u termoregulaciji... [28]. Generalno, sastojci etarskih ulja mogu biti derivati izoprenoida (terpenoida/terpena), derivati masnih kisjeline i fenolnih jedinjenja (Slika 1.9.) [28]. Slika 1.9. Biosintetski putevi u

kojima nastaju glavna isparljiva jedinjenja u biljkama. Preuzeto i prilagođeno iz: Rehman i sar. (2016) [28]. Etarska ulja su izuzetno složenog sastava, zbog prisustva velikog broja različitih hemijskih supstanci, međutim možemo reći da su glavne grupe jedinjenja: monoterpeni, seskviterpeni i u manjem procentu fenilpropanoidi [28]. U pitanju su različiti ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, epoksidi, fenoli. Etarska ulja mogu da sadrže i do 200 različitih komponenti, pri čemu su neke prisutne u većem procentu u odnosu na druge (20- 95%) i označene su kao glavne [24]. Osnovna struktura izoprenoida je građena od ostataka 2-metilbutana, koji se obično nazivaju izoprenske jedinice (2-metilbutadien) (C5) n (Slika 1.10.). Slika 1.10. Osnovna strukturna jedinica izoprenoida (izopren). Preuzeto iz: Rehman i sar. (2016) [28]. Podjela terpenoida, prema broju izoprenskih – C5 jedinica je data na Slici 1.11. Slika 1.11. Klasifikacija terpenoida. Preuzeto iz: Rehman i sar. (2016) [28]. Aktivna C5 izoprenska jedinica, izopentenil pirofosfat (IPP) i njegov izomer dimetilalil pirofosfat (DMAPP) su univerzalni prekursori svih terpenoida. Biosinteza terpenoida se uglavnom dešava dodavanjem IPP-a izomeru DMAPP (glava-rep vezivanje), što rezultira stvaranjem geranil difosfata (sin. geranil pirofosfat, GPP). Naime, enzim prenil difosfat sintaza (prenal transferaza) u određenom dijelu biljne ćelije (citosol ili plastid) omogućava kondenzaciju IPP i DMAPP prekursora koji dalje formiraju prenil difosfat, koji je supstrat za terpenske sintaze (TPS). TPS je ogromna grupa enzima, koji katalizuju stvaranje finalnih terpenoidnih proizvoda [28]. Šematski uprošćena biosinteza terpenoida je prikazana na Slici 1.12. Slika 1.12. Sinteza različitih klasa terpenoida u biljci. Preuzeto i prilagođeno iz: Rehman i sar. (2016) [28]. Izopentenil pirofosfat (IPP) i dimetilalil pirofosfat (DMAPP) nastaju iz dva nezavisna biosintetska puta u biljkama: mevalonatni put (koji djeluje u citosolu i biosintetiše IPP iz acetil-koenzima A (CoA)) i plastidni, mevalonat nezavisni put (put 2-C-metil-D-eritritol-4- fosfata (MEP) ili put 1-deoksi-D-ksiluloza-5-fosfata (DKSP ili DOKSP)), koji dovodi do stvaranja IPP i DMAPP iz gliceraldehid-3-fosfata i piruvata (Slika 1.9.) [28]. Istraživanja su pokazala da se seskviterpeni i triterpeni sintetišu iz farnezil difosfata (FDP) uglavnom koristeći citosolni IPP kao prekursor, dok je plastidni IPP uglavnom prekursor za geranil difosfat (GDP) i geranil geranil difosfat (GGDP), od kojih dalje nastaju mono-, di- i tetraterpeni [28]. Etarska ulja, kao lipofilna se rastvaraju u nepolarnim, organskim rastvaračima. Nakon destilacije i izolacije etarskog ulja, nastali sporedni proizvod, vodeni destilat, predstavlja aromatičnu vodicu i u njoj se nalaze hidrosolubilni sastojci etarskog ulja (sa kiseoničnim funkcionalnim grupama, u prvom redu alkoholi i kisjeline) [24]. 1.5. Sekundarni metaboliti *H. officinalis* Dosadašnja istraživanja fitohemijskog profila izopa, su uglavnom bila fokusirana na vrstu *H. officinalis*; manji broj istraživanja je bio fokusiran na podvrste. Pored toga, istraživanja su se uglavnom bavila sastavom etarskog ulja, dok su ekstrakti izučavani u mnogo manjem obimu. Etarsko ulje je najvažniji i najčešće ispitivani proizvod izopa. U pitanju je bezbojna ili blijedo žućkasta do zelena tečnost, sa kamforastim, prijatnim mirisom i pikantnim ukusom. Dostupni literaturni podaci o samoniklom i gajenom izopu pokazuju da herba daje 0.3% – 1% etarskog ulja uglavnom sa izopinokamfonom kao dominantnim jedinjenjem, pri čemu su kvantitativno zastupljeni i pinokamfon, β -pinen, 1,8-cineol, pinokarvon, linalool, sabinen i metil eugenol (Slika 1.13.) [15,29,30]. Međutim, kada se sumiraju dosadašnji podaci u literaturi, treba napomenuti da su identifikovana i brojna druga jedinjenja (Tabela 1.1.) i dobijeni različiti hromatografski profili u zavisnosti od biljnog materijala koji je korišćen u ispitivanjima. Razlike u sastavu ulja (koje potiču od klimatskih uslova, porijekla biljnog materijala, podvrste ili sorte, stadijuma razvoja, tipa zemljišta, tehnologije obrade, metode ekstrakcije itd.) određuju njegova organoleptička i fiziološka svojstva, a time i mogućnosti primjene [15,31-37]. U literaturi se takođe navodi da je biljni materijal, u cilju dobijanja najvećeg prinosa etarskog ulja, kao i etarskog ulja najboljeg kvaliteta, preporučljivo sakupljati u periodu oko pete godine života biljke, u fazi punog cvjetanja. Sadržaj etarskog ulja je najveći u cvjetovima, nešto manji u listovima, a najmanji u stabljikama [8,38]. Nalaze se i podaci da razlike u sadržaju izopinokamfona i pinokamfona u etarskom ulju herbe izopa variraju

u zavisnosti od stadijuma rasta biljke, na način da pinokamfon preovladava u etarskom ulju biljke u vegetativnoj fazi i sadržaj se smanjuje sa rastom biljke, dok se sadržaj izopinokamfona povećava [39]. Takođe, navodi se da u fazi cvjetanja, dolazi do povećanja masenog udjela monoterpena za 18% i smanjenja sadržaja seskviterpena za 10% [38]. Pored etarskog ulja, herba izopa sadrži i flavonoide, fenolne kisjeline, tanine, diterpenske laktone (marubiin) i triterpenoidna jedinjenja kao što su ursolna i oleanolna kisjeline [15,32,40]. Kada su u pitanju flavonoidna jedinjenja, kvantitativno se prema nekim literaturnim podacima izdvajaju izokvercitrin i diosmin (Slika 1.14.), a karakterističan flavonoid (halkon) je i hisopin, koji se sastoji od hisopin aglikona (Slika 1.14.) i šećera ramnoze i glukoze [38,40,41]. U radu Srivastava i saradnika iz 2018. godine u kom je ispitivan samonikli izop iz Kašmira se navodi da je ukupan sadržaj flavonoida, u herbi (metanolni ekstrakt) oko 1.16% [42]; Hatipoglu i saradnici u radu iz 2013. godine, su ispitivali hloroformski, heksanski, metanolni i vodeni ekstrakt *Hyssopus officinalis* L. i prema njihovim rezultatima najveći ukupan sadržaj flavonoida je imao vodeni ekstrakt - 1.3% [43]. Prema navodima iz rada Vlase i saradnika iz 2014. godine, u kom je ispitivan etanolni ekstrakt gajenog izopa iz Italije, ukupni sadržaj flavonoida je bio 1.30±0.10 mg/g, izraženo kao rutin ekvivalent, a kao flavonoid sa najvećim sadržajem identifikovan je izokvercitrin (32.78±0.23µg/g) [40]. Kada su u pitanju fenolne kisjeline, kao kvantitativno dominantne u dostupnoj literaturi za herbu izopa, se navode ferulinska i kafena kisjeline, mada su zabilježene i druge, npr. protokatehinska, siringinska, p-hidroksibenzoeva, hlorogenska, rozmarinska (Slika 1.15.) [31,44]. U radu Srivastava i saradnika iz 2018. godine je pokazano da je sadržaj ferulinske kisjeline (0.034%), veći od sadržaja kafene kisjeline (0.0064%), a ukupan sadržaj fenolkarboksilnih kisjeline je bio 2.32% [42]. U Tabeli 1.1. je dat sumarni literaturni pregled jedinjenja identifikovanih u herbi izopa. Slika 1.13. Dominantna jedinjenja etarskog ulja herbe izopa. Strukture preuzete iz: Tahir i sar. (2018) i Southwell i sar. (2003) [45,46]. a) diosmin; struktura preuzeta iz: Li i Du (2018) [47] b) izokvercitrin; struktura preuzeta iz: Valentová i sar. (2014) [48] c) hisopin aglikon; struktura preuzeta iz: Karrer (1976) [49] Slika 1.14. Karakteristična flavonoidna jedinjenje herbe izopa: a) diosmin [47], b) izokvercitrin [48] i c) hisopin (aglikon) [49]. Slika 1.15. Strukture predstavnika fenolnih kisjeline prisutnih u herbi izopa, preuzete iz: Chaowuttikul i sar. (2020) i Zduńska i sar. (2018) [50,51].

Tabela 1.1. Literaturni pregled glavnih sastojaka herbe izopa - *Hyssopus officinalis* L. (gajeni i samonikli)

jedinjenje Zemlja porijekla biljnog materijala i sadržaj jedinjenja Etarsko ulje Dominantno jedinjenje (+) Biljni materijal i podatak o podvrsti (subsp.)/varijetetu (var.) - gdje je poznato Literatura izopinokamfon Turska – 57.27% + samonikli 52 Turska – 5.3% samonikli 53 Bugarska – 48.98-50.77% + komercijalni uzorak 30 Bugarska – 16.3% i 29.2% samonikli (subsp. aristatus) 44 Poljska - 44.77% + gajeni 54 Poljska – 37.13% + gajeni 39 Italija – 43.3% + samonikli 31 Italija – 29% gajeni (subsp. officinalis) 55 Srbija – 44.7% + gajeni 33 Srbija – 15.32% samonikli (subsp. aristatus) 31 Iran (Khalkhal) – 38.47% (list) i 40.25% (cvijet) + samonikli 56 Iran – 28.1% (list) i 27.49% (cvijet) gajeni 57 Indija (U.P. Himalaya) – 38.1% + samonikli 44 Indija – 9.7% gajeni (subsp. officinalis) 58 Litvanija - 33.6% + (u 2/6 lokaliteta) samonikli 59 Kosovo – 30.44-57.73% + samonikli (subsp. aristatus) 35 pinokamfon Indija – 49.1% + gajeni (subsp. officinalis) 58 Italija – 18.5% + gajeni (subsp. officinalis) 55 Poljska – 28.67% gajeni 39 Turska – 19.6% samonikli 53 Turska – 2.59% samonikli 52 Egipat – 19.2% gajeni 60 Kosovo – 14.76% samonikli (subsp. aristatus) 35 Iran (Khalkhal) – 13.32% (list) i 14.92% (cvijet) samonikli 56 Iran – 15.5% (list) i 19.34% (cvijet) gajeni 57 Srbija – 6.39% samonikli (subsp. aristatus) 31 Srbija – 14.1% gajeni 33 Bugarska – 5.78-5.94% komercijalni uzorak 30 β-pinen Iran – 31.2% (list) i 23.38% (cvijet) + gajeni 57 Egipat – 19.6% + gajeni 60 Srbija – 19.55% samonikli (subsp. aristatus) 31 Indija – 18.4% gajeni (subsp. officinalis) 58 Indija (U.P. Himalaya) – 10.2% samonikli 44 Španija – 16.82% gajeni 61 Kosovo – 12.66% samonikli (subsp. aristatus) 35 Bugarska – 11.4% i 39.6% samonikli (subsp. aristatus) 44 Bugarska – 13.38-13.54% komercijalni uzorak 30 Italija – 10.8% gajeni (subsp. officinalis) 55 Turska – 10.6% samonikli 53 Turska – 7.23% samonikli 52

Crna Gora – 9.6% samonikli (subsp. aristatus) 34 Poljska – 8.12% gajeni 39 Litvanija - 7-11.4% samonikli 59 pinokarvon Turska – 36.3% + samonikli 53 Turska – 6.49% samonikli 52 Litvanija - 21.1-28.1% + (u 4/6 lokaliteta) samonikli 59 Indija (U.P. Himalaya) – 20.3% samonikli 44 Iran (Khalkhal) – 5.34% (list) i 6.76% (cvijet); samonikli 56 1, 8 - cineol Španija – 52.89% + gajeni 61 Bugarska – 48.2% i 39.6% + samonikli (subsp. aristatus) 44 Srbija – 36.43% + samonikli (subsp. aristatus) 31 Francuska – 13.3% samonikli (var. decumbens) 62 Indija (U.P. Himalaya) – 12.2% samonikli 44 Turska – 7.2% samonikli 53 linalool Italija - 35.3-51.2% + samonikli (subsp. aristatus) 32 Italija – 7.9% gajeni (subsp. officinalis) 55 Francuska – 49.6% + samonikli (var. decumbens) 62 metil-eugenol Crna Gora – 38.3% + samonikli 34 Italija - 7.3-22.7% samonikli (subsp. aristatus) 32 sabinen Iran – 4.2 – 17.1% + gajeni 63 mirtenil acetat Iran – 74.08% + samonikli 64 kamfor Egipat – 16.3% gajeni 60 Bugarska – 12.5% gajeni 44 Iran – 6.76% samonikli 64 Iran – 3.47% samonikli 65 limonen Crna Gora – 37.4% samonikli 34 Francuska – 5.4% samonikli (var. decumbens) 62 Italija - 3.7-4.4% samonikli (subsp. aristatus) 32 germakren D Srbija – 5.7% gajeni 33 Litvanija - 3.7-5.5% samonikli 59 Poljska – 4.65% gajeni 39 Italija - 1.9-4.1% samonikli (subsp. aristatus) 32 kumin aldehid Iran – 3.22%; samonikli 65 β -bisabolol Iran – 16.62% samonikli 65 p-cimen Turska – 2.81% samonikli 52 n-dodekan Iran – 5.23% samonikli 65 n-dekan Iran (Khalkhal) – 8.67% (list) i 8.63% (cvijet) samonikli 56 hedikariol Litvanija - 4.1-4.8 % samonikli 59 orto-acetanisol Iran – 4.72% samonikli 65 β -kariofilen Francuska – 2.8% samonikli (var. decumbens) 62 Iran – 2.10% samonikli 64 β -felandren Bugarska – 4.44-5.17% komercijalni uzorak 30 kariofilen oksid Iran – 2.13% samonikli 64 α -pinen Francuska – 2.4% samonikli (var. decumbens) 62 elemol Poljska – 8.95% gajeni 39 Srbija – 5.6% gajeni 33 spatulenol Iran – 3.02% samonikli 64 cis-sabinol Iran – 1.75% samonikli 64 β -burbonen Iran – 1.47% samonikli 64 bornil-acetat Iran – 1.42% samonikli 64 (Z)- β -ocimen Italija - 5.1-5.8% samonikli (subsp. aristatus) 32 (E)- β -ocimen Italija - 2.1-5.3% samonikli (subsp. aristatus) 32 terpinen-4-ol Turska – 7.33% samonikli 52 Ostali sastojci identifikovani u etraskom ulju herbe izopa Literatura mirtenol metil etar 44 mirtena kisjelina 44 metil mirtenat 44 pinska kisjelina 44 pinonska kisjelina 44 kubeben 44 biciklogermakren 66 safrol 44 benzil benzoat 44 germakren B 44 Flavonoidi (Pod * navedeni dodatni dostupni podaci (tip ekstrakta, porijeklo biljnog materijala i sl.) Literatura kvercetin-

7-O- β -D - apiofuranozil-(**1 \rightarrow 2**)- **β -D** - ksilopiranozid kvercetin- **7-O- β -D** - apiofuranozil-(**1 \rightarrow 2**)- **47**
 β -D - ksilopiranozid **3'-O- β -D** - glukopiranozid **apigenin** -7- **O- β -D** - glukopiranozid **apigenin-**
7-O- β -D

- glukuronopiranozid metil estar

apigenin-7-O- β -D - glukuronopiranozid butil estar **luteolin-7-O- β -D** - glukopiranozid akacetin- **7-O** **67**

- α -L- ramnopiranozil-(1 \rightarrow 6)- β -D- glukopiranozid * Kina - etanolni ekstrakt; gajeni 67 apigenin-7-O- β -D-glukuronid * Kina - etanolni ekstrakt; gajeni 67 * Iran - vodenometanolni ekstrakt; samonikli 64 diosmin * Kina - etanolni ekstrakt; gajeni 67 * Španija - sredstvo za ekstrakciju - dimetil sulfoksid; gajeni 41 5,4'-dihidroksi-7,3'-dimetoksi flavanon / 44 katehin apigenin * Grčka - metanolni ekstrakt; gajeni i samonikli 68 hesperidin, kvercetin, izokvercitrin, rutin, hisopin, hrizoeriol / 8, 38, 40

Fenolkarboksilne kisjeline (Pod * navedeni dodatni dostupni podaci (tip ekstrakta, porijeklo biljnog materijala i sl.) Literatura hlorogenska *metanolni ekstrakt 68, 69 *deodorisani vodeni ekstrakt 31 *etanolni ekstrakt; Rumunija; gajeni * etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 40, 32 protokatehinska *metanolni ekstrakt 68, 69 ferulinska *metanolni ekstrakt 68, 69 *deodorisani vodeni ekstrakt 31 *etanolni ekstrakt; Rumunija; gajeni 40 siringinska *metanolni ekstrakt 68, 69 *deodorisani vodeni ekstrakt 31 *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 32 p-hidroksibenzoeva *metanolni ekstrakt 68, 69 kafena kisjelina *metanolni ekstrakt 68, 69 *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 32 vanilinska *metanolni ekstrakt 68, 69 p-kumarna *metanolni ekstrakt 68, 69 *etanolni ekstrakt; Rumunija; gajeni 40 rozmarinska *metanolni ekstrakt 68, 69 *deodorisani vodeni ekstrakt 31 *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 32 genistinska kisjelina *metanolni ekstrakt 68, 69 *etanolni ekstrakt; Rumunija; gajeni 40 kaftarna kisjelina *etanolni ekstrakt; Rumunija; gajeni 40 8-epiloganinska kisjelina *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 32 Ostali sastojci Literatura triterpeni - ursolna i oleanolna kisjelina *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. aristatus; samonikli 32 ugljeni hidrati / 38, 42 diterpenski lakton (marubiin) / 14 tanini / 42 alkaloidi / 42 vitamini (C, B2) / 38 kumarini (umbeliferon i skopoletin) / 38 pigmenti (karoten), smole / 38 1.6. Farmakološka aktivnost H. officinalis Antibakterijska i antigljivična aktivnost Antibakterijska i antigljivična aktivnost etarskog ulja samoniklog ili gajenog izopa u različitim regionima svijeta, najčešće je ispitivana aktivnost ovog prirodnog proizvoda. U Tabeli 1.2. je dat pregled literaturnih podataka u kojima je vršeno ispitivanje navedenih aktivnosti preparata herbe izopa i date minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), gdje je poznato. Tabela 1.2. Pregled literaturnih podataka o antibakterijskoj/antigljivičnoj aktivnosti preparata herbe izopa Podaci o ispitivanom biljnom materijalu/preparatu

Bakterije/Gljive Dodatne napomene Literatura * Hyssopus officinalis var. decumbens (Jordan and Fourr.) Briq. – samonikli G (+) bakterije - Enterococcus spp. i * Baktericidno dejstvo MIC između 0.15% i 0.6% v/v [70] * Porijeklo: Francuska (Banon) - Staphylococcus aureus G (-) bakterije MIC između 0.3% i 1.2% v/v * Etarsko ulje - Escherichia coli - Pseudomonas spp. - Proteus mirabilis - Klebsiella oxytoca - Salmonella spp. Gljive - Candida tropicalis - Candida krusei i - Candida albicans MIC između 0.15% i 0.3% v/v ***** Smatra se da su sastojci 1,8- cineol (12.3%) i linalool (57.1%) kojima je bogat H. officinalis var. decumbens, odgovorni za njegovu veću antimikrobnu aktivnost, u poređenju sa H. officinalis (Italija (Pijemont)), koji je ispitivan istovremeno, a da je limonen odgovoran za dobru antigljivičnu aktivnost pokazanu kod oba ulja. * Hyssopus officinalis subsp. aristatus – samonikli * Porijeklo: centralna Italija * Etarsko ulje, sa linaloolom (35.3% - 51.2%) i metil eugenolom (7.3 - 22.7%), kao glavnim sastojcima G (+) bakterije - Staphylococcus aureus G (-) bakterije - Escherichia coli Dijametar inhibicije rasta (mm): 8.1-10.5 * Nije bilo aktivnosti protiv Enterococcus faecalis Dijametar inhibicije rasta (mm): 7.5-10.3 * Nije bilo aktivnosti protiv Pseudomonas aeruginosa [32] Gljive Dijametar inhibicije rasta Candida albicans (mm): 9.4-10.2 * Hyssopus officinalis L. – samonikli * Porijeklo: Jugoistočna Anadolija (Turska) * Etarsko ulje (5 µL i 10 µL) sa izopinokamfonom (52.27%) kao glavnim sastojkom G (+) bakterije - Staphylococcus pyogenes - Staphylococcus aureus G (-) bakterije - Escherichia coli Gljive - Candida albicans Dijametar inhibicije rasta (mm) za 5 µL i 10 µL: - Staphylococcus pyogenes 5 µL: 19.0±0.1; 10µL: 23.6±0.5 - Staphylococcus aureus 5 µL: 18.0±1.7; 10µL: 21.7±1.5 [52] - Escherichia coli 5 µL: 20.3±1.8; 10µL: 23.3±1.7 * Nije bilo aktivnosti protiv Pseudomonas aeruginosa - Candida albicans 5 µL: 15.0±1.0; 10 µL: 20.0±1.1 * Hyssopus officinalis L. - gajeni G (+) bakterije - Bacillus cereus (MIC 1.562 µg/µL) [71] * Porijeklo: Iran G (-) bakterije - Pseudomonas aeruginosa (MIC 3.125 µg/µL) * Etanolni ekstrakt nadzemnih djelova, sa glavnim sastojcima metil benzoatom (15.78%) i izopinokamfonom (10.3%) - Serratia marcescens (MIC 6.25 µg/µL) Nije pokazao aktivnost na gljive Candida albicans

i *Aspergillus niger*. **Hyssopus officinalis* L. Porijeklo: Bugarska *Etarsko ulje izopa iz Bugarske (komercijalni uzorak) *

Dominantna jedinjenja u etarskom ulju: cis-pinokamfon (48.

98%-50.77%), β -pinen (13.38%-13.54%), trans-pinokamfon (5.78%-5.94%) i β -felandren (4.44%-5.17%)

48

%) -

Candida albicans* - *Candida glabrata* - *Candida tropicalis* - *Candida parapsilosis* - *Candida krusei

48

Antigljivična aktivnost protiv 52 klinička izolata i referentna soja kvasnica *Candida* spp. (MIC \pm SD, μ g/mL): (210.3 \pm 62.3) (768.0 \pm 280.4) (682.7 \pm 264.4) (298.7 \pm 104.5) (224.0 \pm 64.0) Kompleksan hemijski sastav i sinergija sastojaka kao što su cis- i trans-pinokamfon, α - i β -pinen. [30] Etarsko ulje - aktivno i protiv flukonazol osjetljivih i flukonazol rezistentnih izolata *Candida* spp. Mehanizam antigljivičnog dejstva etaskog ulja bi mogao da bude posljedica povećanja permeabiliteta ćelijske membrane gljive, kao i narušavanja normalnog membranskog transporta, djelujući na membransku ATP-azu. U radu Hamzah iz 2016., se navodi da je etarsko ulje i etanolni ekstrakt izopa pokazao antimikrobni efekat na *Pseudomonas aeruginosa* (dijametar inhibicije je bio oko 20.5 mm za etarsko ulje, odnosno 18.3 mm za ekstrakt, pri koncentraciji od 50 mg/mL; MIC vrijednosti - 2.5 mg/mL za etarsko ulje i 1.25 mg/mL za etanolni ekstrakt) [72]. Džamić i saradnici su 2013. ispitivali antigljivičnu aktivnost etarskog ulja i ekstrakata (deodorisani vodeni, metanolni i etil acetatni) *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. na nekoliko sojeva gljiva iz rodova *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, zatim na *Trichoderma viride* i *Candida albicans*. Pokazalo se da je *Aspergillus niger* najrezistentnija gljiva, dok su vrste *Cladosporium* bile najosjetljivije; ekstrakti su bili aktivniji od etarskog ulja, a najbolju aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) u ovom eksperimentu se kretala u opsegu od 4 do 10 mg/mL, a minimalna fungicidna koncentracija (MFC): 6–14 mg/mL [31]. Navode se podaci da je kompletna inhibicija gljive *Aspergillus niger* postignuta pri koncentraciji etarskog ulja od 0.5 do 1.5% v/v [44]. Takođe, postoje i podaci o antigljivičnom djelovanju etarskog ulja izopa na neke fitopatogene gljive, kao i 23 gljivu *Penicillium verucosum*, koja se javlja na siru, što ima značaja u prehrambenoj industriji, kako bi se očuvala i unaprijedila organoleptična svojstva hrane [15,73]. Dostupni podaci o antimikrobnoj aktivnosti su različiti i zavise od brojnih faktora, koji u krajnjem utiču na sastav etarskog ulja/ekstrakta, kao što su podvrsta/varijetet biljke, stanište, metoda ekstrakcije i sl. U svakom slučaju, postoje osnove za dalja ispitivanja, kao što su potencijalni sinergistički efekti etarskog ulja sa antibioticima, o čemu nedostaju literaturni podaci. Antivirusna aktivnost Kada se govori o antimikrobnoj aktivnosti, postoje interesantni podaci o antivirusnoj aktivnosti preparata izopa, konkretno ekstrakata. Naime, u radu Kreis i saradnika iz 1990. godine, se navodi da su sirovi ekstrakti osušenih listova izopa, *H. officinalis* pokazali jaku anti-HIV aktivnost, koja je utvrđena mjerenjem inhibicije formiranja sincicijuma, HIV reverzne transkriptaze (RT) i inhibicije ekspresije p17 i p24 antigena, pri čemu nisu bili toksični za neinficirane Molt-3 ćelije. Etarski ekstrakti dobijeni direktnom ekstrakcijom (Postupak I), nakon uklanjanja tanina (Postupak II) ili iz ostatka nakon dijalize sirovog ekstrakta (Postupak III), pokazali su dobru antivirusnu aktivnost. Metanolni ekstrakti, dobijeni nakon ekstrakcije etrom, hloroformom i

hloroform etanolom, izvedeni iz procedure I ili II, takođe su pokazali veoma jaku anti-HIV aktivnost. Pored toga i rezidualni materijal, nakon ekstrakcije metanolom i dalje pokazuje jaku aktivnost. Kafena kisjelina je identifikovana pomoću HPLC i UV spektroskopije, u etarskom ekstraktu dobijenom u postupku I. U ovom radu je utvrđeno da ekstrakti izopa sadrže kafenu kiselinu, neidentifikovane tanine i eventualno treću klasu neidentifikovanih jedinjenja veće molekulske mase koja pokazuju jaku anti-HIV aktivnost, i mogu biti korisni u liječenju pacijenata sa AIDS-om [74]. U studiji koju su sproveli Gollapudi i saradnici 1995. godine, izolovan je polisaharid (MAR-10) iz vodenog ekstrakta *H. officinalis* i ispitan je na aktivnost protiv HIV-1 (soj SF) u HUT78 T ćelijskoj liniji i primarnim kulturama mononuklearnih ćelija periferne krvi. Oni su pokazali da MAR-10 inhibira replikaciju HIV-1 na način zavisen od koncentracije, bez značajne direktne toksičnosti ili efekta na funkcije limfocita ili titar CD4+ i CD8+ T ćelija [75]. Antioksidativna aktivnost Prema dostupnim podacima, dobru antioksidativnu aktivnost su pokazala flavonoidna jedinjenja (apigenin, kvercetin, luteolin, akacetin i njihovi derivati, kao i diosmin) [14]. Od fenolnih kisjelina, značajne su galna i kafena kisjelina [76]. Ebrahimzadeh i saradnici (2010) su u radu koristili šest različitih in vitro metoda za procjenu antioksidativnih aktivnosti i sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala metanolnog ekstrakta iz nadzemnih djelova *H. officinalis* var. *angustifolius* zajedno sa još tri biljke. Pokazana je snažna do umjerena antioksidativna aktivnost ekstrakta izopa u testovima redukcione moći, DPPH testovima i Fe (II) helatnim testovima [77]. Etanolni ekstrakt *H. officinalis* pokazao je dobro antioksidativno djelovanje u sljedećim testovima - antioksidativni kapacitet Trolox ekvivalenta (eng. The Trolox equivalent antioxidant capacity, TEAC), elektronska paramagnetna rezonanca (EPR), DPPH i test inhibicije aktivnosti hemoglobin-askorbat peroksidaze [40]. Citotoksična aktivnost U radu Venditti i saradnika iz 2015. godine, se navodi da je etarsko ulje *H. officinalis* subsp. *aristatus* testirano na humane tumorske ćelijske linije korišćenjem MTT testa. Humane tumorske ćelijske linije (A375 - melanoma; MDA-MB 231 - adenocarcinoma dojke i HCT116 - karcinoma kolona), su tretirane rastućim koncentracijama etarskog ulja izopa u toku 72h. U zaključku se navodi da etarsko ulje pokazuje umjerenu citotoksičnu aktivnost prema testiranim ćelijskim linijama, kao i da je ona dozno zavisna, u opsegu koncentracija od 0.78-200 µg/mL. IC50 vrijednosti etarskog ulja su bile redom 35.16, 62.66 i 29.91 µg/mL na ćelijskim linijama A375, MDA-MB 231 i HCT116 [32]. Dominantna jedinjenja u navedenom, ispitivanom etarskom ulju su bila linalool i metil-eugenol. Prema ranijim istraživanjima, jedinjenje linalool, pokazalo je umjerene inhibitorne efekte na ćelijske linije kancera - T-47D dojke (IC50, 224 µM), SW 620 kolorektuma (IC50, 222 µM) i HepG2 jetre (IC50, 290 µM) [78]. Metil eugenol

je pokazao aktivnost u MTT testu na ćelijske linije : HL- 60 **humane**

29

promijelocitne leukemije (IC50, 76.5 µM) i U-937 humanog histocitnog limfoma (IC50, 89.3 µM) [79]. Veća citotoksična aktivnost etarskog ulja u poređenju sa najdominantnijim komponentama može biti rezultat njihovog sinergizma ili sinergizma sa drugim manjim komponentama [32]. Podaci o citotoksičnoj aktivnosti preparata herbe izopa, a naročito ekstrakata su oskudni. 25 Antiinflamatorna i imunomodulatorna aktivnost U radu Wang i sar. (2011) se navodi da vodeni ekstrakt herbe izopa djeluje kao potencijalni regulator diferencijacije T pomoćnih ćelija (Th1, Th2 i Th17) na transkripcionom nivou, čime doprinosi antiupalnom djelovanju [80]. U radu Ma i sar. (2014), pokazano je da je u grupi astmatičnih miševa koja je tretirana suvim vodenim ekstraktom *H. officinalis*, nivo eozinofila u bronhoalveolarnoj tečnosti i nivo imunoglobulina IgG i IgE u serumu, bio sličan grupi zdravih životinja, za razliku od grupe tretirane deksametazonom, gdje je došlo do povećanja nivoa eozinofila u

bronhoalveolarnoj tečnosti i povećanja nivoa serumskog IgE, dok je nivo serumskog IgG smanjen, u poređenju sa grupom zdravih životinja. Navodi se da *H. officinalis* ne pokazuje samo antiinflamatornu aktivnost inhibirajući porast eozinofila i smanjujući nivo IgE, već utiče i na imunoregulaciju [81]. Sedativna i anksiolitička aktivnost U studiji Lim i sar. (2005) se navodi da inhalacija etarskog ulja izopa ima sedativne efekte na miševima u testu prinudnog plivanja, koji su prethodno bili vještački stimulirani intraperitonealnom injekcijom kofeina [82]. U zaključku studije Salehi (2017) se navodi da etarsko ulje *H. officinalis* (u dozi od 75 mg/kg) ima anksiolitički efekat i može da podstakne pamćenje i učenje kod miševa pod hroničnim stresom: značajno je smanjen nivo serumskog i moždanog malondialdehida, moždani i serumski antioksidativni kapacitet značajno je povećan, zabilježen je neznatno niži nivo kortikosterona u serumu [83]. Spazmolitička aktivnost Etarsko ulje izopa i izopinokamfon, u radu Lu i sar. (2002) inhibirali su kontrakciju ileuma zamorca indukovanu acetilholinom i barijum hloridom ($BaCl_2$) na način zavisen od koncentracije. Što se tiče inhibicije kontrakcije indukovane acetilholinom, vrijednost IC_{50} za etarsko ulje je iznosila 42.4 $\mu g/mL$, a 61.9 $\mu g/mL$ za izopinokamfon, dok su vrijednosti istog parametra inhibicije kontrakcije indukovane barijum hloridom iznosile 48.3 $\mu g/mL$ i 70.4 $\mu g/mL$ za etarsko ulje i izopinokamfon, respektivno. Aktivnost limonena i β -pinena je bila neznatna. Bez obzira na to, sinergizam djelovanja različitih komponenata etarskog ulja ne može biti isključan. U radu se navodi da bi miorelaksantna aktivnost indukovana etarskim 26 uljem izopa mogla da potiče od njegove interakcije sa plazma membranom i naknadne izmjene jonskih kanala. S obzirom na neaktivnost β -pinena i limonena, sugerisano je da interakcija ne zavisi samo od lipofilnosti etarskog ulja i njegovih komponenti, već i od hemijske strukture komponenti etarskog ulja [84]. Antiulcerska aktivnost Predtretman albino pacova sa 100 mg/kg i 125 mg/kg etanolnog ekstrakta *H. officinalis*, 1 h prije primjene etanola, pokazao je dobar antioksidativni i antiulkusni potencijal, koji se detektovao smanjenim nivoom azotnog oksida, smanjenim generisanjem reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), poboljšanim integritetom želudačne sluznice i povećanom sekrecijom sluzi [85]. Ekstrakt *H. officinalis* obogaćen polifenolnim jedinjenjima (fenolne kiseline, tanini i flavonoidi) pokazao je značajnu inhibiciju (92.67%) ureaze dobijene iz zrna pasulja i nisku inhibiciju (19.6%) α -himotripsina, što ga čini potencijalnim lijekom za ulkusnu bolest [86]. Antiasmatična aktivnost Jedna od glavnih patoloških karakteristika astme jeste remodelovanje disajnih puteva. Glavni razlog fibroze i opstrukcije protoka vazduha može biti taloženje ekstracelularnog matriksa (ECM) u zidu disajnih puteva. Ekspresija tkivnog inhibitora metaloproteinaze 1 (TIMP-1) i matriks metaloproteinaze 9 (MMP-9), koji dovode do destrukcije plućnog ekstracelularnog matriksa, kod modela asmatičnih miševa, smanjila se nakon tretmana deksametazonom, kao i nakon tretmana vodenim ekstraktom *H. officinalis*, uz smanjenje patoloških promjena i proliferacije glatkih mišića, sekrecije sluzi i taloženja kolagena, što sve, u krajnjem podržava inhibiciju remodelovanja disajnih puteva [87]. Antidijabetična aktivnost Matsuura i sar. (2004) su procjenjivali inhibitorne aktivnosti vodeno-metanolnih ekstrakata osušenih listova *H. officinalis* prema α -glukozidazi, na eksperimentalnim miševima. Ekstrakt je pokazao inhibitornu aktivnost što je dalje vodilo ka izolaciji i identifikaciji jedinjenja koja doprinose ovakvom efektu. Dva izolovana jedinjenja su (

7S, 8S)-siringoilglicerol- **9-O-** (**6'-O** -cinamoil)- **β -d** -glukopiranozid i (**7S, 8S**)-
siringoilglicerol- **9-O- β -d**

50

-glukopiranozid [88]. U drugoj studiji, Miyazaki i sar. (2003) su procijenili inhibitorne efekte ekstrakta izopa na hiperglikemiju i apsorpciju ugljenih hidrata u crijevima kod miševa. Utvrdili su da ekstrakti izopa inhibiraju varenje složenih ugljenih hidrata, ali

ne apsorbabilnih monosaharida i mogu biti korisni suplementi kod hiperglikemije. Za vodeno metanolni ekstrakt osušenog izopa je potvrđeno da ima inhibitornu aktivnost prema α -glukozidazi. Prema rezultatima, prilikom primjene 0.5 i 1.0 mg/mL ekstrakta izopa, prekomjerno povećanje glukoze u krvi je inhibirano u roku od 120 minuta, što sugerira da bi izop mogao biti korisna dopunska hrana za inhibiciju postprandijalne hiperglikemije [89]. U skladu sa ovim rezultatima, patentiran je proizvod JP 2004256467 koji se bazira na izopu i njegovom inhibitornom dejstvu prema α -glukozidazi [90]. U studiji Loizzo i saradnika 2008. je pokazano da hloroformski ekstrakt *H. officinalis* djeluje inhibitorno prema enzimu α -glukozidazi, sa vrijednostima IC50 koje se kreću od 127.3 do 908.4 μ g/mL [91]. Antidijabetička aktivnost metanolnog ekstrakta *H. officinalis* je evaluirana određivanjem njegove sposobnosti inhibicije biološke aktivnosti enzima alfa amilaze. Inhibitorna aktivnost ekstrakta na α -amilazu je uočena u opsegu 0.1-0.5 mg/mL. IC50 metanolnog ekstrakta je 0.8366 mg/mL. Međutim, vrijednost IC50, referentnog jedinjenja, akarboze, je manja od 0.025 mg/mL [42]. Larvicidna aktivnost U radu Pavela (2004) se navodi da metanolni ekstrakt *Hyssopus officinalis* u koncentraciji od 10% (w/v), značajno inhibitorno utiče na indeks rasta larve moljca *Spodoptera littoralis* (afrički/egipatski pamučni crv) [92]. Etarsko ulje *H. officinalis* pokazalo je i aktivnost protiv larve komarca, *Culex quinquefasciatus*, vektora limfatične filarijaze [93]. Aktivnost protiv lajšmanioze U radu Tabatabaie i saradnika iz 2014. se navodi da je alkoholni ekstrakt izopa bio efikasan protiv parazita *Leishmania major* in vitro [94]. Antiholinesterazna i antidementivna aktivnost Metanolni i heksanski ekstrakti dvanaest biljaka, uključujući *H. officinalis*, koji se koriste u tradicionalnoj evropskoj medicini za liječenje različitih poremećaja centralnog nervnog sistema, testirani su za simptomatsko liječenje Alchajmerove bolesti. Pošto se terapija ranih i umjerenih stadijuma Alchajmerove bolesti uglavnom zasniva na inhibitorima holinesteraze, ispitivani su inhibitorni efekti biljnih ekstrakata na enzime acetilholinesterazu (AChE) i butirilholinesterazu (BuChE), korišćenjem Ellmanove kolorimetrijske metode. Na kraju, *H. officinalis* nije pokazao značajnu inhibitornu aktivnost - metanolni i heksanski ekstrakti su pokazali 5.2 ± 8.2 i 29.6 ± 2.3 AChE inhibicije (%) i 11.5 ± 0.5 i 23.2 ± 2.0 BuChE inhibicije (%) u koncentracijama od 100 mg/mL [95]. Antimelanogena aktivnost U radu Shin iz 2016. ispitivana su antimelanogena svojstva suvog etanolnog ekstrakta *Hyssopus officinalis* upotrebom in vitro testova i sistema kultura ćelija. Pokazano je da navedeni ekstrakt inhibira produkciju intracelularnih kiseoničnih vrsta i melanina u B16F10 ćelijama melanoma kao i aktivnost tirozinaze. Ovi nalazi ukazuju da ekstrakt izopa može biti koristan za sprečavanje oksidativnog oštećenja i melanogeneze kože [96]. Antihemolitička aktivnost Ekstrakti *H. officinalis* pokazali su veoma dobru antihemolitičku aktivnost protiv hemolize izazvane vodonik peroksidom u eritrocitima pacova (IC50 – 48.

51 ± 2.27 μ g/mL za cvjetove, **19.47 ± 0.73 μ g/mL**

50

za listove i 63.1 ± 2.65 μ g/mL za stabljike) [97]. 1.7. Istraživanja vrste *H. officinalis* u Crnoj Gori Kada je u pitanju Crna Gora, izop nije značajnije ispitivan: Postoji jedan rad iz 1995. godine, u kom je ispitivan sastav etarskog ulja izopa koji je sakupljen na lokalitetu Petnjica (Šavnik). Kombinacijom metoda GC i GC/MS određen je sastav etarskog ulja. Naime, identifikovano je 57 sastojaka, od kojih su glavni bili metil eugenol (38.30%), limonen (37.40%) i β -pinen 89.6% [34]. Pored ovog istraživanja, u dostupnoj literaturi se navodi samo još jedno iz 2009. godine. Naime, ispitivana je antimikrobna aktivnost etarskog ulja herbe izopa sakupljenog u Piperima (Kopilje i Radovče) disk difuzionom metodom, pri koncentracijama ulja od 5 do 15 μ l/disku i navodi se da je ulje pokazalo aktivnost na Gram pozitivne bakterije: *Staphylococcus aureus* (zona inhibicije 16-31 mm),

Enterococcus faecalis (15-25 mm) i Gram negativne bakterije: *Escherihia coli* (15-37 mm) i *Citrobacter sp.* (16-30 mm) [98]. Nema podataka o hemijskom sastavu polarnih ekstrakata herbe izopa iz Crne Gore. Postoji potreba za dodatnim istraživanjima hemijskog sastava i farmakoloških aktivnosti kako isparljivih frakcija, tako i polarnih ekstrakata herbe izopa sa teritorije Crne Gore.

1.8. Tradicionalna primjena *H. officinalis* Izop je ljekovita i aromatična biljka, čija se ljekovita svojstva koriste u narodnoj medicini od davnina. U prošlosti je ova biljka korišćena za ritualno čišćenje hramova i svetih mjesta. Primjena biljke u duhovnom pročišćvanju se pominje u Bibliji na više mjesta, što je navedeno na početku rada. Takođe biljka je korišćena kao lijek za čišćenje kod oboljelih od gube [15]. Hipokrat je preporučivao izop za upalu pluća, a Dioskorid ga je koristio za liječenje astme i katara [99]. U narodu je zabilježena primjena nadzemnih djelova biljke i njenih preparata (infuz, sirupi, tinkture, ekstrakti) u različite svrhe - kao karminativ, stomahik, tonik, dijaforetik, emenagog, ekspektorans, antiseptik, miorelaksans; kod probavnih i crijevnih tegoba, nadutosti, gasova, gubitka apetita, bolova i grčeva u stomaku; menstrualnih bolova; kod infekcija urinarnog trakta; za liječenje respiratornih bolesti, kao što su tuberkuloza, astma, hronični katar i bronhitis, kašalj, bol u grlu, respiratorne infekcije, groznica i iritacije respiratornog trakta koje prate prehladu [11,15,32,69]; takođe je vrednovan u liječenju reumatskih bolova, modrica, rana, opekotina, promrzlina, iritacija kože; stanja anksioznosti i histerije; zubobolje, bolova u uhu; u regulaciji krvnog pritiska [32]; kod noćnog znojenja [10]. Listovi i cvjetovi se koriste osušeni za pripremu čaja [14]. Tucakov navodi nekoliko preparata na bazi izopa koji se mogu pripremiti kod kuće: čajevi za olakšavanje iskašljavanja; čaj protiv znojenja (naročito noćnog znojenja kod nekih bolesnika); protiv hronične upale zglobova; protiv neugodnog zadaha iz usta; bolova u krstima i stomaku za vrijeme (i prije) menstruacije; vodica za njegu usta i desni [11]. Gostuški navodi da je najzgodnije upotrebljavati čaj na bazi herbe izopa, koji se priprema od 4 g izopa i 200 g ključale vode i piju se 2 do 3 šolje dnevno. Navodi se da se može koristiti i tinktura u dozi od 10 do 30 kapi dnevno u čaši vode ili 100 g (6 kašika) sirupa dnevno, koji se sastoji od 100 g herbe izopa, 1000 g ključale vode i 1600 g šećera [100]. Ovi podaci su slični sa podacima iz drugih literaturnih izvora, gdje se uopšteno smatra da je primjena herbe izopa sigurna u dozama do 2-3 g/dan. Pojedinačne doze su obično 450-900 mg do tri puta dnevno, a kada se primjenjuje kombinacija izopa sa drugim biljem, pojedinačne doze su obično 100-300 mg do tri puta dnevno [101].

1.9. Savremena primjena *H. officinalis* Etarsko ulje izopa se koristi kao mirisna komponenta u sapunima, parfemima, kremama i drugim kozmetičkim proizvodima, kao i u aromaterapiji [15]. Etarsko ulje se koristi i u kupkama, oblogama, uljima za njegu tijela i masažu [71]. Etarsko ulje izopa se ne bi smjelo primjenjivati interno, osim pod stručnim nadzorom [56]. Izop se koristi i za začinjavanje mesa i generalno kao začin u prehrambenoj industriji. Koristi se i kao sredstvo za aromatizaciju u likerima [44,71]. Listovi i cvjetovi se mogu koristiti kao začin uz meso, mesne proizvode, supe, sireve, salate, ribu; cvjetovi se mogu koristiti za pripremu salate [14]. Izop se koristi i kao dekorativna biljka. Pogodan je za ozeljenjavanje suvih predjela [13]. Postoje i patentirani kozmetički preparati na bazi izopa: JP 2004262861 od 24.09.2004, koji se koristi protiv bora i KR2005073080 od 07.03.2015. koji se koristi u tretmanu akni, tačnije protiv bakterije *Propionibacterium acnes* [44]. Isop se ne preporučuje trudnicama i dojama zbog nedostatka dostupnih naučnih dokaza [101]. Uprkos brojnim podacima o tradicionalnoj primjeni, još uvijek nema podataka o zvaničnoj primjeni izopa u terapijske svrhe -

relevantne institucije i udruženja (Evropska agencija za lijekove - EMA, Evropsko naučno udruženje za fitoterapiju – ESCOP, Komisija E njemačkog ministarstva

6

zdravstva i Svjetska zdravstvena organizacija – WHO)) do sada nisu objavile zvanične podatke (monografije) kojima bi bila uređena primjena biljnih ljekovitih proizvoda na bazi *Hyssopus officinalis*. 1.10. Oficinalne droge *H. officinalis* Do sada nema definisanih zvaničnih podataka o specifičnom kvalitetu biljnih droga biljke *H. officinalis*, odnosno nema oficinalnih droga. 2. CILJEVI I HIPOTEZE Na osnovu pregleda literaturnih izvora i dosadašnjih istraživanja herbe *H. officinalis* i njenih preparata, definisani su glavni ciljevi doktorske disertacije: a) Ispitivanje morfoloških i anatomskih karakteristika herbe izopa sa različitih staništa u Crnoj Gori, kao i uzorka iz Srbije u cilju definisanja parametara za makroskopsku i mikroskopsku identifikaciju biljnog materijala; b) Ispitivanje hemijskog sastava i varijabilnosti hemijskog sastava etarskog ulja i metanolnog ekstrakta herbe izopa porijeklom sa različitih prirodnih staništa u Crnoj Gori i uzorka iz Srbije, u cilju procjene kvaliteta raspoloživih resursa; c) Preliminarna procjena opravdanosti tradicionalne primjene i potencijalno novih mogućnosti za primjenu različitih preparata herbe izopa; d) Preliminarna procjena farmakološke aktivnosti etarskog ulja, ekstrakata i sastojaka herbe izopa, te njihovog značaja za definisanje specifičnog kvaliteta potencijalno nove biljne droge *Hyssopi herba*. Radi ostvarivanja postavljenih ciljeva, formulisane su sledeće hipoteze: H1: Hemijski sastav polarnih ekstrakata i isparljivih frakcija herbe izopa sa prirodnih staništa u Crnoj Gori i uzorka iz Srbije ne varira u značajnoj meri; H2: Hemijski sastav polarnih ekstrakata i isparljivih frakcija herbe izopa sa prirodnih staništa u Crnoj Gori i uzorka iz Srbije je povezan sa farmakološkom aktivnošću; H3: Preparati herbe izopa ispoljavaju antimikrobnu aktivnost i sinergistički efekat kombinovane primjene sa antibioticima; H4: Preparati herbe izopa ispoljavaju citotoksičnu aktivnost; H5: Preparati herbe izopa ispoljavaju antiinflamatornu aktivnost; H6: Preparati herbe izopa ispoljavaju antioksidativno djelovanje; H7: Preparati herbe izopa ispoljavaju antigenotoksičnu aktivnost; H8: Primjena ispitivane vrste u okviru indikacija poznatih iz tradicionalne medicine je opravdana, a preparati imaju određeni ljekoviti potencijal i pružaju nove mogućnosti primjene. H9: Izolovane i/ili identifikovane komponente, čije djelovanje bude potvrđeno, moguće je predložiti kao marker-jedinjenja, pogodna za definisanje specifičnog kvaliteta biljne sirovine *Hyssopi herba*. 3. MATERIJALI I METODE 3.1. Biljni materijal Nadzemni dio u cvijetu (herba) biljke *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman, je sakupljen na 5 različitih, prirodnih lokaliteta na teritoriji Crne Gore (Tabela 3.1., Slika 3.1.). Sakupljanje biljnog materijala je izvršeno u prijepodnevnim časovima, po sunčanom vremenu, u toku mjeseca septembra 2018. godine, kada je biljka bila u fazi punog cvjetanja. Vrsta nije pronađena na svim lokalitetima, koji se navode u literaturi za teritoriju Crne Gore. Tokom terenskog rada i potrage za biljnom vrstom, uočeno je da su prirodna staništa izopa u Crnoj Gori rijetka, kao i da su populacije malobrojne. Na lokalitetima na kojima je vrsta nađena, koji se navode u Tabeli 3.1, nijesu zabilježene brojne populacije, ali su bile dovoljne za uzorkovanje, pri čemu se vodilo računa da se staništa ne ugroze. Identifikacija biljnog materijala je izvršena prema *Flora Europaea* [102], a herbarski primjerci su deponovani u herbarskoj zbirci Prirodno matematičkog fakulteta u Podgorici (Crna Gora), na studijskom programu Biologija (TGU). Sakupljeni biljni materijal je osušen u suvoj, dobro provjetреноj prostoriji, na sobnoj temperaturi. Pored biljnog materijala koji je direktno sakupljen na terenu, obezbijeđen je još jedan uzorak za dalje analize - komercijalni uzorak herbe izopa, koji je kupljen od lokalnog preduzeća u Srbiji. Komercijalni uzorak je dobijen takođe od samoniklog izopa (*Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman), prikupljenog na lokalitetima u jugoistočnoj Srbiji (Pirotski i Nišavski okrug). Prije izolacije etarskog ulja, odnosno ekstrakcije, osušeni biljni materijal je usitnjen do stepena grubog praška. Tabela 3.1. Podaci o biljnom materijalu (herba *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman) i prinosu etarskih ulja (1EO-6EO) i metanolnih ekstrakata (1E-6E). a Srednja vrijednost pet uzastopnih određivanja. b N/P (nije primjenjivo) Porijeklo Nadmorska Uzorak biljnog Mjesto Geografske materijala sakupljanja koordinate visina Stanište (m)

Datum sakupljanja (dd/mm/yyyy) Kolberkotjor-ski etarPsrkiongosulja mePtaminoolnsog Voucher (EO) ekstrakta Specimen (mL/100 g) a (E) (% w/w) 1 Komercijalni uzorak (Srbija) Jugoistočna Srbija

N/Pb N/P N/P N/P N/P

77

1.00 12.02 2 Samonikli (Crna Gora) Kući N42°31'55" E19°24'07" 870 kamenjar 13/09/2018 1420263 0.40 9.48 3 Samonikli (Crna Gora) Šavnik N42°57'16" E19°05'59" 880 kameniti pašnjak 19/09/2018 1420261 0.54 10.24 4 Samonikli (Crna Gora) Piva N43°9'25" E18°50'46" 750 kamenjar 14/09/2018 1420162 0.65 9.05 5 Samonikli (Crna Gora) Piperi N42°34'23" E19°16'0.8" 800 kameniti pašnjak 07/09/2018 1420259 0.79 10.21 6 Samonikli (Crna Gora) Cuce N42°35'19" E18°47'40" 820 kamenjar 12/09/2018 1420260 0.48 9.64

Slika 3.1. *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman, na prirodnim staništima na teritoriji Crne Gore (gore lijevo i dolje desno - Piperi; gore u sredini i desno - Cuce; dolje lijevo - Kući) 3.2. Makroskopska i mikroskopska analiza herbe izopa Prikupljeni biljni materijal je analiziran makroskopski. Triokularna lupa Olympus SZ61 je korišćena za makroskopsku analizu površine listova. Izvršena je i mikroskopska analiza usitnjenog biljnog materijala u cilju utvrđivanja prisustva karakterističnih elemenata, poređenjem sa dostupnim literaturnim podacima. Trajni preparati su pripremljeni standardnom metodom za svjetlosnu mikroskopiju. Poprečni presjeci listova i stabala (debljine 10-15 µm) su isječeni na Reichert kliznom mikrotomu. Presjeci su obojeni safraninom (1%, w/v, u 50% etanolu) i alcian plavim (1%, w/v, vodeni rastvor). Svi preparati su montirani u Kanada balzamu, nakon dehidracije. Anatomski presjeci listova i stabljika su analizirani na svjetlosnom mikroskopu (LM) Olympus BX41, sa kamerom Olympus SC30. Pod svjetlosnim mikroskopom Olympus BX41, takođe su analizirani i fotografisani i privremeni preparati (poprečni presjeci stabala i listova) bojani u opštem reaktivu prema Tucakovu. 3.3. Izolacija etarskog ulja Etarska ulja su izolovana iz biljnog materijala hidrodestilacijom u aparaturi po Klevendžeru (Clevenger) (Slika 3.2.), prema Postupku I, IV Jugoslovenske Farmakopeje (1984), koji je pogodan za izolaciju etarskih ulja lakših od vode [103]. Za izračunavanje prinosa etarskih ulja (% u odnosu na suhu masu biljnog materijala), izvršeno je pet uzastopnih volumetrijskih određivanja. Nakon izolacije, etarska ulja su čuvana na temperaturi 4°C, u tamnim, staklenim, dobro zatvorenim bočicama, zaštićenim od svjetlosti. Podaci o prinosu etarskih ulja iz biljnog materijala su dati u Tabeli 3.1. Slika 3.2. Izolacija etarskog ulja iz biljnog materijala postupkom hidrodestilacije u aparaturi po Klevendžeru 3.4. Postupak pripreme metanolnih ekstrakata Metanolni ekstrakti su pripremljeni postupkom bimaceracije, koji propisuje IV Jugoslovenska Farmakopeja (1984) [103]. Naime, osušen i samljeven biljni materijal, je preliven sa tri dijela metanola i maceriran tri dana, uz mućkanje i miješanje, najmanje dva puta dnevno, u dobro zatvorenoj posudi zaštićenoj od direktne sunčeve svjetlosti. Nakon tri dana macerat je odvojen od droge cijedenjem. Zaostala droga u posudi je ponovo macerirana tri dana na isti način sa još dva dijela metanola. Macerat je ponovo odvojen cijedenjem i sjedinjen sa prvim maceratom. Sjedinjeni macerat je ostavljen dva dana na hladnom mjestu zaštićenom od svjetlosti i filtriran [103]. Nakon bimaceracije, ekstrakti su upareni do suva, pomoću rotacionog evaporatora, pod sniženim pritiskom i na temperaturi ispod 50°C, a zatim i u struji azota (Slika 3.3.). Do analiza, dobijeni ekstrakti su čuvani na 4°C, u dobro zatvorenim, staklenim posudama, zaštićenim od svjetlosti. Podaci o prinosu metanolnih ekstrakata iz biljnog materijala su dati u Tabeli 3.1. Neposredno prije analiza, ekstrakti su rekonstituisani dodavanjem metanola (J.T. Baker Chemicals Co., Phillipsburg, NJ, SAD), do koncentracije 5 mg/mL i filtrirani kroz

membranski filter, veličine pora 0.45 µm (Captive Syringe Filters, **Agilent**, Njemačka). Slika **3.3**

40

. Priprema metanolnih ekstrakata herbe izopa 3.5. GC-MS analiza

etarskih ulja Kvalitativna i semikvantitativna hemijska analiza **etarskih ulja** izvedena je primjenom **gasne hromatografije** u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (**GC-MS**), na gasnom hromatografu **Agilent Technologies 6890 Series**

5

. Alikvot od 0.2 µL svakog rastvora etarskog

ulja (10 µL/mL u heksanu) je injektovan u **split modu, uz split odnos 1 :20, pri temperaturi od 220° C. Komponente su razdvojene na nepolarnoj poli(tetrametil-1,4 -sulfenilensiloksan) HP-5ms koloni (Agilent Technologies; dimenzija 30 m × 0.25 mm, debljina sloja 0.25 µm). Kolona je eluirana u temperaturno- programiranom režimu**

5

: početna temperatura 60°C, porast 3°C/min do 246°C (ukupno vrijeme analize 62

min). **Helijum** visoke **čistoće (5.0)** je korišćen kao gas nosač, sa konstantnim protokom

33

od 0.9 mL/min. Efluent je prosljeđen u Agilent Technologies series 5975 maseni spektrometar za elektronsku jonizaciju, preko transfer-linije čija je temperatura održavana na 280°C.

Parametri masenog spektrometra bili su sljedeći: **energija elektrona 70 eV, temperatura jonskog izvora 230°C, temperatura kvadrupola 150°C**. Primijenjen je **scan mod akvizicije, u m/z opsegu 35–400, i uz solvent delay od 2.30 min**

5

. Da bi se postiglo bolje slaganje

između eksperimentalnih i bibliotečkih spektara, korišćen je standard spectra tune. Dobijeni **podaci su obrađeni pomoću softvera Agilent Technologies MSD ChemStation (revizija E01.01.335) u kombinaciji sa**

5

NIST MS Search softverom (verzija 2.0d). Za identifikaciju masenih spektara korišćene su spektralne biblioteke

Wiley Registry of Mass Spectral Data [104], **NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library** [105] i **Adams'** 1
mass 38 spectral library of essential oils (3rd Edition)

) [106]. Identitet jedinjenja je potvrđen poređenjem MS spektara i linearnih retencionih indeksa sa literaturnim podacima. Relativni udio jedinjenja određen je metodom normiranja površine i izražen kao površina u procentima (%). 3.6. LC-DAD-MS analiza ekstrakata

Tečna hromatografija sa diodnim i **masenim detektorom** (eng. **liquid chromatography with** 66
 diode array and **mass spectrometry, LC** -DAD- **MS**

), je sprovedena na uređaju Agilent LC/MS System 1260/6130 (Agilent Technologies, Waldbronn, Njemačka) (Slika 3.4.), koji je bio opremljen sa: softverom, ChemStation

Rev. B.04.03-SP1, degazerom (**model G1311B**), kvaternarnom pumpom (**G1311B/1260**), 1
 autosemplerom (**G1329B**

), detektorom sa diodnim nizom (DAD) (G4212B), maseno selektivnim detektorom (MSD) (6130) (jednostruki kvadrupol sa elektrosprej jonizacijom na atmosferskom pritisku (eng. atmospheric pressure ionization - electrospray ionization, API-ESI)) i reverzno-faznom kolonom Zorbax SB-Aq (150 × 3.0 mm; prečnik čestica

3.5 µm, Agilent Technologies), pri radnoj **temperaturi od** 25° **C. Mobilna faza** se **sastojala od** 24
0.1

% vodenog rastvora mravlje kisjeline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) - faza A i acetonitrila (J.T. Baker Chemicals Co., Phillipsburg, NJ, SAD) - faza B. Korišćen je sljedeći gradijentni program eluiranja:

10% B do **35% B (0-20 min)**, **35% B** do **90% B (20-24 min)**, **90% B (24-25 min)**, 90% **B** do 1
10% B (25-30 min)

), sa ukupnim vremenskim intervalom rada od 30 minuta, brzinom protoka mobilne faze 0.35 mL/min i zapreminom injektovanog uzorka od 3.00 µL. Spektralni podaci svih pikova su sakupljeni u opsegu od 190 do 640 nm, a hromatogrami su snimani na 210, 270, 320 i 350 nm. Elektrosprej jonizacija na atmosferskom pritisku (API-ESI) u negativnom polaritetu i rasponu m/z 100-1000 je korišćena za jonizaciju analita. Parametri jonskog izvora su bili sljedeći: naponi fragmentacije

100 i 250 V, protok gasa za sušenje (azot) 10 .0 L/min

23

, temperatura gasa za sušenje 350°C, pritisak nebulizacije 40 psi, a napon na kapilari 3500 V. Jedinjenja su identifikovana poređenjem njihovih UV i MS spektralnih podataka i retencionih vremena (Rt) sa odgovarajućim podacima dobijenim za standardna jedinjenja pod istim hromatografskim uslovima, kao i poređenjem sa ranije objavljenim literaturnim podacima. Sadržaj hlorogenske (eng. chlorogenic acid, CA) i rozmarinske kisjeline (eng. rosmarinic acid, RA) je određen metodom eksternog standarda na 320 nm. Osnovni (eng. stock) rastvori hlorogenske kisjeline (0.4 mg/mL) i rozmarinske kisjeline (0.5 mg/mL) su pripremljeni rastvaranjem referentnih supstanci u metanolu i naknadnim filtriranjem dobijenih rastvora kroz membranski filter (0.45 µm, Captiva, Agilent). Naknadnim razblaživanjem istim rastvaračem, pripremljeni su kalibracioni standardi, sa širokim koncentracionim opsegom. Navedeni postupak (uključujući pripremu osnovnih rastvora) je ponavljan tri puta, tako da su za svaku kalibracionu tačku vršena tri mjerenja. Kalibracione krive i koeficijenti determinacije su dobijeni na osnovu linearne regresione analize.

Limit detekcije (LoD) i limit kvantifikacije (LoQ) su izračunati prema

11

smjernicama International Conference on Harmonisation (ICH) [107]. Za određivanje sadržaja CA (>97%) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i RA (≥99%) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka), korišćene su sljedeće kalibracione krive: - CA:

$y = 26733x + 70.594$, $R^2 = 0.9998$, opseg linearnosti **0.02-0.4 mg/mL; LoD = 0.005 mg/mL; LoQ = 0.015 mg/mL** ; - RA: **$y = 18000x + 39.94$, $R^2 = 0.9998$**

1

, opseg linearnosti

0 .00625- 0 .5 mg/mL; LoD = 0 .003 mg/mL; LoQ = 0 .010 mg/mL

1

. Rastvarači koji su se koristili za LC-DAD-MS analizu su bili stepena čistoće LC-MS grade; svi drugi rastvarači i reagensi korišćeni u eksperimentima su bili analitičke čistoće. Slika 3.4. Uređaj za LC-DAD-MS analizu - Agilent LC/MS System 1260/6130 3.7. Ukupni fenoli

Sadržaj ukupnih fenolnih jedinjenja u suvim metanolnim ekstraktima je određen pomoću Folin-Ciocalteu 76

(FC) reagensa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) - fosfomolibdovolframova kiselina, metodom koju opisuju Veliglou i sar. (1998) [108]. Fenolna jedinjenja prisutna u biljnom ekstraktu, u baznoj sredini, redukuju FC reagens,

Wo⁶⁺ jon do Wo⁴⁺ jona i Mo⁶⁺ jon do Mo⁴⁺ jona (volfram-molibdensko plavo), a sama se oksiduju do o-hinona 29

. Intenzitet plave boje se određuje spektrofotometrijski i proporcionalan je sadržaju fenolnih jedinjenja u biljnom ekstraktu [108]. Postupak i reagensi su prikazani u Tabeli 3.2. Tabela 3.2. Postupak određivanja sadržaja ukupnih fenolnih jedinjenja u metanolnom ekstraktu herbe izopa Analiza Slijepa proba Uzorak1 100 µL Metanol FC reagens2 750 µL 750 µL Smješa je snažno promućkana i nakon 5 minuta dodat je sljedeći reagens (Na₂CO₃ u vodi – vidjeti ispod) Na₂CO₃ u vodi (60 g/L) 750 µL 750 µL Smješa je inkubirana 90 min. u mraku na sobnoj temperaturi. Apsorbancija je mjerena na 725 nm. 1 Metanolni rastvor suvog metanolnog ekstrakta herbe izopa, koncentracije 1 mg/mL za sve uzorke, osim za uzorak 4E, gdje je korišćen rastvor koncentracije od 0.5 mg/mL. 2 Koristi se reagens razblažen vodom 10 puta 3 Odnosi se na bezvodni Na₂CO₃ Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je rastvor galne kiseline (GA) (10-100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Postupak je bio isti kao pri radu sa uzorcima. Rezultati, odnosno sadržaj ukupnih fenola (na osnovu izmjerenih apsorbancija i konstruisane kalibracione krive) je izražen u

mg ekvivalenata galne kiseline (GAE) po g suvog ekstrakta (mg GAE/ g). Uzeta je srednja vrijednost tri 26

uzastopna mjerenja. 3.8. Antioksidativna aktivnost ekstrakata herbe izopa Za procjenu antioksidativne aktivnosti ispitivanih ekstrakata korišćena su dva testa: DPPH i FRAP test. 3.8.1. DPPH test Test neutralizacije/

inhibicije DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) je jedan od 51

dosta korišćenih i vrlo pogodnih testova za ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata in vitro. U reakciji sa molekulima (u konkretnom slučaju antioksidansima prisutnim u biljnom ekstraktu) koji mogu da doniraju proton i elektron, tj. da otpuste vodonikov atom, DPPH radikal ljubičaste boje, koji ima nespareni elektron, se redukuje u DPPH-H (2,2-difenil-1-

pikrilhidrazin), žute boje (Slika 3.5.). Promjena/smanjenje intenziteta boje se određuje spektrofotometrijski i predstavlja mjeru antioksidativnog potencijala ispitivanog biljnog ekstrakta [109].

DPPH radikal (ljubičast) DPPH-H (žut) Slika 3 .5. Redukcija **DPPH** radikala u

12

reakciji sa antioksidansom [110]. Test neutralizacije DPPH radikala je izveden prema metodologiji koju opisuje Kukić i sar. (2006) [111], sa manjim prilagođavanjima, koja su bila neophodna za izvođenje testa na mikrotitarskim pločama. Metanolni rastvori ispitivanih ekstrakata izopa su pripremljeni u različitim koncentracijama, a uporedo i metanolni rastvori standarda, rutina. Testni rastvor se sastojao od smješe: 0.1 mL metanolnog rastvora ispitivanog ekstrakta, 0.1

mL metanola i 0 .05 mL 0 .5 mM metanolnog rastvora DPPH

52

(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Smješe su

snažno promućkane i inkubirane **30** minuta **u mraku na sobnoj temperaturi** . Apsorbancija je

mjerena **na 492 nm uz metanol kao** slijepu **probu**

29

na uređaju Biochrom EZ Read 400 (čitač mikrotitarskih ploča, Slika 3.6.). Negativna kontrola se sastojala od

0.2 mL metanola i 0 .05 mL 0 .5 mmol/L rastvora **DPPH**

52

. Inhibicija DPPH je izračunata prema sljedećoj formuli: $I (\%) = (A_c - A_t) / A_c \times 100$ gdje je: A_c – apsorbanca kontrole; A_t – apsorbanca test rastvora. Konstruiše se kriva zavisnosti koncentracije ispitivanog uzorka (x-osa) i procenta inhibicije DPPH radikala (y-osa). Rezultati su izraženi kao polovina maksimalne inhibitorne koncentracije (IC50 vrijednost; $\mu\text{g/mL}$), što predstavlja onu koncentraciju ekstrakta, koja neutrališe 50% DPPH radikala. Svaki rezultat predstavlja srednju vrijednost tri uzastopna određivanja. Slika 3.6. Fotografije tokom izvođenja DPPH testa i rada na uređaju Biochrom EZ Read 400 3.8.2. FRAP test Ukupna antioksidativna aktivnost metanolnih ekstrakata herbe izopa i standardnih rastvora je određena FRAP testom (eng. ferric reducing/antioxidant power test), koji je u osnovi opisan od strane Pellegrini i sar. (2003) [112]. FRAP test

se zasniva na redukciji Fe (III)-tripiridil-triazin kompleksa (Fe (III))-TPTZ1) do Fe (II)-tripiridil-triazin kompleksa (Fe (II)-TPTZ

45

), plave boje [113,114]

kao što je prikazano na Slici 3.7. Slika 3.7

71

. Fe (III)-TPTZ + redukciono sredstvo Fe (II)-TPTZ (kompleks plave boje) [114] Ukratko, test rastvor, odnosno rastvor standardnih supstanci koje su korišćene za poređenje (rutin, 0.1 mg/mL; Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka); askorbinska kisjelina 0.05 mg/mL (Acros, Geel, Belgija), kontrolni rastvor (rastvor Fe(II)-sulfata; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), su prenijeti (po 0.1 mL) u epruvete za analizu i dodato je po 3 mL

ex tempore pripremljenog **FRAP** reagensa (**25 mL** acetatnog pufera, **300 mmol/L, pH 3.6 +**
2.5 mL 10 mmol/L TPTZ u **40 mmol/L HCl + 2.5 mL 20 mmol/L** FeCl₃ x **6H₂O**

1

). Apsorbancija je mjerena na 593 nm prema slijepoj probi (0.1 mL metanola), nakon prethodne inkubacije od pola sata na temperaturi 37°C. FRAP vrijednosti su izračunate iz kalibracione krive kontrolnog rastvora FeSO₄ x 7H₂O, koji su pokrivali koncentracioni opseg između 100 i 1000 µmol/mL i izražene kao mmol Fe²⁺/g suvog ekstrakta (mmol Fe²⁺/g). Sva mjerenja su izvedena u triplikatu. 1 TPTZ -

2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (Sigma-Aldrich

73

, St. Louis, MO, SAD) 2 FeCl₃ (gvožđe (III) hlorid; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) 3.9. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa Antimikrobna aktivnost etarskih ulja i ekstrakata *H. officinalis* je ispitana in vitro bujon mikrodilucionom metodom,

prema smjernicama Instituta za kliničke i laboratorijske standarde (eng. **Clinical and Laboratory**
Standards Institute guidelines, **CLSI**

56

) [115], određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). U studiji je korišćeno sedam standardnih sojeva mikroorganizama (

Gram pozitivne bakterije: **Staphylococcus aureus ATCC 6538, Bacillus subtilis ATCC 6633; Gram**
negativne bakterije: Escherichia coli ATCC 8739

53

Klebsiella pneumoniae NCIMB 9111, Salmonella typhimurium ATCC 14028, Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027

65

i standardni soj gljivice *Candida albicans* ATCC 10231). Metoda je izvedena na mikrotitarskim pločama za 96 determinacija, korišćenjem serijskih razblaženja testiranih uzoraka rastvorenih u dimetil-sulfoksidu (DMSO) i dalje razblaženih u Mueller-Hinton bujonu (Torlak, Srbija) do ispitivanih koncentracija (500-25 µg/mL za etarska ulja, odnosno 2000-125 µg/mL za ekstrakte). Svježe, prekonoćne kulture mikroorganizama su suspendovane u sterilni fiziološki rastvor i dobijene suspenzije turbiditeta 0,5 McFarland-a (gustine oko 2×10^8 CFU/mL). Suspenzije su dalje razblažene (u Mueller-Hinton bujonu za bakterijske sojeve, odnosno u Sabouraud dekstroznom bujonu (Torlak, Srbija) za *C. albicans*) do konačne gustine 2×10^6 CFU/mL. U svakom udubljenju se pomiješa po 100 µL odgovarajućeg rastvora etarskog ulja (odnosno ekstrakta) i 100 µL odgovarajuće bakterijske, odnosno gljivične suspenzije. Rezultati (MIC vrijednosti) su interpretirani nakon inkubacije ploča tokom 24 sata na 35°C. Za poređenje su korišćena dva standardna antibiotika, aminoglikozidni antibiotik, amikacin (Sigma-Aldrich, SAD) i cefalosporinski antibiotik, ceftriakson (Sigma-Aldrich, SAD). Raspon koncentracija antibiotika je bio 0.01 - 8.0 µg/mL. Minimalne inhibitorne koncentracije su određene tako što je nedostatak zamućenosti bujona u udubljenju mikrotitarske ploče ukazivao na inhibiciju rasta inokulisanog mikroorganizma. Minimalna koncentracija etarskog ulja, odnosno ekstrakta, pri kojoj je došlo do nedostatka zamućenosti je zapravo predstavljala minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIC). Svaki test je ponavljen tri puta i uzete su srednje vrijednosti dobijenih rezultata. Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti smješe etarskih ulja i antibiotika (amikacin (Sigma-Aldrich, SAD)) korišćena je mikrodiluciona „checkerboard“ metoda [116]. Navedena metoda se zasniva na smanjivanju koncentracije etarskog ulja horizontalno, odnosno smanjivanju koncentracije antibiotika vertikalno na mikrotitarskoj ploči. Pomiješano je po 50 µL etarskog ulja i antibiotika u udubljenju mikrotitarske ploče, a zatim inokulisano u 100 µL prethodno pripremljene suspenzije mikroorganizama (106 CFU/mL). Posljednja dva vertikalna reda mikrotitarske ploče su predstavljala pozitivnu kontolu (i sadržavala su samo suspenziju bakterija, bez antimikrobnog agensa). Nakon inkubacije ploča tokom 24 sata na 35°C, određena je MIC vrijednost smješa. U cilju procjene interakcije etarskog ulja sa antibiotikom izračunat je indeks frakcione inhibitorne koncentracije (FICI). Frakciona inhibitorna koncentracija (FIC) svake supstance u smješi se dobija dijeljenjem MIC te supstance u smješi sa MIC čiste supstance (npr. FIC etarskog ulja = MIC etarskog ulja u smješi sa antibiotikom/MIC etarskog ulja). FICI vrijednost predstavlja zbir FIC etarskog ulja i FIC antibiotika i tumači se na sljedeći način:

FICI ≤ 0.5 sinergizam; 0.5 < FICI ≤ 1 aditivnost; 1 < FICI ≤ 2 indiferentnost (bez efekta) i FICI ≥ 2 antagonizam

28

[117,118]. 3.10. Ispitivanje genotoksične i antigenotoksične aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa Uzorci periferne krvi, uzeti iz prsta tri dobrovoljna ispitanika (starosti 21-35 godina), prikupljeni su u heparinizovane kontejnere i odmah

podvrgnuti eksperimentu. Ispitanici su bili nepušači i u periodu davanja krvi nisu uzimali lijekove, alkohol, kao ni dijetetske suplemente. Studija je sprovedena u skladu sa smjernicama Helsinške deklaracije; pisanu saglasnost na davanje uzoraka u cilju sprovođenja eksperimenta, ispitanici su potpisali u skladu sa propisima etičkih standarda Etičkog odbora za biomedicinska istraživanja Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, koji je odobrio ispitivanje (broj protokola 1121/2; datum odobrenja: 31.08.2020. godine). Suvi metanolni ekstrakti herbe izopa su rastvoreni u fiziološkom rastvoru sa fosfatnim puferom (eng. phosphate-buffered saline, PBS) (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, SAD); etarska ulja su rastvorena u apsolutnom etanolu, a zatim razblažena sa PBS. 3.10.1. Ispitivanje genotoksične aktivnosti Prilikom ispitivanja genotoksične aktivnosti, ćelije pune krvi (eng. human whole blood cells, WBC) su inkubirane sa različitim koncentracijama etarskih ulja (12.5, 5 i 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), odnosno različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata herbe izopa (100, 200 i 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) u trajanju od 30 minuta na 37°C. Ispitivane koncentracije su odabrane na osnovu literaturnih podataka [96,119]. Uzorci su tretirani, paralelno: sa negativnom kontrolom (PBS, 30 minuta na 37°C); odnosno sa pozitivnom kontrolom (vodonik peroksid, H₂O₂ (Zorka Pharma; Šabac, Srbija), 50 μM , 20 minuta na 4°C), a zatim PBS-om 30 minuta na 37°C.

Koncentracija od 50 μM H₂O₂ je bila najniža **koja je** indukovala statistički **značajno** povećanje oštećenja **DNK** 22

u testiranim ćelijama. 3.10.2. Ispitivanje antigenotoksične aktivnosti Antigenotoksična aktivnost ekstrakata, odnosno etarskih ulja (koja nisu pokazala aktivnost u testu genotoksičnosti), je ispitana u post-tretmanu [120,121]. Ćelije pune krvi su tretirane sa H₂O₂ tokom 20 minuta na 4°C, isprane PBS-om i zatim inkubirane tokom 30 minuta na 37°C sa ispitivanim etarskim uljima/metanolnim ekstraktima herbe izopa. Koncentracija od 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, izabrana je za dalja ispitivanja ekstrakata, budući da je to bila najefikasnija koncentracija u testu antigenotoksičnosti sa ekstraktom komercijalnog uzorka. Sa druge strane, smanjenje oštećenja DNK izazvanog vodonik peroksidom u leukocitima periferne krvi čovjeka u post-tretmanu sa etarskim uljima, procijenjeno je primjenom one koncentracije etarskih ulja koja nije indukovala statistički značajno povećanje oštećenja DNK u testiranim ćelijama prilikom procjene genotoksičnosti (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). 3.10.3 Komet test Komet test (eng. single cell gel electrophoresis), koji se obično koristi za detekciju oštećenja DNK, je odrađen po protokolu koji opisuje autor Singh i sar. (1988), tzv. alkalnom metodom, po kom se detektuju prekidi DNK i alkalna labilna mjesta, a na stepen oštećenja DNK ukazuje obim migracije DNK molekula [122]. Naime, količina od 100 μL ispitivane suspenzije, koja sadrži 6 μL periferne krvi suspendovane u 0.67% agarosi niske temperature topljenja (eng.

low-melting-point agarose, LMPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO 79

, SAD), ravnomjerno je nanijeta na pripremljene mikroskopske pločice, prethodno obložene

slojem 1% agarose normalne tačke topljenja (eng. **normal-melting-point agarose**, NMPA) (**Sigma-Aldrich, St. Louis, MO**) 4

, SAD). Pokrovna stakla su stavljena na pločice, koje su potom ostavljene 5 minuta na 4°C. Nakon toga pokrovna stakla su polako uklonjena i ćelije izložene odgovarajućem tretmanu (kako je porethodno opisano za genotoksičnu, odnosno antigenotoksičnu aktivnost). Nakon tretmana, nanijet je treći sloj -

100 µl 0.5% LMPA, stavljena su pokrovna stakla i pločice ponovo ostavljene

22

na 4°C tokom 5 minuta. Pokrovna stakla su nakon toga ponovo pažljivo uklonjena, a mikroskopske pločice potopljene u rastvor za liziranje (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA (etilendiaminotetrasirćetna kisjelina),

10 mM Tris, 1% Triton X100 i 10 % DMSO, pH 10, podešen sa NaOH) i držane na 4°C u toku noći.
Nakon lize ćelija

7

, izvršena je denaturacija DNK u istom rastvoru koji je kasnije korišćen za elektroforezu, u trajanju od 30 minuta (10 M NaOH, 200 mM EDTA, pH ≥ 13). Elektroforeza je izvršena na 25 V i 300 mA u trajanju od 30 minuta. Nakon elektroforeze, izvedena je alkalna neutralizacija u gelovima, dvostrukim ispiranjem

neutrališućim puferom (0.4 M Tris, pH 7.5) u trajanju od 10 minuta

4

, a nakon toga i destilovanom vodom. Nakon ispiranja, izvršeno je bojenje i vizuelizacija kometa fluorescentnom bojom - rastvorom etidijum bromida (20 µg/L). Nakon bojenja (15 min) pločice su bile spremne za analizu. 48 Svi eksperimenti su urađeni tri puta, u duplikatu. Kako bi se odredio stepen oštećenja DNK, za svakog donora i za svaku koncentraciju, 200 nukleoida (kometa) je odabrano i analizirano, metodom slučajnog izbora, odnosno po 100 sa svake mikroskopske pločice duplikata, korišćenjem fluorescentnog mikroskopa

Olympus BX 50 (Olympus Optical Co., GmbH, Hamburg , Njemačka), sa živinom lampom (HBO) (50 W,
516-560 nm Carl Zeiss Microscopy, Jena , Njemačka) i pri uvećanju

22

od 100x. Analiza je izvršena određivanjem dužine i gustine DNK u "repu", na osnovu čega su nukleoidi (komete) klasifikovane u 5 grupa, opisanih od strane Anderson i sar. (1994) [123]: A – bez "repa" (<

5% oštećenja DNK); B - nizak stepen oštećenja (5–20%); C - srednji stepen oštećenja (20–40%); D - visok stepen oštećenja (40–95%) i E - potpuno oštećenje DNK (> 95

22

%). Stepen ukupnog oštećenja DNK je izražen kao zbir svih oštećenja/migracija DNK preko 5% (B+C+D+E). 3.11. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata herbe izopa 3.11.1 Čelijske linije i kulture Potencijalni citotoksični efekti metanolnih ekstrakata herbe izopa su ispitani na humanim čelijskim linijama kancera grlića materice (HeLa), dojke (MDA-MB 231) i kolona (SW480), dok je njihova selektivnost testirana korišćenjem zdravih čelijskih linija MRC-5 (humani fibroblasti pluća).

Sve korišćene čelijske linije su nabavljene od ustanove American Type Culture Collection (ATCC

28

).

Ćelije su kultivisane u standardnom medijumu - Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM

25

) na pH 7.4. Medijum je bio obogaćen 10%-im fetalnim goveđim serumom, koji je termički inaktivisan (eng. heat-inactivated fetal bovine serum, FBS), L-glutaminom, neesencijalnim amino kiselinama (0.1 mM), penicilinom (100 IU/mL) i streptomycinom (100 µg/mL). Kultivacija ćelija je izvršena u monosloju u flaskovima T-25 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u aseptičnom okruženju i pod standardnim uslovima za kulture (temperatura 37°C, vazduh - obogaćen sa 5% CO₂; vlažnost 100%). Medijumi su mijenjani po potrebi, a ćelije su pasažirane svakog petog dana. Neposredno prije in vitro eksperimenata, subkonfluentni čelijski jednoslojevi (~80%) u logaritamskoj fazi rasta, odvojeni su od dna flaska kratkotrajnim tretiranjem rastvorom 0.25% tripsina i 0.53 mM EDTA u PBS. 3.11.2. Priprema ekstrakata za analizu Osnovni (eng. stock) rastvori su pripremljeni rastvaranjem metanolnih ekstrakata u DMSO do koncentracije od 50 mg/mL i čuvani na 4°C. Prije tretmana, svježi radni rastvori ekstrakata u različitim koncentracijama su pripremljeni razblaživanjem osnovnog rastvora u hranjivom DMEM medijumu. Finalna koncentracija DMSO u radnim rastvorima je bila niža od 0.5% (v/v). 3.11.3. MTT test Citotoksični potencijal ekstrakata na HeLa, MDA-MB 231, SW480 i MRC-5 čelijske linije je ocijenjen in vitro primjenom MTT testa (eng. Microculture Tetrazolium Test), koji predstavlja uobičajenu kolorimetrijsku metodu, za određivanje vijabilnosti ćelija [124]. Naime, metoda

se zasniva na redukciji MTT reagensa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijum

23

bromid), do formazana ljubičaste boje, do koje dolazi u mitohondrijama vijabilnih ćelija, uz pomoć enzima sukcinat dehidrogenaze [124]. Ćelije su zasijane u mikrotitarске ploče sa ravnim dnom (sa 96 udubljenja) (ThermoFisher Scientific,

Waltham, MA, SAD), tako da je gustina bila 5×10^3 ćelija po udubljenju i inkubirane tokom noći u cilju adheriranja. Poslije 24 h, supernatant je zamijenjen rastvorima ekstrakata sa sedam različitih koncentracija (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$). U udubljenjima sa kontrolom, omogućen je rast ćelija samo u prisustvu hranjivog medijuma. Ćelije su inkubirane 24, 48 i 72h. MTT rastvor u finalnoj koncentraciji od 0.5 mg/mL u neobogaćenom medijumu (bez dodataka), je dodat u svako udubljenje u nultom vremenu (nakon inkubacije tokom noći), kao i na kraju različitog vremena inkubacije. Nakon 2 h od inkubacije, MTT rastvor je odbačen, a kristali formazana su rastvoreni sa 150 μL DMSO. Ploče su mućkane 5 min, a apsorbancija je mjerena na 550 nm pomoću čitača za mikrotitarske ploče (Zenyth 3100, Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals-Salzburg, Austrija). Svi eksperimenti su ponovljeni najmanje tri puta u triplikatu. Sve hemikalije/medijumi/reagensi koji su korišćeni pri ispitivanju citotoksičnosti ekstrakata (DMEM, FBS, L-glutamin, ne-esencijalne amino kisjeline, DMSO, penicilin, streptomycin, rastvor tripsina i EDTA u PBS, MTT reagens)

su nabavljeni od Sigma Aldrich, St. Louis, MO , SAD. 3 .11. 4

28

. Parametri citotoksičnosti Rezultati MTT testa su predstavljeni u odnosu na vrijednosti za ćelije u kontrolnim udubljenjima, za koje je uzeto da vijabilnost iznosi 100%. Inhibicija ćelijskog rasta je izračunata prema izrazu: $(A_0 - A) \times 100 / A_0$ gdje je A_0 - apsorbancija izmjerena u kontrolnim udubljenjima, a A apsorbancija izmjerena u udubljenjima sa ispitivanim ekstraktima. Mjera ukupne inhibitorne aktivnosti ispitivanog agensa (ekstrakta) je procijenjena na osnovu IC50 vrijednosti, koja se definiše kao koncentracija agensa koja inhibira biološku aktivnost ciljane ćelije za 50% u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu. Indeks selektivnosti (SI) je izračunat kao količnik IC50 vrijednosti za tretiranu netransformisanu (zdravu) ćelijsku liniju i IC50 vrijednosti ispitivanih ekstrakata na malignim ćelijama. $SI < 2$ ukazuje na generalnu toksičnost ispitivanog agensa, $SI \leq 2$ označava selektivnu toksičnost, dok $SI \leq 3$ ukazuje na visoku selektivnu toksičnost [125]. Prateći preporuke Nacionalnog instituta za kancer (eng. National Cancer Institute, NCI) [126], izračunati su parametri GI50, TGI i LC50 za svaki ekstrakt: ? Vrijednost GI50 je ona koncentracija ispitivanog ekstrakta pri kojoj je $100 \times (T - T_0) / (C - T_0)$ jednako 50 i mjeri snagu inhibicije ćelijskog rasta ispitivanog ekstrakta; ? Vrijednost TGI je ona koncentracija ispitivanog ekstrakta pri kojoj je $100 \times (T - T_0) / (C - T_0)$ jednako 0 i mjeri citostatski efekat; ? Vrijednost LC50 je ona koncentracija ispitivanog ekstrakta pri kojoj je $100 \times (T - T_0) / T_0$ jednako 50 i mjeri citotoksični efekat ekstrakta. U ovim formulama, T_0 je apsorbancija u vremenu nula (kada se doda ispitivani agens (ekstrakt)). T je apsorbancija izmjerena u udubljenju nakon 24, 48 ili 72 h od dodavanja ispitivanog ekstrakta, a C je optička gustina kontrolnih udubljenja (ćelijske linije inkubirane 48h bez dodataka). Ako efekat nije postignut ili je prekoračen, vrijednost tog parametra je izražena kao veća ili manja od maksimalne ili minimalne ispitivane koncentracije.

3.12. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa 3.12.1. In vitro ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa (test inhibicije enzimske aktivnosti ciklooksigenaze-1 i 2) Metoda za ispitivanje sposobnosti uzorka da inhibira aktivnost

enzima ciklooksigenaze-1 (COX-1) i ciklooksigenaze-2 (COX-2

42

), zasniava se na ELISA (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) kvantifikaciji formiranog proizvoda, prostaglandina E2 (PGE2), u kaskadi arahidonske kisjeline. Testovi su sprovedeni u mikrotitarskim pločama sa 96 udubljenja, sa ravnim dnom, korišćenjem COX-1 iz sjemenih kesica ovna (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, SAD), odnosno humanog rekombinantnog enzima, COX-2 (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, SAD), po metodi koju opisuju Fiebich i sar. (2005) [127]. Inkubaciona smješa se sastojala od

180 µL 0.1 M TRIS/HCl -pufera (**pH 8.0**) (**Roth, Karlsruhe** , Njemačka), **5 µM**

57

hematina (MP biomedicals LLC, Solon, OH, SAD), 18 mM epinefrin hidrogen tartarata (Fluka, Buchs, Švajcarska), 0.2 U enzima i 50 µM Na2EDTA (samo za COX-2 test) (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka). Dodati su uzorci (rastvori ispitivanih etarskih ulja, odnosno metanolnih ekstrakta herbe *H. officinalis* u DMSO (Sigma-Aldrich, MO, SAD)) u zapremini od 10 µL i smješa je preinkubirana 5 min na sobnoj temperaturi. Za pozitivnu kontrolu, korišćeni su indometacin (čistoće ≥ 99%) (MP biomedicals LLC, Solon, OH, SAD) i celekoksib (čistoće ≥ 98%) (Sigma-Aldrich, Handels GmbH, Vienna, Austrija), prethodno rastvoreni u etanolu p.a. (lat. pro analysi). U eksperimentu su korišćene sljedeće koncentracije: etarska ulja i ekstrakti – 20 µg/mL, indometacin 1.2 µM, celekoksib 8.8 µM. Kako bi reakcija započela, dodato je 10 mL 5 mM arahidonske kisjeline (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI, SAD) u etanolu p.a. i smješa inkubirana 20 min na 37°C. Nakon toga, u cilju okončanja reakcije, dodato je 10 mL 10% mravlje kisjeline (Sigma-Aldrich, MO, SAD). Koncentracija glavnog metabolita arahidonske kisjeline, PGE2, u ovoj reakciji je određena pomoću kompetitivnog PGE2 EIA kita (Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, SAD) za ELISA analizu, koji je procijenjen pomoću čitača mikrotitarskih ploča (Tecan Rainbow, Tecan Group Ltd., Maennedorf, Švajcarska), kako je opisano u metodi Fiebich i sar. (2005) [127]. Inhibicija enzimske aktivnosti COX odnosi se na smanjenje stvaranja PGE2, u odnosu na blanko probu bez inhibitora. Svi rezultati su izraženi kao procenat inhibicije aktivnosti enzima COX-1, odnosno COX-2. Svaka analiza je rađena u dva ponavljanja, u toku dva uzastopna dana, pa je na kraju uzeta srednja vrijednost 4 mjerenja ± standardna devijacija, za oba testa (COX-1 i COX-2). 3.12.2. In vivo ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa Eksperimentalne životinje Wistar albino pacovi (200-250 g), muškog pola, 8 nedjelja starosti, su čuvani u strogo kontrolisanim uslovima (temperatura 22±2°C, ciklus svjetlost:tama - 12:12 časova). Voda i hrana su bili dostupni ad libitum [128]. Ispitivanje je sprovedeno na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Kragujevcu (Srbija). Protokol studije (broj 01-6121) je izveden u skladu sa propisima Etičkog odbora fakulteta za dobrobit laboratorijskih životinja, principima Dobre laboratorijske prakse i Direktivom 86/609/EEC. Edem šape izazvan karagenanom i određivanje

antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata Ispitivanje antiedematozne aktivnosti metanolnih **ekstrakata**
herbe izopa **sprovedeno je na modelu** karagenanom izazvane **inflamacije**

45

šape pacova [128,129]. Inflamacija kod svih pacova je izazvana intraplantarnom primjenom 1 mL 0.5% fiziološkog rastvora karagenana (Sigma, St. Louis, 91 MO, SAD) u zadnju lijevu šapu. Ispitivani ekstrakti su primijenjeni intraperitonealnom (i.p.) injekcijom u tri doze - 50, 100 i 200 mg/kg. U svakoj od tri eksperimentalne grupe je bilo po 10 pacova. Životinje iz indometacin

grupe (10 pacova) su tretirane i.p. injekcijom indometacina (Sigma, St. Louis, 91 MO, SAD)) suspendovanog u fiziološkom rastvoru, u dozi od 8 mg/kg. Životinje iz kontrolne grupe (10 pacova) su tretirane i.p. injekcijom fiziološkog rastvora. Svi ispitivani agensi (ekstrakti, indometacin, fiziološki rastvor) su primijenjeni 60 min. prije izazivanja inflamacije [128,129]. Kako bi se kvantifikovao antiinflamatorni efekat, mjerena je debljina tkiva lijeve šapice svakog pacova u sljedećim vremenskim intervalima: neposredno prije izazivanja inflamacije (trenutak 0) i 1, 2, 3, 4 sata (trenuci 1, 2, 3 i 4) nakon inflamacije. Debljina tkiva je mjerena na sredini šapice pacova korišćenjem digitalnog kalipera (Aerospace, Kina). Procenat inhibicije edema šapice je računat prema formuli: % inhibicije = $100 \times [1 - (Y_t / Y_c)]$ gdje je Y_t = prosječno povećanje debljine šape u tretiranoj grupi pacova između dva trenutka mjerenja, a Y_c = prosječno povećanje debljine šape u netretiranoj grupi pacova između dva trenutka mjerenja [129].

3.12.3. In silico - studije molekularnog dokinga Efikasnost kvantitativno dominantnih jedinjenja u ekstraktima herbe izopa (rozmarinska i hlorogenska kiselina) u inhibiciji COX-1 i COX-2 receptora je procijenjena in silico, studijama molekularnog dokinga. Afinitet vezivanja ispitivanih jedinjenja je procijenjen pomoću softvera AutoDock 4.2 [130]. Džepovi i mjesta vezivanja za COX-1 i COX-2 su određeni programom AutoGridFR (AGFR). Kristalne strukture ispitivanih enzima COX-1 (PDB ID: 1EKG [131]) i COX-2 (PDB ID: 4PH9 [132]) preuzete su iz RCSB baze podataka Protein Data Bank u PDB formatu. Ciljni receptori su pripremljeni za doking

uklanjanjem ko-kristalizovanog liganda, molekula vode i kofaktora, korišćenjem Discovery Studio 4.0

60

[133]. Grafički korisnički interfejs, AutoDockTools (ADT) [130] korišćen je za izračunavanje Kolmanovih parcijalnih naboja i dodavanje polarnih atoma vodonika. Fleksibilnost liganda je analizirana u ADT, dok je struktura proteina bila rigidna. Podešeno je da se veze liganada mogu rotirati, kako bi se omogućila njihova fleksibilnost. Metod Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) je korišćen za fleksibilni protein-ligand doking. Parametri za LGA metodu su postavljeni na sljedeći način: maksimalni broj od 250 000 energetske evaluacije, maksimalni broj od 27 000 generacija; stopa mutacije od 0.02 i stopa prelaza od 0.8. Algoritmi u AutoDock 4.2 softveru su setovani tako da predvide položaj jedinjenja unutar proteinskog targeta, kao i da izvrše procjenu pomoću funkcija u postavljenoj kutiji sa koordinatnom mrežom. Kutije sa koordinatnom mrežom veličine $48 \times 44 \times 44 \text{ \AA}$ i $38 \times 44 \times 48 \text{ \AA}$ u -x, -y i -z pravcima COX-1 i COX-2 receptora, su korišćene za pokrivanje vezivnog mjesta proteina i prilagođavanje liganda kako bi mogao slobodno da se kreće. Korišćen je mrežni razmak od 0.375 \AA za Auto Grid Runs. Interakcija između ciljnog proteina i ispitivanog jedinjenja, u obliku 3D rezultata je analizirana i ilustrovana korišćenjem programa Discovery Studio 4.0 i AutoDockTools. AutoDock program je računao potrebne vrijednosti na osnovu sljedećeg izraza: $\Delta G_{bind} = \Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{desolv} + \Delta G_{elec} + \Delta G_{total} + \Delta G_{tor} - \Delta G_{unb}$ gdje je ΔG_{bind} procijenjena slobodna energija vezivanja, $\Delta G_{vdw} + \Delta G_{hbond} + \Delta G_{desolv}$ označava zbir energija disperzije i odbijanja (ΔG_{vdw}), vodonične veze (ΔG_{hbond}) i desolvacije (ΔG_{desolv}). ΔG_{total} predstavlja konačnu ukupnu unutrašnju energiju, ΔG_{tor} je torzijska slobodna energija, ΔG_{unb} je energija nevezanog sistema, a ΔG_{elec} je elektrostatička energija. Efikasnost liganda (LE) označava energiju vezivanja liganda za protein po atomu. LE ima jedinicu $\text{kJ mol}^{-1}/\text{teški atom}$. $LE = \Delta G_{bind} / N$ gdje je N broj ne-vodonikovih atoma.

3.13. Statistička analiza Rezultati eksperimenata su predstavljeni kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija.

Analiza glavnih komponenti (eng. principal component analysis (PCA)) i hijerarhijska klaster analiza

34

(HCA) je rađena u cilju ispitivanja međusobnih odnosa hemijskih sastojaka etarskih ulja, korišćenjem softvera: Statistica® v.8.03 i StatistiXL® Version 2.0 add-in for MS Excel®4. Rezultati LC-MS kvantitativne analize, kao i rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata, su analizirani softverom SPSS (verzija 20.0), primjenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa Turkey post hoc testom. Razlike između srednjih vrijednosti

su smatrane statistički značajnim ako je $p < 0.05$. Za ispitivanje genotoksične i

78

antigenotoksične aktivnosti,

rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ($n=3$) \pm standardna greška srednje vrijednosti (eng. Standard error of the mean, SEM). Statistička

9

analiza rezultata komet testa je sprovedena korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa Turkey post hoc testom, u cilju poređenja različitih tretmana u odnosu na odgovarajuće kontrole. Korišćen je softver GraphPad Prism 6.0. Za određivanje efekta ispitivane koncentracije bioaktivnog agensa na ishod, korišćena je metoda regresije. Dobijene vrijednosti (

rezultati) su smatrane statistički značajnim ako je $p < 0.05$, a visoko statistički značajnim ako je $p < 0$

8

.001. U testu citotoksičnosti, parametri IC50, GI50, TGI i LC50 su izračunati korišćenjem softvera

MS Office Excel® free add-in ED50 plus v1.0

1

software5. SPSS alat, verzija 20 je korišćen za statističku obradu podataka. Shapiro-Wilk test je korišćen za ocjenu normalnosti raspodjele podataka. Zavisno od testa normalnosti,

za poređenje između grupa korišćena je jednofaktorska analiza varijanse (ANOVA) ili Kruskal-Wallis test

64

. U COX-1 i COX-2 testu,

korišćene su metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna devijacija i

41

standardna greška aritmetičke sredine). Za upoređivanje aritmetičkih sredina korišćen je Studentov t test za dva nezavisna uzorka pretpostavljajući da je 0.05 nivo značajnosti. Za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti in vivo, srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD), kao i minimalne i maksimalne vrijednosti su korišćeni kao parametri 3 www.statsoft.com, datum pristupa 1. April 2021. 4 www.statistixl.com, datum pristupa 1. April 2021. 5 www.sciencegateway.org/protocols/cellbio/drug/data/, datum pristupa 1. April 2021. deskriptivne statistike. Normalnost raspodjele je procijenjena korišćenjem testova Shapiro–Wilk i Kolmogorov-Smirnov. Dodatno, podaci su analizirani korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) sa Bonferroni post hoc testom za višestruka poređenja. Statistička značajnost se zasnivala na vrijednosti $p < 0.05$. Kompletna statistička analiza je sprovedena korišćenjem alata SPSS Statistics 22 (SPSS, Chicago, IL).

4. REZULTATI I DISKUSIJA 4.1. Rezultati preliminarne makroskopske i mikroskopske analize

6

herbe izopa Makroskopska analiza Makroskopskom analizom herbe izopa utvrđeno je da su listovi sivkasto zeleni, izduženo eliptični do lancetasti, zašiljeni na vrhu i veoma tačkasti sa obje strane od brojnih žljezdanih dlaka sa etarskim uljem. Iako površina lista djeluje glatko kada se posmatra golim okom, tek pod uvećanjem lupe se vide neravnine tj. ispupčenja od brojnih nežljezdanih i žljezdanih dlaka, koje pokrivaju i lice i naličje listova na stablu, ali i listova koji su prisutni u cvastima (Slika 4.1.). Slika 4.1. Prikaz lista izopa pod triokularnom lupom Olympus SZ61 Brojne žljezdane dlake ispunjene etarskim uljem, čine ovu biljku izuzetno aromatičnom. Mirisa je jakog, prijatnog; ukusa takođe aromatičnog, kamforastog i nagorkog. Stabljike su uspravne, četvrtaste, pokrivene kratkim dlakama i svijetlo zelenkaste iznad odrvenjelog dijela, koji je pri zemlji. Listovi su naspramno postavljeni (Slika 4.2.). Slika 4.2. Stabljika izopa; nodus Cvjetovi su tamno plavo-ljubičaste boje, grupisani u cvasti pri vrhu stabljike, koje su orjentisane na jednu stranu. Čašica je cjevasta, pokrivena dlačicama, modra, sa pet jednakih zubaca; krunica dvousnata, tamno plava do ljubičasta. Prašnici (4) vire iz krunice. Izgled cvijeta i cvasti pod uvećanjem lupe je prikazan na Slici 4.3. Slika 4.3. Cvijet izopa Mikroskopska analiza Kada je u pitanju list izopa, karakteriše ga izobilateralna građa; sa lica i naličja su redom: ? ? ? ? ? epidermis prevučen razvijenom kutikulom (ćelije epidermisa su izdužene, zadebljalog ćelijskog zida sa spoljne strane) palisadno tkivo (sa dva sloja ćelija) u centralnom dijelu sunđerasti parenhim (jednoslojan) zatvoreni kolateralni sprovodni snopić i kolenhim sa unutrašnje strane lica i naličja, u centralnom nervu (Slika 4.4.). Slika 4.4. Poprečni presjek lista izopa (izobilateralna građa) Stome su diacitne, brojne, nalaze se i na licu i na naličju (amfistomatični listovi) (Slika 4.4.). Žljezdane dlake su brojne na licu i naličju, i to kapitatne (sa jednoćelijskom drškom i glavicom koju čine jedna ili dvije ćelije) i peltatne (sa jednoćelijskom drškom i sekretornom glavicom koju čini osam ćelija u istom nivou) (Slika 4.5.). Pored žljezdanih dlaka, na epidermisu lista (posebno na naličju), u manjem obimu su prisutne i nežljezdane dlake, koničnog oblika, obično jednoćelijske, kratke, dok u predjelu centralnog nerva mogu biti i duže, izgrađene od najčešće tri ćelije (Slika 4.5.). Slika 4.5. Žljezdane (kapitatne i peltatne) i nežljezdane dlake na epidermisu lista izopa Stablo izopa na poprečnom presjeku je četvorougao. U primarnoj građi stabla (Slika 4.6.) se, od površine ka centru presjeka, razlikuju: ? epidermis, sa izduženim, na

presjeku, poligonalnim ćelijama (u jednom sloju), koje pokriva tanka kutikula. Na epidermisu se mogu uočiti dlake kao i na listu: žljezdane (kapitatne i peltatne) i nežljezdane; ? ? ? ? kolenhim (u uglovima stabla) i hlorenhim (parenhim za fotosintezu) u ravnom dijelu ispod epidermisa, koji zajedno formiraju primarnu koru; središnji dio stabla - centralni cilindar započinje periciklom, kog čine sklerenhimska vlakna i sitne parenhimske ćelije; sprovodni elementi (floem periferno i ksilem iznutra; s obzirom da biljka ima sekundarno debljanje, između floema i ksilema nalazi se kambijum); krupne ćelije parenhima srži. Slika 4.6. Glavni elementi u primarnoj građi stabla izopa Kada su u pitanju praškovi, analizirano je svih šest uzoraka i zabilježeni su neki karakteristični elementi u građi lista, stabla i cvijeta (Slike 4.7., 4.8., 4.9. i 4.10.). Slika 4.7. Epidermis sa svim tipovima trihoma Slika 4.8. Prašak herbe izopa; karakteristični elementi građe lista i stabla Slika 4.9. Prašak herbe izopa; karakteristični elementi građe lista i stabla * U ksilemu (na slici), najčešće se zapažaju traheidalni elementi sa spiralnim zadebljanjima sekundarnog ćelijskog zida Slika 4.10. Prašak herbe izopa; karakteristični elementi cvijeta * Ćelije epidermisa cvijeta su izrazito valovitih bočnih ćelijskih zidova Svi ispitivani uzorci su pokazali iste anatomske elemente, odnosno nije bilo značajnih razlika među uzorcima kada je u pitanju mikroskopska analiza. Kada je u pitanju organoleptičko ispitivanje, uočile su se manje razlike u smislu intenziteta mirisa, intenziteta boje cvjetova, odnosno visine cvjetnih grančica i veličine listova, što je vjerovatno posljedica samog staništa na kom je sakupljanje izvršeno, osunčanosti predjela i sl. 4.2. GC-MS analiza etarskih ulja Hidrodestilacijom herbe izopa, *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*, porijeklom sa 5 različitih prirodnih lokaliteta u Crnoj Gori, kao i komercijalnog uzorka iz Srbije dobijeno je etarsko ulje blijedo žućkasto-zelene boje, karakterističnog, prijatnog mirisa. Prinos etarskog ulja se kretao u opsegu od 0.4 do 0.79% (v/w), za uzorke sakupljene na prirodnim lokalitetima u Crnoj Gori, dok je najveći prinos etarskog ulja dobijen iz komercijalnog uzorka (Srbija) i iznosio je 1% (v/w). Rezultati GC-MS analize etarskih ulja (1EO-6EO) dobijenih iz ispitivanih uzoraka *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (1-6, Tabela 3.1.) su dati u Tabeli 4.1., a odgovarajući hromatogrami na Slikama 4.11. - 4.16. Sveukupno 12 do 16 jedinjenja je identifikovano, u zavisnosti od uzorka, što je ukupno više od 98% ulja u prosjeku, sa jednim izuzetkom (uzorak 2EO), gdje je procenat identifikovanih jedinjenja bio manji (86.84%). Tabela 4.1. Sastav etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*. *-Aritmetički retencioni indeks. Sadržaj (%)

tR [min] AI * Jedinjenje 1EO 2EO 3EO 4EO 5EO 6EO 5.517 925 α

1

-Tujen 5.706 932 α-Pinen 6.762 972 Sabinen 6.872 976 β-Pinen 7.238 990 β-Mircen 8.343 1024 p-Cimen 8.482 1028 Limonen 8.569 1030 1,8-Cineol 8.765 1036 Z-β-Ocimen 9.142 1046 E-β-Ocimen 9.531 1057 γ-Terpinen 12.592 1138 trans-Pinokarveol 13.463 1159 trans-Pinokamfon 13.556 1162 Pinokarvon 14.027 1173 cis-Pinokamfon 14.961 1196 Mirtenal 20.403 1325 Mirtenil acetat 22.856 1384 β-Burbonen 23.758 1406 Metil eugenol 24.265 1418 E-β-Kariofilen 26.771 1480 Germakren D 0.00 0.51 2.08 4.13 1.86 1.24 6.73 9.13 0.93 0.46 0.27 1.92 7.99 7.99 67.10 42.07 3.57 2.94 0.27 0.00 0.31 0.58 0.23 2.26 0.00 1.84 0.00 1.20 1.15 5.61 0.32 3.71 0.00 1.25 0.00 0.00 5.43 0.00 0.47 0.00 0.40 0.00 0.00 1.05 1.12 0.53 0.57 0.47 16.33 15.79 0.46 0.00 0.00 0.00 16.11 23.81 9.77 1.42 2.06 1.88 0.00 0.00 0.00 0.00 0.83 0.54 3.34 8.34 3.99 1.67 22.75 14.72 1.02 0.66 0.00 0.00 0.00 0.00 19.24 28.33 0.00 0.00 0.00 0.00 1.44 0.79 0.54 9.69 0.43 0.00 21.77 38.19 3.11 0.00 0.00 0.00 4.72 0.00 14.54 0.69 0.00 0.00 3.52 0.00 0.00 0.00 1.03 0.56 5.48 0.36 0.28 15.43 56.08 3.06 0.00 0.00 0.61 0.00 0.41 0.00 0.80 0.00 0.31 13.70 0.00 0.36

Monoterpenski ugljovodonici Oksidovani monoterpeni Seskviterpenski ugljovodonici Fenilpropanoidi Identifikovana jedinjenja (ukupno) 24.01 68.8 0.87 5.43 99.11 28.9 36.65 43.53 37.77 26.2 57.94 41.7 27.35 58.14 57.9 0.00 0.00 0.00 0.00 0.67 0.00 19.24

28.33 3.52 13.70 86.84 97.59 99.21 99.43 98.47 1.0 0.9 0.8 Relative Intensity 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 8.579 5.701 6.759 6.870
7.238 8.651 8.763 14.038 23.767 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.11. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (1EO) 1.0 0.9 0.8 Relative Intensity 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 8.566 5.705 6.866 8.480 8.343 8.767 13.460 14.021
14.162 14.954 30.511 31.046 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.12. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (2EO) 1.0 0.9 0.8 Relative Intensity 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 6.870 8.476 14.025 8.561 23.733 5.705 8.758 13.460 4 6 8
10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.13. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (3EO) 8.480 1.0 0.9 0.8 6.870 Relative Intensity 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 14.021 23.724 13.460 8.763 4 6 8 10 12 14 16
18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.14. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (4EO) 8.570 1.0 0.9 0.8 Relative Intensity 0.7 8.484 0.6 0.5 0.4 0.3 0.2 0.1 6.870 14.021 5.705 8.759 13.460 4 6 8 10 12
14 16 18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.15. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (5EO) 8.574 1.0 0.9 0.8 Relative Intensity 0.7 0.6 0.5 0.4 0.3 8.489 0.2 23.741 6.870 0.1 5.705 6.763 8.763 4 6 8 10 12
14 16 18 20 22 24 26 28 30

Retention Time (min) Slika 4.16. **GC-MS hromatogram etarskog ulja** Hyssopus officinalis **subsp**

. aristatus (6EO) Prema dobijenim rezultatima, dominantna grupa identifikovanih isparljivih jedinjenja su bili monoterpeni (70.88%-95.91%). Njihovi oksidovani derivati su bili najzastupljeniji (41.7%-68.8%), a među njima se po sadržaju izdvajaju 1,8-cineol i cis-pinokamfon. Jedino je u uzorku 4EO (Piva), sadržaj monoterpenskih ugljovodonika (43.53%) bio veći od sadržaja oksidovanih derivata monoterpena. Kada su u pitanju monoterpenski ugljovodonici dominantna jedinjenja su bila β -pinen i limonen. Metil eugenol (do 28.33%), jedino jedinjenje koje pripada fenilpropanoidnoj grupi i seskviterpenski ugljovodonici (do 0.87%) su bili prisutni u manjem procentu. Monoterpenski ugljovodonici: β -pinen, limonen, Z- β -ocimen, α -pinen, sabinen, kao i oksidovani monoterpenski derivat - mirtenal, su bili prisutni u svim ispitivanim uzorcima. Analiza glavnih komponenti (PCA) je potvrdila postojanje značajnih hemijskih varijacija u ispitivanim etarskim uljima. PCA izvršena na cijelom skupu podataka je pokazala pet glavnih komponenti (eng. principal components, PCs), pri čemu prve tri čine više od 86% ukupne varijanse (Slika 4.17.). Sastojci etarskih ulja koji najviše doprinose odgovarajućim PCs su predstavljeni u Tabeli 4.2., kao i njihova opterećenja i ocjene. Duž prve PC ose, detektovan je najveći broj značajnih pokazatelja razdvajanja (faktor opterećenja veći od ± 0.7). Ose druge i treće glavne komponente (PCs) dodatno su naglasile hemijske varijacije između uzoraka. Slika 4.17. Dijagrami analize glavnih komponenti (PCA) - ocjene (a) i opterećenja (b) duž osa prve dvije glavne komponente (PC); rezultati su izvučeni iz skupa podataka etarskih ulja *Hissopus officinalis*, iz šest međusobno nezavisnih izvora, kao što je navedeno u Tabeli 4.1. Tabela 4.2. Opterećenja komponenti (eng. component loadings) i koeficijenti komponentnih ocjena (sopstveni vektori) (eng. component score coefficients (eigenvectors)) za sastojke etarskih ulja *Hyssoopus officinalis*. Značajni pokazatelji razdvajanja (faktorska opterećenja veća od ± 0.7) su boldovani. Varijabla Opterećenja komponenti Koeficijenti komponentnih ocjena (sopstveni vektori)

PC 1 PC 2 PC 3 PC 4 PC 1 PC 2 PC 3

54

PC 4 α -Tujen 0.472 0.146 -0.128 0.858 0.150 0.061 -0.081 0.607 α -Pinen -0.707 0.700 0.093 -0.008 -0.224 0.292 0.059 -0.006
 Sabinen -0.863 -0.019 0.473 0.060 -0.274 -0.008 0.299 0.042 β -Pinen 0.821 0.285 0.476 -0.134 0.260 0.119 0.301 -0.095 β -
 Mircen -0.798 -0.271 0.412 -0.021 -0.253 -0.113 0.260 -0.015 p-Cimen -0.562 0.808 -0.145 0.016 -0.178 0.337 -0.091 0.012
 Limonen 0.902 -0.239 -0.205 0.292 0.286 -0.100 -0.130 0.206 1,8-Cineol -0.905 -0.324 -0.237 0.095 -0.287 -0.135 -0.150 0.067

Z- β -Ocimen -0 .866 - 0 .301 - 0 .164 0 .310 - 0 .275 - 0 .126 - 0 .104 0

32

.219

E- β -Ocimen -0 .645 - 0 .490 0 .552 0 .050 - 0 .205 - 0 .204 0 .349 0

32

.036 γ -Terpinen -0.745 0.610 0.190 0.097 -0.236 0.254 0.120 0.069 trans-Pinokarveol -0.274 0.915 -0.091 -0.266 -0.087 0.381
 -0.057 -0.188 trans-Pinokamfon 0.851 0.166 0.163 0.376 0.270 0.069 0.103 0.266 Pinokarvon 0.550 0.367 0.387 -0.609 0.174

0.153 0.244 -0.430 cis-Pinokamfon 0.813 0.204 0.403 0.011 0.258 0.085 0.254 0.008 Mirtenal -0.311 0.939 -0.147 -0.015 -0.099 0.391 -0.093 -0.011 Mirtenil acetat -0.427 0.893 -0.098 0.073 -0.135 0.372 -0.062 0.052 β -Burbonen -0.143 -0.348 -0.812 -0.444 -0.045 -0.145 -0.513 -0.314 Metil eugenol 0.775 -0.214 0.091 -0.411 0.246 -0.089 0.057 -0.290 E- β -Kariofilen -0.645 -0.490 0.552 0.050 -0.205 -0.204 0.349 0.036 Germakren D -0.642 -0.667 -0.149 -0.290 -0.204 -0.278 -0.094 -0.205

Klaster analiza cijelog skupa podataka je pokazala sličnost u hemijskom sastavu etarskih ulja: - komercijalnog uzorka *H. officinalis* i uzorka sakupljenog na lokalitetu Cuce, Crna Gora (Klaster 1) - uzoraka sakupljenih na lokalitetima Kuči i Piperi (Klaster 2) i - uzoraka sakupljenih na lokalitetima Šavnik i Piva (Klaster 3), kao što je pokazano na Slici 4.18. Rezultati su pokazali da je klasifikacija koju predlaže PCA analiza u saglasnosti sa HCA analizom. Slika 4.18. Dendrogram prikazuje odnose sličnosti hemijskog sastava etarskih ulja *Hissopus officinalis*. Za ovu analizu uzet je u obzir čitav hromatografski skup podataka. Korišćeno je prosto povezivanje (engl. single linkage); Metrika udaljenosti je euklidska udaljenost (nestandardizovana). Dobijeni rezultati su pokazali veliku varijabilnost u sastavu etarskih ulja, budući da se mogu razlikovati tri hromatografska profila ispitivanih etarskih ulja izopa samoniklog u Crnoj Gori: ? etarska ulja bogata 1,8-cineolom i relativno bogata β -pinenom, ali sa niskim sadržajem cis-pinokamfona; ? etarska ulja bogata β -pinenom, limonenom, cis-pinokafonom i metil eugenolom, ali sa relativno niskim sadržajem 1,8-cineola; ? etarska ulja relativno bogata 1,8-cineolom, limonenom, β -pinenom i cis-pinokampfonom. Naime, etarsko ulje dobijeno iz biljnog materijala sakupljenog na lokalitetu Cuce u Crnoj Gori (uzorak 6EO) je bilo slično etarskom ulju komercijalnog uzorka iz jugoistočne Srbije (uzorak 1EO), po visokom sadržaju 1,8-cineola, relativno visokom sadržaju β -pinena i niskom sadržaju cis-pinokamfona. Sa druge strane, etarska ulja dobijena iz biljnog materijala sakupljenog na lokalitetima Šavnik i Piva u Crnoj Gori (uzorci 3EO i 4EO) su pokazala visok sadržaj β -pinena, limonena, cis-pinokamfona i metil eugenola, ali relativno nizak sadržaj 1,8-cineola. Na kraju, etarska ulja dobijena iz biljnog materijala sakupljenog na lokalitetima Kuči i Piperi u Crnoj Gori (uzorci 2EO i 5EO), su pokazala relativno visok sadržaj 1,8-cineola, limonena, β -pinena i cis-pinokamfona. Prema dosadašnjim ispitivanjima, najkarakterističniji i najvažniji sastojci etarskog ulja *H. officinalis* su 1,8-cineol [31,35,36], cis-pinokamfon, trans-pinokamfon i njihov prekursor β -pinen [31,33]. Među drugim, važnijim sastojcima su: pinokarvon, sabinen, germakren D, germakren-D-4-ol, α -, β -felandren, 4-karvomentol, timol, karvakrol, elemol, limonen, linalool, α -terpinen, mirtenol, mirtenil acetat i metil eugenol [15]. Kada je u pitanju izop, koji raste na teritoriji Srbije, Mitić i sar. (2000) su identifikovali cis-pinokamfon (44.7%) kao dominantan sastojak dobijenog etarskog ulja. Drugi zastupljeniji sastojci su bili trans-pinokamfon (

14.1 %), germakren- **D-11-ol (5.7** %) i **elemol (5.6** %) [33]. **Gorunović** i sar. (**1995**

1

) su ispitivali hemijski sastav etarskog ulja izopa samoniklog na teritoriji Crne Gore (Petnjica) i utvrdili da su dominantni sastojci metil

eugenol (38.30 %), limonen (**37.40** %) i **β** -pinen (**9.6** %) [34]. **Hajdari** i sar. (**2018**

1

) su ispitivali sastav etarskog ulja herbe samoniklog izopa, *H. officinalis* subsp. *aristatus* sa pet različitih lokaliteta na Kosovu i utvrdili da je u četiri od pet uzoraka, dominantan sastojak *cis*-pinokamfon, sa sadržajem u opsegu od 30.44% do 57.73%. U jednom od lokaliteta dominantno jedinjenje je bilo 1,8-cineol (45.27%). Značajan je bio i sadržaj *trans*-pinokamfona (14.76%) u jednom od uzoraka, kao i β -pinena (23.31%) i kariofilen oksida (12.66%) [35]. Etarska ulja dobijena od herbe samoniklog *H. officinalis* L. subsp. *aristatus* (Bugarska) u dvije različite faze razvoja biljke (tokom formiranja cvjetnih pupoljaka i u fazi punog cvjetanja) su bila slična po sastavu, sa 1,8-cineolom (48.2% i 39.6%), izopinokamfonom (16.3% i 29.2%) i β -pinenom (11.4% i 39.6%) kao glavnim sastojcima. Kada je u pitanju etarsko ulje dobijeno od gajenog *H. officinalis* - sadržalo je veće količine izopinokamfona (40.2%), pinokamfona (10.3%) i β -pinena (14.2%), ali ne i tragove 1,8-cineola [36]. U etarskom ulju herbe samoniklog *H. officinalis* subsp. *aristatus* (Italija), glavni sastojak je bio linalool (35.3-51.2%), takođe su nađeni i metil

eugenol (7.3-22.7 %), limonen (**3.7- 4.4 %**), germakren **D (1.9-4.1%), (Z)- β** -ocimen (**5.1-5.8** 1 %) i (**E)- β** -ocimen (**2.1-5.3**

%) [32]. Sumirano, dosadašnji literaturni podaci navode brojna jedinjenja koja su identifikovana u etarskom ulju izopa (kako je navedeno i u Tabeli 1.1.), kao i da je opisano nekoliko hromatografskih profila. Razlike u sastavu etarskog ulja (koje potiču od različitih faktora, kao što su: klimatski uslovi, porijeklo biljnog materijala, podvrsta ili varijetet, faza razvoja u kojoj se biljka nalazila u momentu kada je sakupljan biljni materijal, tip zemljišta, tehnologija uzgoja, metode ekstrakcije i sl.) utiču na organoleptička i fiziološka svojstva etarskog ulja, a samim tim i na mogućnost primjene [15,31-37]. 74 4.3. Hemijska analiza metanolnih ekstrakata i sadržaj ukupnih fenolnih sastojaka Rezultati LC-DAD-MS analize metanolnih ekstrakata (1E-6E) ispitivanih uzoraka herbe *H. officinalis* subsp. *aristatus* (1-6, Tabela 3.1.), su predstavljeni

u Tabelama 4.3. i 4.4., kao i na Slikama 4 .19. i 4

59

.20. Naime, LC-DAD-MS analizom metanolnih ekstrakata herbe izopa je pokazano prisustvo fenolnih jedinjenja: siringinske kisjeline (kao derivata benzojeve kisjeline), derivata hidroksicimene kisjeline (hlorogenska kisjelina, feruloilhina i rozmarinska kisjelina, kao i jedinjenje kafeoil pentozid) i flavonoida (derivati kvercetina i diosmetina). Podaci o identifikovanim jedinjenjima, njihovim spektralnim karakteristikama i retencionim vremenima, su dati u Tabeli 4.3. Usporedni prikaz hromatograma ispitivanih ekstrakata (1E-6E), snimljenih na 320 nm je dat na Slici 4.19. Na osnovu relativnih površina dobijenih pikova (%), pokazano je da se hlorogenska i rozmarinska kisjelina, mogu smatrati kvantitativno dominantnim jedinjenjima. Tabela 4.3. Identifikovana jedinjenja, retencionna vremena, UV i MS spektralni podaci fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *H. officinalis* subsp. *aristatus*. a Identifikacija izvršena poređenjem sa komercijalno dostupnim referentnim jedinjenjima. b Tentativna identifikacija (izvršena poređenjem dobijenih UV i MS spektralnih podataka sa literaturnim podacima). Pik

tr (min) UV λ max (nm) ESI-MS Podaci (**m/z**) Jedinjenje **1 4.255 280 395.1 [2M-H]⁻, 197 [M-H]⁻, 3**
153.1 Siringinska kisjelina **b 2 9.107 218, 240** , 298sh, **326 707.1 [2M-H]⁻, 353.1 [M-H]⁻, 191**

Hlorogenska kisjelina (**5-O** -kafeoilhina kisjelina) **a 3 10.954 218, 238** , 298sh, **328 623.1 [2M-H]–, 311.1 [M-H]–, 134.1** Kafeoil pentozid **b 4 12.087 218, 238** , 296sh, **326 735.2 [2M-H]–, 367.1 [M-H]–, 173.1**
 Feruloilhina kisjelina **b 5 15.339 256** , 266sh, **356 463.1 [M-H]–, 300.1** Kvercetin **O** -heksozid **b 6 17.215 252, 266, 348 607.2 [M-H]–, 299.1, 284 Diosmetin O** -deoksiheksozil- heksozid **b 7 18.461** 286sh, **328 719.1 [2M-H]–, 359 [M-H]–, 197, 161.1** Rozmarinska kisjelina **a** a) b) Slika **4**

.19. Usporedni prikaz LC-DAD hromatograma metanolnih ekstrakata (1E–6E) *H. officinalis* snimljenih na 320 nm (različiti vizuelni prikazi - a) i b)). CA – hlorogenska kisjelina (eng. chlorogenic acid), RA – rozmarinska kisjelina (eng. rosmarinic acid). Slika 4.20. Identifikovani pikovi na primjeru LC-DAD hromatograma metanolnog ekstrakta herbe *H. officinalis* komercijalnog uzorka (1E), snimljen na 320 nm; Identifikacija svakog pika i odgovarajući podaci su dati u Tabeli 4.3. Identifikovana fenolna jedinjenja su bila prisutna u svim ispitivanim ekstraktima, bez obzira na mjesto sakupljanja biljnog materijala. Varijabilnost među ekstraktima se ogledala kroz relativno male razlike u koncentracijama pojedinih sastojaka. Sadržaj hlorogenske kisjeline je bio u opsegu od 23.35 do 33.46 mg/g, dok je sadržaj rozmarinske kisjeline bio manji, od 3.53 do 17.98 mg/g (Tabela 4.4.). Među analiziranim ekstraktima, ekstrakt 4E je bio najbogatiji kada je u pitanju sadržaj hlorogenske i rozmarinske kisjeline. Tabela 4.4. Sadržaj ukupnih fenola, hlorogenske i rozmarinske kisjeline u metanolnim ekstraktima *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*. Različita slova u superskriptu označavaju statistički različite vrijednosti pri $p < 0.05$. Uzorak Ukupni fenoli Hlorogenska kisjelina Rozmarinska kisjelina (

mg GAE/g) (mg/g) (mg/g) 1E 74.7 ± 0.8 c 23.35 ± 0.2 a 13.71 ± 0.19 d 2E 68.2 ± 0.8 b 30.94 ± 0.11 d 5.35 ± 0.02 b 3E 64.1 ± 1.3 a 24.12 ± 0.11 b 3.53 ± 0.03 a 4E 112.0 ± 1.6 e 33.46 ± 0.08 e 17.98 ± 0.25 e 5E 81.8 ± 0.8 d 33.17 ± 0.1 e 4.97 ± 0.12 b 6E 69.0 ± 0.3 b 30.19 ± 0.1 c 8.13 ± 0.04 c 1

Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima. Naime, prethodne studije sa etanolnim i deodorisanim vodenim ekstraktima nadzemnih djelova samoniklog *H. officinalis* subsp. *aristatus* (porijeklom iz centralne Italije i istočne Srbije), su 77 pokazali prisustvo hlorogenske kisjeline, rozmarinske kisjeline, 4-O-feruloilhine kisjeline i siringinske kisjeline [31,32]. Flavonoidi, izokvercitrin (kvercetin 3-O-glukozid) i diosmin (diosmetin 7-O-rutinozid), su takođe prethodno detektovani u ekstraktima herbe izopa [40,41]. U studiji koju su sproveli Borelli i sar. (2019), etanolni macerat herbe izopa je analiziran sa hemijskog aspekta, i potvrđeno je prisustvo kafeoil pentozida, derivata hidroksicimetne kisjeline [134]. Nalazi drugih autora, kada je u pitanju kvantitativni sastav različitih ekstrakata herbe izopa su u saglasnosti sa dobijenim rezultatima u ovoj disertaciji. Naime, Venditti i sar. (2015), kao i Hatipoğlu i sar. (2013), su pokazali da je sadržaj hlorogenske kisjeline najveći kada su u pitanju fenolna jedinjenja [32,43]. Detaljnom analizom, utvrđeno je da je sadržaj hlorogenske kisjeline u ispitivanim uzorcima u okviru ove disertacije bio 4 do 5 puta veći od sadržaja koji se navodi u dostupnim literaturnim podacima, dok je sadržaj rozmarinske kisjeline bio približno sličan onom u dostupnoj literaturi. Međutim, određene varijacije su očekivane i mogu se objasniti brojnim faktorima, kao što su razlike u: rastvaraču za ekstrakciju, metodologiji ekstrakcije, porijeklu biljnog materijala i/ili razvojnoj fazi biljke za vrijeme sakupljanja biljnog materijala. Sadržaj ukupnih polifenola (TPC, eng. the contents

of total polyphenols), u ispitivanim uzorcima se kretao između 64.1 i 112.0 mg GAE/g (Tabela 4.4., Slika 4.21.). Najveći sadržaj ukupnih polifenola je utvrđen u ekstraktu 4E (112

mg GAE/g), a najniži **u ekstraktu** 3E (64.1 **mg GAE/g**). Uzorak (4E) koji **je**

43

bio najbogatiji hlorogenskom i rozmarinskom kisjelinom, je takođe bio najbogatiji i ukupnim polifenolnim jedinjenjima. Redosljed preostalih ekstrakata, prema opadajućem sadržaju ukupnih polifenola je bio sljedeći: 5E > 1E > 6E > 2E. Slika 4.21. Sadržaj ukupnih polifenola u ispitivanim metanolnim ekstraktima (1E–6E) *H. officinalis* Prethodne studije su dale različite rezultate,

što je i očekivano s obzirom na to da na

31

sadržaj ukupnih polifenola mogu uticati brojni faktori. Naime, vrijednosti ukupnih polifenolnih jedinjenja, dostupne u literaturi, za nekoliko različitih preparata herbe *H. officinalis* su bile u dosta širokom opsegu - od 2.69 do 497.6 mg GAE/g [31,35,40,43,64,69,134] (Tabela 4.6.). 4.4. Antioksidativna aktivnost Suvi metanolni ekstrakti (1E-6E) herbe izopa su pokazali značajnu antioksidativnu aktivnost u DPPH i FRAP testovima (Tabela 4.5.). Tabela 4.5. Ukupna antioksidativna aktivnost i sposobnost neutralizacije 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikala u metanolnim ekstraktima *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*. Različita slova u superskriptu ukazuju na statistički različite vrijednosti pri $p < 0.05$. Uzorak 1E 2E 3E 4E 5E 6E
Rutin Ascorbinska kisjelina DPPH-IC50 ($\mu\text{g/mL}$) 88.42 \pm 3.48 d 175.41 \pm 2.92 e 199.89 \pm 0.60 f 56.04 \pm 0.19 b 79.37 \pm 1.51 c 87.90 \pm 0.67 d 4.67 \pm 1.41 a - FRAP mmol Fe²⁺/g 0.815 \pm 0.012

b 0 .781 \pm **0** .012 **a,b** 0.667 \pm **0** .004 **a 0** .959 \pm **0** .003 **c 0** .877 \pm **0** .007 b,c
0 .736 \pm **0**

55

.023 a,b 4.111 \pm 0.0253 d 8.181 \pm 0.136 e Najniža IC50 vrijednost, odnosno, najbolja sposobnost neutralizacije DPPH radikala, je pokazana za ekstrakt

4E (56.04 $\mu\text{g/mL}$) , zatim za ekstrakt **5E (79.37 $\mu\text{g/mL}$)**

1

), dok je najniža aktivnost zabilježena za ekstrakt 3E (199.89 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 4.5., Slika 4.22.). Slika 4.22. Grafički prikaz IC50 vrijednosti šest ispitivanih metanolnih ekstrakata (1E-6E) herbe *H. officinalis* Ovi rezultati dobro koreliraju sa vrijednostima za ukupnu antioksidativnu aktivnost, procijenjenu FRAP testom. Naime, najveća FRAP vrijednost je dobijena za ekstrakt 4E (0.959 mmol Fe²⁺/g), zatim za ekstrakt 5E (0.877 mmol Fe²⁺/g), dok je najniža vrijednost ponovo dobijena za ekstrakt 3E (0.667 mmol

Fe²⁺/g) (Tabela 4.5., Slika 4.23.). Slika 4.23. Grafički prikaz FRAP vrijednosti šest ispitivanih metanolnih ekstrakata (1E-6E) herbe *H. officinalis* Podaci dobijeni u antioksidativnim testovima, za tri navedena ekstrakta (4E, 5E i 3E), su u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenola, koji su poznati kao sastojci koji doprinose antioksidativnoj aktivnosti biljaka. Kada su u pitanju ekstrakti 1E, 2E i 6E nije postojala tako dobra korelacija između antioksidativne aktivnosti i sadržaja ukupnih polifenolnih jedinjenja. Poređenjem sa standardnim supstancama (rutin i askorbinska kiselina), ispitivani preparati izopa su bili manje efikasni u neutralisanju DPPH radikala i redukciji Fe (III)-tripiridil-triazin kompleksa (Tabela 4.5.).

Uzimajući u obzir dobijene rezultate, može se zaključiti da je

27

pokazana umjerena antioksidativna aktivnost (IC₅₀ < 100 µg/mL) za četiri od šest analiziranih uzoraka, pri čemu je najbolju aktivnost pokazao ekstrakt 4E. Prema dostupnim podacima iz literature, postoje značajne varijabilnosti u IC₅₀ vrijednostima (25-2970 µg/mL) dobijenim u DPPH testu [31,35,40,43,64,69,134] (Tabela 4.6.), što se može objasniti različitim geografskim porijeklom biljnog materijala, razlikama u proceduri ekstrakcije i protokolu ispitivanja antioksidativne aktivnosti. Kada je u pitanju ukupna antioksidativna aktivnost, Stanković i sar. (2016) su ispitivali metanolni ekstrakt vegetativnih djelova *H. officinalis* iz jugoistočne Srbije i utvrdili da je njegova FRAP vrijednost 0.73 mmol Fe²⁺/g [135]. FRAP vrijednost dobijena u okviru ove disertacije, koja se kretala od

0.667 mmol Fe²⁺/g do 0.959 mmol Fe²⁺/g

1

, korelira sa gore navedenom vrijednošću iz literature. Hemijski sastav, može pomoći u objašnjavanju utvrđene antioksidativne aktivnosti. Naime, prethodno objavljeni radovi, pružaju dokaze da dominantna jedinjenja ispitivanih ekstrakata (hlorogenska i rozmarinska kiselina), pokazuju značajnu efikasnost u neutralizaciji DPPH radikala i redukciji kompleksa jona gvožđa [136-140]. Tabela 4.6. Pregled literaturnih podataka o sadržaju ukupnih polifenola i IC₅₀ vrijednostima u DPPH testu različitih ekstrakata izopa (*H. officinalis* L.), porijeklom iz nekoliko različitih geografskih regiona Uzorak DPPH IC₅₀ Sadržaj ukupnih fenola Literatura *H. officinalis* L. (samonikli, Iran); herba n-butanolni ekstrakt 25 µg/mL etil acetatni ekstrakt 103 µg/mL 246 mg GAE/g 51 mg GAE/g [64] *H. officinalis* L. ssp. *angustifolius* (samonikli, Turska); listovi vodeni ekstrakt 18.80 µg/mL metanolno-vodeni ekstrakt (1:1) 28.80 µg/mL hloroformski ekstrakt 250 µg/mL 4.70±0.04%w/w 4.26±0.06%w/w 4.19±0.03%w/w [43] *H. officinalis* L. subsp. *angustifolius* (samonikli, Turska); herba metanolni ekstrakt 117 µg/mL 75 mg GAE/g [69] *H. officinalis* L. subsp. *aristatus* (samonikli, Kosovo, Prizren); herba metanolni ekstrakt 95.57±5.30 % 84.28±20.18mg CAE/g* (*CAE-catechin equivalent) 2.69±0.09 mg GAE/g [35] *H. officinalis* L. subsp. *aristatus* (samonikli, Srbija); herba deodorisani vodeni ekstrakt 540 µg/mL deodorisani metanolni ekstrakt 820 µg/mL deodorisani etil acetatni ekstrakt 2970 µg/mL 96.47 mg GAE/L 71.18 mg GAE/L 15.06 mg GAE/L [31] *H. officinalis* L. (samonikli, Rumunija); herba etanolni ekstrakt 125.44±4.70µg/mL 77.72±1.83 mg GAE/g [40] *H. officinalis* subsp. *aristatus* (samonikli, Južna Italija); herba etanolni ekstrakt 40.1 µg/mL 497.6 ± 40.9 mg GAE/g [134] 4.5. Antimikrobna aktivnost Rezultati ispitivanja antimikrobne aktivnosti etarskih ulja herbe izopa su predstavljeni u Tabeli 4.7. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etarskih ulja herbe izopa (1EO-6EO) na ispitivane bakterijske sojeve je bila

uglavnom > 500 µg/mL i dosta slabija u odnosu na antibiotike, ceftriakson i amikacin, koji su korišćeni za poređenje. Nešto bolja aktivnost, odnosno manja MIC vrijednost u odnosu na navedenu, je zabilježena za sojeve: ? *Escherichia coli* i to kod uzoraka 1EO, 3EO, 5EO, gdje je MIC vrijednost bila 400 µg/mL, kao i kod uzorka 6EO, kod kog je MIC vrijednost bila 500 µg/mL; ? *Staphylococcus aureus* i to kod uzorka 3EO, gdje je MIC vrijednost bila 400 µg/mL. Rast *Candida albicans* je inhibiran pri minimalnoj koncentraciji od 500 µg/mL za sve uzorke. Tabela 4.7. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etarskih ulja herbe izopa i antibiotika (ceftriakson i amikacin) (DMSO < 1%) Mikroorganizmi MIC 1EO (µg/mL) MIC 2EO (µg/mL) MIC 3EO (µg/mL) MIC 4EO (µg/mL) MIC 5EO (µg/mL) MIC 6EO (µg/mL) MIC Ceftriakson (µg/mL) MIC Amikacin (µg/mL) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 >500 >500 400 >500 >500 >500 >500 4 4 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 >500 >500 >500 >500 >500 >500 >500 2 0.5 *Escherichia coli* ATCC 8739 400 >500 400 >500 400 500 2 1 *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111 >500 >500 >500 >500 >500 >500 >500 4 0.25 *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 >500 >500 >500 >500 >500 >500 2 2 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 *Candida albicans* ATCC 10231 >500 500 >500 500 >500 500 >500 500 >500 500 >500 500 8 / 2 / Etarska ulje komercijalnog uzorka iz Srbije (1EO) i 6EO (Cuće, Crna Gora), su sličnog sastava, bogata sa 1,8-cineolom i β-pinenom, ali siromašna cis-pinokamfonom. Sa druge strane etarska ulja 3EO i 5EO, prema PCA i HCA analizama nisu pokazala sličan hemijski profil. Naime, dominantan sastojak kod etarskog ulja 5EO je 1,8-cineol, a kod etarskog ulja 3EO cis-pinokamfon. U svakom slučaju, sva navedena etarska ulja (1EO, 3EO, 5EO i 6EO) su pokazala umjerenu antimikrobnu aktivnost na soj *E. coli*, a etarsko ulje 3EO, pored *E. coli* i na soj *S. aureus*. Možemo zaključiti da ovakvoj aktivnosti etarskih ulja 1EO, 3EO, 5EO i 6EO na soj *E. coli* i etarskog ulja 3EO na soj *S. aureus* (pored *E. coli*) vjerovatno doprinose dominantna jedinjenja 1,8-cineol i cis-pinokamfon, ali u sinergiji sa drugim sastojcima, što je u saglasnosti i sa nekim ranije objavljenim literaturnim podacima [52,70]. U literaturi takođe postoje i neki podaci o antimikrobnom djelovanju etarskog ulja izopa na soj gljivice *C. albicans* [30,32,52,70]. Naime, u radu Hristova i sar. (2015) se navodi da je etarsko ulje izopa iz Bugarske (komercijalni uzorak), sa dominantnim sastojcima cis-pinokamfonom, β-pinenom i trans-pinokamfonom, prema soju *C. albicans* pokazalo antigljivični efekat sa MIC vrijednošću 210 µg/mL. Smatra se da bi mehanizam antigljivičnog dejstva etarskog ulja mogao da bude posljedica povećanja permeabilneta ćelijske membrane gljivice, kao i narušavanja normalnog membranskog transporta, djelujući na membransku ATP-azu [30]. Rezultati ispitivanja kombinovanog djelovanja etarskih ulja sa antibiotikom (amikacin), prikazani su u Tabeli 4.8. Kod svih kombinacija je MIC vrijednost etarskog ulja i antibiotika u kombinaciji bila niža nego pojedinačno, što je i očekivano. Međutim, ono što nam je pravi pokazatelj aktivnosti kombinacije jeste FICI vrijednost. Tabela 4.8. Antimikrobna aktivnost etarskih ulja herbe izopa u kombinaciji sa antibiotikom (amikacin) (DMSO < 1%) Mikro- MIC (µg/mL) organizmi 1EO/ Amikacin 2EO/ amikacin 3EO/ amikacin 4EO/ amikacin 5EO/ amikacin 6EO/ amikacin *S. aureus* 200/0.5 200/0.5 200/0.5 200/1 200/1 200/1 *E. coli* 200/0.5 200/0.5 200/0.5 200/1 200/1 200/1 *K. pneumoniae* 400/0.0625 400/0.0625 400/0.0625 200/0.5 200/0.5 200/0.5 *S. typhi* 200/4 200/4 300/2 300/2 300/1 300/1 FICI vrijednost je izračunata za one sojeve, odnosno etarska ulja za koje je to bilo moguće, tj. koji su pri određivanju MIC dali konkretnu vrijednost. Na soj *E. coli* su etarska ulja 1EO i 3EO u kombinaciji sa amikacinom pokazala aditivni efekat (etarska ulja 5EO i 6EO su bila indiferentna); etarsko ulje 3EO je takođe pokazalo aditivni antimikrobni efekat sa antibiotikom i na soj *S. aureus*: FICI (3EO/amikacin, *S. aureus*) = 0.625 (Aditivnost) FICI (1EO/amikacin, *E. coli*) = 1 (Aditivnost) FICI (3EO/amikacin, *E. coli*) = 1 (Aditivnost) FICI (5EO/amikacin, *E. coli*) = 1.5 (Indiferentnost) FICI (6EO/amikacin, *E. coli*) = 1.4 (Indiferentnost) Ovo je prvo ispitivanje kombinovane primjene etarskog ulja herbe izopa sa antibiotikom, prema raspoloživim informacijama. Pokazalo se da etarsko ulje 1EO sa 1,8- cineolom kao glavnim sastojkom ima aditivni efekat sa antibiotikom (amikacin) prema soju *E. coli*, dok etarsko ulja 3EO sa cis-pinokamfonom, kao dominantnim

sastojkom, ima aditivni efekat sa amikacinom prema sojevima *S. aureus* i *E. coli*. Međutim svakako treba uzeti u obzir i druge sastojke koji doprinose antimikrobnom dejstvu etarskog ulja u cjelini. Kada su u pitanju ekstrakti, pokazana je slabija antimikrobna aktivnost u odnosu na etarska ulja. Naime, MIC vrijednost ekstrakata se kretala od 1000 µg/mL (koliko je bila MIC ispitivanih ekstrakata (1E-6E) prema soju *S. aureus*) do 2000 i > 2000 µg/mL za ostale standardne sojeve bakterija (Tabela 4.9.). Nešto bolju aktivnost su ekstrakti pokazali prema 85 soju gljivice *C. albicans* – MIC 250 µg/mL za ekstrakte 4E i 6E, odnosno 500 µg/mL za ostale ekstrakte. Kada su u pitanju ekstrakti, podaci u literaturi su prilično oskudni u odnosu na etarska ulja. Džamić i saradnici su 2013. ispitivali antigljivičnu aktivnost etarskog ulja i ekstrakata (deodorisani vodeni, metanolni i etil acetatni) *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. na nekoliko sojeva gljivica iz rodova *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, zatim na *Trichoderma viride* i *Candida albicans*. Pokazalo se da je *Aspergillus niger* najrezistentnija gljivica, dok su vrste *Cladosporium* bile najosjetljivije; ekstrakti su bili aktivniji od etarskog ulja, a najbolju aktivnost je pokazao metanolni ekstrakt. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) deodorisanog metanolnog ekstrakta za soj *C. albicans* je bila 10 mg/mL, a minimalna fungicidna koncentracija (MFC) 14 mg/mL [31]. U ispitivanju u okviru ove disertacije je pokazana mnogo bolja aktivnost ekstrakata herbe izopa na soj gljivice *C. albicans* (MIC vrijednost izražena u mg/mL iznosi 0.25 mg/mL za ekstrakte 4E i 6E, odnosno 0.5 mg/mL za ostale ekstrakte), što daje dobru osnovu za dalja ispitivanja u ovom smjeru. Tabela 4.9. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) metanolnih ekstrakata herbe izopa (DMSO < 5%) Mikroorganizmi MIC 1E (

µg/mL) MIC 2E (µg/mL) MIC 3E (µg/mL) MIC 4E (µg/mL) MIC 5E (µg/mL

68

) MIC 6E (µg/mL) *S. aureus* (ATCC 6538) 1000 1000 1000 1000 1000 1000 *B. subtilis* (ATCC 6633) 2000 2000

2000 2000 2000 2000 *E. coli* (ATCC 8739) 2000 2000 2000 2000 2000 2000 *S. Typhi* (ATCC 14028) > 2000 2000 2000 >2000 2000 >2000

46

K. pneumoniae (NCIMB 9111) >2000 >2000 >

2000 >2000 >2000 >2000 *P. aeruginosa* (ATCC 9027) >2000 >2000 > 2000 >2000 >2000 >2000 *C. albicans* (ATCC

46

10231) 500 500 500 250 500 250 Dostupni literaturni podaci o antimikrobnoj aktivnosti za preparate herbe izopa su različiti i zavise od brojnih faktora, koji u krajnjem utiču na sastav etarskog ulja/ekstrakta, kao što su podvrsta/varijetet biljke, stanište, metoda ekstrakcije i sl. Svjedoci smo da je antimikrobna rezistencija sve veći problem sa kojim se suočava čovječanstvo. U vezi sa tim, naučna javnost intenzivno istražuje nove antimikrobne agense, među kojima biljne droge i njihovi preparati zauzimaju značajno mjesto. Razlog tome jeste 86 složen hemijski sastav biljnih droga i njihovih preparata, na koji mikrobi ne mogu baš lako da razviju otpornost, kao što je to slučaj sa dostupnim, najčešće monokomponentnim sintetskim antimikrobnim

agensima. Ovim ispitivanjem se pokazalo da postoji određeni potencijal etarskog ulja izopa da djeluje antimikrobno; umjerena aktivnost određenih uzoraka ispitivanih etarskih ulja je pokazana prema sojevima *S. aureus* i *E. coli*; takođe pokazan je i njihov aditivni efekat sa sintetskim antibiotikom (amikacinom), što daje osnov za dalja ispitivanja, a takođe bi moglo da se dovede i u vezu sa primjenom izopa u narodnoj medicini kod blažih infekcija respiratornog i urinarnog trakta. Dodatno, pokazan je i antimikrobni potencijal na gljivicu *Candida albicans*, posebno zapažen kod ekstrakata. Svakako potrebna su dalja istraživanja u ovom smjeru, kako bi se razjasnio mehanizam djelovanja i koje su glavne komponente, odnosno kombinacija sastojaka nosioci antimikrobne aktivnosti.

4.6. Genotoksična i antigenotoksična aktivnost Potencijalna genotoksična i antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa je procijenjena Komet testom.

4.6.1. Genotoksična aktivnost Ekstrakti herbe izopa nisu pokazali genotoksični efekat pri koncentracijama od 100, 200 i 400 µg/mL. Kada su u pitanju etarska ulja, genotoksični efekat se nije manifestovao pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 2.5 µg/mL. Dobijeni rezultati su poslužili za dalje ispitivanje antigenotoksične aktivnosti navedenih preparata herbe izopa.

4.6.2. Antigenotoksična aktivnost Svi ispitivani ekstrakti herbe *H. officinalis* (pri koncentraciji 400 µg/mL) su statistički značajno ($p < 0.0001$) redukovali DNK oštećenja u humanim leukocitima periferne krvi, koja su prethodno indukovana vodonik peroksidom (Slika 4.24.). Slika 4.24. Antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata herbe *H. officinalis* subsp. *aristatus* (1E-6E) na DNK oštećenja u humanim leukocitima periferne krvi, koja su prethodno izazvana tretiranjem vodonik peroksidom (H₂O₂) (eng. post-treatment protocol). Pravougaonici na slici predstavljaju srednju vrijednost broja ćelija sa DNK oštećenjima ± standardna greška srednje vrijednosti, nasuprot kontroli koja je tretirana samo sa H₂O₂ (n=3). PBS - fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (eng. phosphate-buffered saline). *** $p < 0.0001$. Smanjenje srednje vrijednosti broja ćelija sa DNK oštećenjima je bilo najizraženije za ekstrakte 2E i 4E; međutim, nije bilo većih razlika u antigenotoksičnoj aktivnosti među ispitivanim ekstraktima (1E-6E). Slično, Borrelli i sar. (2019) su pokazali da etanolni ekstrakti nadzemnih dijelova samoniklog *H. officinalis* subsp. *aristatus*, porijeklom sa juga Italije, nisu pokazali genotoksičnost, ali su, sa druge strane, djelovali protiv oštećenja DNK u Caco-2 ćelijama, uzrokovanim vodonik-peroksidom [134]. Zapažena antigenotoksična aktivnost ispitivanih ekstrakata herbe izopa, može se, barem djelimično, pripisati značajnom sadržaju polifenolnih sastojaka i njihovoj sposobnosti da neutrališu slobodne radikale. Hlorogenska i rozmarinska kiselina, kao kvantitativno dominantna jedinjenja u ispitivanim preparatima, mogu biti značajne za zabilježenu antigenotoksičnu aktivnost, budući da neki ranije objavljeni podaci govore da su ova dva jedinjenja pokazala efikasnost u Komet testu, u smislu antigenotoksičnog djelovanja [141,142]. Kada su u pitanju ispitivana etarska ulja herbe izopa, pokazana je statistički značajna antigenotoksična aktivnost, u primijenjenoj koncentraciji od 2.5 µg/mL, u post-tretmanu. Najbolju aktivnost je pokazalo etarsko ulje 4EO ($p < 0.0001$), zatim komercijalni uzorak, 1EO ($p < 0.001$), dok su ostala etarska ulja (2EO, 3EO, 5EO i 6EO) pokazala slabiju, ali takođe statistički značajnu aktivnost ($p < 0.01$) (Slika 4.25.). Prema dostupnim podacima, ovo je prvo ispitivanje antigenotoksičnosti etarskih ulja herbe izopa. Slika 4.25. Antigenotoksična aktivnost etarskih ulja herbe *H. officinalis* subsp. *aristatus* (1EO-6EO) na DNK oštećenja u humanim leukocitima periferne krvi, koja su prethodno izazvana tretiranjem vodonik peroksidom (H₂O₂) (eng. post-treatment protocol). Pravougaonici na slici predstavljaju srednju vrijednost broja ćelija sa DNK oštećenjima ± standardna greška srednje vrijednosti, nasuprot kontroli koja je tretirana samo sa H₂O₂ (n=3). PBS - fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (eng.

phosphate-buffered saline). * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$

1

. Fenilpropanoid, metil eugenol je bio dominantan sastojak u etarskom ulju 4EO. Kada su u pitanju etarska ulja, 1EO, 2EO, 5EO i 6EO, dominantni sastojak je bio oksidovani monoterpen, 1,8-cineol, dok je cis-pinokamfon bio kvantitativno najzastupljeniji sastojak u etarskom ulju 3EO. Za metil eugenol [143] i 1,8-cineol [144] postoje podaci u literaturi koji potvrđuju njihovu sposobnost da neutrališu slobodne radikale, što bi moglo doprinijeti i antigenotoksičnom efektu. Potvrđeni benefiti etarskih ulja herbe izopa, u smislu antigenotoksičnog djelovanja, bi se mogli zasnivati na njihovom učešću u direktnoj neutralizaciji slobodnih radikala, ali, takođe i na njihovom doprinosu popravci DNK molekula. Dobijeni rezultati pokazuju da ekstrakti herbe izopa i etarska ulja ispoljavaju statistički značajnu antigenotoksičnu aktivnost, što bi moglo da ima praktični značaj u terapiji hroničnih degenerativnih oboljenja, koja u osnovi imaju oštećenja u genetskom materijalu. U vezi sa tim, potrebna su dalja istraživanja i sprovođenje in vivo eksperimenata, kako bi dobijeni rezultati o antigenotoksičnom djelovanju preparata *H. officinalis* postali pouzdaniji.

4.7. Citotoksična aktivnost Citotoksični agens može izazvati ćelijsku smrt, tako što će dovesti do propadanja ćelije ili, sa druge strane, tako što će dovesti do reproduktivne ćelijske smrti, kroz inhibiciju rasta i proliferacije ćelija, pri čemu ćelija ostaje živa. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata herbe izopa je imalo za cilj da utvrdi ukupni citotoksični potencijal, citostatske i citocidne efekte ekstrakata (1E-6E) na humane tumorske ćelijske linije (SW480, MDA-MB 231 i HeLa). Dodatno, svi navedeni efekti ekstrakata herbe izopa su ispitani i na netransformisanoj ćelijskoj liniji humanih fibroblasta pluća (MRC-5). Citotoksični efekti navedenih ekstrakata su ispitivani u opsegu od sedam koncentracija nakon 24, 48 i 72 h od početka tretmana, u MTT testu. MTT test je metoda koja indirektno određuje vitalnost ćelije. MTT reagens je kristal žute boje, rastvorljiv u vodi, koji lako prolazi kroz ćelijsku membranu zbog svog pozitivnog naelektrisanja. U

metabolički aktivnim ćelijama , MTT reagens **se redukuje do** nerastvorljivih **kristala formazana** 28
ljubičaste boje

. Mitohondrijalna reduktaza (sukcinat dehidrogenaza), koja je aktivna samo u živim ćelijama, katalizuje ovu reakciju, tako da je redukcija originalnog jedinjenja (MTT) u formazan direktno proporcionalna broju živih ćelija. Dobijeni rezultati su predstavljeni grafički, pomoću krive "doza-odgovor" (Slika 4.26.), kao i preko parametara citotoksičnosti, koji su na primjeru HeLa ćelijske linije predstavljeni u Tabeli 4.10. (a) (

c) (e) (f) (g) (i) (k) (m) (o) (q) (s) (u) (w) (x)

69

) Slika 4.26. Krive doza-odgovor u MTT testu nakon 24, 48 i 72 h tretmana ćelijskih linija

MRC-5 (a - f), SW480 (g - l), MDA-MB 231 (m - r) i HeLa (s - x)

1

) ekstraktima 1E-6E. Vrijednosti su predstavljene kao srednja vrijednost \pm SD; MTT test je rađen u triplicatu u najmanje tri nezavisna eksperimenta. Tabela 4.10. Koncentracije ekstrakata ($\mu\text{g/mL}$) koje: izazivaju inhibiciju biološke aktivnosti kod 50%

ćelija (IC50), izazivaju inhibiciju rasta kod 50% ćelija (GI50), dovode do totalne inhibicije rasta ćelija (TGI) i dovode do smrtnosti 50% ćelija (LC50) u HeLa ćelijskoj liniji, izražene kao

X ± SD. SI : indeks selektivnosti. **HeLa 1E 2E 3E 4E 5E 6E** 24 h **IC50** 48 h

1

72 h >100 22.72 ± 3.53 19.53 ± 1.03 >100 16.97 ± 2.10 15.15 ± 1.72 >100 44.38 ± 1.96 33.43 ± 1.36 >100 16.74 ± 1.43 14.97 ± 0.78 >100 25.90 ± 4.60 18.73 ± 0.53 >100 25.32 ± 7.80 20.04 ± 5.10

SI 24 h 0.97 1.52 1.71 1.31 1.10 3.61 48 h 14.19 20.14 12.08 19.61 8.34 11.87 72 h 12.17 13.87 8.30 15.04
11.31 7.82 GI50 24 h

1

48 h 72 h 6.95 ± 0.95 4.91 ± 0.84 0.86 ± 0.51 6.00 ± 0.34 3.49 ± 0.46 <0.3 98.09 ± 11.08 65.64 ± 3.66 59.38 ± 1.85 5.56 ± 0.18 2.54 ± 0.45 <0.3 7.67 ± 1.45 5.61 ± 1.22 4.97 ± 0.54 7.46 ± 0.99 5.75 ± 0.68 4.76 ± 0.52 24 h 16.90 ± 4.96 14.67 ± 0.58 >100 12.91 ± 0.44 47.25 ± 5.66 27.55 ± 1.89 TGI 48 h 72 h 13.60 ± 1.75 13.27 ± 1.33 11.00 ± 0.56 1.69 ± 0.36 >100 >100 9.18 ± 0.59 <0.3 19.90 ± 4.38 18.42 ± 3.57 16.77 ± 1.52 13.63 ± 1.26 >100 61.09 ± 16.15 43.19 ± 10.03 >100 35.65 ± 1.16 26.02 ± 2.88 >100 >100 >100 27.07 ± 1.56 >100 20.28 ± 1.10 >100 63.66 ± 2.30 60.65 ± 1.59 >100 41.15 ± 6.75 31.20 ± 5.93 Naime, ekstrakti 1E-6E su pokazali statistički značajan procenat inhibicije rasta ispitivanih ćelijskih linija, na dozno zavisnan način, nakon 48 h i 72 h ($p < 0.05$); međutim navedeni trend nije primijećen nakon 24 h ($p > 0.05$). Vremenski zavisna inhibicija rasta je bila prisutna samo kod HeLa ćelijske linije i to sa visokim statističkim značajem ($p < 0.0001$). Kada su u pitanju ostale ćelijske linije, vremenski zavisnan efekat inhibicije rasta je utvrđen za linije MRC-5 i MDA-MB 231 i to samo za najvišu ispitivanu koncentraciju ($p < 0.05$). Sa druge strane povećanje inhibicije rasta ćelijske linije SW480 je bilo nezavisno od perioda izlaganja. Za procjenu ukupnog inhibitornog potencijala ispitivanih ekstrakata, izračunata je vrijednost IC50 kao parameter inhibicije rasta u odnosu na kontrolu, koja nije uzimala u obzir početni broj ćelija u nultom trenutku. Ispitivani ekstrakti su pokazali veoma nisku inhibitornu aktivnost prema zdravoj ćelijskoj liniji MRC-5, ali i prema linijama tumorskih ćelija SW480 i MDA-MB 231, jer su njihove vrijednosti IC50 premašile najvišu ispitivanu koncentraciju (podaci nijesu prikazani). Sa druge strane na HeLa ćelijskoj liniji je pokazana visoka ukupna inhibicija rasta, na šta su ukazale niske vrijednosti IC50. Kada govorimo o HeLa ćelijskoj liniji, ekstrakti 2E i 4E su pokazali najjaču ukupnu inhibitornu aktivnost nakon 48 h i 72 h tretmana, poslije njih ekstrakti 1E, 5E i 6E, dok je ekstrakt 3E imao najvišu IC50 vrijednost, tj. najslabiji stepen inhibicije. Međutim bez obzira na navedene razlike, nije bilo statistički značajne razlike u djelovanju među ispitivanim ekstraktima za HeLa ćelijsku liniju. Takođe, važno je istaći da su ekstrakti pokazali aktivnost visoko selektivnu za HeLa ćelijsku liniju, sa vrijednostima indeksa selektivnosti (SI), koje su se kretale između 8 i 20. Antitumorska aktivnost većine klinički primjenjivanih agenasa je ograničena zbog velikog spektra neželjenih efekata koje izazivaju i generalno toksičnosti koju pokazuju i prema nekim zdravim ćelijama. Iako naučnici nastavljaju da razvijaju jedinjenja sa ciljanim mehanizmom djelovanja, mnogim od tih jedinjenja nedostaje selektivnost prema tumorskim ćelijama [145]. Iz tog razloga su sve više u fokusu prirodni proizvodi, koji se smatraju manje toksičnim za zdrave ćelije, o čemu svjedoči veliki broj ekstrakata i sekundarnih metabolita u kliničkim ispitivanjima [146]. Dalje, prema preporukama Nacionalnog

instituta za kancer (eng. National Cancer Institute, NCI) [126], izračunata su tri parametra, kako bi se utvrdilo da li su ispitivani ekstrakti imali citostatski (GI50, TGI) ili citocidni (LC50) efekat na određene ćelijske linije. Prema dobijenim vrijednostima navedenih parametara, pokazano je odsustvo citostatske ili citocidne aktivnosti ispitivanih ekstrakata (1E-6E) na kancerske ćelijske linije SW480 i MDA-MB 231, i što je još važnije, odsustvo aktivnosti na netransformisanu ćelijsku liniju MRC-5 (podaci nisu prikazani). Nasuprot tome, kada je u pitanju kancerska ćelijska linija HeLa, svi ispitivani ekstrakti su djelovali kao veoma moćni inhibitori ćelijskog neto rasta, sa veoma niskim vrijednostima GI50, posebno ekstrakti 2E i 4E, koji su pokazali inhibiciju neto ćelijskog rasta za 50% pri koncentracijama nižim od minimalnih nakon 72 h tretmana (GI50 < 0.3 mg/mL) (Tabela 4.10.). Ekstrakti 1E, 5E i 6E su pokazali neto inhibiciju ćelijskog rasta od 50%, sa sličnom snagom kao i prethodni ekstrakti. U poređenju sa ekstraktom komercijalnog uzorka (1E), samo ekstrakt 3E je imao statistički značajno nižu aktivnost inhibicije ćelijskog rasta ($p < 0.0001$). Isti trend je bio prisutan i kada je u pitanju ukupna inhibicija rasta i citocidna aktivnost. Naime, ekstrakti 2E i 4E su izazvali snažno citostatsko dejstvo poslije 72 h tretmana sa vrijednostima TGI od 1.69 mg/mL i < 0.3 mg/mL. Takođe, vrijednosti LC50 ovih ekstrakata bile su značajno niže nego za druge ekstrakte ($p < 0.05$), što ukazuje na njihovu moćnu citocidnu prirodu. Ekstrakti 1E, 5E i 6E su pratili isti trend. Tumor raste kada ukupna stopa deobe njegovih ćelija premaši ukupnu stopu mortaliteta. Sposobnost nekontrolisanog rasta nastaje akumulacijom mutacija gena koji upravljaju proliferacijom ćelije i njenom smrću. U vezi sa tim, agensi koji mogu da prevaziđu akumulaciju mutacija, zaustave nekontrolisanu ćelijsku deobu i ubiju ćelije raka su korisni u liječenju. Testirani ekstrakti 1E, 2E i 4E-6E su pokazali, sa visokom selektivnošću, sposobnost i da inhibiraju proliferaciju ćelija, ali i da indukuju ćelijsku smrt u humanoj 106 ćelijskoj liniji kancera grlića materice (HeLa) (Tabela 4.10.). Zbog toga, ekstrakte herbe izopa i jedinjenja koja su u njima zastupljena treba dalje ispitivati u smjeru njihove moguće primjene u terapiji ove vrste raka. Prema dostupnim saznanjima, podaci o citotoksičnoj aktivnosti ekstrakata herbe izopa se javljaju po prvi put u okviru ove disertacije. Dominantna jedinjenja u ekstraktima su, kao što je već pomenuto, hlorogenska i rozmarinska kiselina, čiji je citotoksični potencijal ranije zabilježen [147,148]. Ekstrakt 4E je imao najveći sadržaj hlorogenske i rozmarinske kiseline, kao i ukupnih fenolnih jedinjenja, dok je ekstrakt 3E, koji je ispoljio najslabiju citotoksičnu aktivnost u odnosu na druge ispitivane ekstrakte, imao najmanji sadržaj ukupnih fenola i rozmarinske kiseline. Sa druge strane, ekstrakt 2E, koji je takođe dao veoma dobre rezultate u ovoj studiji, zajedno sa ekstraktom 4E, nije se izdvajao ni po sadržaju ukupnih fenola, ni po sadržaju hlorogenske ili rozmarinske kiseline. Ekstrakti 2E i 4E su takođe pokazali antigenotoksičnu aktivnost u Komet testu. Dakle, možemo zaključiti da hlorogenska i rozmarinska kiselina vjerovatno doprinose ukupnom citotoksičnom potencijalu ispitivanih ekstrakata, međutim doprinos pojedinačnih komponenti ekstrakta i/ili njihovo sinergističko/aditivno djelovanje u smislu doprinosa selektivnoj citotoksičnosti na HeLa ćelijsku liniju je od posebnog interesa i trebalo bi da se dalje istražuje.

4.8. Antiinflamatorna aktivnost

Inflamacija je zaštitni odgovor mikrocirkulacije, koji se pokreće nakon infekcije/povrede, a za cilj ima uklanjanje djelovanja štetnih stimulusa [149]. Inflammatory procesi su povezani sa velikim brojem akutnih i hroničnih bolesti [150], od kojih su mnoge aktuelni problemi današnjice, npr. reumatoidni artritis, multipla skleroza, hronična astma, inflamatorne bolesti crijeva, psorijaza, kardiovaskularne i maligne bolesti [151]. Glavni antiinflamatorni lijekovi su glukokortikoidi i nesteroidni antiinflamatorni lijekovi (NSAIL). Međutim usljed brojnih neželjenih reakcija, koje su povezane sa primjenom postojećih antiinflamatornih lijekova, traže se alternativna jedinjenja, koja će ispoljiti zadovoljavajući antiinflamatorni efekat, uz manje neželjenih dejstava. Tu su posebno u fokusu prirodna jedinjenja, kao što su biljni polifenoli [152]. U te svrhe, najprije se ispituju one biljne vrste koje su tokom godina primjene u narodnoj medicini, pokazale da su djelotvorne kod inflamatornih procesa. Jedna takva vrsta je i *H. officinalis*. Naime,

u tradicionalnoj medicini se između ostalog koristi kod probavnih i crijevnih tegoba, za liječenje respiratornih bolesti, kao što su tuberkuloza, astma, hronični katar i bronhitis; takođe je vrednovan u liječenju reumatskih bolova, modrica, rana, opekotina, promrzlina, iritacija kože [11,15]. Dodatno, nalazimo i podatke u literaturi koji govore u prilog antiinflamatornom djelovanju ove vrste; npr. u radu Wang i sar. (2011) se navodi da vodeni ekstrakt herbe izopa djeluje kao potencijalni regulator diferencijacije T pomoćnih ćelija (Th1, Th2 i Th17) na transkripcionom nivou, čime doprinosi anti-upalnom djelovanju [80]. U radu Ma i sar. (2014), pokazano je da je u grupi astmatičnih miševa koja je tretirana suvim vodenim ekstraktom *H. officinalis*, nivo eozinofila u bronhoalveolarnoj tečnosti i nivo imunoglobulina IgG i IgE u serumu, bio sličan zdravoj grupi, za razliku od grupe tretirane deksametazonom, gdje je došlo do povećanja nivoa eozinofila u bronhoalveolarnoj tečnosti i povećanja nivoa serumskog IgE, dok je nivo serumskog IgG smanjen, u poređenju sa normalnom grupom. Navodi se da *H. officinalis* ne pokazuje samo antiinflamatornu aktivnost inhibirajući porast eozinofila i smanjujući nivoe IgE, već utiče i na imunoregulaciju [81]. Tradicionalna primjena, kao i dosadašnji literaturni podaci daju osnov za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti preparata herbe izopa, što je upravo bio jedan od ciljeva ove disertacije. Naime, antiinflamatorna aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa ispitana je in vitro, a zatim je nastavljeno ispitivanje ekstrakata i in vivo; sposobnost inhibicije enzimske aktivnosti cikooksigenaze-1 (COX-1) i cikooksigenaze-2 (COX-2), od strane dominantnih jedinjenja u ekstraktima (hlorogenska i rozmarinska kisjelina), procijenjena je in silico.

4.8.1. Efekti metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa na aktivnost enzima COX-1 i COX-2

Antiinflamatorna aktivnost etarskih ulja i metanolnih ekstrakata herbe izopa, ispitana je in vitro, mjerenjem njihove sposobnosti da inhibiraju aktivnost enzima COX-1 i COX-2, odgovornih za sintezu prostaglandina. Pokazano je da ispitivana etarska ulja i ekstrakti herbe *H. officinalis* djeluju inhibitorno na enzimsku aktivnost COX-1 i COX-2, pri koncentraciji od 20 µg/mL, kao što je prikazano na Slici 4.27. Slika 4.27. Rezultati ispitivanja sposobnosti metanolnih ekstrakata (1E-6E, 20 µg/mL) i etarskih ulja (1EO- 6EO, 20 µg/mL) herbe *H. officinalis* da inhibiraju aktivnost enzima COX-1 ((a) A), odnosno COX-2 ((a) B) - predstavljeni grafički (a) i tabelarno (b). Kao pozitivna kontrola u COX-1 testu korišćen je indometacin (1.2 µM), odnosno celekoksib (8.8 µM), u COX-2 testu. Grafici predstavljaju % inhibicije aktivnosti enzima COX, što je dobijeno u dva nezavisna eksperimenta (srednja vrijednost ± SD); *

statistički značajna razlika u odnosu na pozitivnu kontrolu ($p < 0.05$). Kada su u

39

pitanju ekstrakti, u COX-2 testu je pokazana značajna inhibitorna aktivnost. Naime, pri koncentraciji od 20 µg/mL svi analizirani ekstrakti su inhibirali aktivnost enzima COX-2 u opsegu od 54.04% do 63.04%, što se nije statistički značajno razlikovalo od aktivnosti koju je dao celekoksib, kao pozitivna kontrola pri koncentraciji od 8.8 µM (61.60%). Što se tiče etarskih ulja, zapaženu aktivnost je pokazalo etarsko ulje 1EO (52.37%), pri koncentraciji 20 µg/mL, odnosno njegova inhibitorna aktivnost na enzim COX- 2 se nije statistički značajno razlikovala od pozitivne kontrole (celekoksib pri koncentraciji od 8.8 µM). U COX-1 testu, je pokazana slabija aktivnost. Naime, u ovom testu su se po aktivnosti izdvojili ekstrakt 1E (16.15%) i etarsko ulje 6EO (11.04%), koji pri koncentraciji od 20 µg/mL nisu pokazali statistički značajnu razliku u aktivnosti u odnosu na pozitivnu kontrolu, indometacin (za koji je procenat inhibicije COX-1 enzimske aktivnosti bio 22.11%, pri koncentraciji od 1.2 µM). Dominantni sastojak kod etarskih ulja koja su pokazala zapaženu aktivnost u COX-1 i COX-2 testu je 1,8-cineol. Prema dostupnim literaturnim podacima 1,8-cineol, antiinflamatorno djelovanje ostvaruje uglavnom preko regulacije NF-kB puta (eng.

nuclear factor-kappa B), a takođe ima dobru sposobnost uklanjanja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) [153]. LC-DAD-MS analizom ispitivanih ekstrakata (1E-6E) u okviru ove disertacije je pokazano da svi ispitivani metanolni ekstrakti nadzemnog dijela izopa, sadrže fenolna jedinjenja: derivate benzoeve kiseline (siringinska kiselina), hidroksicimne kiseline (hlorogenska (5-O-kefeoilhina kiselina), feruloilhina i rozmarinska kiselina, kao i kefeoil pentozid) i flavonoide (derivate kvercetina (kvercetin O-heksozid) i diosmetina (diosmetin O- deoksiheksozol-heksozid)). Međutim, kvantitativno dominantna jedinjenja u svim uzorcima su: hlorogenska i rozmarinska kiselina. Sadržaj hlorogenske kiseline se kretao od 2.34 do 3.35%, dok je sadržaj rozmarinske kiseline bio nešto niži (0.33–1.80%). Vjerovatno je da ukupnom antiinflamatornom djelovanju ekstrakata doprinose svi fenolni sastojci detektovani u ekstraktu. Opisani su različiti mehanizmi kojima polifenolna jedinjenja postižu antiinflamatorni efekat. Jedan od njih je inhibicija regulatornih enzima i transkripcionih faktora koji imaju važnu ulogu u kontroli medijatora uključenih u inflamatorni proces (npr. inhibicija protein-kinaza koje su uključene u prenosu signala tokom ćelijske aktivacije u inflamaciji; inhibicija transkripcionog faktora NF- κ B, koji reguliše određene citokine, hemokine i molekule ćelijske adhezije uključene u upalni proces; flavonoidi npr. inhibirajući fosfodiesterazu cikličnog adenzin monofosfata (cAMP, eng. 111 cyclic adenosine monophosphate) mogu dovesti do povećanja nivoa cAMP, koji doprinosi antiinflamatornom djelovanju). Polifenoli antiinflamatornom djelovanju doprinose i zahvaljujući svojoj antioksidativnoj aktivnosti (inhibicija produkcije slobodnih radikala i neutralizacija reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS), reaktivnih azotnih vrsta (RNS) i drugih reaktivnih vrsta). Polifenolna jedinjenja, takođe, mogu da inhibiraju enzime: fosfolipazu A2 (PLA2), ciklooksigenazu (COX) i lipooksigenazu (LOX), što dovodi do smanjenja proizvodnje prostaglandina (PG) i leukotriena (LT) i posljedično do antagonizma upale. Polifenoli imaju uticaj i na neke ćelije imunog sistema i njegove mehanizme, koji su važni u upalnim procesima [154,155]. Kada su u pitanju kvantitativno dominantna jedinjenja, hlorogenska i rozmarinska kiselina, u literaturi takođe postoje podaci koji govore u prilog antiinflamatornog djelovanja navedenih sastojaka. U radu Shin i sar. (2017) mehanizam antiinflamatornog djelovanja hlorogenske kiseline u humanim intestinalnim epitelim ćelijama je objašnjen inhibicijom protein kinaza D-NF- κ B signalnog puta i vodonik peroksidom indukovane produkcije interleukina-8 (IL-8), zahvaljujući prisustvu kateholnih grupa koje hvatanju intracelularne reaktivne kiseonične vrste (ROS) [156]. Takođe, još neke in vitro studije su prijavile antiinflamatorni efekat hlorogenske kiseline, koji se uglavnom zasnivao na uklanjanju ROS i RNS [157,158]. U radu Hwang i sar. (2014) su ispitivani efekti hlorogenske kiseline na lipopolisaharidom (LPS) stimulisanim mišjim makrofazima (RAW 264.7) i mikroglijalnim ćelijama BV2. Pokazalo se da je došlo do inhibicije proizvodnje azot (II) oksida (NO), kao i inhibicije ekspresije COX-2 i inducibilne NO sintaze (iNOS, eng. inducible nitric oxide synthase), bez izazivanja citotoksičnosti. Hlorogenska kiselina je takođe dovela do slabljenja dejstva pro-inflamatornih citokina (uključujući interleukin 1 beta (

IL-1 β) i faktor nekroze tumora , alfa (TNF- α , eng. **tumor necrosis factor**

30

alpha)), kao i drugih markera povezanih sa upalom, kao što je interleukin 6 (IL-6), na dozno zavisian način. Dodatno, smanjena je adhezija makrofaga izazvana endotoksinom, kao i nivo ekspresije ninjurina 1 (Ninj 1); inhibirana je i nuklearna translokacija NF- κ B [159]. U radu Shan i sar. (2009) je takođe sprovedena ćelijska studija na mišjim makrofazima RAW 264.7 i pokazano da hlorogenska kiselina suzbija LPS-indukovanu ekspresiju COX-2, slabljenjem aktivacije NF- κ B i JNK / AP-1 (eng. c-Jun N-terminal kinase / activator protein-1) signalnih puteva [160]. Kada je u pitanju rozmarinska kiselina, u literaturi su opisani

različiti mogući mehanizmi antiinflamatornog djelovanja; međutim najviše se pominje interakcija rozmarinske kisjelina sa sistemom komplementa. Naime pokazano je da rozmarinska kisjelina inhibira aktivaciju sistema komplementa in vivo i in vitro, vezujući se kovalentno sa 112 C3b, aktiviranom komponentom komplementa na mjestu inflamacije (gdje se vrši aktivacija sistema komplementa) [161]. Scheckel i sar. (2008) navode da rozmarinska kisjelina može biti efikasan inhibitor ekspresije proupalnog gena COX-2 (koji se smatra faktorom rizika za razvoj tumora) [162]. Takođe, neki literaturni podaci govore da rozmarinska kisjelina štiti moždane ćelije od ishemijsko-reperfuzijske povrede kod dijabetesa, što bi moglo da uključuje NF-kB i HMGB1 signalni put (eng. high mobility group box 1); rezultati koji govore o antiseptičkom efektu rozmarinske kisjeline, ukazuju da je isti posredovan smanjenjem lokalnog i sistemskog nivoa inflamatornih medijatora [161]. U radu Ghasemzadeh i sar. (2017) je pokazano da primjena etanolnih ekstrakata herbe *Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae (400 mg/kg), kao i rozmarinske kisjeline (40 mg/kg) kod pacova sa indukovanom bolnom perifernom neuropatijom (izazvanom hroničnim suženjem/povredom nerva išijadikusa) dovodi do smanjenja inflamatornih markera u kičmi, metalopeptidaze

2 (MMP2) , prostaglandina **E2 (PGE-2)** , interleukina- **1 (IL-1)** i **COX-2**

2

[163]. Primjena rozmarinske kisjeline (10 mg/kg) kod Wistar pacova sa povredom kičmene moždine, dovela je do poboljšanja antioksidativnog statusa, smanjenja oksidativnog stresa i antiinflamatornog djelovanja, smanjenjem proinflamatornih citokina i regulacijom NF-kB [164]. Prema dostupnim saznanjima, ovo je prvo ispitivanje djelovanja ekstrakata herbe *H. officinalis* na enzime COX-1 i COX-2. Pokazano je da je inhibitorna aktivnost ekstrakata herbe *H. officinalis* na enzim COX-2 veća u odnosu na iste uzorke ispitane na aktivnost enzima COX-1, što bi moglo da ima praktični značaj i otvara mogućnosti za dalja ispitivanja, s obzirom da brojna neželjena dejstva lijekova koji djeluju inhibitorno na aktivnost COX enzima, potiču od istovremene snažne inhibicije enzima COX-1 (koji je konstitutivni enzim u brojnim zdravim tkivima), pored COX-2. 4.8.2. Rezultati in vivo ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa na modelu karagenanom izazvane inflamacije šape pacova Kako su ekstrakti pokazali mnogo bolju aktivnost, posebno prilikom inhibicije COX-2 enzimске aktivnosti, nastavljeno je ispitivanje ekstrakata in vivo. Rezultati ispitivanja antiinflamatornog djelovanja ekstrakata (1E-6E) in vivo u zavisnosti od vremena proteklog od karagenanom izazvane inflamacije šape pacova (1, 2, 3 i 4 h), kao i od primijenjene koncentracije ekstrakta (50, 100 i 200 mg/kg) su prikazani u Tabeli 4.11. Tabela 4.11. Antiinflamatorna aktivnost metanolnih ekstrakata herbe izopa (1E-6E) na modelu karagenanom izazvane inflamacije šape pacova.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (X ± SD); * Statistički značajna razlika na

51

nivou $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu. Debljina šape pacova (mm)(% inhibicije) Eksperimentalne grupe 0h 1h 2h 3h 4h 1E 50 mg/kg 1E 100 mg/kg 1E 200 mg/kg 4.1 ± 0.3 4.3 ± 0.2 4.18 ± 0.1 4.92 ± 0.1 (18) 4.95 ± 0.3 (35) 4.62 ± 0.3 (56)* 5.5 ± 0.2 (0) 5.7 ± 0.4 (0) 5.2 ± 0.3 (27.14) 5.31 ± 0.25 (28.82) 5.75 ± 0.2 (14.71) 5.12 ± 0.2 (44.71)* 5.15 ± 0.15 (25) 5.45 ± 0.1 (17.86) 4.95 ± 0.4 (45)* 2E 50 mg/kg 2E 100 mg/kg 2E 200 mg/kg 4.05 ± 0.2 4.13 ± 0.1 3.98 ± 0.1 4.83 ± 0.1 (22) 4.55 ± 0.2 (58)* 4.65 ± 0.1

(33)* 5.55 ± 0.3 (-7.14) 5.62 ± 0.2 (-6.43) 5.45 ± 0.2 (-5) 5.16 ± 0.2 (34.71) 5.1 ± 0.2 (42.94) 4.72 ± 0.3 (56.47)* 4.95 ± 0.13 (35.71) 4.65 ± 0.1 (62.86)* 4.6 ± 0.3 (55.71)* 3E 50 mg/kg 3E 100 mg/kg 3E 200 mg/kg 4.2 ± 0.1 4.25 ± 0.2 4.2 ± 0.1 4.87 ± 0.2 (33) 5.07 ± 0.1 (18) 5 ± 0.2 (20) 5.75 ± 0.4 (-10.71) 5.47 ± 0.1 (12.86) 5.44 ± 0.1 (11.43) 5.28 ± 0.2 (36.47) 5.2 ± 0.1 (44.12) 5.18 ± 0.2 (42.35)* 5.1 ± 0.1 (35.71) 4.97 ± 0.2 (48.57) 4.87 ± 0.1 (52.14)* 4E 50 mg/kg 4E 100 mg/kg 4E 200 mg/kg 4.22 ± 0.2 4.2 ± 0.1 4.25 ± 0.4 4.9 ± 0.3 (32) 5.32 ± 0.2 (-12) 5.45 ± 0.3 (-20) 5.35 ± 0.2 (19.29) 5.37 ± 0.2 (16.43) 5.52 ± 0.2 (9.29) 5.33 ± 0.1 (34.71) 5.32 ± 0.1 (34.12) 5.26 ± 0.3 (40.59)* 5.05 ± 0.2 (40.71)* 5.15 ± 0.3 (32.14)* 5.02 ± 0.4 (45)* 5E 50 mg/kg 5E 100 mg/kg 5E 200 mg/kg 4.15 ± 0.1 4.08 ± 0.3 4.5 ± 0.2 5.1 ± 0.1 (5) 5.3 ± 0.1 (-22) 5.37 ± 0.1 (13) 5.22 ± 0.3 (23.57) 5.5 ± 0.2 (-1.43) 5.6 ± 0.4 (24.43) 5.45 ± 0.2 (23.53) 5.37 ± 0.3 (24.12) 5.12 ± 0.5 (63.53)* 5.18 ± 0.2 (26.43) 5.12 ± 0.1 (25.71) 5.01 ± 0.1 (63.57)* 6E 50 mg/kg 6E 100 mg/kg 6E 200 mg/kg 4.22 ± 0.1 4.12 ± 0.2 4.47 ± 0.1 5.52 ± 0.2 (-30) 5.45 ± 0.1 (-33) 5.37 ± 0.2 (10) 5.21 ± 0.2 (29.29) 5.65 ± 0.1 (-9.29) 5.32 ± 0.3 (39.29) 5.25 ± 0.3 (39.41)* 5.25 ± 0.1 (33.53)* 5.29 ± 0.2 (51.76)* 4.87 ± 0.3 (53.57)* 5.3 ± 0.1 (15.71) 5.07 ± 0.2 (57.14)* Indometacin 4.1 ± 0.2 4.9 ± 0.2 (20) 5.2 ± 0.3 (21.43) 5.02 ± 0.1 (45.88) 4.7 ± 0.1 (57.14) 8 mg/kg Kontrola 4.2 ± 0.4 5.2 ± 0.2 5.6 ± 0.3 5.9 ± 0.4 5.6 ± 0.4 Prema dobijenim rezultatima svi metanolni ekstrakti herbe izopa (1E-6E), u najvišoj ispitivanoj dozi od 200 mg/kg u trećem i četvrtom satu, nakon primjene karagenana, pokazuju statistički značajan ($p < 0.05$) inhibitorski efekat na povećanje edema šape pacova u odnosu na kontrolu. Ova aktivnost je uporediva ili veća u odnosu na referentnu supstancu (indometacin, pri koncentraciji 8 mg/kg): ? U trećem satu (

200 mg/kg), ekstrakti **2E (56.47%)**, **5E (63.53 %)** i **6E (51.76**

2

%) su pokazali veći procenat inhibicije od grupe tretirane indometacinom (8 mg/kg) u istom satu (45.88%). Dodatno, procenat inhibicije koju je dao ekstrakt 5E (63.53%) je bio veći od indometacina (8 mg/kg) i u posljednjem (četvrtom) satu (57.14%). ? U četvrtom satu, procenat inhibicije edema šape pacova za grupu tretiranu indometacinom (8 mg/kg) je bio 57.14%. Isti procenat inhibicije je pokazao ekstrakt 6E pri dozi od 200 mg/kg, dok su ekstrakti

2E (100 mg/kg) – 62.86 % i **5E (200 mg/kg) – 63.57**

2

% u posljednjem (četvrtom) satu dali veći procenat inhibicije u odnosu na indometacin grupu. Najveći procenat inhibicije je dao ekstrakt 5E (200 mg/kg), u posljednjem satu – 63.57%. Međutim, treba istaći da se dobijeni rezultati ne mogu direktno porediti sa pozitivnom kontrolom (indometacinom), budući da je upotrijebljena mnogo niža doza indometacina, to jest dozni antiinflamatorni odgovor indometacina je bolji. S druge strane, treba napomenuti da je indometacin čista, laboratorijski sintetisana supstanca sa dokazanim antiinflamatornim djelovanjem dok su primijenjeni ekstrakti multikomponentni sistemi. Eksperimentalno indukovana upala karagenanom je često korišćen metod za mjerenje antiinflamatorne aktivnosti nekog agensa. U indukovanom inflamatornom odgovoru se izdvajaju dvije faze, inicijalna (oko 1h nakon primjene karagenana) koju uglavnom karakteriše produkcija histamina i serotonina od strane mastocita, posljedično povećanje vaskularne propustljivosti i kasnija faza (nakon 1h) u kojoj dolazi do infiltracije neutrofila, produkcije prostaglandina i razvoja edema [165]. NSAID, kao što je indometacin, ispoljavaju antiinflamatornu aktivnost tokom druge faze karagenanom indukovane upale, na način što

inhibiraju sintezu prostaglandina, inhibicijom COX enzima [166], što je pokazano i u ovom ispitivanju (najveći procenat inhibicije, indometacin je imao u trećem i četvrtom satu, od primjene karagenana). Kako prema dobijenim rezultatima, svi ispitivani ekstrakti (u najvišoj dozi, 200 mg/kg) pokazuju statistički značajan stepen inhibicije edema šape pacova u odnosu na kontrolu u drugoj fazi inflamacije indukovane karageninom (treći i četvrti sat), koju između ostalog karakteriše sinteza prostaglandina; kako je, dodatno, u in vitro ispitivanju, pokazano da dolazi do inhibicije aktivnosti COX enzima (naročito COX-2), preliminarno se može zaključiti da ispitivani metanolni ekstrakti herbe izopa djeluju istim ili sličnim mehanizmom djelovanja kao referentna supstanca, indometacin, odnosno NSAIL. Kada su u pitanju dostupni literaturni podaci o ispitivanjima ekstrakata herbe izopa na indukovane upalne procese, kod pacova, u radu Salehi i sar. (2018), se navodi da je etanolni ekstrakt herbe izopa u dozama 25, 50 and 75 mg/kg pokazao visoku antiinflamatornu aktivnost na edem uha pacova (13.33 ± 3.1 , 20 ± 3.1 , i 19.83 ± 2.8) koji je izazvan ksilenom ($p < 0.05$) [167].

4.8.3. Rezultati studije molekularnog dokinga S obzirom da su ispitivani ekstrakti ispoljili zapaženo antiinflamatorno djelovanje u in vitro i in vivo studijama, ispitan je uticaj u ekstraktima kvantitativno dominantnih fenolnih jedinjenja (hlorogenske (CA) i rozmarinske kisjeline (RA)) na aktivnost COX-1 i COX-2 enzima, in silico. U ovoj studiji, simulacijama molekularnog spajanja, su ispitane molekularne interakcije između aktivnih, vezivnih mjesta COX-1 i COX-2 receptora (u kontekstu molekularnog dokinga) i analiziranih jedinjenja (RA i CA). Prije toga, određeni su džepovi i mjesta spajanja ciljanih receptora. U vezi sa tim, primjenjen je AGFR softver, za konfigurisanje i izračunavanje mapa afiniteta za molekul receptora, koje dalje koristi AutoDock4. Nativno vezani ligand (ibuprofen) je ekstrahovan iz COX-1 i izvršena je analiza vezivnog džepa. Zatim je izvršeno ponovno spajanje, sada sa ispitivanim jedinjenjima, kako bi se dobila ista poza dokinga, kao ona koja je detektovana u ko-kristalizovanom obliku. Isti protokol je sproveden i za ko-kristalizovani oblik COX-2, gdje je takođe korišćen ibuprofen kao ligand. Ovaj korak je izveden, kako bi se uporedio teoretski afinitet vezivanja RA i CA (prema COX-1 i COX-2) sa referentnim lijekom, ibuprofenom [168], i uporedio sa eksperimentalnom konstantnom inhibicije. Najstabilnije doking konformacije ispitivanih jedinjenja su predstavljene sa Slici 4.28. i Tabeli 4.12. Naime, niža vrijednost konstante inhibicije (K_i) i negativnija vrijednost ΔG_{bind} ukazuju na bolju inhibiciju. Inhibitorni efekti jedinjenja RA i CA prema COX enzimima, su rangirani na osnovu njihove najniže energije vezivanja uključene u formiranje kompleksa na aktivnim mjestima. Utvrđeno je da se energije vezivanja spojenih jedinjenja sa COX-1 i COX-2 kreću u opsegu između -48.2 i -50.8 kJ mol⁻¹ (Tabela 4.12.). Kao što se može vidjeti iz Tabele 4.12., ligandi se snažno vezuju za receptore COX-1 i 2. Doking analize ispitivanih molekula su pokazale da postoji nekoliko nekovalentnih interakcija između ispitivanih molekula i ciljanih receptora. Najistaknutije interakcije su vodonične veze, alkil- π , i π - π interakcije (Slika 4.28.). Aminokisjeline

ARG, MET, TYR, VAL, SER , i **GLY** na pozicijama **120, 522, 355, 349, 530** , i **526**

2

u primarnoj strukturi COX-1 lanca imaju dominantnu ulogu, kao aktivno mjesto ovih receptora u odnosu na ligande RA i CA. Ove aminokisjeline formiraju snažne vodonične veze (dužine lanca u rasponu od 1.68 do

2.86 Å), dok **TYR355, ALA527, VAL116, LEU531, VAL349, ILE523, LEU532** , i **PHE518** formiraju
slabe alkil- π i π - π

2

interakcije sa benzenovim prstenom ispitivanih jedinjenja (Slika 4.28.). Sa druge strane, GLN193, GLY527, SER354, TYR386, i PHE519 u primarnoj strukturi COX-2 formiraju vodonične veze sa OH i C=O groupama ispitivanih fenolnih kisjelina, RA i CA. Pored toga, VAL524 i VAL350 formiraju slabe alkil- π interakcije sa benzenovim prstenom CA i RA. Dobijeni rezultati vezivnih energija liganada su u dobroj korelaciji sa eksperimentalnim (biološkim) podacima [168]. Ibuprofen, kao NSAIL, za ista receptorska ciljna mjesta, je pokazao značajno višu energiju vezivanja ($\Delta G_{bind}=-$

31.3 kJ mol⁻¹ za **COX-1** i $\Delta G_{bind}=-$ **30.9 kJ mol⁻¹** za **COX-2**

44

), što ukazuje da ispitivana jedinjenja pokazuju bolju inhibitornu aktivnost prema COX-1 i 2 receptorima (Tabela 4.12.), u poređenju sa ibuprofenom [168]. Slika 4.28. Vodonična veza (zelene isprekidane linije) i hidrofobne doking interakcije (ružičaste isprekidane linije) najstabilnijih konformacija RA i CA sa COX-1 i COX-2. Tabela 4.12. Važni termodinamički parametri za najbolje konformacije dokinga ispitivanih molekula sa

COX-1 i **COX-2 (PDB IDs: 1EQG** i **4PH9). Conformations ΔG_{bind} (kJ mol⁻¹) Ki $\Delta G_{Intermol. Energy}$**

2

ΔG_{elec} (nM) (**vdw+hbond+desolv**) (kJ mol⁻¹) (kJ mol⁻¹) **$\Delta G_{Final Intermol. Energy}$ (kJ mol⁻¹) ΔG_{total}**

ΔG_{tor} ΔG_{unb} LE (**kJ mol⁻¹) (kJ mol⁻¹) (kJ mol⁻¹) Ibuprofen-COX-1**

Ibuprofen-

COX-2 RA- **COX-1** RA- **COX-2** CA- **COX-1** CA- **COX-2**

75

-31.3 3180 -30.9 3840 -49.2 2.4 -50.8 1.3 -48.2 3.6 -50.6 1.4 -33.4 0.1 -32.3 -0.4 -47.8 -0.8 -47.6 -1.1 -44.8 -1.6 -46.1 -0.9 -33.3 -1.84
 -32.7 -2.05 -48.6 -12.0 -48.7 -13.5 -46.4 -12.3 -46.9 -14.1 3.8 0.0 3.8 0.0 11.4 0.0 11.4 0.0 10.5 0.0 10.5 0.0 -2.1 -2.1 -1.9 -2.0 -1.9
 -2.0 Na osnovu rezultata prikazanih u Tabeli 4.12. jasno je da efikasnost liganda nije odlučujući faktor za vrijednost energije vezivanja. Sa druge strane, glavni doprinos energiji vezivanja dolazi od zbir energija disperzije, odbijanja i vodonične veze. Veći broj OH grupa dovodi do veće vjerovatnoće stvaranja vodonične veze, što direktno dovodi do značajno nižih vrijednosti energije vezivanja. Treba napomenuti da elektrostatičke interakcije takođe značajno doprinose stabilizaciji kompleksa sa rozmarinskom i hlorogenskom kisjelinom u poređenju sa ibuprofenom. Torzione energije su niže za ibuprofen zbog manje veličine i manje fleksibilnosti ovog molekula u poređenju sa RA i CA. Svakako, trebalo bi sprovesti dodatne in vivo studije sa RA i CA da bi se vidjelo kako ova dva jedinjenja djeluju pojedinačno u živom sistemu i da bi se potvrdilo njihovo djelovanje, jer se takođe moraju uzeti u obzir i metaboličke transformacije. 5. ZAKLJUČAK U okviru doktorske disertacije, odgovoreno je na glavne definisane ciljeve i postavljene hipoteze. Ispitane su ciljevima definisane farmakološke aktivnosti hemijski okarakterisanih etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa, Hyssopus officinalis subsp. aristatus (Godr.) Nyman, sakupljenog na 5 različitih, prirodnih lokaliteta na teritoriji Crne Gore, kao i komercijalnog uzorka, koji je dobijen takođe od samoniklog izopa

(*Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman), prikupljenog na lokalitetima u jugoistočnoj Srbiji. Takođe, definisana su dominantna jedinjenja, kao potencijalni markeri kvaliteta biljne droge *Hyssopi herba*. Nije bilo značajnih razlika među ispitivanim uzorcima herbe izopa kada je u pitanju mikroskopska analiza. Kada je u pitanju organoleptičko ispitivanje, uočile su se manje razlike u smislu intenziteta mirisa i boje cvjetova, kao i visine cvjetnih grančica i veličine listova. Hemijski sastav je ispitan GC-MS metodom za etarska ulja, odnosno LC-DAD-MS metodom za ekstrakte. Rezultati su pokazali da su ispitivana etarska ulje herbe izopa bogata monoterpenskim ugljovodonicima (npr. limonen; 7.99%-23.81%), oksidovanim monoterpenskim jedinjenjima (1,8-cineol; 38.19%-67.1%) i fenilpropanoidima (metil eugenol; 0.00%-28.33%). Generalno, kada je u pitanju hemijski sastav etarskih ulja, dobijeni rezultati su pokazali veliku varijabilnost, budući da se mogu razlikovati tri hromatografska profila ispitivanih etarskih ulja izopa samoniklog u Crnoj Gori: ? etarska ulja bogata 1,8-cineolom i relativno bogata β -pinenom, ali sa niskim sadržajem cis-pinokamfona; ? etarska ulja bogata β -pinenom, limonenom, cis-pinokafonom i metil eugenolom, ali sa relativno niskim sadržajem 1,8-cineola; ? etarska ulja relativno bogata 1,8-cineolom, limonenom, β -pinenom i cis-pinokampfonom. Etarsko ulje komercijalnog uzorka iz Srbije (1EO), koje je bogato 1,8-cineolom i β -pinenom, ali siromašno cis-pinokampfonom, je pokazalo sličnost sa samo jednim uzorkom dobijenim od samoniklih biljaka u Crnoj Gori (u pitanju je biljni materijal sakupljen na lokalitetu Cuce, 6EO). LC-DAD-MS analizom metanolnih ekstrakata herbe izopa je pokazano prisustvo fenolnih jedinjenja: siringinske kisjeline (kao derivata benzoeve kisjeline), derivata hidrosicimetne kisjeline (hlorogenska kisjeline, feruloilhina i rozmarinska kisjeline, kao i jedinjenje kafeoil pentozid) i flavonoida (derivati kvercetina i diosmetina), pri čemu su kvantitativno dominante bile rozmarinska (3.53–17.98 mg/g) i hlorogenska kisjeline (23.35–33.46 mg/g). Metanolni ekstrakti herbe izopa su pokazali slabu do srednje jaku antioksidativnu aktivnost (

DPPH IC50 = 56.04–199.89 μ g/mL, FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe²⁺/g

1

),

koja je uglavnom bila u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenje u ekstraktima

14

. Pokazalo se da postoji određeni potencijal etarskog ulja izopa da djeluje antimikrobno; umjerena aktivnost određenih uzoraka ispitivanih etarskih ulja je pokazana prema sojevima *S. aureus* i *E. coli*; takođe pokazan je i njihov aditivni efekat sa sintetskim antibiotikom (amikacin), što bi moglo da se dovede i u vezu sa primjenom izopa u narodnoj medicini kod blažih infekcija respiratornog i urinarnog trakta. Takođe, pokazan je i antimikrobni potencijal na gljivicu *Candida albicans*, posebno značajan kod ekstrakata. Pokazano je da i ekstrakti i etarska ulja značajno smanjuju oštećenja DNK in vitro (Komet test). Dodatno, snažan, selektivan, vremenski i dozno zavisian, citotoksični efekat ispitivanih metanolnih ekstrakata herbe izopa je utvrđen na humanim ćelijskim linijama kancera grlića materice (HeLa). Kada je u pitanju antiinflamatorna aktivnost herbe izopa, izvršeno je ispitivanje za etarska ulja (in vitro) i metanolne ekstrakte (in vitro i in vivo); takođe ispitana je i sposobnost inhibitornog dejstva dominantnih sastojaka ekstrakata (hlorogenska i rozmarinska kisjeline) na aktivnost enzima COX-1 i COX-2 (in silico).

? Značajna inhibitorna aktivnost je pokazana u COX-2 testu i to kada su u pitanju ekstrakti (etraska ulja nisu pokazala zapaženu aktivnost). Naime, svi analizirani ekstrakti (pri koncentraciji 20 µg/mL) su pokazali procenat inhibicije enzimske aktivnosti COX-2 koji se nije statistički značajno razlikovao od pozitivne kontrole, celekoksiba (pri koncentraciji 8.8 µM). ? In vivo, svi ispitivani ekstrakti (u dozi od 200 mg/kg) su pokazali statistički značajan ($p < 0.05$) stepen inhibicije edema šape pacova u odnosu na kontrolu u drugoj fazi inflamacije indukovane karagenanom, koju između ostalog karakteriše sinteza prostaglandina. Dobijena aktivnost je uporediva ili veća u odnosu na referentnu supstancu, indometacin, pri koncentraciji od 8 mg/kg. 121 ? Inhibitorna priroda ispitivanih liganada prema COX-1 i COX-2 receptorima ispitana je in silico pomoću studija molekularnog dokinga. Prema dobijenim rezultatima RA i CA postižu efikasnu interakciju sa ciljnim receptorima. Najvažnije interakcije su H-veze, π - π , i π -alkil. Preliminarni rezultati sugerišu da ispitivana jedinjenja pokazuju bolju inhibitornu aktivnost prema COX-1 i COX-2 od standardnog NSAID, ibuprofena, što se vidi iz slobodne energije vezivanja (ΔG_{bind} u kJ mol⁻¹). Naime, vezivna energija ispitivanih jedinjenja prema COX-1 i COX-2 je bila u opsegu od -48.2 do -50.8 kJ mol⁻¹. Ibuprofen, kao NSAID, za ista receptorska ciljna mjesta, je pokazao značajno višu energiju vezivanja ($\Delta G_{\text{bind}} =$

31.3 kJ mol⁻¹ za **COX-1** i $\Delta G_{\text{bind}} =$ **30.9 kJ mol⁻¹** za **COX-2**

44

). Dobijeni rezultati ukazuju na dobar antiinflamatorni potencijal herbe izopa i podržavaju tradicionalnu primjenu iste kod nekih upalnih procesa u narodnoj medicini. Takođe ukazuju na preliminarni zaključak da je mehanizam djelovanja ispitivanih metanolnih ekstrakata herbe izopa - inhibicija sinteze prostaglandina, najvjerovatnije preko inhibicije aktivnosti COX enzima (čemu pretpostavlja se, između ostalog doprinose dominantni sastojci, hlorogenska i rozmarinska kisjelina) i to naročito COX-2, kako se pokazalo u in vitro ispitivanju, što bi moglo da ima praktični značaj, s obzirom da brojna neželjena dejstva lijekova koji djeluju inhibitorno na aktivnost COX enzima, potiču od istovremene snažne inhibicije enzima COX-1 (koji je konstitutivni enzim u brojnim zdravim tkivima), pored COX-2. Na sve postavljene hipoteze je eksperimentalno odgovoreno potvrdno, pri čemu je kod prve pokazana određena varijabilnost kada je u pitanju hemijski sastav etarskih ulja analiziranih uzoraka, te su definisana tri hromatografska profila. Dobijeni rezultati, demonstriraju značajan ljekoviti potencijal *H. officinalis*, opravdavaju primjenu u tradicionalnoj medicini, otvaraju nova vrata i pozivaju na dodatna in vivo istraživanja naročito ekstrakata herbe izopa, kako bi se istražili molekularni mehanizmi antigenotoksične, citotoksične (prema HeLa ćelijskoj liniji) i antiinflamatorne aktivnosti u živim sistemima i kako bi se u budućnosti možda razvio neki novi lijek ili suplement. LITERATURA 1. Bräuchler, C.; Meimberg, H.; Heubl, G. Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Menthae)-Taxonomy, biogeography and conflicts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010, 55, 501–523. 2. Jančić, R. *Botanika farmaceutika*; Službeni list SRJ: Beograd, Srbija, 2008. 3. Diklić, N. *Flora SR Srbije*; Josifović, M., Ed.; SANU: Beograd, Srbija, 1974. 4. Rohlena, J. *Conspectus Florae Montenegrinae*; Preslia: 1974; pp. 20-21. 5. Pulević, V. *Građa za vaskularnu floru Crne Gore*; posebna izdanja, Knjiga 2; Rep. Zavod Zašt. Prir.: Podgorica, Crna Gora, 2005. 6. Domac, R. *Mala flora Hrvatske*; Školska knjiga: Zagreb, Hrvatska, 1984. 7. Jančić, R. *Lekovite biljke sa ključem za određivanje*; Grafopan: Beograd, Srbija, 2001. 8. Veres, K. *Variability and biologically active components of some Lamiaceae species* [Ph. D. Thesis]. University of Szeged, Hungary: Department of Pharmacognosy, 2007. 9. Anon. *Hyssopus L.* in GBIF Secretariat (2019). GBIF Backbone Taxonomy. Checklist Dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2019-05-19. 10. Milovanović, D. *Atlas lekovitog bilja*; Šip: Beograd, Srbija, 1975. 11. Tucakov, J. *Lečenje Biljem*; Zapis: Beograd,

Srbija, 2010. 12. Tucakov, J. Lečenje čajevima lekovitog bilja; August Cesarec: Zagreb, Hrvatska, 1973. 13. Kišgeci, J. Lekovite i Aromatične Biljke; Partenon, Srpska Književna Zadruga: Novi Sad, Srbija, 2008. 14. Charles, D.J. Hyssop. In Antioxidant Properties of Spices, Herbs and Other Sources; Charles, D.J., Ed.; Springer: New York, NY, USA, 2013. 15. Judžentienė, A. Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Oil. In Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety; Preedy, V., Ed.; Elsevier, Academic Press: London, UK, 2016; pp. 471–479. 16. Sveto pismo Staroga i Novoga zavjeta. prev. Daničić Đ. i Karadžić V. Britansko i inostrano biblijsko društvo Beograd. 1984. 17. Marković, B. Priručnik za sakupljanje i gajenje lekovitog bilja i pečuraka; Rad Beograd: Beograd, Srbija, 1973. 18. Pravilnik o bližem načinu i uslovima sakupljanja, korišćenja i prometa nezaštićenih divljih vrsta, životinja, biljaka i gljiva koje se koriste u komercijalne svrhe („Službeni list CG” broj 51/08; 2010.). 19. Pravilnik o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva (Sl. glasnik RS br. 5/2010, 47/2011, 32/2016 i 98/2016; Prilog II). 20. Carović-Stanko, K.; Petek, M.; Grdiša, M.; Pintar, J.; Bedeković, D.; Herak Ćustić, M.; Satović, Z. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—A review. Czech J. Food Sci. 2016, 34, 377–390. 21. Kovačević, N. Osnovi farmakognozije; Srpska školska knjiga: Beograd, Srbija, 2002. 22. Marchiosi, R.; Dantas dos Santos, W.; Polimeni Constantin, R.; Barbosa de Lima, R.; Soares, A.R.; Finger-Teixeira, A.; Rodrigues Mota, T.; Matias de Oliveira, D.; de Paiva Foletto-Felipe, M.; Abrahão, J.; et al. Biosynthesis and metabolic actions of simple phenolic acids in plants. Phytochem. Rev. 2020, 19, 865–906. 23. Dewick, P.M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd ed; John Wiley and Sons Ltd: Chichester, 2009. 24. Petrović, S.; Maksimović, Z.; Kundaković, T. Analiza sastojaka biljnih droga: priručnik za teorijsku i praktičnu nastavu; Farmaceutski fakultet, Beograd: Beograd, Srbija, 2009. 25. Falcone Ferreyra, M.L.; Rius, S.P.; Casati, P. Flavonoids: Biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. Front. Plant. Sci. 2012, 3, 222. 26. Singh, B.; Kumar, A.; Malik, A.K. Flavonoids biosynthesis in plants and its further analysis by capillary electrophoresis. Electrophoresis 2016, 38, 820–832. 27. Weston, L.A.; Mathesius, U. Flavonoids: Their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. J. Chem. Ecol. 2013, 39, 283–297. 28. Rehman, R.; Hanif, M.A.; Mushtaq, Z.; Al-Sadi, A.M. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review. Food Rev. Int. 2016, 32, 117–160. 29. ISO 9841 Standard. ISO 9841:2013-Essential oil of hyssop (*Hyssopus officinalis* L. ssp. *officinalis*). Available online: <https://www.iso.org/standard/57475.html> (accessed on 19.05.2018). 30. Hristova, Y.R.; Wanner, J.; Jirovetz, L.; Stappen, I.; Iliev, I.A.; Gochev, V. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. from Bulgaria against clinical isolates of *Candida* species. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 2015, 29, 592–601. 31. Džamić, A.; Soković, M.; Novaković, M.; Jadranin, M.; Ristić, M.; Tešević, V.; Marin, P. Composition, antifungal and antioxidant properties of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *pilifer* (Pant.) Murb. essential oil and deodorized extracts. Ind. Crop. Prod. 2013, 51, 401–407. 32. Venditti, A.; Bianco, A.; Frezza, C.; Conti, F.; Bini, L.; Giuliani, C.; Bramucci, M.; Quassinti, L.; Damiano, S.; Lupidi, G.; et al. Essential oil composition, polar compounds, glandular trichomes and biological activity of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman from central Italy. Ind. Crop. Prod. 2015, 77, 353–363. 33. Mitić, V.; Đorđević, S. Essential oil composition of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Serbia. Facta Univ. Ser. Phys. Chem. Technol. 2000, 2, 105–108. 34. Gorunović, M.; Bogavac, P.M.; Chalchat, J.; Chabard, J.L. Essential Oil of *Hyssopus officinalis* L., Lamiaceae of Montenegro Origin. J. Essent. Oil Res. 1995, 7, 39–43. 35. Hajdari, A.; Giorgi, A.; Beretta, G.; Gelmini, F.; Buratti, S.; Benedetti, S.; Merkouri, A.; Mala, X.; Kabashi, S.; Pentimalli, D.; et al. Phytochemical and sensorial characterization of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (Godr.) Nyman (Lamiaceae) by GC–MS, HPLC–UV–DAD, spectrophotometric assays and e-nose with aid of chemometric techniques. Eur. Food Res. Technol. 2018, 244, 1313–1327. 36. Tsankova, E.; Konaktchiev, A.N.; Génova, E. Chemical composition of the essential oils of two *Hyssopus officinalis* taxa. J. Essent. Oil Res. 1993, 5, 609–611.

37. Moro, A.; Zalacain, A.; Mendoza, J.H.; Carmona, M. Effects of agronomic practices on volatile composition of *Hyssopus officinalis* L. essential oils. *Molecules* 2011, 16, 4131–4139.
38. Владимировна, Т. Фармакогностическое изучение иссопа лекарственного [Диссертация]. Курский государственный медицинский университет, 2006.
39. Zawislak, G. The chemical composition of essential Hyssop oil depending on plant growth stage. *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*. 2013; 12 (3), 161-170.
40. Vlase, L.; Benedec, D.; Hanganu, D.; Damian, G.; Csillag, I.; Sevastre, B.; Mot, A.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Țilea, I. Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities and Phenolic Profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules* 2014, 19, 5490–5507.
41. Marín, F.R.; Ortuño, A.; Benavente-García, O.; Río, J.D. Distribution of flavone glycoside diosmin in *Hyssopus officinalis* plants: Changes during growth. *Planta Med.* 1998, 64, 181–182.
42. Srivastava, A; Awasthi, K; Kumar, B; Misra, A; Srivastava, S. Pharmacognostic and Pharmacological Evaluation of *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae) Collected from Kashmir Himalayas, India. *Pharmacogn J.* 2018; 10(4), 690-693.
43. Hatipoğlu, G.; Sökmen, M.; Bektaş, E.; Daferera, D.; Sökmen, A.; Demir, E.; Şahin, H. Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Ind. Crop. Prod.* 2013, 43, 427–433.
44. Fathiazad, F.; Hamedeyazdan, S. A review on *Hyssopus officinalis* L. Composition and biological activities. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011, 5, 1959–1966.
45. Tahir, M.; Khushtar, M.; Fahad, M.; Rahman, M.A. Phytochemistry and pharmacological profile of traditionally used medicinal plant Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *J. Appl. Pharm. Sci.* 2018, 8, 132–140.
46. Southwell, I.A.; Russell, M.F.; Maddox, C.D. et al. Differential Metabolism of 1,8- Cineole in Insects. *J Chem Ecol.* 2003, 29, 83–94.
47. Li, C; Du, G.H. Diosmin. in *Natural Small Molecule Drugs from Plants*. Springer. 2018; pp. 65-69.
48. Valentová, K.; Vrba, J.; Bancířová, M.; Ulrichová, J.; Křen, V. Isoquercitrin: Pharmacology, toxicology, and metabolism. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 68, 267–282.
49. Karrer, W. *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe (exklusive Alkaloide)*. Birkhauser Verlag, Basel. 1976.
50. Chaowuttikul, C.; Palanuvej, C.; Ruangrunsi, N. Quantification of chlorogenic acid, rosmarinic acid, and caffeic acid contents in selected Thai medicinal plants using RP- HPLC-DAD. *Braz. J. Pharm. Sci.* 2020, 56, 56.
51. Zduńska, K.; Dana, A.; Kolodziejczak, A.; Rotsztejn, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its possible application. *Ski. Pharm. Physiol.* 2018, 31, 332–336.
52. Kizil, S.; Hasimi, N.; Tolan, V.; Kilinc, E.; Karatas, H. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Not. Bot. Horti. Agrobi.* 2010, 38, 99–103.
53. Özer, H.; Sahin, F.; Kiliç, H.; Güllüce, M. Essential Oil composition of *Hyssopus officinalis* L. subsp. *angustifolius* (Bieb.) Arcangeli from Turkey. *Flav. Frag. J.* 2005, 20, 42–44.
54. Wesolowska, A.; Jadczyk, D.; Grzeszczuk, M. Essential Oil Composition of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Cultivated in North-Western Poland. *Herba Pol.* 2010, 56, 57–65.
55. Daniele, F.; Ricci, D.; Epifano, F.; Massimo, C. Composition and antifungal activity of two essential oils of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.). *J. Essential Oil Res.* 2004, 16, 617–622.
56. Moghtader, M. Comparative evaluation of the essential oil composition from the leaves and flowers of *Hyssopus officinalis* L. *J. Hort. For.* 2014, 6, 1–5.
57. Hashemi, L.; Sayedshourbalal, S. Volatile Oil Composition From Flowers and Leaves of *H.officinalis* L. Grown in Esfahan Headsapce Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Research On Crop Ecophysiology.* 2017, 12(1), 35-43.
58. Garg, S.N.; Naqvi, A.A.; Singh, A.; Ram, G.; Kumar, S. Composition of essential oil from an annual crop of *Hyssopus officinalis* grown in Indian plains. *Flav. Frag. J.* 1999, 14, 170–172.
59. Bernotienė, G.; Butkienė, R. Essential oils of *Hyssopus officinalis* L. cultivated in East Lithuania. *Chemija.* 2010, 21, 135–138.
60. Salma A. Chemical and physiological studies on anise hysop (*Agastache foeniculum* Pursh) and hyssop (*Hyssopus officinalis* L) plants grown in Egypt as new spices. *J Bullet Nation Res Centre.* 2002, 27, 25-35.
61. Vallejo, M; Herraiz, J.; Perez-Alonso, M.; Velasco-Negueruela, A. Volatile oil of *Hyssopus officinalis* L. from Spain, *J. Essent. Oil Res.* 1995, 7, 567-568.
62. Salvatore, G.; Nicoletti, M.; Di Gioia, V.; Ciccoli,

R.; D'Andrea, A. Chemical characterization of essential oil of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L. var. *decumbens*) from the High-Provence Alps (Banon, France). *Rivista Italiana EPPOS*. 1997, 673- 681. 63. Kazazi, H.; Rezaei, K.; Ghotb-Sharif, S.J.; Emam-Djomeh, Z.; Yamini, Y. Supercritical fluid extraction of flavors and fragrances from *Hyssopus officinalis* L. cultivated in Iran. *Food Chem*. 2007, 105, 805–811. 64. Fathiazad, F.; Mazandarani, M.; Hamedeyazdan, S. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. From Iran. *Adv. Pharm. Bull*. 2011, 1, 63–67. 65. Dehghanzadeh, N.; Ketabchi, S.; Alizsdeh, A. Essential oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus officinalis* L. grown in Iran. *Asian J. Exp. Boil. Sci*. 2012, 3, 767–771. 66. Chalchat, J.C.; Adamovic, D.; Gorunovic, M.S. Composition of oils of three cultivated forms of *Hyssopus officinalis* endemic in Yugoslavia: *f. albus* Alef., *f. cyaneus* Alef. and *f. ruber* Mill. *J. Essent. Oil Res*. 2001, 13, 419–421. 127 67. Wang, N.; Yang, X-W. Two new flavonoid glycosides from the whole herbs of *Hyssopus officinalis*. *J. Asian Natural. Prod. Res*. 2010, 12, 1044-1050. 68. Proestos, C.; Chorianopoulos, N.; Nychas, G.-J. E.; Komaitis, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem*. 2005, 53, 1190–1195. 69. Ozer, H.; Sokmen, M.; Gulluce, M.; Adiguzel, A.; Kilic, H.; Sahin, F.; Sokmen, A.; Baris, O. In-vitro antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Ital. J. Food Sci*. 2006, 18, 73–83. 70. Mazzanti, G.; Battinelli, L.; Salvatore, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour. Fragrance. J*. 1998, 13, 289-294. 71. Rastkari, N.; Samadi, N.; Ahmadkhaniha, R.; Alemi, R.; Afarin, L. Chemical Composition And Biological Activities Of *Hyssopus Officinalis* Cultivated In Iran. *Natural Products*. 2007, 3(2), 87-91. 72. Hamzah A.M. In Vitro Antibiofilm And Antibacterial Activity Of *Hyssopus Officinalis* Extract And Its Oil Against *Pseudomonas Aeurogenosa*. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR)*. 2016, 2, 2454-1362. 73. Moro, A.; Librán, C.M.; Berruga, M.I.; Zalacain, A.; Carmona, M. Mycotoxigenic fungal inhibition by innovative cheese cover with aromatic plants. *J. Sci. Food Agric*. 2013, 93, 1112–1118. 74. Kreis, W.; Kaplan, M.; Freeman, J.; Sun, D.K.; Sarin, P. Inhibition of HIV replication by *Hyssopus officinalis* extracts. *Antivir. Res*. 1990, 14, 323–337. 75. Gollapudi, S.; Sharma, H.A.; Aggarwal, S.; Byers, L.D.; Ensly, H.E.; Gupta, S. Isolation of a previously unidentified polysaccharide (MAR-10) from *Hyssopus officinalis* that exhibits strong activity against human immunodeficiency virus type 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1995, 210, 145–151. 76. Heilerova, L.; Culakova, V. Ludmila H, Viera C. Antiradical activity and the reduction power of herbal extracts and their phenolic acids. *Bulletin Potravinarskeho Vyskumu*. 2005, 44, 237-247. 77. Ebrahimzadeh, M.A.; Nabavi, S.M.; Nabavi, S.F.; Bahramian, F.; Bekhradnia, A.R. Antioxidant and free radical scavenging activity of *H. officinalis* L. var. *angustifolius*, *V. odorata*, *B. hyrcana* and *C. speciosum*. *Pak. J. Pharm. Sci*. 2010, 23, 29–34. 78. Chang, M.-Y.; Shen, Y.-L. Linalool Exhibits Cytotoxic Effects by Activating Antitumor Immunity. *Molecules* 2014, 19, 6694-6706. 79. Yoo, C.-B.; Han, K.-T.; Cho, K.-S.; Ha, J.; Park, H.-J.; Nam, J.-H.; Kil, U.-H.; Lee, K.-T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. *Cancer Lett*. 2005, 225, 41–52. 80. Wang, H.Y.; Ding, J.B.; Halmurat, U.; Hou, M.; Xue, Z.Q.; Zhu, M.; Tian, S.G.; Ma, X.M. The effect of Uyghur medicine *Hyssopus officinalis* L. on expression of T-bet, GATA-3 and STAT-3 mRNA in lung tissue of asthma rats. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*. 2011, 27, 876–879. 81. Ma, X.; Ma, X.; Ma, Z.; Wang, J.; Sun, Z.; Yu, W.; Li, F.; Ding, J. Effect of *Hyssopus officinalis* L. on inhibiting airway inflammation and immune regulation in a chronic asthmatic mouse model. *Exp. Ther. Med*. 2014, 8, 1371–1374. 82. Lim, W.C.; Seo, J.; Lee, C.I.; Pyo, H.B.; Lee, B.C. Stimulative and sedative effects of essential oils upon inhalation in mice. *Arch. Pharmacol Res*. 2005, 28, 770–774. 83. Salehi, A.; Setorki, M. Effect of *Hyssopus officinalis* essential oil on chronic stress- induced memory and learning impairment in male mice. *Bangladesh J. Pharmacol*. 2017, 12, 448–454. 84.

Lu, M.; Battinelli, L.; Daniele, C.; Melchioni, C.; Salvatore, G.; Mazzanti, G. Muscle relaxing activity of *Hyssopus officinalis* essential oil on isolated intestinal preparations. *Planta Med.* 2002, 68, 213–216. 85. Saini, A.; Sharma R., To explore the ulcer protective and antioxidant potential of *Hyssopus officinalis* in ethanol-induced gastric ulcers in rats. *Br J Pharm Res*, 2012, 2, 197-214. 86. Păun, G.; Litescu, S.C.; Neagu, E.; Tache, A.; Radu, G.L. Evaluation of *Geranium* spp., *Helleborus* spp. and *Hyssopus* spp. polyphenolic extracts inhibitory activity against urease and α -chymotrypsin. *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* 2014, 29, 28–34. 87. Ma, X.; Ma, X.; Ma, Z.; Sun, Z.; Yu, W.; Wang, J.; Li, F.; Ding, J. The Effects of Uygur Herb *Hyssopus officinalis* L. on the Process of Airway Remodeling in Asthmatic Mice. *Evid. Based Complementary Altern. Med.* 2014, 2014, 710870. 88. Matsuura, H.; Miyazaki, H.; Asakawa, C.; Amano, M.; Yoshihara, T.; Mizutani, J. Isolation of α -glucosidase inhibitors from hyssop (*Hyssopus officinalis*). *Phytochemistry.* 2004, 65, 91-97. 89. Miyazaki, H.; Matsuura, H.; Yanagiya, C.; Mizutani, J.; Tsuji, M.; Ishihara, C. Inhibitory effects of hyssop (*Hyssopus officinalis*) extracts on intestinal alpha- glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 2003, 49, 346–349. 90. Miyazaki, H.; Ishihara, T.; Matsuura, H.; Yanagitani, C.; Amano, M.; Mizutani, J. Preparation of propane-1,2,3-triol derivatives as α -glucosidase inhibitors. *J. K. T. Koho. Japan.* 2004, JP 2004256467. 91. Loizzo, M.R.; Saab, A.M.; Tundis, R.; Menichini, F.; Bonesi, M.; Piccolo, V.; Statti, G.A.; de Cindio, B.; Houghton, P.J.; Menichini, F. In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes. *J. Ethnopharmacol.* 2008, 119, 109–116. 92. Pavela, R. Insecticidal activity of certain medicinal plants. *Fitoterapia.* 2004, 75, 745- 749. 93. Benelli, G.; Pavela, R.; Canale, A.; Cianfaglione, K.; Ciaschetti, G.; Conti, F.; Nicoletti, M.; Senthil-Nathan, S.; Mehlhorn, H.; Maggi, F. Acute larvicidal toxicity of five essential oils (*Pinus nigra*, *Hyssopus officinalis*, *Satureja montana*, *Aloysia citrodora* and *Pelargonium graveolens*) against the filariasis vector *Culex quinquefasciatus*: Synergisti. *Parasitol. Int.* 2017, 66, 166–171. 94. Tabatabaie, F.; Golestani, M.; Akhlaghi, L.; Asadi, A.H.; Noori, M.; Maleki, F. In Vitro Activity of *Hyssopus Officinalis*, *Tussilage Farfara*, *Carum Copticum* Extracts Against *Leishmania Major* in Iran. *Advanced Studies in Biology.* 2014, 6/4, 193 – 201. 95. Wselaki, N.; Kuciun, A.; Kiss, A.K. Screening of traditional European herbal medicines for acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory activity. *Acta Pharm.* 2010, 60, 119–128. 96. Shin, S.Y.; Kim, H.; Kang, S.W.; Cho, H.; Kim, E.J.; Park, S.H.; Park, K.M. Antioxidant and Anti-Melanogenic Activities of *Hyssopus officinalis* Extracts. *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea* 2016, 42, 195–201. 97. Alinezhad, H.; Azimi, R.; Zare, R.; Ebrahimzadeh, M.A.; Eslami, S.; Nabavi, S.F.; Nabavi, S.F. Antioxidant and antihemolytic activities of ethanolic extract of flowers, leaves, and stems of *Hyssopus officinalis* L. var. *angustifolius*. *Int J Food Prop.* 2013, 16, 1169-1178. 98. Božović, M.; Milić, M.; Radonjić, M.; Lalić, J.; Mijanović, M.; Ajanović, E. et al. Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Hyssopus officinalis* L. (*Lamiaceae*). *Scripta Scientarum Naturalium.* 2010, 1, 123-131. 99. Goncariuc, M.; Balmus, Z. Diversity of the essential oil content and chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. genotype. *Muzel Olteniei Craiova.* 2013, 29, 71–77. 100. Gostuški, R. *Lečenje lekovitim biljem*; Narodna knjiga, Beograd: Beograd, Srbija, 1969. 101. The Association for the Advancement of Restorative Medicine (AARM). Available online: <https://restorativemedicine.org/library/monographs/hyssop/> (accessed on 19.05.2018). 102. DeFilipps, R.A. *Hyssopus* L. In *Flora Europaea*; Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1972; Volume 3, pp. 170–171. 103. *Pharmacopoea Jugoslavica*, 4th ed.; Savezni zavod za zdravstvenu zaštitu: Beograd, Serbia, 1984. 104. McLafferty, F.W. *The Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 7th ed.; John Wiley and Sons, Inc.: New York, NY, USA, 2000. 105. NIST Mass Spectral Library ver. 05; NIST Mass Spectrometry Data Center: Gaithersburg, MD, USA, 2005. 106. Adams, R. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*, 4th ed.; Allured Business Media: Carol Stream, IL, USA, 2012.

107. International Conference on Harmonisation (ICH). ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1); ICH: Geneva, Switzerland, 2005. 108. Velioglu, Y.; Mazza, G.; Gao, L.; Oomah, B. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 4113–4117. 109. Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.; Dyatmiko, W. 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta.* 1997, 80, 1144–1152. 110. Popović, V. Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Laserpitium* L. (Apiaceae) [doktorska disertacija]. Univerzitet u Beogradu, Beograd, 2013. 131 111. Kukić, J.; Petrović, S.; Niketić, M. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol. Pharm. Bull.* 2006, 29, 725–729. 112. Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* 2003, 133, 2812–2819. 113. Luximon-Ramma, A.; Bahorun, T.; Soobrattee, MA; Aruoma, OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J Agric Food Chem.* 2002, 50, 5042-5047. 114. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 4290–4302. 115. CLSI, Clinical and laboratory standards institute, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard – tenth edition, CLSI document M07–A10, 32, Wayne, PA; USA, 2015. 116. Langeveld, W.T.; Veldhuizen, E.J.; Burt, S.A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol.* 2014, 40(1), 76-94. 117. Hu, Z.Q.; Zhao, W.H.; Asano, N.; Yoda, Y.; Hara, Y.; Shimamura, T. Epigallocatechin gallate synergistically enhances the activity of carbapenems against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2002, 46, 558-560. 118. Orhan, G.; Bayram, A.; Zer, Y.; Balci, I. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005, 43, 140-43. 119. Di Sotto, A.; Mazzanti, G.; Carbone, F.; Hrelia, P.; Maffei, F. Genotoxicity of lavender oil, linalyl acetate, and linalool on human lymphocytes in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 2011, 52, 69–71. 120. Živković, L.; Čabarkapa, A.; Marčetić, M.; Kovačević, N.; Bajić, V.; Jovičić, S.; Spremo-Potparević, B. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic properties of essential oils of *Seseli rigidum* Waldst. & Kit. (Apiaceae). *Arch. Biol. Sci.* 2016, 68, 135–144. 121. Živković, L.; Bajić, V.; Dekanski, D.; Čabarkapa-Pirković, A.; Giampieri, F.; Gasparrini, M.; Mazzoni, L.; Potparević, B.S. Manuka honey attenuates oxidative damage induced by H₂O₂ in human whole blood in vitro. *Food Chem. Toxicol.* 2018, 119, 61–65. 122. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988, 175, 184–191. 123. Anderson, D.; Yu, T.-W.; Phillips, B.; Schmezer, P. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1994, 307, 261–271. 124. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55–63. 125. Koch, A.; Tamez, P.; Pezzuto, J.; Soejarto, D. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 101, 95–99. 126. Boyd, M.R. The NCI Human Tumor Cell Line (60-Cell) Screen. In *Anticancer Drug Development Guide. Cancer Drug Discovery and Development*; Teicher, B.A., Andrews, P.A., Eds.; Humana Press: Totowa, NJ, USA, 2004. 127. Fiebich, B.L.; Grozdeva, M.; Hess, S.; Hüll, M.; Danesch, U.; Bodensieck, A.; Bauer, R. Petasites hybridus extracts in vitro inhibit COX-2 and PGE₂ release by direct interaction with the enzyme and by preventing p42/44 MAP kinase activation in rat primary microglial cells. *Planta Med.* 2005, 71, 12–19. 128. Bakhta, A.; Amira, M.S.; Hamadi, F.; Monique, S.J.S.; Mohamed, B. Anti-oxidant, anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of grapevine leaf extract (*Vitis vinifera*) in

mice and identification of its active constituents by LC–MS/MS analyses. *Biomed. Pharmacother.* 2016, 84, 1088–1098. 129.

Ganga R.B.; Madhu K.P.; Vijaya R.A. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2012, 5, 455–458. 130. Morris, G.M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M.F.; Belew, R.K.; Goodsell, D.S.; Olson, A.J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009, 30, 2785–2791. 131. Selinsky, B. S.; Gupta, K.; Sharkey, K.; Loll, P. J. Structural Analysis of NSAID Binding by Prostaglandin H2 Synthase: Time-Dependent and Time-Independent Inhibitors Elicit Identical Enzyme Conformations. *Biochemistry-US* 2001, 40, 5172–5180. 133 132. Orlando, B.J.; Lucido, M.J.; Malkowski, M.G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J. Struct. Biol.* 2015, 189, 62–66. 133. BIOVIA Discovery Studio 2020, (2020). 134. Borrelli, F.; Pagano, E.; Formisano, C.; Piccolella, S.; Fiorentino, A.; Tenore, G.C.; Izzo, A.; Rigano, D.; Pacifico, S. *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*: An unexploited wild-growing crop for new disclosed bioactives. *Ind. Crop. Prod.* 2019, 140, 111594. 135. Stanković, N.; Mihajilov-Krstev, T.; Zlatković, B.; Stankov-Jovanović, V.; Mitić, V.; Jović, J.; Čomić, L.; Kocić, B.; Bernstein, N. Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula. *NJAS Wagening. J. Life Sci.* 2016, 78, 21–28. 136. Ohnishi, M.; Morishita, H.; Iwahashi, H.; Toda, S.; Shirataki, Y.; Kimura, M.; Kido, R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. *Phytochemistry* 1994, 36, 579–583. 137. Biskup, I.; Golonka, I.; Gamian, A.; Sroka, Z. Antioxidant activity of selected phenols estimated by ABTS and FRAP methods. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2013, 67, 958–963. 138. Adomakobonsu, A.G.; Chan, S.L.; Pratten, M.; Fry, J.R. Antioxidant activity of rosmarinic acid and its principal metabolites in chemical and cellular systems: Importance of physico-chemical characteristics. *Toxicol. Vitro.* 2017, 40, 248–255. 139. Adımcılar, V.; Kalaycıoğlu, Z.; Aydoğdu, N.; Dirmenci, T.; Kahraman, A.; Erim, F.B. Rosmarinic and carnosic acid contents and correlated antioxidant and antidiabetic activities of 14 *Salvia* species from Anatolia. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2019, 175, 112763. 140. Benedec, D.; Hanganu, D.; Oniga, I.; Tipericiuc, B.; Olah, N.; Raita, O.; Bischin, C.; Silaghi-Dumitrescu, R.; Vlase, L. Assessment of rosmarinic acid content in six Lamiaceae species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2015, 28, 2297–2303. 141. Abraham, S.K.; Schupp, N.; Schmid, U.; Stopper, H. Antigenotoxic effects of the phytoestrogen pelargonidin chloride and the polyphenol chlorogenic acid. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 880–887. 142. De Oliveira, N.C.; Sarmiento, M.S.; Nunes, E.A.; Porto, C.M.; Rosa, D.P.; Bona, S.R.; da Silva, J. Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1208–1214. 143. Choi, Y.K.; Cho, G.; Hwang, S.; Kim, B.; Lim, J.H.; Lee, J.; Kim, H.; Kim, W.; Kim, Y. Methyleugenol reduces cerebral ischemic injury by suppression of oxidative injury and inflammation. *Free Radic. Res.* 2010, 44, 925–935. 144. Ciftci, O.; Ozdemir, I.; Tanyildizi, S.; Yıldız, S.; Oguzturk, H. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol. Ind. Health* 2011, 27, 447–453. 145. Chari, R.V. Targeted cancer therapy: Conferring specificity to cytotoxic drugs. *Acc. Chem. Res.* 2008, 41, 98–107. 146. Seca, A.; Pinto, D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 263. 147. Moon, A.; Agrawa, T.; Gupta, P.; Kondlekar, N.; Taksande, A. Anti-cancer therapy: Chlorogenic acid, gallic acid and ellagic acid in synergism. *IOSR J. Pharm. Biol. Sci.* 2017, 12, 48–52. 148. Hossan, M.S.; Rahman, S.; Bashar, A.B.M.A.; Rahmatullah, M. Rosmarinic acid: A review of its anticancer action. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014, 3, 57–70. 149. Fullerton, J.N.; Gilroy, D.W. Resolution of inflammation: A new therapeutic frontier. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016, 15, 551–567. 150. Yang, R.; Yuan, B.C.; Ma, Y.S.; Zhou, S.; Liu, Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb. *Pharm. Biol.* 2017, 55, 5–18. 151. Gautam, R.; Jachak, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* 2009, 29, 767–820. 152. Pushpa K.; Mahesh K. An overview

on plants with anti-inflammatory potential. *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2017, 9, 1-4. 153. Cai Z.M.; Peng J.Q.; Chen Y.; Tao L.; Zhang Y.Y.; Fu L.Y.; Long Q.D.; Shen X.C. 1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research.* 2020, 28, 1-17. 154. Maleki, S.J.; Crespo, J.F.; Cabanillas, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem.* 2019, 299, 125124. 155. Yahfoufi, N.; Alsadi, N.; Jambi, M.; Matar, C. The Immunomodulatory and Anti- Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients* 2018, 10, 1618. 156. Shin, H.S.; Satsu, H.; Bae, M.-J.; Totsuka, M.; Shimizu, M. Catechol Groups Enable Reactive Oxygen Species Scavenging-Mediated Suppression of PKD-NFκB-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Nutrients* 2017, 9, 165. 135 157. Palocz, O.; Pászti-Gere, E.; Gálfi, P.; Farkas, O. Chlorogenic Acid Combined with *Lactobacillus plantarum* 2142 Reduced LPS-Induced Intestinal Inflammation and Oxidative Stress in IPEC-J2 Cells. *PLoS ONE* 2016, 11, e0166642. 158. Han, D.; Chen, W.; Gu, X.; Shan, R.; Zou, J.; Liu, G.; Shahid, M.; Gao, J.; Han, B. Cytoprotective effect of chlorogenic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in MC3T3-E1 cells through PI3K/Akt-mediated Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Oncotarget* 2017, 8, 14680. 159. Hwang, S.J.; Kim, Y.-W.; Park, Y.; Lee, H.-J.; Kim, K.-W. Anti-inflammatory effects of chlorogenic acid in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Inflamm. Res.* 2014, 63, 81–90. 160. Shan, J.; Fu, J.; Zhao, Z.; Kong, X.; Huang, H.; Luo, L.; Yin, Z. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-κB and JNK/AP-1 activation. *Int. Immunopharmacol.* 2009, 9, 1042–1048. 161. Colica, C.; Di Renzo, L.; Aiello, V.; De Lorenzo, A.; Abenavoli, L. Rosmarinic acid as potential anti-inflammatory agent. *Rev. Recent Clin. Trials* 2018, 13, 240–242. 162. Scheckel, K.A.; Degner, S.C.; Romagnolo, D.F. Rosmarinic acid antagonizes activator protein-1-dependent activation of cyclooxygenase-2 expression in human cancer and nonmalignant cell lines. *J. Nutr.* 2008, 138, 2098–2105. 163. Ghasemzadeh Rahbardar, M.; Amin, B.; Mehri, S.; Mirnajafi-Zadeh, S.J.; Hosseinzadeh, H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. *Biomed. Pharmacother.* 2017, 86, 441–449. 164. Shang, A.J.; Yang, Y.; Wang, H.Y.; Tao, B.Z.; Wang, J.; Wang, Z.F.; Zhou, D.B. Spinal cord injury effectively ameliorated by neuroprotective effects of rosmarinic acid. *Nutr. Neurosci.* 2017, 20, 172–179. 165. Carey M.W.; Rao N.V.; Kumar B.R.; Mohan G.K. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. *J Ethnopharmacol.* 2010, 130, 179-182. 166. Singh S.; Kaur M.; Singh A.; Kumar B. Pharmacological evaluation of Antiinflammatory and Anti-ulcer potential of heartwood of *Santalum album* in rats. *AJBPR.* 2014, 4, 140-153. 167. Salehi A.; Setorki M. Analgesic and anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Hyssopus officinalis* in mice. *J. Gorgan Univ. Med. Sci.* 2018, 20, 42-47. 136 168. Khan S.A.; Imam S. M.; Ahmad A.; Basha S.H.; Husain A. Synthesis, molecular docking with COX 1& II enzyme, ADMET screening and in vivo anti-inflammatory activity of oxadiazole, thiadiazole and triazole analogs of felbinac. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2018, 22, 469-484. BIOGRAFIJA

Tijana Mićović je rođena 15.09.1990. **godine u Nikšiću, gdje je završila osnovnu** i srednju **školu** , 16 kao đak generacije i dobitnik diplome "Luča". **Kao**

učenicu Gimnazije "Stojan Cerović", na prirodno-matematičkom smjeru, posebno je zanimala oblast hemije, iz koje je nadograđivala znanja i učestvovala na brojnim takmičenjima. Tako je

na Državnom takmičenju učenika srednjih škola, 2006. godine osvojila prvo mjesto iz oblasti opšte i neorganske hemije, a 2008. godine, prvo mjesto iz oblasti organske hemije . Farmaceutski fakultet u

16

Podgorici UCG (petogodišnje studije) je završila u roku, 2014. godine, sa prosječnom ocjenom "A" (9.99), kao student generacije i dobitnica Plakete

Univerziteta Crne Gore za najboljeg svršenog studenta u Crnoj Gori iz oblasti tehničkih, prirodno-matematičkih i medicinskih nauka za studijsku 2014/15. godinu

16

. Tokom perioda studija, dobila je brojne nagrade i priznanja za postignute rezultate (nagrada Univerziteta Crne Gore za studenta generacije Farmaceutskog fakulteta sa prosječnom ocjenom 10.00, 2011. godine; Atlas stipendija za najboljeg studenta Farmaceutskog fakulteta, 2014. godine; Studentska nagrada "18. septembar" Opštine Nikšić, za najboljeg studenta Farmaceutskog fakulteta, 2014. godine; stipendije Ministarstva prosvjete i nauke). Od 2015.

godine, zaposlena je u Institutu za lijekove i medicinska sredstva Crne Gore

20

. Od završetka studija (2014. godine),

angažovana je i kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici (studijski program Farmacija

19

); od 2017. godine, praktičnu nastavu izvodi na predmetima Farmakognozija I, II i Fitoterapija. Jezici: engleski i ruski. Hobi: Pisanje poezije i kratkih priča (2007. godine izdala je knjigu refleksivne poezije „Isprekidani glasovi“). (b) (d) (h) (j) (l) (n) (p) (r) (t) (v) 1 2 3 4 5 6 7 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 24 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 39 40 41 42 43 44 45 46 47 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 75 76 78 79 80 81 82 83 84 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 107 108 109 110 113 114 115 116 117 118 119 120 122 123 124 125 126 128 129 130 132 134 137 138

sources:

1

677 words / 2% - Internet

[Mićović, Tijana, Topalović, Dijana et al. "Antioxidant, antigenotoxic and cytotoxic activity of essential oils and methanol extracts of hyssopus officinalis l. Subsp. aristatus \(godr.\) nyman \(lamiaceae\)", Plants, 2021](#)

-
- 2 509 words / 2% - Crossref
[Tijana Mićović, Jelena S. Katanić Stanković, Rudolf Bauer, Xuehong Nöst et al. "In vitro, in vivo and in silico evaluation of the anti-inflammatory potential of Hyssopus officinalis L. subsp. aristatus \(Godr.\) Nyman \(Lamiaceae\)", Journal of Ethnopharmacology, 2022](#)
-
- 3 120 words / < 1% match - Internet from 29-Dec-2021 12:00AM
[farfar.pharmacy.bg.ac.rs](#)
-
- 4 27 words / < 1% match - Internet
[Janković, Milena, Živković, Lada et al. "Evaluacija antigenotoksičnog potencijala salvianolične kiseline B u prisustvu vodonik-peroksida na leukocitima periferne krvi in vitro", Medicinski casopis, 2017](#)
-
- 5 123 words / < 1% match - Internet
[Bošković, Marija D.. "Effect of essential oils on survival of salmonella spp. in pork packaged in vacuum and modified atmosphere", Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, 2016](#)
-
- 6 91 words / < 1% match - Internet
[Samardžić, Stevan. "Comparative chemical and pharmacological investigation of lyophilized flower infusions of representatives of the genus Filipendula Miller in Serbia", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2018](#)
-
- 7 34 words / < 1% match - Internet from 26-Feb-2020 12:00AM
[fedorabg.bg.ac.rs](#)
-
- 8 16 words / < 1% match - Internet
[Šmitran, Aleksandra M.. "Influence of the subinhibitory concentration of antibiotics to biofilm production and adherence to matrix proteins of invasive and noninvasive isolates of group A beta-hemolytic streptococcus", Универзитет у Београду, Медицински факултет, 2013](#)
-
- 9 13 words / < 1% match - Internet
[Bufan, Biljana S.. "Influence of aging on phenotypic and functional characteristics of dendritic cells from different rat strains", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2014](#)
-
- 10 13 words / < 1% match - Internet
[Vitnik, Vesna D.. "Experimental and computational study of the mechanism of the reaction of ketones with bromoform", Универзитет у Београду, Хемијски факултет, 2009](#)
-
- 11 10 words / < 1% match - Internet
[Smajić, Miralem M.. "Identification of pharmacophore of at1 receptor antagonists and chemometric approach in hplc method optimization for determination of losartan, valsartan and irbesartan.", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2016](#)
-
- 12 10 words / < 1% match - Internet from 26-Feb-2020 12:00AM
[fedorabg.bg.ac.rs](#)
-

- 13 10 words / < 1% match - Internet
[Kukić-Marković, Jelena. "Chemical and pharmacological characterisation of Stachys anisochila, S. beckeana, S. plumosa i S. alpina subsp. dinarica \(Lamiaceae\)", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2013](#)
-
- 14 10 words / < 1% match - Internet
[Milutinović, Milica M.. "Preparation of biologically active polyphenols by utilising the primrose \(Primula veris\), the horsetail \(Equisetum arvense\) and the yarrow \(Achillea millefolium\) processing waste.", Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, 2017](#)
-
- 15 10 words / < 1% match - Internet
[Matejić, Jelena S.. "Biological activities of essential oils and extracts of selected Apiaceae species", 'National Library of Serbia', 2013](#)
-
- 16 64 words / < 1% match - Internet from 25-Jul-2021 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 17 22 words / < 1% match - Internet from 02-Jan-2015 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 18 20 words / < 1% match - Internet from 14-Jan-2022 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 19 14 words / < 1% match - Internet from 25-Jul-2021 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 20 11 words / < 1% match - Internet from 25-Jul-2021 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 21 10 words / < 1% match - Internet from 06-Sep-2021 12:00AM
www.ucg.ac.me
-
- 22 69 words / < 1% match - Internet from 30-Dec-2019 12:00AM
nardus.mpi.gov.rs
-
- 23 24 words / < 1% match - Internet
[Ušjak, Ljuboš. "Chemical and pharmacological characterisation of selected taxa of the genus Heracleum L. \(Apiaceae\), autochthonous for Southeastern Europe", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2019](#)
-
- 24 15 words / < 1% match - Internet
[Majkić, Tatjana. "Modulators of arachidonic acid metabolism in inflammation: effect of polyphenols on prostaglandin E2 and thromboxane A2 production", Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, 2021](#)
-

- 25 11 words / < 1% match - Internet
[Obradović, Hristina. "Functional characterization of primary mesenchymal stem cells under proinflammatory and altered oxygenation conditions", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2019](#)
-
- 26 11 words / < 1% match - Internet from 02-Nov-2017 12:00AM
[nardus.mpn.gov.rs](#)
-
- 27 10 words / < 1% match - Internet from 27-Feb-2020 12:00AM
[nardus.mpn.gov.rs](#)
-
- 28 48 words / < 1% match - Internet
[Damjanović, Ana B.. "In vitro investigation of antitumor and antimicrobial activities of extracts of mahonia, Mahonia aquifolium \(Pursh\) Nutt.", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2018](#)
-
- 29 45 words / < 1% match - Internet
[Popović, Višnja B.. "Analysis of secondary metabolites and investigation of pharmacological activity of selected species of the genus Laserpitium L. \(Apiaceae\)", Универзитет у Београду, Фармацеутски факултет, 2013](#)
-
- 30 10 words / < 1% match - Internet
[Gnjatović, Marija. "Application of 7C2C5 monoclonal antibody in the development of ELISAs for the detection of Trichinella infection and for the isolation of parasite components that carry an immunodominant epitope", Универзитет у Београду, Технолошко-металуршки факултет, 2018](#)
-
- 31 10 words / < 1% match - Internet
[Popović, Slađana. "Diversity of aerophytic cyanobacteria and algae in biofilm from selected caves in Serbia", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2018](#)
-
- 32 32 words / < 1% match - Internet
[Orčić, Dejan. "Scandiceae tribe \(Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae\) species – potential resources of biologically and pharmacologically active secondary biomolecules", 'National Library of Serbia', 2010](#)
-
- 33 13 words / < 1% match - Internet
[Bošković, Svetlana. "The phytochemical composition, healing potential and sensory characteristics of cultivars of Brassica oleracea L. i Brassica rapa L. species \(Brassicaceae\) from organic and conventional cropping systems", Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, 2016](#)
-
- 34 12 words / < 1% match - Internet from 18-Dec-2018 12:00AM
[www.cris.uns.ac.rs](#)
-
- 35 10 words / < 1% match - Internet
[Simin, Nataša. "Secondary metabolites from selected species of genus Allium sect. Codonoprasum Rchb. – biological activities, phytochemical and chemotaxonomic aspects", Универзитет у Новом Саду, Природно-математички факултет, 2015](#)

-
- 36 36 words / < 1% match - Internet from 14-Jul-2021 12:00AM
fedora.ucg.ac.me
-
- 37 26 words / < 1% match - Internet from 13-Jul-2020 12:00AM
fedora.ucg.ac.me
-
- 38 60 words / < 1% match - ProQuest
[Karanovic, Dunja. "Uporedni pregled morfo-anatomskih karakteristika biljnih organa i analiza etarskih ulja sa njihovom primenom u taksonomiji odabranih rodova tribusa Inuleae Cass. \(Compositae\)". University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 39 11 words / < 1% match - Internet
[Samardžija Nenadov, Dragana D. "Effects of atrazine and biphenol A on the rat ovarian granulosa cells", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2017](#)
-
- 40 10 words / < 1% match - Internet
[Milenković Anđelković, Ana S.. "Ekstrakcija, karakterizacija, biološka aktivnost i potencijalna primena fenolnih jedinjenja iz plodova i lišća biljnih vrsta familija Rosaceae, Cornaceae i Grossulariaceae", Универзитет у Нишу, Природно-математички факултет, 2017](#)
-
- 41 10 words / < 1% match - Internet
[Stevanović, Goran D.. "Clinical significance of extrapulmonary tuberculosis in the differential diagnosis of fever of unknown", Универзитет у Београду, Медицински факултет, 2012](#)
-
- 42 10 words / < 1% match - Internet
[Ćurčić Miladinović, Dejana. "Assessment of the antioxidant and anti-inflammatory potential of vitamin B1 in Japanese quails \(Coturnix japonica\) subacute treated with chlorpyrifos", Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, 2019](#)
-
- 43 10 words / < 1% match - Internet
[Alimpić, Ana Z.. "Macromorphological characteristics of Salvia amplexicaulis Lam., S. jurisicii Košanin and S. ringens Sibth. & Sm. \(Lamiaceae\), chemical composition and biological activity of their essential oils and extracts", Универзитет у Београду, Биолошки факултет, 2016](#)
-
- 44 42 words / < 1% match - Internet from 14-May-2022 12:00AM
pubmed.ncbi.nlm.nih.gov
-
- 45 32 words / < 1% match - Internet from 19-May-2022 12:00AM
www.ph.bg.ac.rs
-
- 46 30 words / < 1% match - Internet
[Tomé, Luciana Uchôa, Ferreira, Heleno Dias et al. "Estudo Morfoanatômico e Atividade Antibacteriana do Óleo Essencial, Extrato Bruto e Frações das Folhas de Macairea radula \(Bonpl.\) Dc.", 'Fronteiras: Journal of Social, Technological and Environmental Science', 2020](#)
-

- 47 29 words / < 1% match - Crossref
[Denys J. Charles. "Chapter 31 Hyssop", Springer Science and Business Media LLC, 2012](#)
-
- 48 28 words / < 1% match - Internet from 21-Oct-2019 12:00AM
www.tandfonline.com
-
- 49 28 words / < 1% match - Internet from 23-Nov-2020 12:00AM
www.zzps.rs
-
- 50 25 words / < 1% match - Internet from 15-Apr-2021 12:00AM
japsonline.com
-
- 51 22 words / < 1% match - ProQuest
[Jakovljevic, Dunja. "Biolosko dejstvo vodenog ekstrakta ploda stavelja \(Rumex crispus L., Polygonaceae\).", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 52 20 words / < 1% match - ProQuest
[Tumbas, Vesna T.. "Antiradikalna i antiproliferativna aktivnost ekstrakata odabranih biljaka iz familija rosaceae i ericaceae.", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 53 17 words / < 1% match - Internet from 19-May-2022 12:00AM
www.pmf.ni.ac.rs
-
- 54 14 words / < 1% match - ProQuest
[Petkovic, Klara. "Uticaj dubrenja azotom i mikroelementima na prinos i mineralni sastav lucerke i silaznog kukuruza", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 55 14 words / < 1% match - ProQuest
[Vujanovic, Milena. "Hemijski Sastav, bioloske i Funkcionalne Karakteristike Novih Proizvoda Od Zove.", University of Novi Sad \(Serbia\), 2021](#)
-
- 56 14 words / < 1% match - Internet from 09-Mar-2017 12:00AM
www.hdmblm.hr
-
- 57 14 words / < 1% match - Internet from 24-Sep-2020 12:00AM
www.thieme-connect.com
-
- 58 13 words / < 1% match - Crossref
[Asta Judžentienė. "Hyssop \(Hyssopus officinalis L.\) Oils", Elsevier BV, 2016](#)
-
- 59 13 words / < 1% match - ProQuest
[Backalic, Svetlana. "Vremenski pristup u metodama istrazivanja frekvencije saobračajnih nezgoda.", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)

- 60 13 words / < 1% match - Internet from 01-Dec-2019 12:00AM
afc.edu.rs
-
- 61 13 words / < 1% match - Internet
[Kostić, Milica. "Hemijski sastav i farmakološki profil ekstrakata Salvia sclarea L.", Универзитет у Нишу, Медицински факултет, 2019](#)
-
- 62 13 words / < 1% match - Internet from 21-Jan-2019 12:00AM
receptti1.blogspot.com
-
- 63 13 words / < 1% match - Internet from 24-Nov-2021 12:00AM
www.tfsa.ac.me
-
- 64 12 words / < 1% match - ProQuest
[Cucuz, Veljko. "Analiza Komine grozda i Dijetetskih Suplemenata Na Bazi grozda i Japanskog Troskota i Ispitivanje Uticaja Suplementacije Kod Eksperimentalnih zivotinja.", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 65 12 words / < 1% match - Crossref
[Dejana Janićijević, Snežana Uskoković-Marković, Dragan Ranković, Marina Milenković et al. "Double active BEA zeolite/silver tungstophosphates – Antimicrobial effects and pesticide removal", Science of The Total Environment, 2020](#)
-
- 66 12 words / < 1% match - ProQuest
[Dimitrov, Nina. "Određivanje sadržaja patulina u proizvodima od jabuka i procena izloženosti stanovništva patulinu", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 67 12 words / < 1% match - Crossref
[Manuel Adrian Picos-Salas, José Basilio Heredia, Nayely Leyva-López, Dulce Libna Ambriz-Pérez et al. "Extraction Processes Affect the Composition and Bioavailability of Flavones from Lamiaceae Plants: A Comprehensive Review", Processes, 2021](#)
-
- 68 12 words / < 1% match - Crossref
[Mohammad, Haroon, P. V. Narasimha Reddy, Dennis Monteleone, Abdelrahman S. Mayhoub, Mark Cushman, G. Kenitra Hammac, and Mohamed N. Seleem. "Antibacterial Characterization of Novel Synthetic Thiazole Compounds against Methicillin-Resistant Staphylococcus pseudintermedius", PLoS ONE, 2015.](#)
-
- 69 12 words / < 1% match - Internet from 01-Mar-2022 12:00AM
epdf.pub
-
- 70 12 words / < 1% match - Internet from 09-Jun-2021 12:00AM
repositorij.pbf.unizg.hr
-
- 71 11 words / < 1% match - Internet from 01-Sep-2021 12:00AM
repositorij.fsb.unizg.hr

-
- 72 11 words / < 1% match - Internet from 18-Apr-2019 12:00AM
www.baltikjunior.com
-
- 73 10 words / < 1% match - Internet from 15-May-2022 12:00AM
9lib.net
-
- 74 10 words / < 1% match - Crossref
[Alessandra Guerrini, Gianni Sacchetti, Monica Paulina Echeverria Guevara, Guglielmo Paganetto et al. "Wild Italian Hyssopus officinalis subsp. aristatus \(Godr.\) Nyman: From Morphological and Phytochemical Evidences to Biological Activities", Plants, 2021](#)
-
- 75 10 words / < 1% match - Crossref
[B. L. Fiebich, M. Grozdeva, S. Hess, M. Hüll, U. Danesch, A. Bodensieck, R. Bauer. " Extracts Inhibit COX-2 and PGE Release by Direct Interaction with the Enzyme and by Preventing p42/44 MAP Kinase Activation in Rat Primary Microglial Cells ", Planta Medica, 2005](#)
-
- 76 10 words / < 1% match - ProQuest
[Franciskovic, Marina. "Fitohemijska karakterizacija i bioloska aktivnost odabranih vrsta tribusa Urticeae i Parietarieae \(Urticaceae Juss.\)", University of Novi Sad \(Serbia\), 2020](#)
-
- 77 10 words / < 1% match - Internet from 04-Dec-2016 12:00AM
pdfs.semanticscholar.org
-
- 78 10 words / < 1% match - Internet from 20-Jul-2020 12:00AM
repositorij.unizg.hr
-
- 79 10 words / < 1% match - Internet
[Biomedicines. 2020 Jan 4; 8\(1\):5](#)
-