

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET PODGORICA

dr pharm. Tijana Mićović

**Farmakognoksijska ispitivanja herbe izopa,
Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) iz
Crne Gore i Srbije**

- Doktorska disertacija -

Podgorica, 2022. godine

UNIVERZITET CRNE GORE
MEDICINSKI FAKULTET PODGORICA

dr pharm. Tijana Mićović

**Farmakognoksijska ispitivanja herbe izopa,
Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) iz
Crne Gore i Srbije**

- Doktorska disertacija -

Podgorica, 2022. godine

UNIVERSITY OF MONTENEGRO
FACULTY OF MEDICINE PODGORICA

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: | Tijana Mićović |
| Datum rođenja: | 15.09.1990. godine |
| Naziv završenog studijskog programa i godina završetka: | Farmaceutski fakultet Univerziteta Crne Gore, petogodišnje osnovne studije (300 ECTS kredita), 2009-2014. godine |

Mentor

Prof. dr Zoran Maksimović, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet (Katedra za Farmakognoziju)

Komisija za ocjenu podobnosti doktorske teze i kandidata:

Prof. dr Zorica Potpara, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet 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 Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet Podgorica (Studijski program Biologija)

Komisija za ocjenu i odbranu doktorske disertacije

Prof. dr Zorica Potpara, vanredni profesor, Univerzitet Crne Gore, Medicinski fakultet 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 Crne Gore, Prirodno-matematički fakultet Podgorica (Studijski program Biologija)

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 kolegini, **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 kolegini prof. dr **Dragici Bojović** na podršci.

Neizmjereno 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 akademske studije Univerziteta Crne Gore Medicinski fakultet u Podgorici Doktorski studijski program Farmacija |
| Naziv doktorske disertacije: | Farmakognozijska ispitivanja herbe izopa, <i>Hyssopus officinalis</i> L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije |
| Datum prijave doktorske teze: | 16.09.2019. godine |
| Datum sjednice Senata UCG na kojoj je 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, farmakognozijskim 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 - tečnom hromatografijom sa diodnim i masenim detektorom (eng. *liquid chromatography with diode array and mass spectrometry*, LC-DAD-MS). Antioksidativna aktivnost je ispitana primjenom testa neutralizacije DPPH radikala (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal) i FRAP testa (eng. *ferric reducing/antioxidant power 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 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 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 IC_{50} = 56.04–199.89 μ g/mL, FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe^{2+} /g). 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 μ g/ml su dali procenat inhibicije COX-2 enzima (54.04 - 63.04%) koji se nije statistički značajno razlikovao od pozitivne kontrole, celekoksiba (61.60%), pri koncentraciji 8.8 μ M. 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 ($p < 0.05$) 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. 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 (ΔG_{bind} = -31.3 kJ mol⁻¹ za COX-1 i ΔG_{bind} = -30.9 kJ mol⁻¹ za COX-2).

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 academic studies at the University of Montenegro Faculty of Medicine Podgorica Doctoral study program: Pharmacy |
| Doctoral thesis title: | Pharmacognostic investigation of aerial parts of <i>Hyssopus officinalis</i> 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. 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 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 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). 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 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). 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. 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 (ΔG_{bind} = -31.3 kJ mol⁻¹ to COX-1, and ΔG_{bind} = -30.9 kJ mol⁻¹ to COX-2).

Conclusion

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 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; 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 biljnih droga.

Farmakognozijska 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, farmakognozijskim 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 farmakognozije 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 zdravlja 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, farmakognozijska ispitivanja herbe izopa predstavljaju neophodan korak ka racionalnoj primjeni ove biljne droge koja se koristi u tradicionalnoj medicini mnogih naroda.

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 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 usnatica (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 <i>H. officinalis</i> | 31 |
| 1.10. Oficinalne droge <i>H. officinalis</i> | 32 |
| 2. CILJEVI I HIPOTEZE | 33 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 34 |
| 3.1. Biljni materijal | 34 |
| 3.2. Makroskopska i mikroskopska analiza herbe izopa | 36 |
| 3.3. Izolacija etarskog ulja | 36 |
| 3.4. Postupak pripreme metanolnih ekstrakata | 37 |
| 3.5. GC-MS analiza etarskih ulja | 38 |
| 3.6. LC-DAD-MS analiza ekstrakata | 39 |
| 3.7. Ukupni fenoli | 41 |
| 3.8. Antioksidativna aktivnost ekstrakata herbe izopa | 42 |
| 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. <i>In vitro</i> ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti etarskih ulja i ekstrakata herbe izopa (test inhibicije enzimске aktivnosti ciklooksigenaze-1 i 2) | 52 |
| 3.12.2. <i>In vivo</i> ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa | 53 |
| 3.12.3. <i>In silico</i> - studije molekularnog dokinga | 54 |
| 3.13. Statistička analiza | 56 |
| 4. REZULTATI I DISKUSIJA | 58 |
| 4.1. Rezultati 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 |

| | |
|---|-----|
| 4.8.1. Efekti metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa na aktivnost enzima COX-1 i COX-2 | 109 |
| 4.8.2. Rezultati <i>in vivo</i> ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata herbe izopa na modelu karagenanom izazvane inflamacije šape pacova | 113 |
| 4.8.3. Rezultati studije molekularnog dokinga | 116 |
| 5. 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].

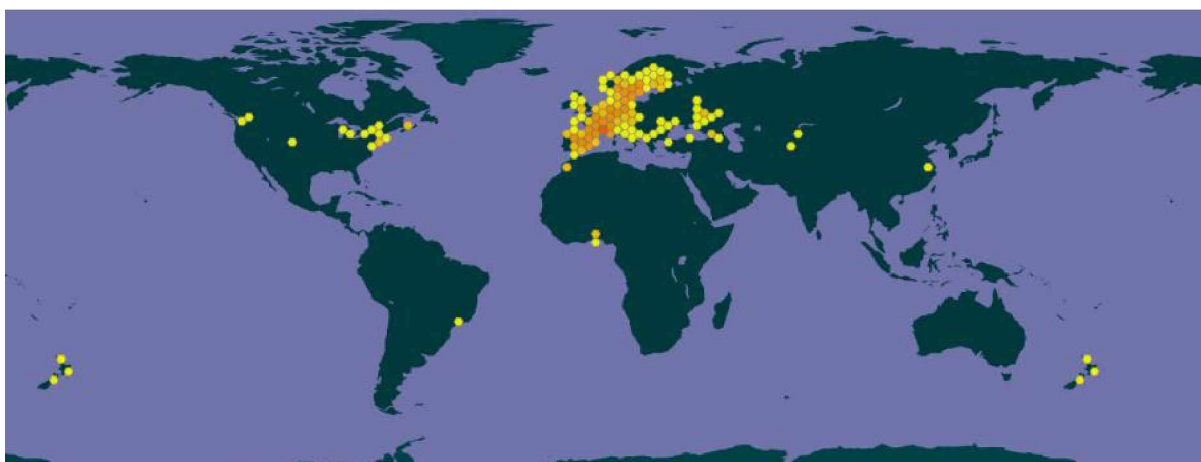
U familiju usnatica spadaju jednogodišnje i višegodišnje biljke, raznovrsnih formi (zeljaste biljke, žbunovi, rjeđe drveće), pri čemu su najzastupljenije višegodišnje zeljaste biljke i žbunovi [2,6]. Stablo je četvrtasto; listovi su obično prosti, naspramni; cvjetovi su zigomorfni, najčešće dvopolni i uglavnom grupisani u cimozne, dihozijalne cvasti, sakupljene u pršljenove, koji mogu biti razmaknuti ili sabijeni, pa grade glavičaste ili klasolike aggregate [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 merikarpium i raspada se na 4 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 farmakognozije, 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, iżop, 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 (sanskrit./ind.), az-zufa (arap.), zufa (pers.)) [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 nadrašta prašnike. Plod je tamna ili crno-smeđa orašica, izduženo-jajastog oblika, zašiljena na vrhu, veličine 2-2.5 mm [3,13].



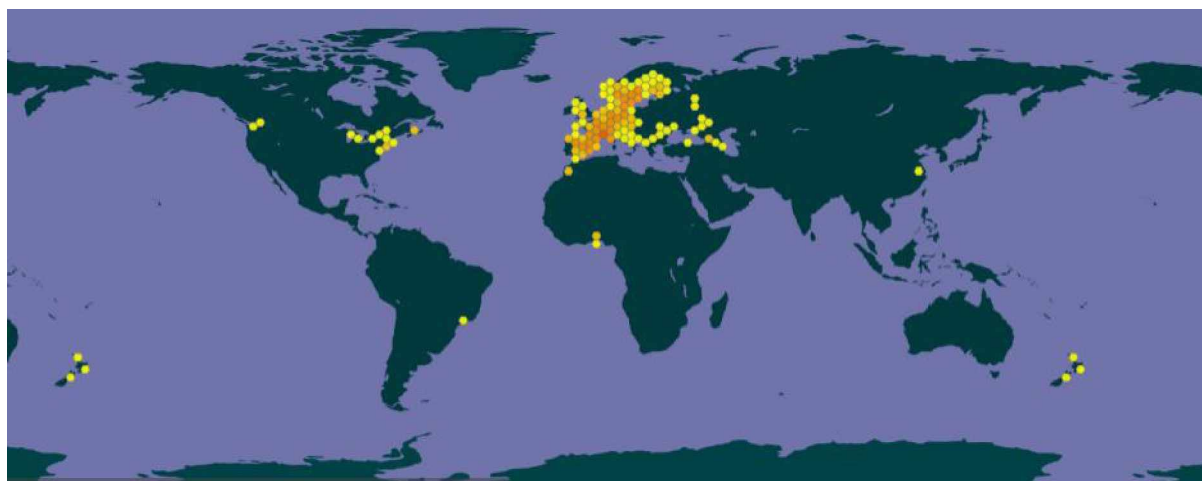
Slika 1.2. *H. officinalis* L.

U okviru vrste *H. officinalis* L. prepoznato je pet podvrsta: subsp. *canescens* (DC.) Nyman; subsp. *montanus* (Jord. & Fourr.) Briq.; subsp. *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 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].

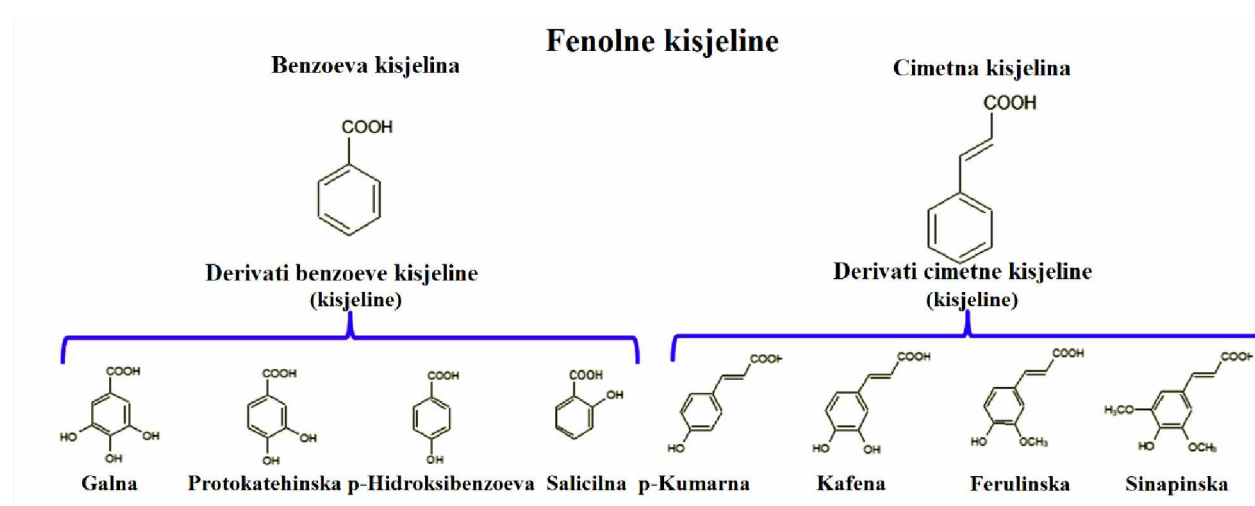
Prema literaturnim podacima u Crnoj Gori je registrovan na sljedećim lokalitetima: “Ad Vučje Gornje pr. Gvožd Han sub monte Vojnik; inter Tušina et Bijela distr. Drobnjaci; Krivača, Radoljev vrh et Bjelice pr. Njeguši; Kokoti distr. Lješanska nahija; Goransko et Šarišnik supra coenob. Piva, Borkovići 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 („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 (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 usnatica (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 benzoeve (C_6-C_1) ili cimetne kisjeline (C_6-C_3) (Slika 1.5.) [21].

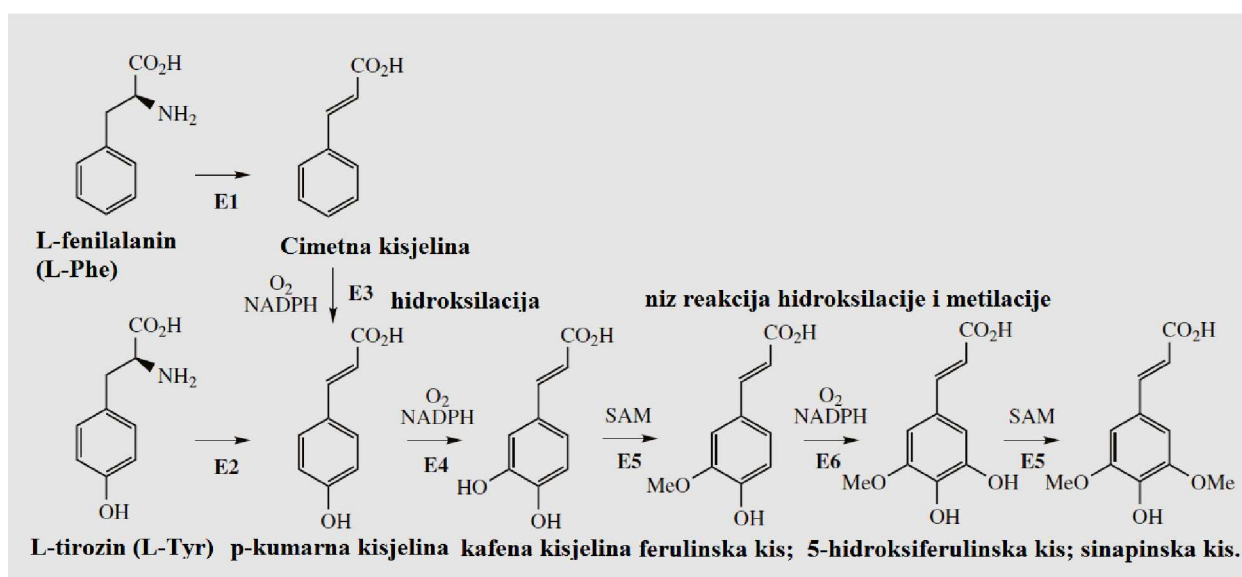


Slika 1.5. Fenolne kisjeline (struktura benzoeve, cimetne kisjeline i njihovih derivata). Preuzeto i prilagođeno iz: Marchiosi i sar. (2020) [22].

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 pentoza fosfata) i nastavlja se nizom od sedam enzimskih koraka preko šikimata ka horismatu, 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 cimetnih kisjeline, 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 cimetne kisjeline nastaju daljim reakcijama hidroksilacije i metilacije [22,23].



Slika 1.6. Biosinteza fenil-propanskih (cimetnih) kisjeline; 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; nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH); S-adenozilmetionin (SAM). Preuzeto i prilagođeno iz: Dewick (2009) [23].

Derivati benzoeve kisjeline, mogu nastati direktno u šikimatnom putu ili cijepanjem derivata cimetne kisjeline [23].

Najzastupljenije fenolne kisjeline u porodici Lamiaceae su kafena i rozmarinska kisjeline, a od značajna je i hlorogenska kisjeline [20].

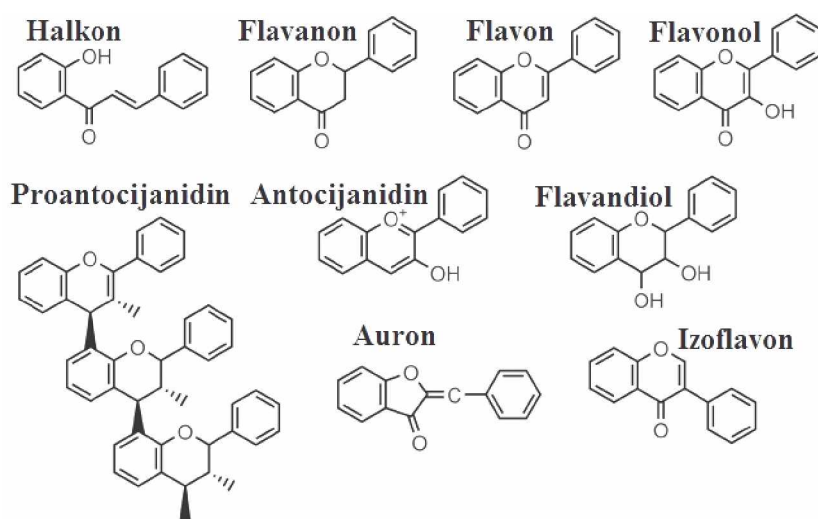
Fenolne kisjeline se mogu naći u različitim organima biljke (slobodne ili konjugovane), a osnovna uloga im je zaštitna, budući da štite biljku od različitih stresora, kao

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 [24].

Flavonoidi su najveća grupa biljnih fenolnih jedinjenja, sa zajedničkom karakterističnom dvoprstenom strukturom i mostom od 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].

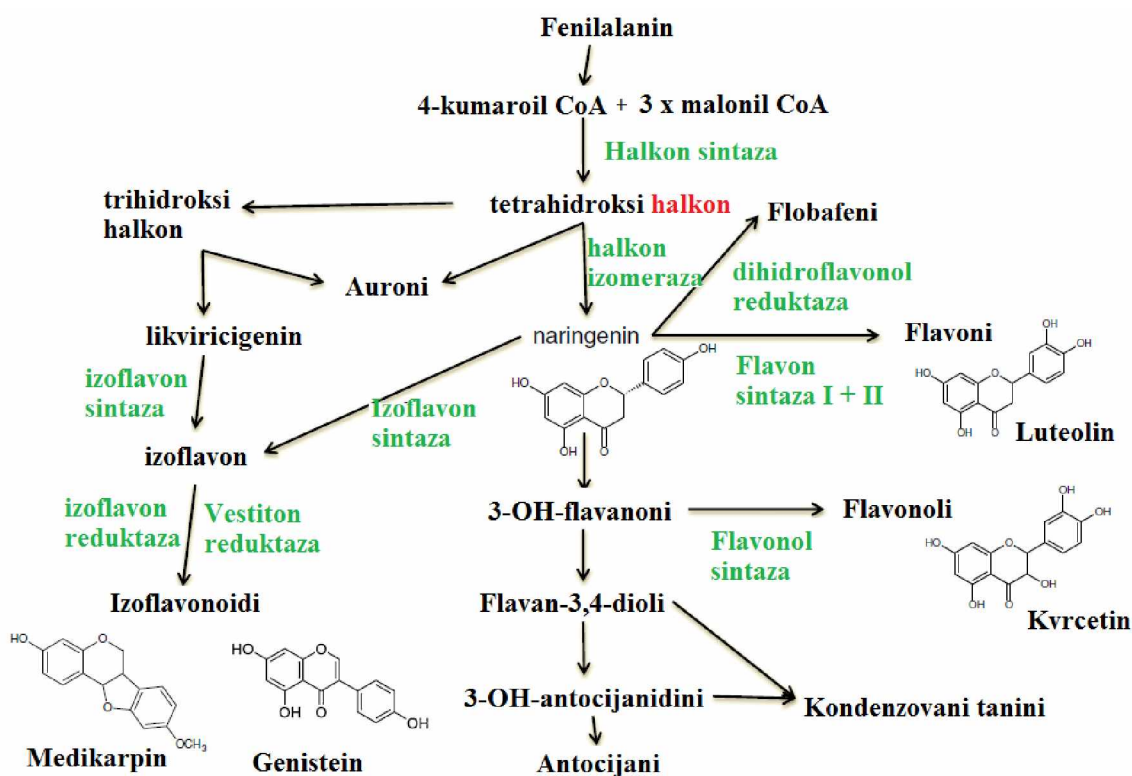
Glavne podrupe flavonoidnih jedinjenja su (ako se posmatra struktura C-3 mosta):

- flavonoidi u užem smislu:
 - derivati hromona (benzo- γ -pirona): flavoni (žuti) i flavonoli (bezbojni do blijedožuti pigmenti); flavanoni (dihidroflavoni) 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 cimetine kiseline, 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 halkanat sintaza (CHS) i nastaje žuto obojeno jedinjenje, halkan. U većini biljnih vrsta, halkanoni nijesu krajnji proizvodi i put se nastavlja kroz nekoliko enzimskih koraka, do drugih klasa flavonoida (Slika 1.8.) [26,27].

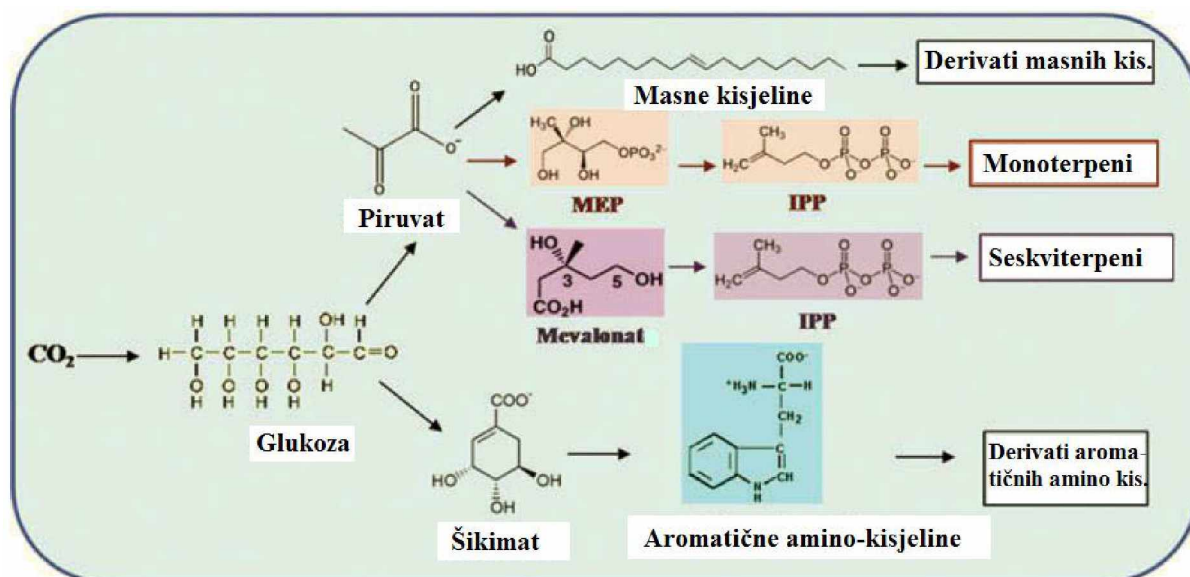


Slika 1.8. Biosinteza flavonoida (pojednostavljeni šematski prikaz sa glavnim enzimima). Preuzeto i prilagođeno iz: Weston i Mathesius (2013) [27].

Etarska ulja su lako isparljive, mirisne, uljaste tečnosti, bezbojne, žućkaste do žutozelene boje ili rijetko specifično obojene, koje produkuju 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].

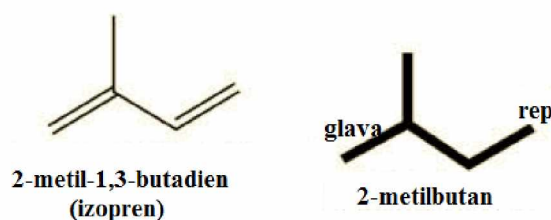
Generalno, sastojci etarskih ulja mogu biti derivati izoprenoida (terpenoida/terpena), derivati masnih kiselina i fenolnih jedinjenja (Slika 1.9.) [28].



Slika 1.9. Biosintetski putevi u kojima nastaju glavna isparljiva jedinjenja u biljkama. Preuzeto i prilagođeno iz: Rehman i sar. (2016) [28].

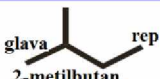
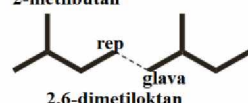
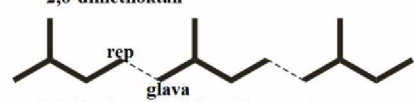
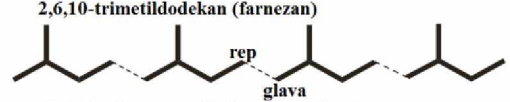
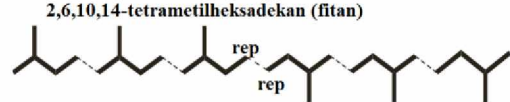
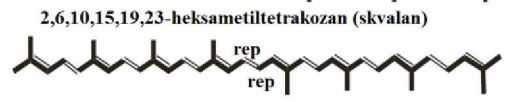
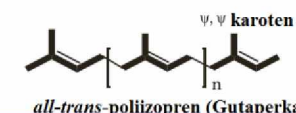
Etarska ulja su izuzetno složenog sastava, zbog prisustva velikog broja različitih hemijskih supstanci, međutim možemo reći da su glavne grupe jedinjenja: monoterpeni, seskviterpeni i u manjem procentu fenilpropanoidi [28]. U pitanju su različiti ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, estri, epoksidi, 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) (C_5) n (Slika 1.10.).



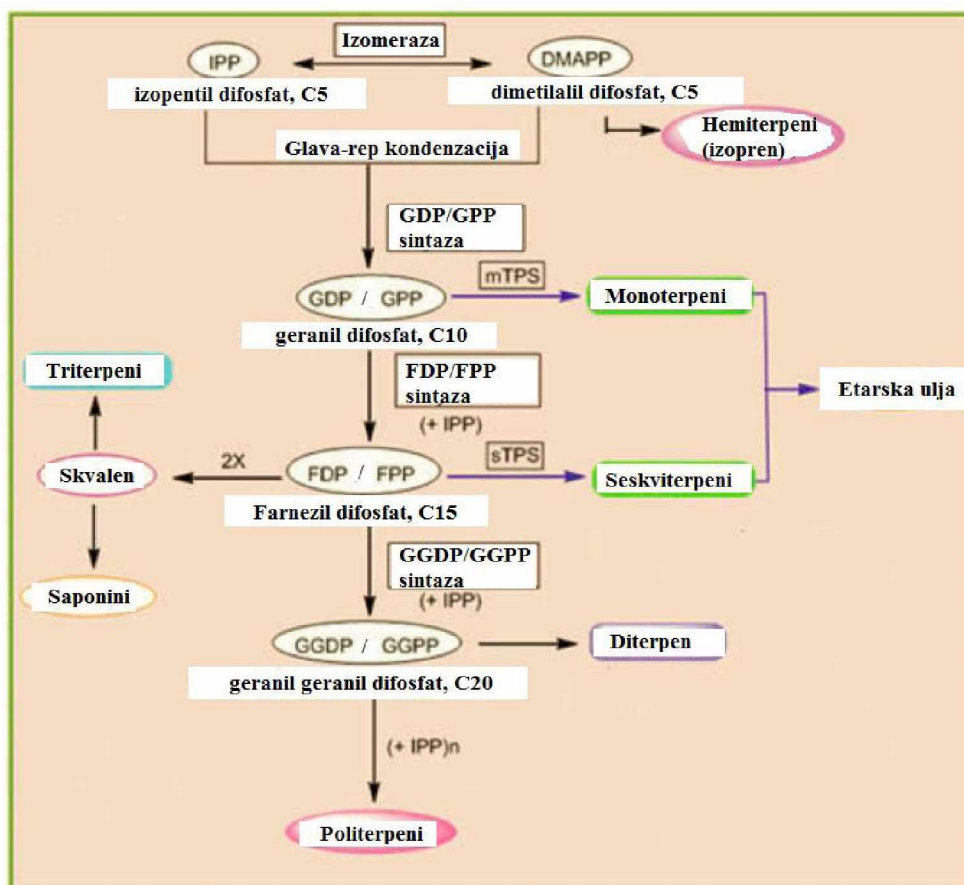
Slika 1.10. Osnovna strukturna jedinica izoprenoida (izopren). Preuzeto iz: Rehman i sar. (2016) [28].

Podjela terpenoida, prema broju izoprenskih – C5 jedinica je data na Slici 1.11.

| Terpeni | Br. C atoma | Br. izoprenskih jedinica | Struktura |
|---------------|---|--------------------------|--|
| Hemiterpeni | C ₅ | Jedna |  2-metilbutan |
| Monoterpeni | C ₁₀ | Dvije |  2,6-dimetiloktan |
| Seskviterpeni | C ₁₅ | Tri |  2,6,10-trimetildodekan (farnezan) |
| Diterpeni | C ₂₀ | Četiri |  2,6,10,14-tetrametilheksadekan (fitan) |
| Triterpeni | C ₃₀ | Šest |  2,6,10,15,19,23-heksametiltetrakozan (skvalan) |
| Tetraterpeni | C ₄₀ | Osam |  2,6,10,15,19,23-heksametiltetrakozan (skvalan) |
| Politerpeni | (C ₅) _n gdje n može biti 9-30,000 ili više | |  all-trans-polizopren (Gutaperka) |

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 (prenil 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. Sintaza 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].

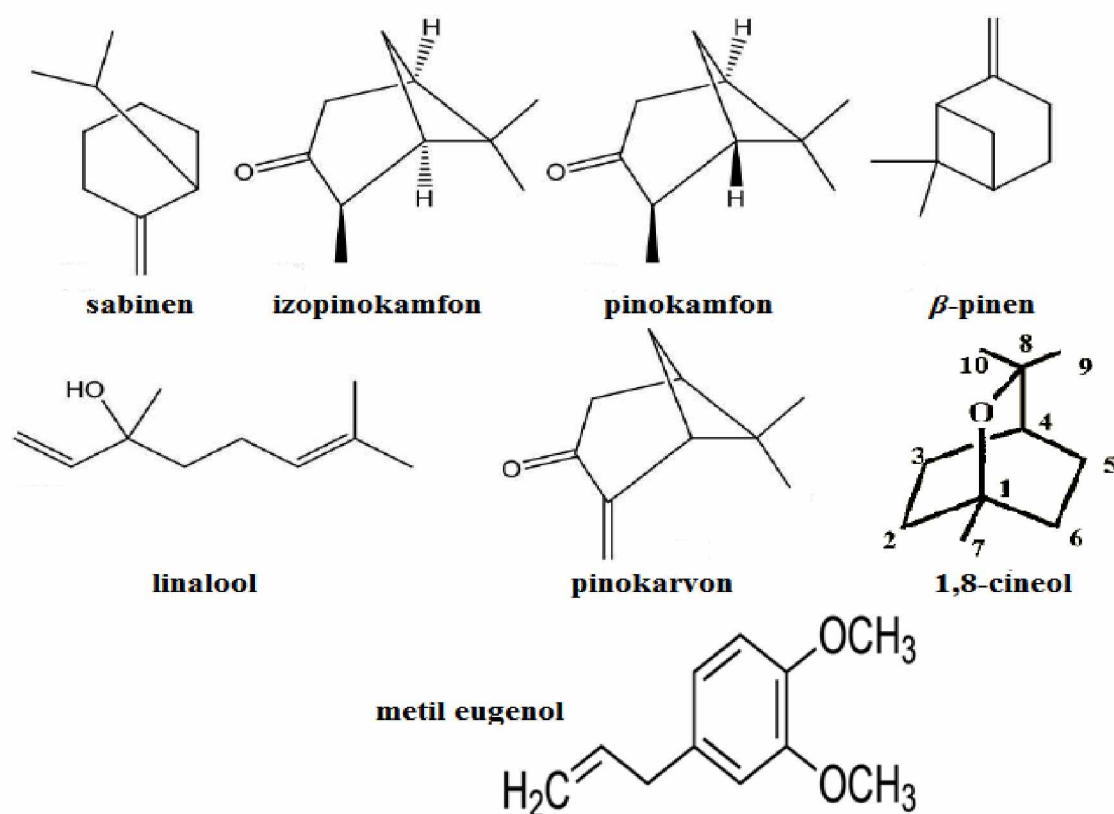
Pored etarskog ulja, herba izopa sadrži i flavonoide, fenolne kiseline, tanine, diterpenske laktone (marubiin) i triterpenoidna jedinjenja kao što su ursolna i oleanolna kiselina [15,32,40].

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

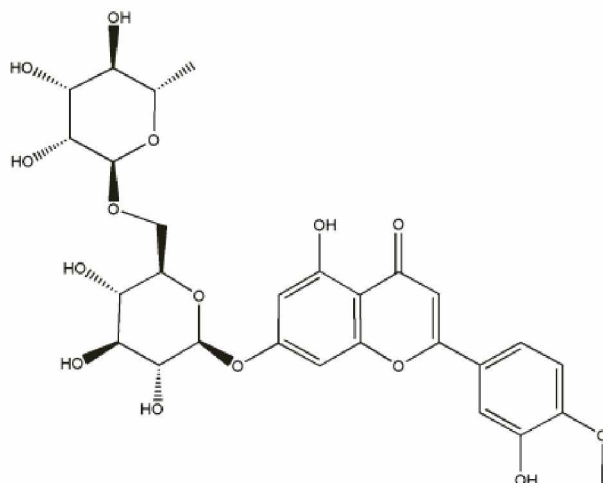
[38,40,41]. U radu Srivastava i saradnika iz 2018. godine u kom je ispitivan samonikli izop iz Kašmira se navodi da je ukupan sadržaj flavonoida, u herbi (metanolni ekstrakt) oko 1.16% [42]; Hatipoglu i saradnici u radu iz 2013. godine, su ispitivali hloroformski, heksanski, metanolni i vodeni ekstrakt *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 \pm 0.10 mg/g, izraženo kao rutin ekvivalent, a kao flavonoid sa najvećim sadržajem identifikovan je izokvercitrin (32.78 \pm 0.23 μ g/g) [40].

Kada su u pitanju fenolne kisjeline, kao kvantitativno dominantne u dostupnoj literaturi za herbu izopa, se navode ferulinska i kafena kisjelina, 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 kisjelina je bio 2.32% [42].

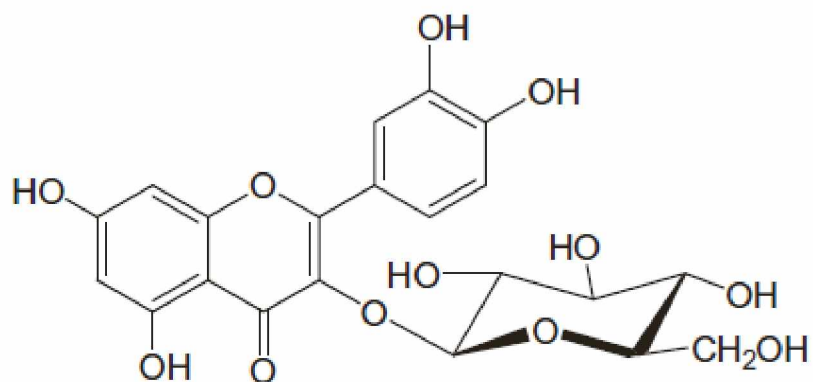
U Tabeli 1.1. je dat sumarni literaturni pregled jedinjenja identifikovanih u herbi izopa.



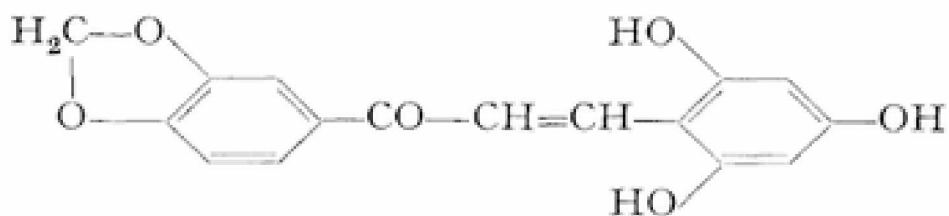
Slika 1.13. Dominantna jedinjenja etarskog ulja herbe izopa. Strukture preuzete iz: Tahir i sar. (2018) i Southwell i sar. (2003) [45,46].



a) diosmin; struktura preuzeta iz: Li i Du (2018) [47]

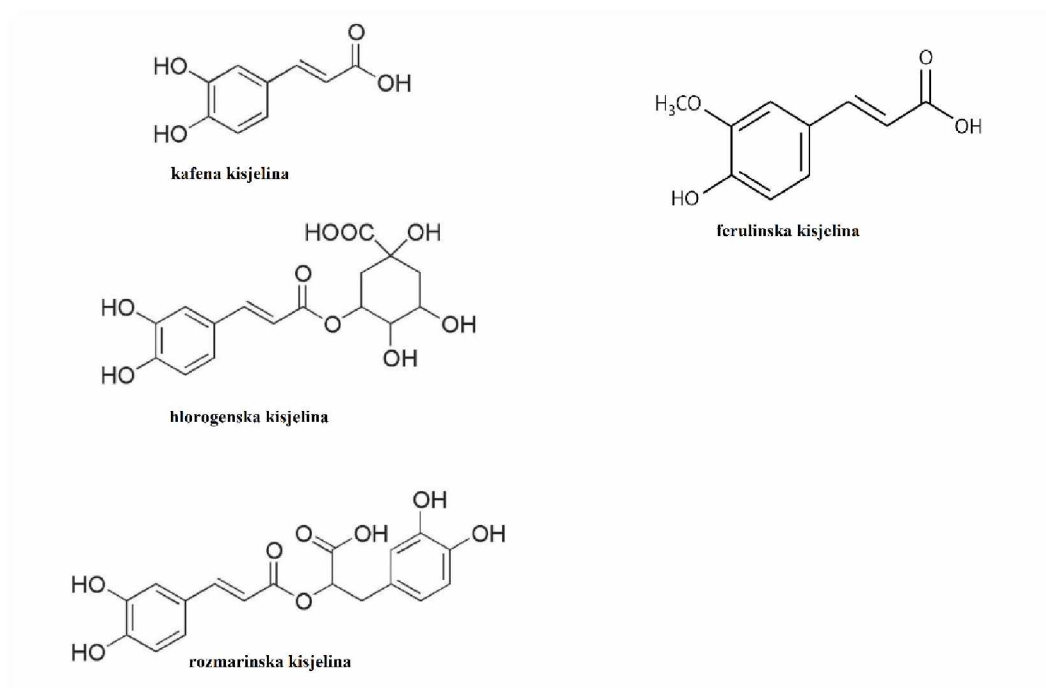


b) izokvercitrin; struktura preuzeta iz: Valentová i sar. (2014) [48]



c) hisopin aglikon; struktura preuzeta iz: Karrer (1976) [49]

Slika 1.14. Karakteristična flavonoidna jedinjenja herbe izopa: a) diosmin [47], b) izokvercitrin [48] i c) hisopin (aglikon) [49].



Slika 1.15. Strukture predstavnika fenolnih kisjelina 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)

| Etarsko ulje | | | | |
|---------------|--|---------------------------|--|------------|
| jedinjenje | Zemlja porijekla biljnog materijala i sadržaj jedinjenja | 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. <i>aristatus</i>) | 44 |
| | Poljska - 44.77% | + | gajeni | 54 |
| | Poljska – 37.13% | + | gajeni | 39 |
| | Italija – 43.3% | + | samonikli | 31 |
| | Italija – 29% | | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 55 |
| | Srbija – 44.7% | + | gajeni | 33 |
| | Srbija – 15.32% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 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. <i>officinalis</i>) | 58 |
| | Litvanija - 33.6% | + (u 2/6 lokaliteta) | samonikli | 59 |
| | Kosovo – 30.44-57.73% | + | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 35 |
| pinokamfon | Indija – 49.1% | + | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 58 |
| | Italija – 18.5% | + | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 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. <i>aristatus</i>) | 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. <i>aristatus</i>) | 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. <i>aristatus</i>) | 31 |
| | Indija – 18.4% | | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 58 |
| | Indija (U.P. Himalaya) – 10.2% | | samonikli | 44 |
| | Španija – 16.82% | | gajeni | 61 |
| | Kosovo – 12.66% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 35 |
| | Bugarska – 11.4% i 39.6% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 44 |
| | Bugarska – 13.38-13.54% | | komercijalni uzorak | 30 |
| | Italija – 10.8% | | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 55 |
| | Turska – 10.6% | | samonikli | 53 |
| | Turska – 7.23% | | samonikli | 52 |
| | Crna Gora – 9.6% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 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. <i>aristatus</i>) | 44 |
| | Srbija – 36.43% | + | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 31 |
| | Francuska – 13.3% | | samonikli (var. <i>decumbens</i>) | 62 |
| | Indija (U.P. Himalaya) – 12.2% | | samonikli | 44 |
| | Turska – 7.2% | | samonikli | 53 |
| linalool | Italija - 35.3-51.2% | + | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 32 |
| | Italija – 7.9% | | gajeni (subsp. <i>officinalis</i>) | 55 |
| | Francuska – 49.6% | + | samonikli (var. <i>decumbens</i>) | 62 |
| metil-eugenol | Crna Gora – 38.3% | + | samonikli | 34 |
| | Italija - 7.3-22.7% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 32 |
| sabinen | Iran – 4.2 – 17.1% | + | gajeni | 63 |
| mirtetil 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. <i>decumbens</i>) | 62 |
| | Italija - 3.7-4.4% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 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. <i>aristatus</i>) | 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. <i>decumbens</i>) | 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. <i>decumbens</i>) | 62 |
| elemol | Poljska – 8.95% | | gajeni | 39 |
| | Srbija – 5.6% | | gajeni | 33 |
| spatulanol | 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. <i>aristatus</i>) | 32 |
| (E)- β -ocimen | Italija – 2.1-5.3% | | samonikli (subsp. <i>aristatus</i>) | 32 |
| terpinen-4-ol | Turska – 7.33% | | samonikli | 52 |
| Ostali sastojci identifikovani u etraskom ulju herbe izopa | | | | Literatura |
| mirtanol metil etar | | | | 44 |
| mirtena kisjelina | | | | 44 |
| metil mirtinat | | | | 44 |
| pinska kisjelina | | | | 44 |
| pinonska kisjelina | | | | 44 |
| kubeben | | | | 44 |
| biciklogermakren | | | | 66 |
| safrol | | | | 44 |
| benzil benzoat | | | | 44 |
| germakren B | | | | 44 |
| Flavonoidi | | | | Literatura |
| (Pod * navedeni dodatni dostupni podaci (tip ekstrakta, porijeklo biljnog materijala i sl.)) | | | | |
| kvercetin-7-O- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-ksilopiranozid | * Kina - etanolni ekstrakt; gajeni | | | 67 |
| kvercetin-7-O- β -D-apiofuranozil-(1 \rightarrow 2)- 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- α -L-ramnopiranozid-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid | | | | |
| 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 | * Grčka - metanolni ekstrakt; gajeni i samonikli | | | 68 |
| apigenin | | | | |
| 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. <i>aristatus</i> ; 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. <i>aristatus</i> ; samonikli | 32 |
| p-hidroksibenzoeva | *metanolni ekstrakt | 68, 69 |
| kafena kisjelina | *metanolni ekstrakt | 68, 69 |
| | *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. <i>aristatus</i> ; 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. <i>aristatus</i> ; 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. <i>aristatus</i> ; samonikli | 32 |
| Ostali sastojci | | Literatura |
| triterpeni - ursolna i oleanolna kisjelina | *etanolni ekstrakt; Italija; subsp. <i>aristatus</i> ; 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 |
|--|---|---|------------|
| <p>* <i>Hyssopus officinalis</i> var. <i>decumbens</i> (Jordan and Fourr.) Briq. – samonikli</p> <p>* Porijeklo: Francuska (Banon)</p> <p>* Etarsko ulje</p> | <p><u>G (+) bakterije</u> - <i>Enterococcus</i> spp. i - <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><u>G (-) bakterije</u> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas</i> spp. - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Klebsiella oxytoca</i> - <i>Salmonella</i> spp.</p> <p><u>Gljive</u> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Candida krusei</i> i - <i>Candida albicans</i></p> | <p>* Baktericidno dejstvo</p> <p>MIC između 0.15% i 0.6% v/v</p> <p>MIC između 0.3% i 1.2% v/v</p> <p>MIC između 0.15% i 0.3% v/v</p> <p>*****</p> <p>Smatra se da su sastojci 1,8-cineol (12.3%) i linalool (57.1%) kojima je bogat <i>H. officinalis</i> var. <i>decumbens</i>, odgovorni za njegovu veću antimikrobnu aktivnost, u poređenju sa <i>H. officinalis</i> (Italija (Pijemont)), koji je ispitivan istovremeno, a da je limonen odgovoran za dobru antigljivičnu aktivnost pokazanu kod oba ulja.</p> | [70] |

| | | | |
|---|---|---|------|
| <p>* <i>Hyssopus officinalis</i> subsp. <i>aristatus</i> – samonikli</p> <p>* Porijeklo: centralna Italija</p> <p>* Etarsko ulje, sa linaloolom (35.3% - 51.2%) i metil eugenolom (7.3 - 22.7%), kao glavnim sastojcima</p> | <p><u>G (+) bakterije</u> - <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><u>G (-) bakterije</u> - <i>Escherichia coli</i></p> <p><u>Gljive</u> <i>Candida albicans</i></p> | <p>Dijametar inhibicije rasta (mm): 8.1-10.5 * Nije bilo aktivnosti protiv <i>Enterococcus faecalis</i></p> <p>Dijametar inhibicije rasta (mm): 7.5-10.3 * Nije bilo aktivnosti protiv <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>Dijametar inhibicije rasta (mm): 9.4-10.2</p> | [32] |
| <p>* <i>Hyssopus officinalis</i> L. – samonikli</p> <p>* Porijeklo: Jugoistočna Anadolija (Turska)</p> <p>* Etarsko ulje (5 µL i 10 µL) sa izopinokamfonom (52.27%) kao glavnim sastojkom</p> | <p><u>G (+) bakterije</u> - <i>Staphylococcus pyogenes</i> - <i>Staphylococcus aureus</i></p> <p><u>G (-) bakterije</u> - <i>Escherichia coli</i></p> <p><u>Gljive</u> - <i>Candida albicans</i></p> | <p>Dijametar inhibicije rasta (mm) za 5 µL i 10 µL:</p> <p>- <i>Staphylococcus pyogenes</i> 5 µL: 19.0±0.1; 10µL: 23.6±0.5</p> <p>- <i>Staphylococcus aureus</i> 5 µL: 18.0±1.7; 10µL: 21.7±1.5</p> <p>- <i>Escherichia coli</i> 5 µL: 20.3±1.8; 10µL: 23.3±1.7</p> <p>* Nije bilo aktivnosti protiv <i>Pseudomonas aeruginosa</i></p> <p>- <i>Candida albicans</i> 5 µL: 15.0±1.0; 10 µL: 20.0±1.1</p> | [52] |
| <p>* <i>Hyssopus officinalis</i> L. - gajeni</p> <p>* Porijeklo: Iran</p> <p>* Etanolni ekstrakt nadzemnih dijelova, sa glavnim sastojcima metil benzoatom (15.78%) i izopinokamfonom (10.3%)</p> | <p><u>G (+) bakterije</u> - <i>Bacillus cereus</i></p> <p><u>G (-) bakterije</u> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Serratia marcescens</i></p> | <p>(MIC 1.562 µg/µL)</p> <p>(MIC 3.125 µg/µL) (MIC 6.25 µg/µL)</p> <p>Nije pokazao aktivnost na gljive <i>Candida albicans</i> i <i>Aspergillus niger</i>.</p> | [71] |

| | | | |
|---|--|--|-------------|
| <p>*<i>Hyssopus officinalis</i> L. Porijeklo: Bugarska</p> <p>*Etarsko ulje izopa iz Bugarske (komercijalni uzorak)</p> <p>* Dominantna jedinjenja u etarskom ulju: <i>cis</i>-pinokamfon (48.98%-50.77%), β-pinen (13.38%-13.54%), <i>trans</i>-pinokamfon (5.78%-5.94%) i β-felandren (4.44%-5.17%)</p> | <p>- <i>Candida albicans</i> - <i>Candida glabrata</i> - <i>Candida tropicalis</i> - <i>Candida parapsilosis</i> - <i>Candida krusei</i></p> | <p>Antigljivična aktivnost protiv 52 klinička izolata i referentna soja kvasnica <i>Candida spp.</i> (MIC \pm SD, μg/mL):</p> <p>(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)</p> <p>Kompleksan hemijski sastav i sinergija sastojaka kao što su <i>cis</i>- i <i>trans</i>- pinokamfon, α- i β- pinen.</p> <p>Etarsko ulje - aktivno i protiv flukonazol osjetljivih i flukonazol rezistentnih izolata <i>Candida spp.</i></p> <p>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.</p> | <p>[30]</p> |
|---|--|--|-------------|

U radu Hamzah iz 2016., se navodi da je etarsko ulje i etanolni ekstrakt izopa pokazao antimikrobni efekat na *Psuedomonas 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

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 zavisao 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 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.

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 nivoe 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 stimulisani intraperitonealnom injekcijom kofeina [82].

U zaključku studije Salehi (2017) se navodi da etarsko ulje 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 zavisano od koncentracije. Što se tiče inhibicije kontrakcije indukovane acetilholinom, vrijednost IC_{50} za etarsko ulje je iznosila 42.4 $\mu\text{g/mL}$, a 61.9 $\mu\text{g/mL}$ za izopinokamfon, dok su vrijednosti istog parametra inhibicije kontrakcije indukovane barijum hloridom iznosile 48.3 $\mu\text{g/mL}$ i 70.4 $\mu\text{g/mL}$ 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 isključen. U radu se navodi da bi miorelaksantna aktivnost indukovana etarskim

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-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 sugerije 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 -amilazi 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 (IC_{50} – 48.51 ± 2.27 µg/mL za cvjetove, 19.47 ± 0.73 µg/mL za listove i 63.1 ± 2.65 µg/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 µl/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 pročišćavanju 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 začín u prehrambenoj industriji. Koristi se i kao sredstvo za aromatizaciju u likerima [44,71]. Listovi i cvjetovi se mogu koristiti kao začín 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 zdravlja 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, ekstrakta 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 prijednevnom vremenu, 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 provjetrenoj 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)

| Uzorak | Porijeklo biljnog materijala | Mjesto sakupljanja | Geografske koordinate | Nadmorska visina (m) | Stanište | Datum sakupljanja (dd/mm/yyyy) | Kolektorski broj - Voucher Specimen | Prinos etarskog ulja (EO) (mL/100 g) ^a | Prinos metanolnog ekstrakta (E) (% w/w) |
|--------|------------------------------|--------------------|-----------------------------|----------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------------------|---|---|
| 1 | Komercijalni uzorak (Srbija) | Jugoistočna Srbija | N/P ^b | N/P | N/P | N/P | N/P | 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 dehidratacije. 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) bojeni 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 prelišen 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. 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.

Alikvot od 0.2 μL svakog rastvora etarskog ulja (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 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-sulfenilsiloksan) HP-5ms koloni (Agilent Technologies; dimenzija 30 m \times 0.25 mm, debljina sloja 0.25 μm). Kolona je eluirana u temperaturno-programiranom režimu: 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 od 0.9 mL/min. Efluent je proslijeđen 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. 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 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' mass

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 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), autosamplerom (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 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 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, 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 μ M, Captiva, Agilent). Naknadnim razblaživanjem istim rastvaračem, pripremljeni su kalibracioni standardi, sa širokim koncentracionim opsegom. Navedeni postupak (uključujući pripremu osnovnih rastvora) je ponavljjan 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 smjernicama International Conference on Harmonisation (ICH) [107].

Za određivanje sadržaja CA (>97%) (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka) i RA (\geq 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: $y = 18000x + 39.94$, $R^2 = 0.9998$, opseg linearnosti 0.00625-0.5 mg/mL; LoD = 0.003 mg/mL; LoQ = 0.010 mg/mL.

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 (FC) reagensa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) - fosfomolibdovolframova kisjelina, metodom koju opisuju Veliglou i sar. (1998) [108].

Fenolna jedinjenja prisutna u biljnom ekstraktu, u baznoj sredini, redukuju FC reagens, W^{6+} jon do W^{4+} jona i Mo^{6+} jon do Mo^{4+} jona (volfram-molibdensko plavo), a sama se oksiduju do o-hinona. 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 (Na_2CO_3 u vodi – vidjeti ispod) | | |
| $Na_2CO_3$³ 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 Na_2CO_3

Za konstruisanje kalibracione krive korišćen je rastvor galne kisjeline (GA) (10-100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Postupak je bio isti kao pri radu sa uzorcima.

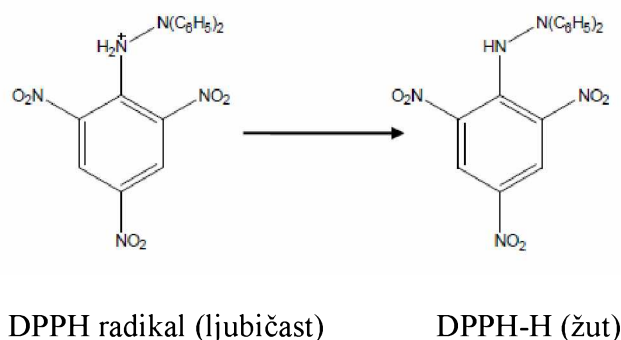
Rezultati, odnosno sadržaj ukupnih fenola (na osnovu izmjerenih apsorbancija i konstruisane kalibracione krive) je izražen u mg ekvivalenata galne kisjeline (GAE) po g suvog ekstrakta (mg GAE/g). Uzeta je srednja vrijednost tri uzastopna mjerenja.

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 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].



Slika 3.5. Redukcija DPPH radikala u 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 (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 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. Inhibicija DPPH je izračunata prema sljedećoj formuli:

$$I (\%) = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

gdje je: A_c – apsorbancija kontrole; A_t – apsorbancija 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 (IC_{50} vrijednost; $\mu\text{g/mL}$), što predstavlja onu koncentraciju ekstrakta, koja neutrališe 50% DPPH radikala. Svaki rezultat predstavlja srednju vrijednost tri uzastopna određivanja.

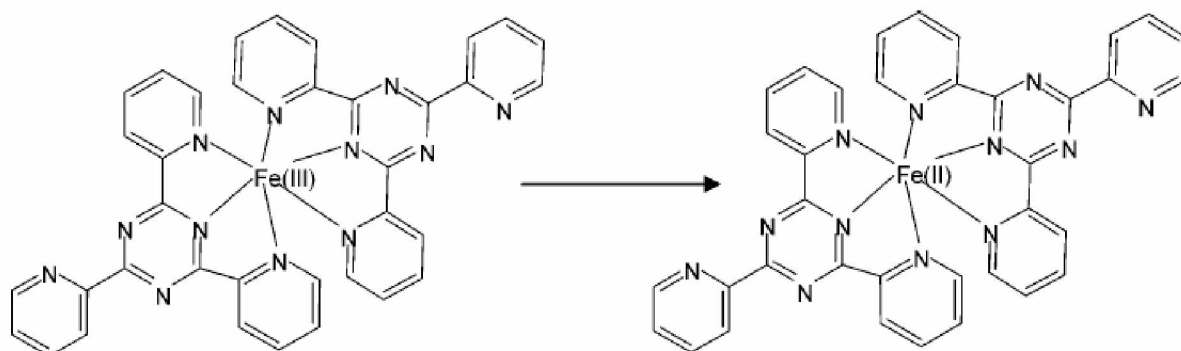


Slika 3.6. Fotografije tokom izvođenja DPPH testa i rada na uređaju Biochrom EZ Read 400

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), plave boje [113,114] kao što je prikazano na Slici 3.7.



Slika 3.7. 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)), kao i 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 FeCl₃² × 6H₂O). 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 × 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 triplicatu.

¹ TPTZ -2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazin (Sigma-Aldrich, 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) [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, *Klebsiella pneumoniae* NCIMB 9111, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 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 μ L etarskog ulja i antibiotika u udubljenju mikrotitarske ploče, a zatim inokulisano u 100 μ L prethodno pripremljene supspenzije mikroorganizama (10^6 CFU/mL). Posljednja dva vertikalna reda mikrotitarske ploče su predstavljala pozitivnu kontrolu (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. $FIC_{\text{etarskog ulja}} = MIC_{\text{etarskog ulja u smješi sa antibiotikom}} / MIC_{\text{etarskog ulja}}$). FICI vrijednost predstavlja zbir FIC etarskog ulja i FIC antibiotika i tumači se na sljedeći način: $FICI \leq 0.5$ sinergizam; $0.5 < FICI \leq 1$ aditivnost; $1 < FICI \leq 2$ indiferentnost (bez efekta) i $FICI \geq 2$ antagonizam [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 $\mu\text{g/mL}$), odnosno različitim koncentracijama metanolnih ekstrakata herbe izopa (100, 200 i 400 $\mu\text{g/mL}$) 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, H_2O_2 (Zorka Pharma; Šabac, Srbija), 50 μM , 20 minuta na 4°C), a zatim PBS-om 30 minuta na 37°C. Koncentracija od 50 μM H_2O_2 je bila najniža koja je indukovala statistički značajno povećanje oštećenja DNK 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 H_2O_2 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 µg/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 µg/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% agarozu niske temperature topljenja (eng. *low-melting-point agarose*, LMPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD), ravnomjerno je nanijeta na pripremljene mikroskopske pločice, prethodno obložene slojem 1% agaroze normalne tačke topljenja (eng. *normal-melting-point agarose*, NMPA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 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 prethodno 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 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, 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, 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.

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 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%). 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).

Ćelije su kultivisane u standardnom medijumu - Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 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 kisjelinama (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 ćelijske 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 bromid), do formazana ljubičaste boje, do koje dolazi u mitohondrijama vijabilnih ćelija, uz pomoć enzima sukcinat dehidrogenaze [124].

Ćelije su zasijane u mikrotitarske 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 µg/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 absorbancija 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. 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 IC_{50} 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 IC_{50} vrijednosti za tretiranu netransformisanu (zdravu) ćelijsku liniju i IC_{50} vrijednosti ispitivanih ekstrakata na malignim ćelijama. $SI < 2$ ukazuje na generalnu toksičnost ispitivanog agensa, $SI \geq 2$ označava selektivnu toksičnost, dok $SI \geq 3$ ukazuje na visoku selektivnu toksičnost [125].

Prateći preporuke Nacionalnog instituta za kancer (eng. *National Cancer Institute*, NCI) [126], izračunati su parametri GI_{50} , TGI i LC_{50} za svaki ekstrakt:

- Vrijednost GI_{50} 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 LC_{50} 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), zasniva 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 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 ekstrakata 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 šape pacova [128,129]. Inflamacija kod svih pacova je izazvana intraplantarom 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:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 \times [1 - (Y_t / Y_c)]$$

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 kisjelina) 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 [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 $48 \times 44 \times 44 \text{ \AA}^3$ i $38 \times 44 \times 48 \text{ \AA}^3$ 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:

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{vdw+hbond+desolv}} + \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{total}} + \Delta G_{\text{tor}} - \Delta G_{\text{unb}}$$

gdje je ΔG_{bind} procijenjena slobodna energija vezivanja, $\Delta G_{\text{vdw+hbond+desolv}}$ označava zbir energija disperzije i odbijanja (ΔG_{vdw}), vodonične veze (ΔG_{hbond}) i desolvacije (ΔG_{desolv}). ΔG_{total} predstavlja konačnu ukupnu unutrašnju enegriju, 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 kJ mol⁻¹/teški atom.

$$\text{LE} = \frac{\Delta G_{\text{bind}}}{N}$$

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 (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 antigenotoksične aktivnosti, rezultati su izraženi kao srednja vrijednost ($n=3$) \pm standardna greška srednje vrijednosti (eng. *Standard error of the mean*, SEM). Statistička 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 $p < 0.001$.

U testu citotoksičnosti, parametri IC₅₀, GI₅₀, TGI i LC₅₀ su izračunati korišćenjem softvera MS Office Excel® free add-in ED50 plus v1.0 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.

U COX-1 i COX-2 testu, korišćene su metode deskriptivne statistike (aritmetička sredina, standardna devijacija i 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 herbe izopa

Makroskopska analiza

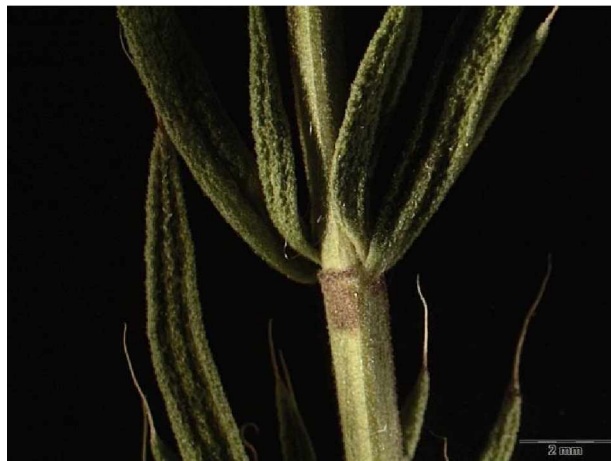
Makroskopskom analizom herbe izopa utvrđeno je da su listovi sivkasto zeleni, izduženo eliptični do lancetasti, zašiljeni na vrhu i veoma tačkasti sa obje strane od brojnih žljezdanih dlaka sa etarskim uljem. Iako površina lista djeluje glatko kada se posmatra golim okom, tek pod uvećanjem lupe se vide 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*

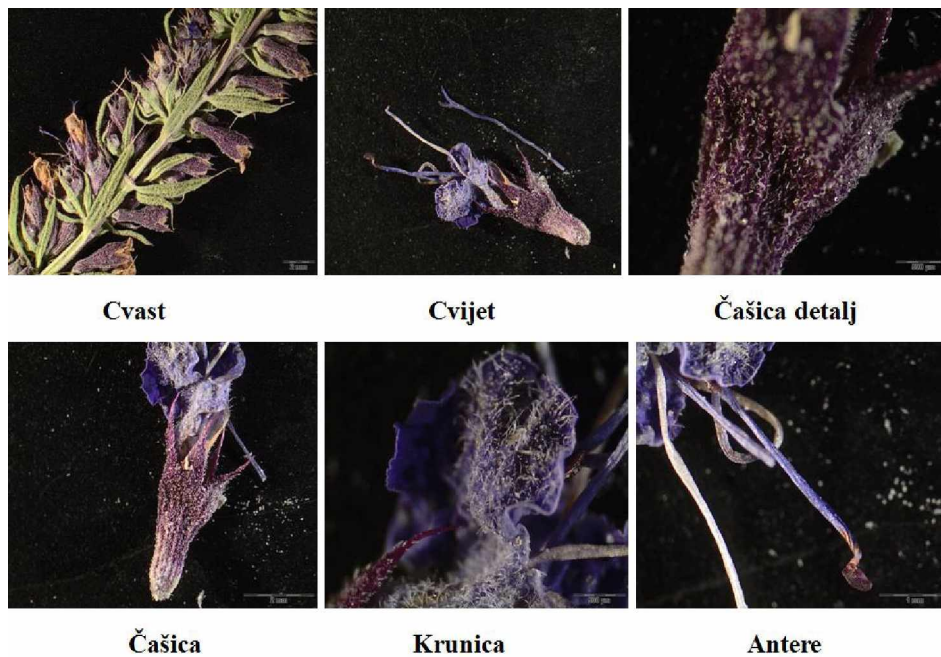
Brojne žljezdane dlake ispunjene etarskim uljem, čine ovu biljku izuzetno aromatičnom. Mirisa je jakog, prijatnog; ukusa takođe aromatičnog, kamforastog i nagorkog.

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.

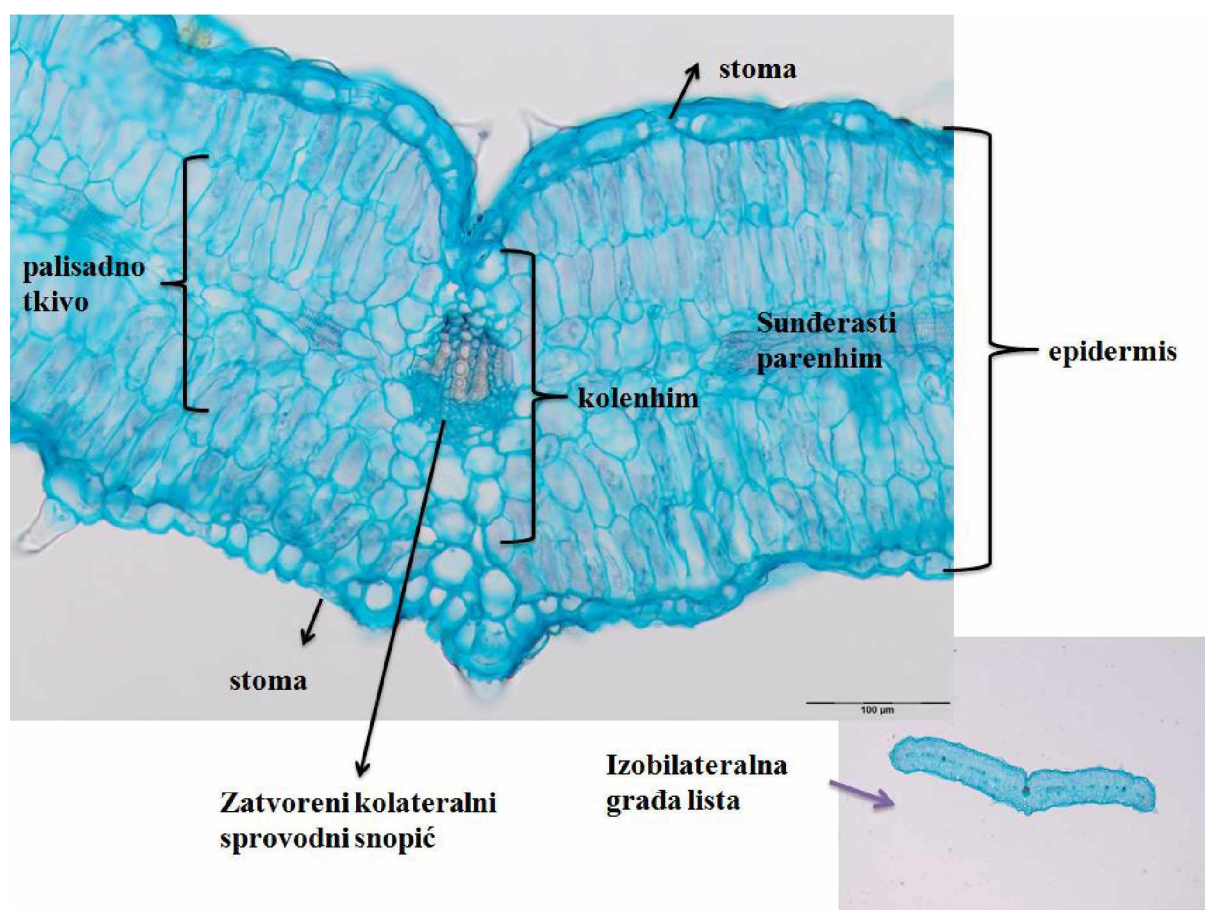


Slika 4.3. Cvijet izopa

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 sunderasti parenhim (jednoslojan)
- zatvoreni kolateralni sprovodni snopić i
- kolenhim sa unutrašnje strane lica i naličja, u centralnom nervu (Slika 4.4.).

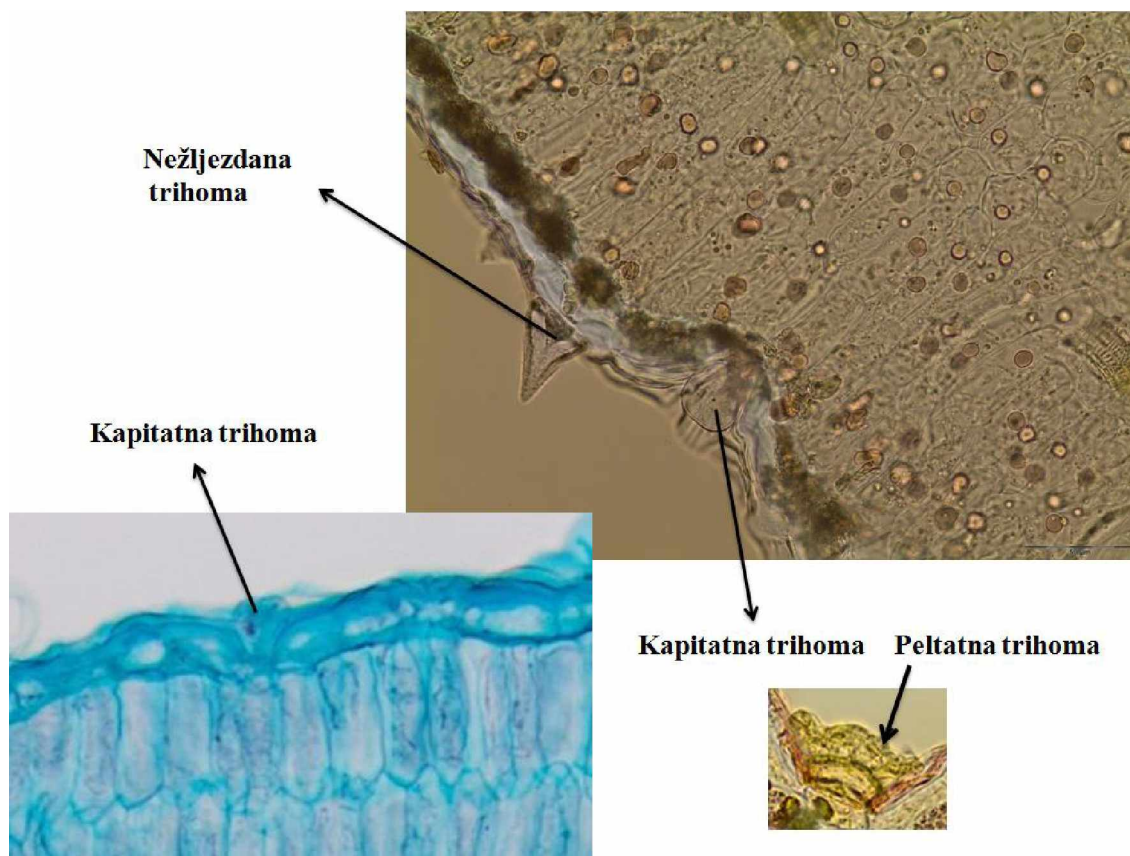


Slika 4.4. Poprečni presjek lista izopa (izobilateralna građa)

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

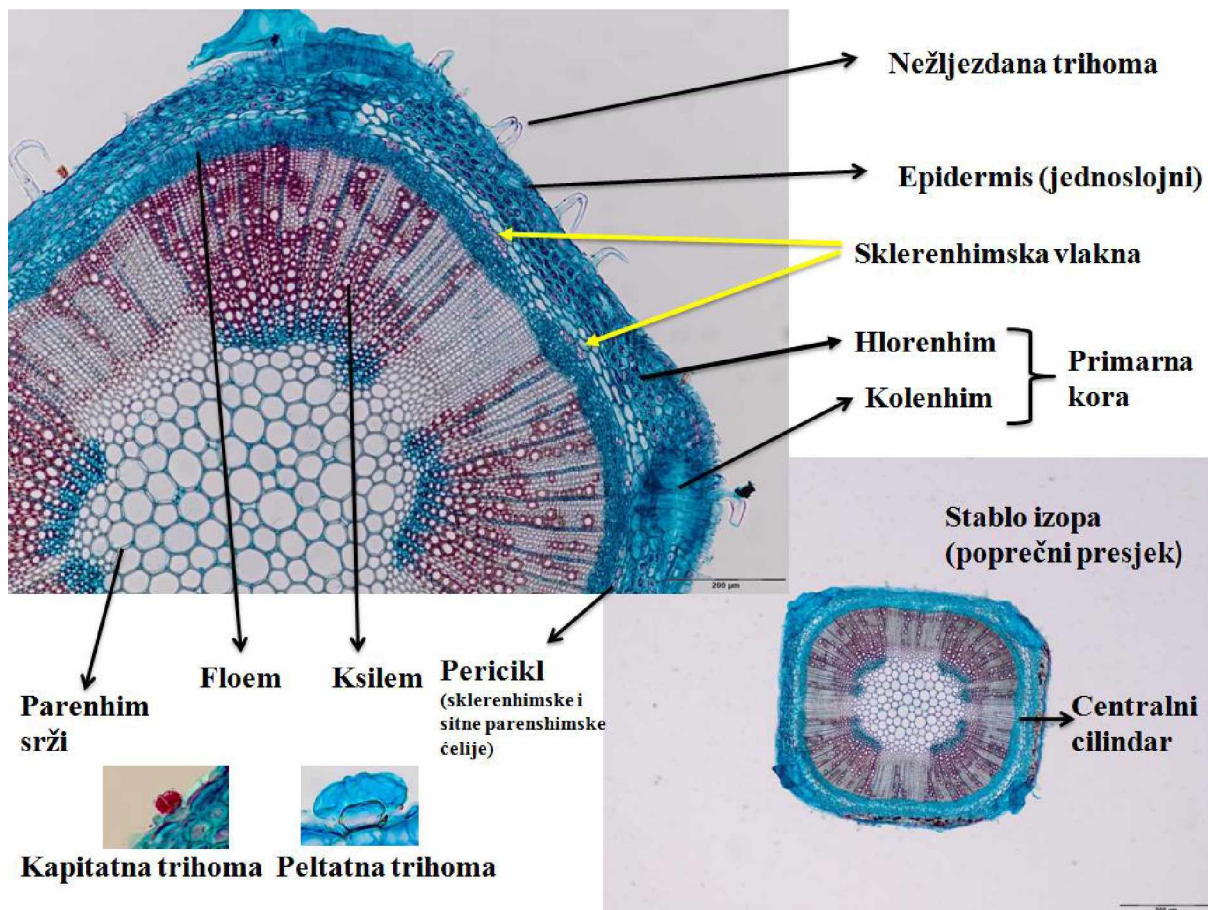
glavicom koju čini osam ćelija u istom nivou) (Slika 4.5.). Pored žljezdanih dlaka, na epidermisu lista (posebno na naličju), u manjem obimu su prisutne i nežljezdane dlake, koničnog oblika, obično jednoćelijske, kratke, dok u predjelu centralnog nerva mogu biti i duže, izgrađene od najčešće tri ćelije (Slika 4.5.).



Slika 4.5. Žljezdane (kapitadne i peltatne) i nežljezdane dlake na epidermisu lista izopa

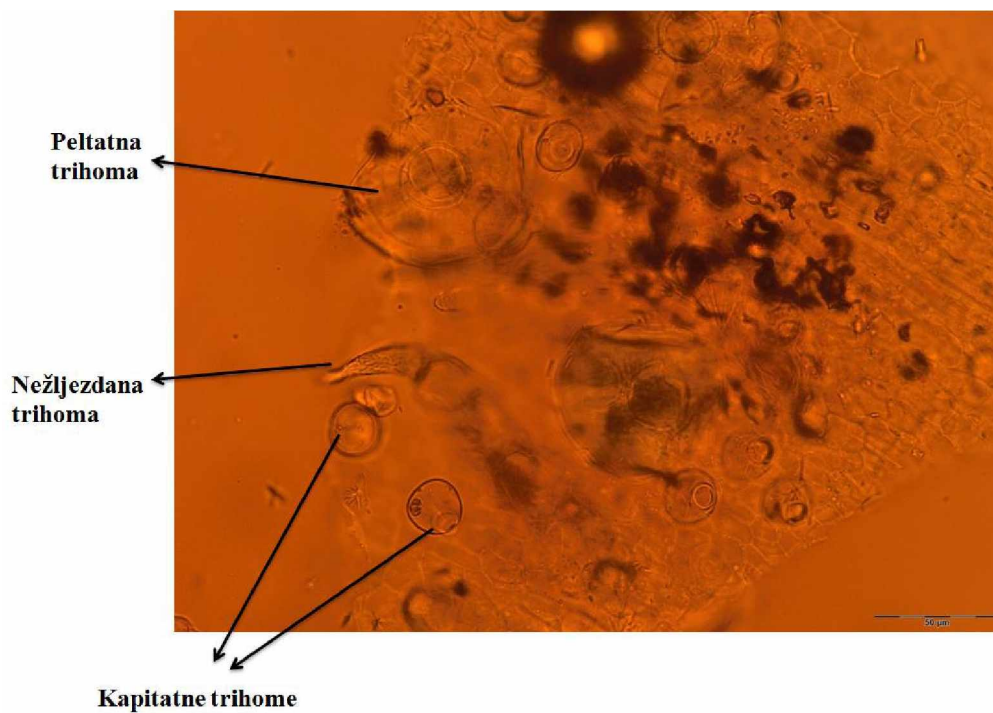
Stablo izopa na poprečnom presjeku je četvorougaono. U primarnoj građi stabla (Slika 4.6.) se, od površine ka centru presjeka, razlikuju:

- 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 (kapitadne 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.

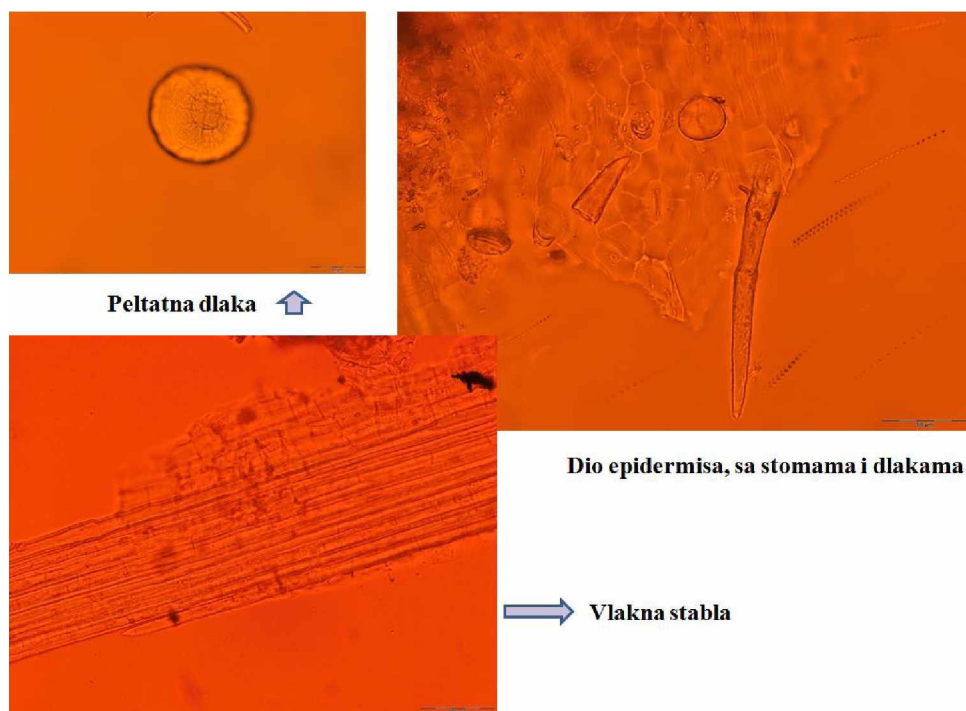


Slika 4.6. Glavni elementi u primarnoj građi stabla izopa

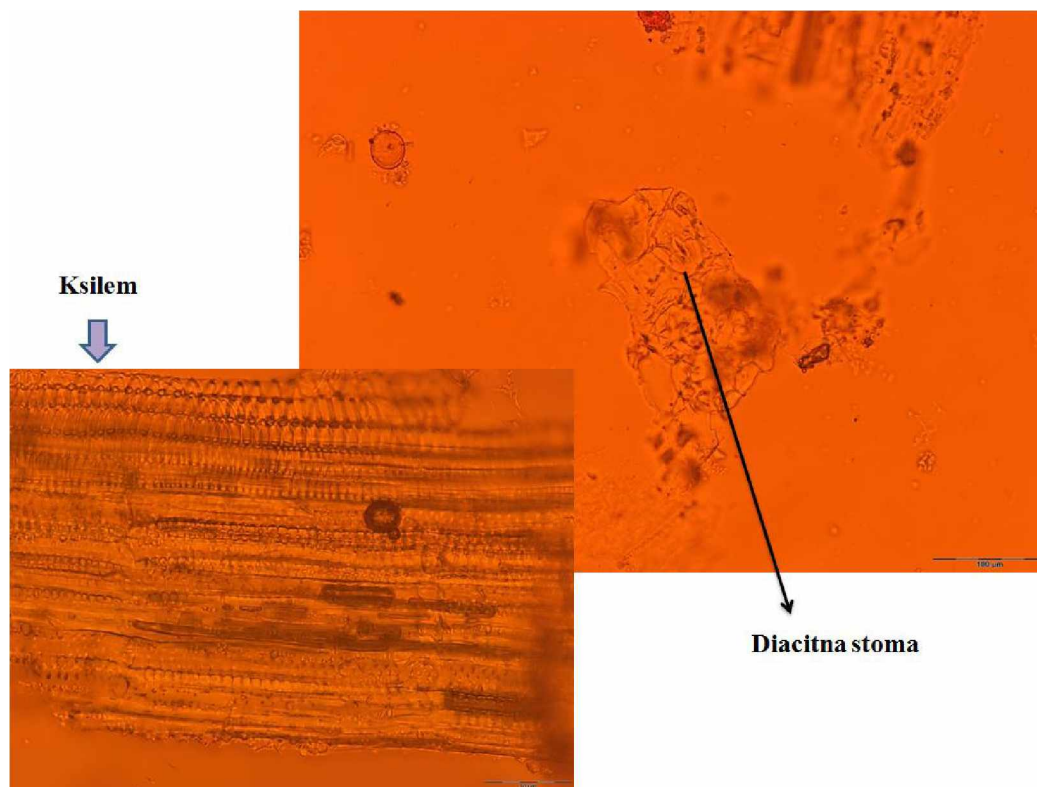
Kada su u pitanju praškovi, analizirano je svih šest uzoraka i zabilježeni su neki karakteristični elementi u građi lista, stabla i cvijeta (Slike 4.7., 4.8., 4.9. i 4.10.).



Slika 4.7. Epidermis sa svim tipovima trihoma

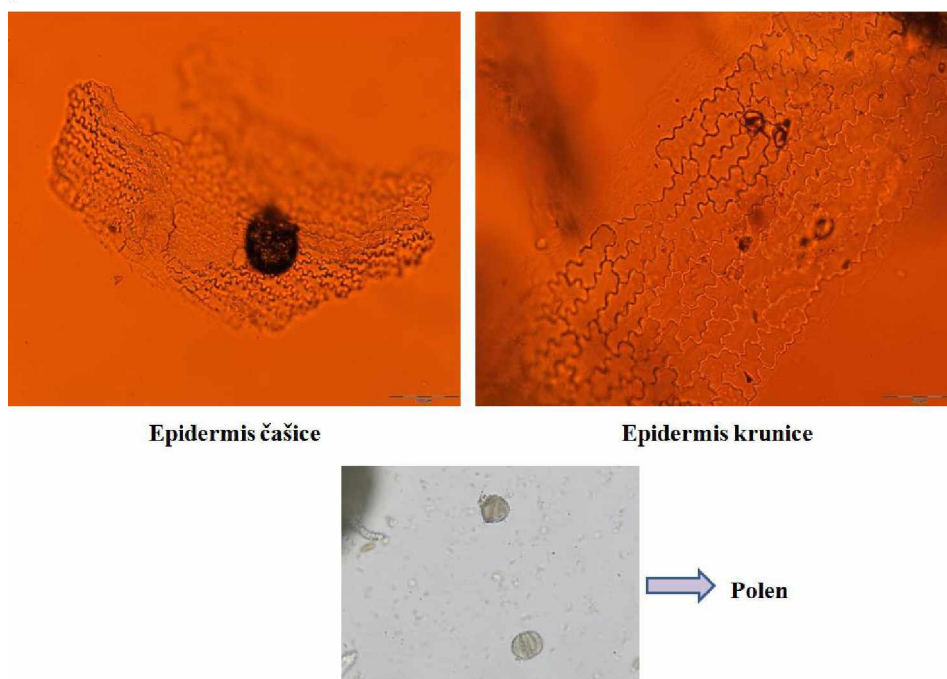


Slika 4.8. Prašak herbe izopa; karakteristični elementi građe lista i stabla



Slika 4.9. Prašak herbe izopa; karakteristični elementi grade 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

* Čelije 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

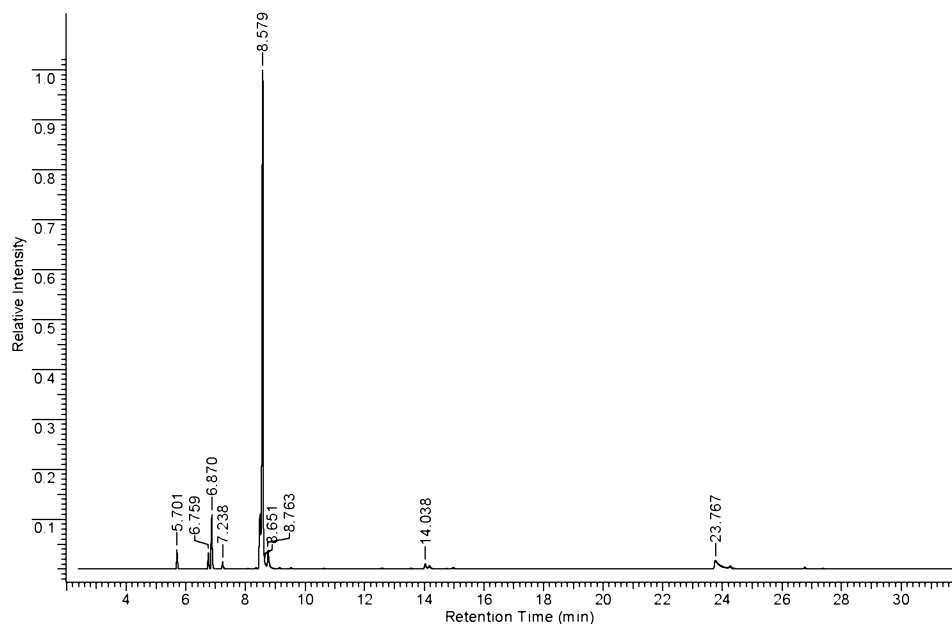
Hidrodestilacijom herbe izopa, *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*, porijeklom sa 5 različitih prirodnih lokaliteta u Crnoj Gori, kao i komercijalnog uzorka iz Srbije dobijeno je etarsko ulje blijedo žućkasto-zelene boje, karakterističnog, prijatnog mirisa. Prinos etarskog ulja se kretao u opsegu 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%).

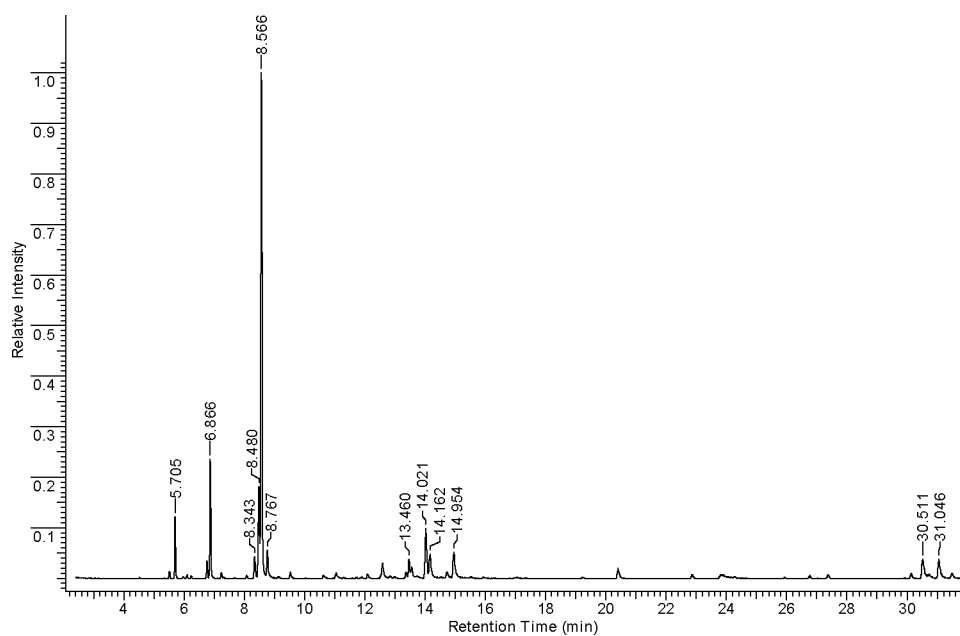
Tabela 4.1. Sastav etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus*.

*-Aritmetički retencioni indeks.

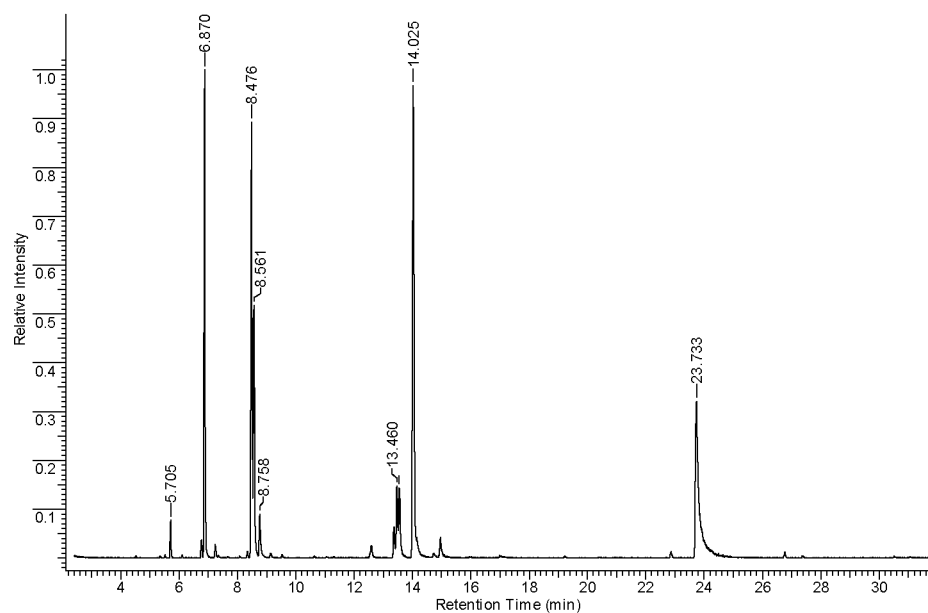
| Sadržaj (%) | | | | | | | | |
|------------------------------------|------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| tr [min] | AI * | Jedinjenje | 1EO | 2EO | 3EO | 4EO | 5EO | 6EO |
| 5.517 | 925 | α -Tujen | 0.00 | 0.51 | 0.00 | 1.05 | 1.44 | 0.00 |
| 5.706 | 932 | α -Pinen | 2.08 | 4.13 | 1.12 | 0.53 | 0.79 | 1.03 |
| 6.762 | 972 | Sabinen | 1.86 | 1.24 | 0.57 | 0.47 | 0.54 | 0.56 |
| 6.872 | 976 | β -Pinen | 6.73 | 9.13 | 16.33 | 15.79 | 9.69 | 5.48 |
| 7.238 | 990 | β -Mircen | 0.93 | 0.46 | 0.46 | 0.00 | 0.43 | 0.36 |
| 8.343 | 1024 | <i>p</i> -Cimen | 0.27 | 1.92 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.28 |
| 8.482 | 1028 | Limonen | 7.99 | 7.99 | 16.11 | 23.81 | 21.77 | 15.43 |
| 8.569 | 1030 | 1,8-Cineol | 67.10 | 42.07 | 9.77 | 1.42 | 38.19 | 56.08 |
| 8.765 | 1036 | <i>Z</i> - β -Ocimen | 3.57 | 2.94 | 2.06 | 1.88 | 3.11 | 3.06 |
| 9.142 | 1046 | <i>E</i> - β -Ocimen | 0.27 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 9.531 | 1057 | γ -Terpinen | 0.31 | 0.58 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 12.592 | 1138 | <i>trans</i> -Pinokarveol | 0.23 | 2.26 | 0.83 | 0.54 | 0.00 | 0.61 |
| 13.463 | 1159 | <i>trans</i> -Pinokamfon | 0.00 | 1.84 | 3.34 | 8.34 | 4.72 | 0.00 |
| 13.556 | 1162 | Pinokarvon | 0.00 | 1.20 | 3.99 | 1.67 | 0.00 | 0.41 |
| 14.027 | 1173 | <i>cis</i> -Pinokamfon | 1.15 | 5.61 | 22.75 | 14.72 | 14.54 | 0.00 |
| 14.961 | 1196 | Mirtenal | 0.32 | 3.71 | 1.02 | 0.66 | 0.69 | 0.80 |
| 20.403 | 1325 | Mirtenil acetat | 0.00 | 1.25 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 22.856 | 1384 | β -Burbonen | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.31 |
| 23.758 | 1406 | Metil eugenol | 5.43 | 0.00 | 19.24 | 28.33 | 3.52 | 13.70 |
| 24.265 | 1418 | <i>E</i> - β -Kariofilen | 0.47 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 26.771 | 1480 | Germakren D | 0.40 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.36 |
| Monoterpenski ugljovodonici | | | 24.01 | 28.9 | 36.65 | 43.53 | 37.77 | 26.2 |
| Oksidovani monoterpeni | | | 68.8 | 57.94 | 41.7 | 27.35 | 58.14 | 57.9 |
| Seskviterpenski ugljovodonici | | | 0.87 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.67 |
| Fenilpropanoidi | | | 5.43 | 0.00 | 19.24 | 28.33 | 3.52 | 13.70 |
| Identifikovana jedinjenja (ukupno) | | | 99.11 | 86.84 | 97.59 | 99.21 | 99.43 | 98.47 |



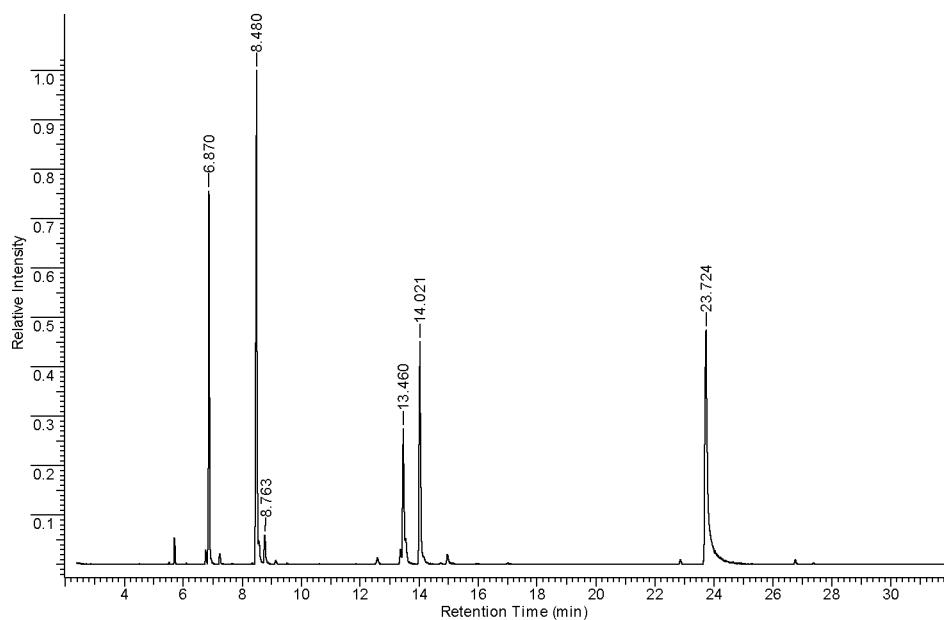
Slika 4.11. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (1EO)



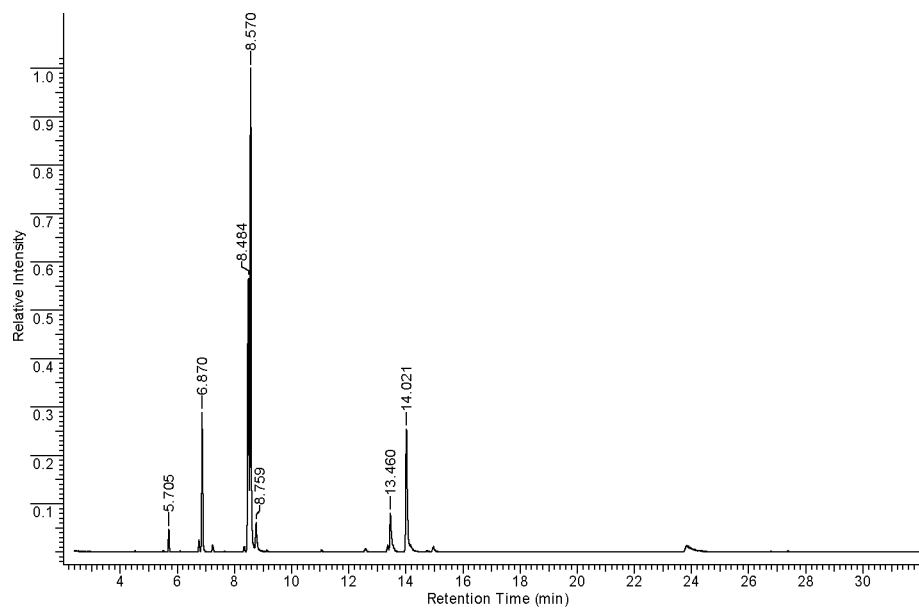
Slika 4.12. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (2EO)



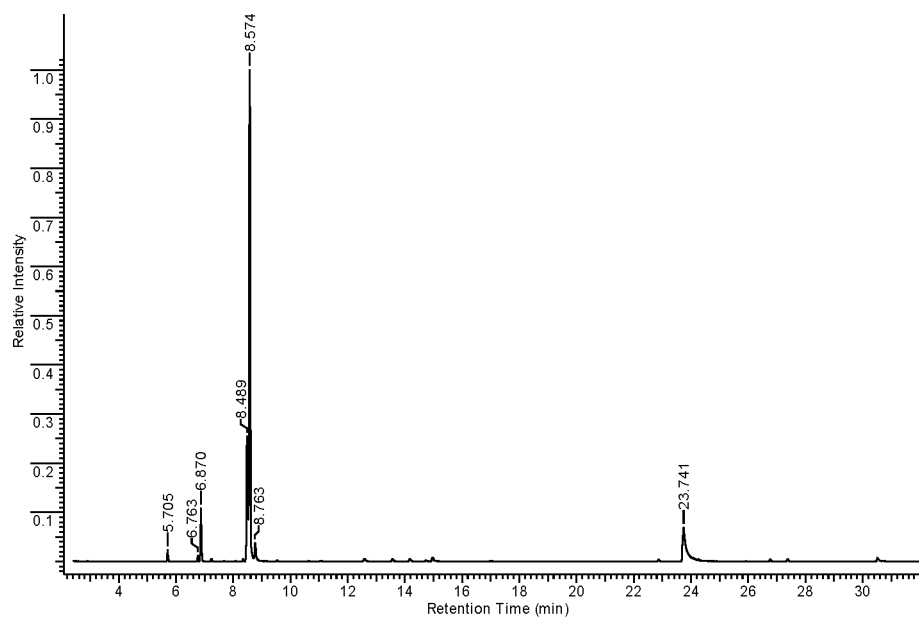
Slika 4.13. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (3EO)



Slika 4.14. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (4EO)



Slika 4.15. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (5EO)



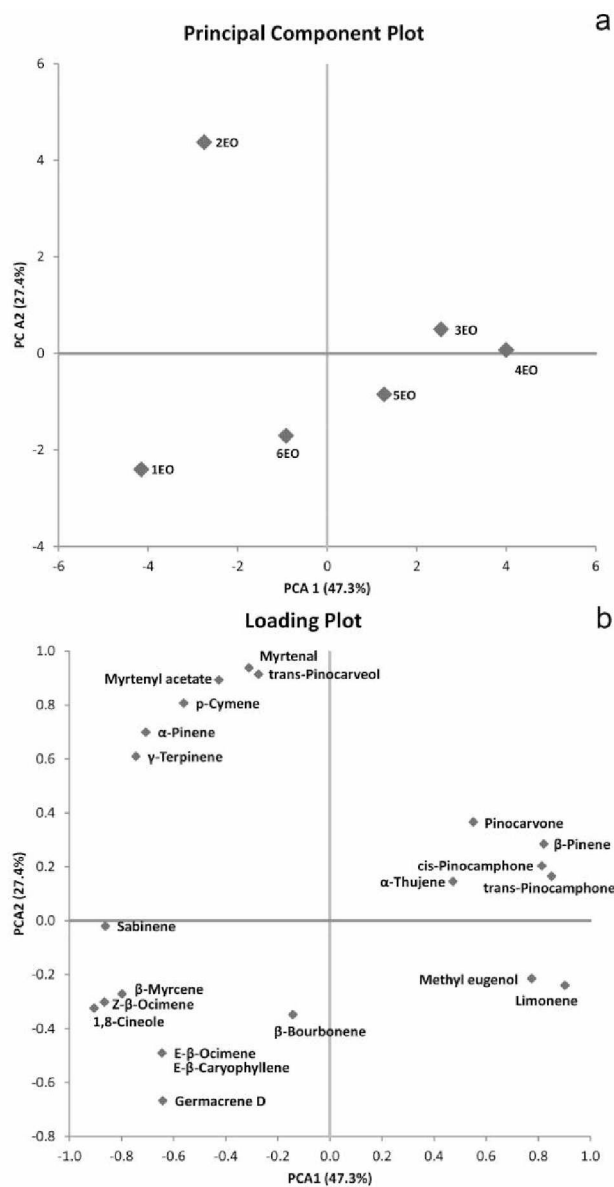
Slika 4.16. GC-MS hromatogram etarskog ulja *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (6EO)

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 predstavljani 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.

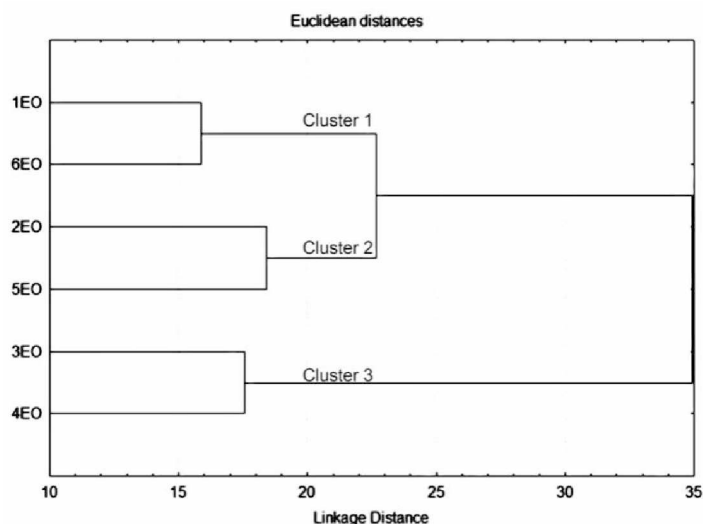
Tabela 4.2. Opterećenja komponenti (eng. *component loadings*) i koeficijenti komponentnih ocjena (sopstveni vektori) (eng. *component score coefficients (eigenvectors)*) za sastojke etarskih ulja *Hyssopus officinalis*. Značajni pokazatelji razdvajanja (faktorska opterećenja veća od ± 0.7) su boldovani.

| Varijabla | Opterećenja komponenti | | | | Koeficijenti komponentnih ocjena (sopstveni vektori) | | | |
|--------------------------------|------------------------|--------------|---------------|--------------|--|--------|--------|--------|
| | PC 1 | PC 2 | PC 3 | PC 4 | PC 1 | PC 2 | PC 3 | 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 |
| <i>p</i> -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 |
| <i>Z</i> - β -Ocimen | -0.866 | -0.301 | -0.164 | 0.310 | -0.275 | -0.126 | -0.104 | 0.219 |
| <i>E</i> - β -Ocimen | -0.645 | -0.490 | 0.552 | 0.050 | -0.205 | -0.204 | 0.349 | 0.036 |
| γ -Terpinen | -0.745 | 0.610 | 0.190 | 0.097 | -0.236 | 0.254 | 0.120 | 0.069 |
| <i>trans</i> -Pinokarveol | -0.274 | 0.915 | -0.091 | -0.266 | -0.087 | 0.381 | -0.057 | -0.188 |
| <i>trans</i> -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 |
| <i>cis</i> -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 |
| <i>E</i> - 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) 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) 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 samoliklog *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%) 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].

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 4.20.

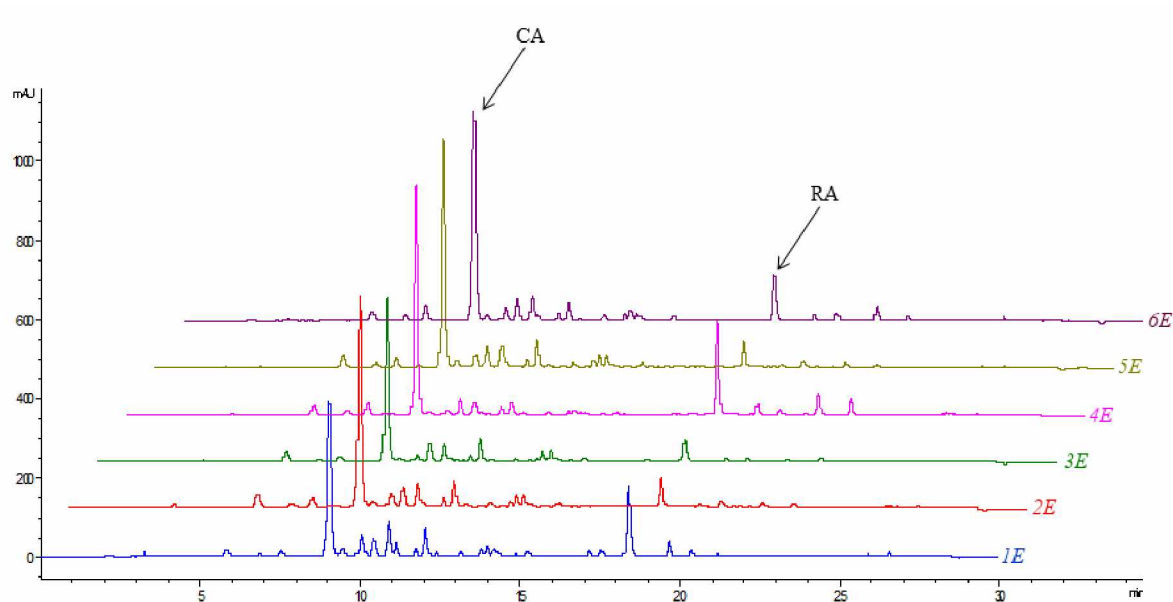
Naime, LC-DAD-MS analizom metanolnih ekstrakata herbe izopa je pokazano prisustvo fenolnih jedinjenja: siringinske kisjeline (kao derivata benzojeve kisjeline), derivata hidroksicimne kisjeline (hlorogenska kisjelina, feruloilhina i rozmarinska kisjelina, kao i jedinjenje kafeoil pentozid) i flavonoida (derivati kvercetina i diosmetina).

Podaci o identifikovanim jedinjenjima, njihovim spektralnim karakteristikama i retencionim vremenima, su dati u Tabeli 4.3. Uporedni 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.

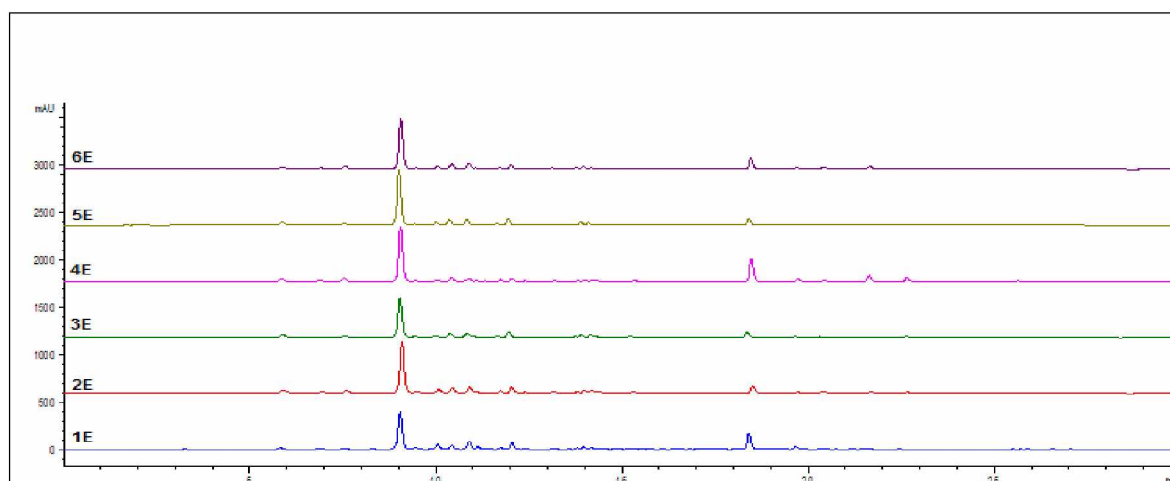
Tabela 4.3. Identifikovana jedinjenja, retencionna vremena, UV i MS spektralni podaci fenolnih jedinjenja u metanolnim ekstraktima *H. officinalis* subsp. *aristatus*. ^a Identifikacija izvršena poređenjem sa komercijalno dostupnim referentnim jedinjenjima. ^b Tentativna identifikacija (izvršena poređenjem dobijenih UV i MS spektralnih podataka sa literaturnim podacima).

| Pik | t _r (min) | UV λ _{max} (nm) | ESI-MS Podaci (m/z) | Jedinjenje |
|-----|----------------------|--------------------------|--|--|
| 1 | 4.255 | 280 | 395.1 [2M-H] ⁻ , 197 [M-H] ⁻ , 153.1 | Siringinska kisjelina ^b |
| 2 | 9.107 | 218, 240, 298sh, 326 | 707.1 [2M-H] ⁻ , 353.1 [M-H] ⁻ , 191 | Hlorogenska kisjelina (5- <i>O</i> -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 <i>O</i> -heksozid ^b |
| 6 | 17.215 | 252, 266, 348 | 607.2 [M-H] ⁻ , 299.1, 284 | Diosmetin <i>O</i> -deoksiheksozil- heksozid ^b |
| 7 | 18.461 | 286sh, 328 | 719.1 [2M-H] ⁻ , 359 [M-H] ⁻ , 197, 161.1 | Rozmarinska kisjelina ^a |

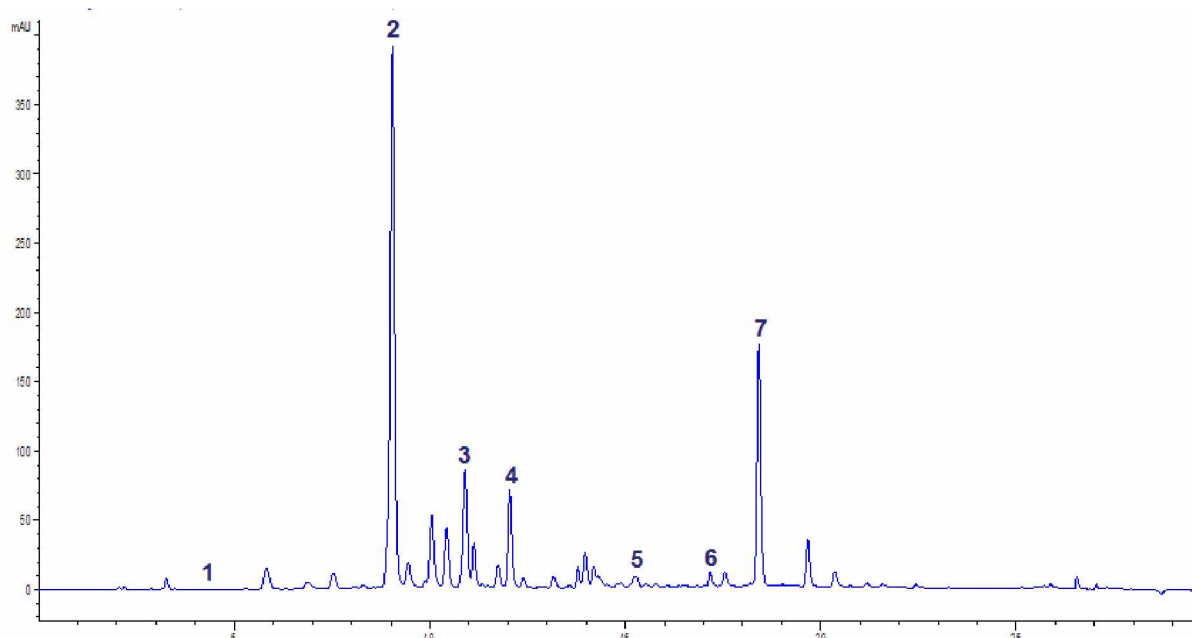
a)



b)



Slika 4.19. Uporedni 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 $p < 0.05$.

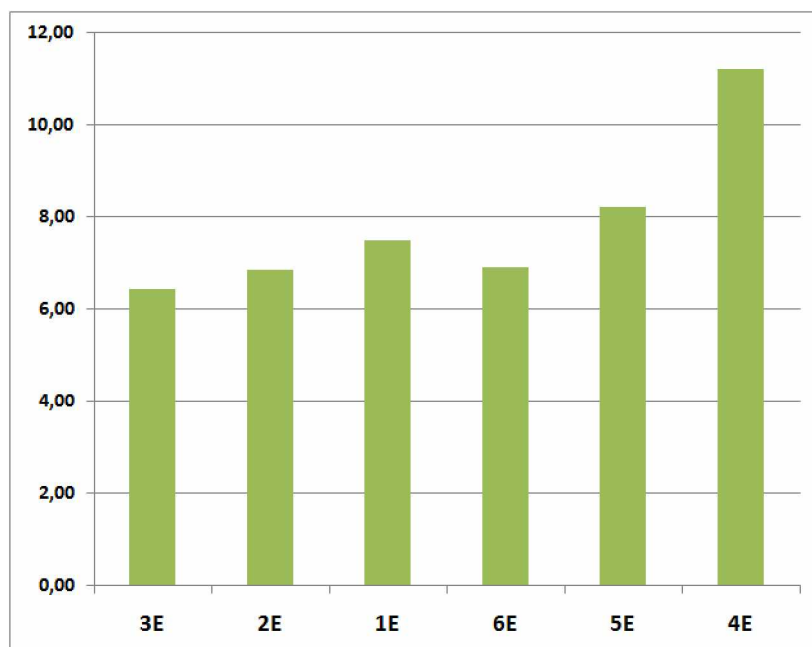
| Uzorak | Ukupni fenoli (mg GAE/g) | Hlorogenska kisjeline (mg/g) | Rozmarinska kisjeline (mg/g) |
|--------|-----------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1E | 74.7 ± 0.8^c | 23.35 ± 0.2^a | 13.71 ± 0.19^d |
| 2E | 68.2 ± 0.8^b | 30.94 ± 0.11^d | 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 |

Dobijeni rezultati su u dobroj saglasnosti sa dostupnim literaturnim podacima. Naime, prethodne studije sa etanolnim i deodorisanim vodenim ekstraktima nadzemnih dijelova samoniklog *H. officinalis* subsp. *aristatus* (porijeklom iz centralne Italije i istočne Srbije), su

pokazali prisustvo hlorogenske kisjeline, rozmarinske kisjeline, 4-*O*-feruloilnine 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 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 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.).

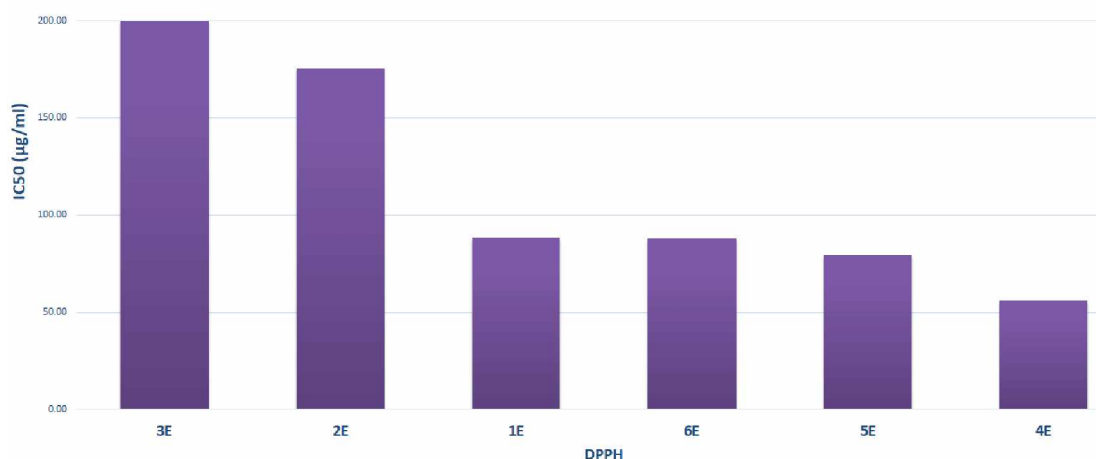
4.4. Antioksidativna aktivnost

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 | DPPH-IC ₅₀ (μg/mL) | FRAP mmol Fe ²⁺ /g |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| 1E | 88.42 ± 3.48 ^d | 0.815 ± 0.012 ^b |
| 2E | 175.41 ± 2.92 ^e | 0.781 ± 0.012 ^{a,b} |
| 3E | 199.89 ± 0.60 ^f | 0.667 ± 0.004 ^a |
| 4E | 56.04 ± 0.19 ^b | 0.959 ± 0.003 ^c |
| 5E | 79.37 ± 1.51 ^c | 0.877 ± 0.007 ^{b,c} |
| 6E | 87.90 ± 0.67 ^d | 0.736 ± 0.023 ^{a,b} |
| Rutin | 4.67 ± 1.41 ^a | 4.111 ± 0.0253 ^d |
| Askorbinska kisjelina | - | 8.181 ± 0.136 ^e |

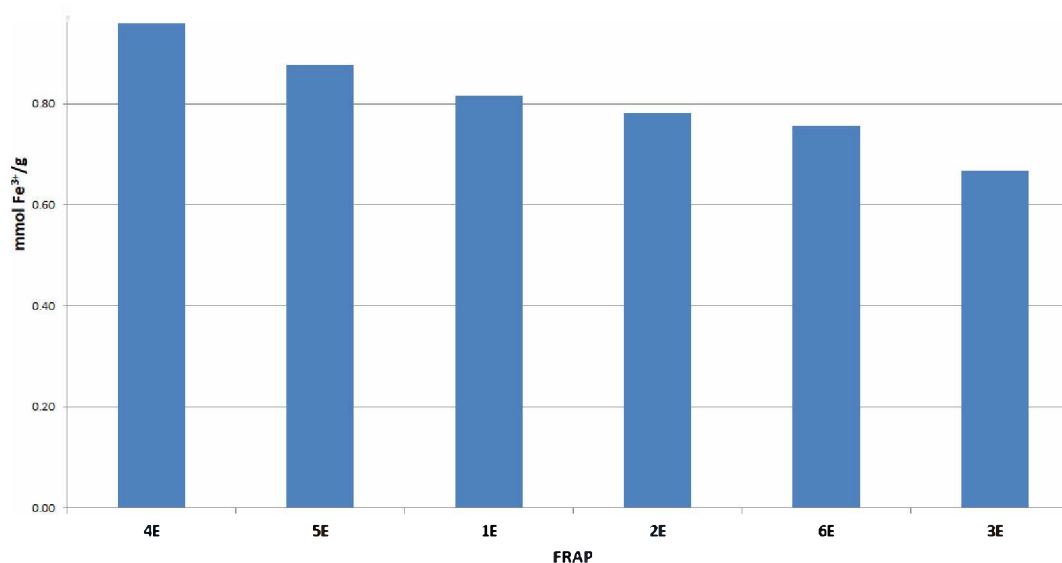
Najniža IC₅₀ vrijednost, odnosno, najbolja sposobnost neutralizacije DPPH radikala, je pokazana za ekstrakt 4E (56.04 μg/mL), zatim za ekstrakt 5E (79.37 μg/mL), dok je najniža aktivnost zabilježena za ekstrakt 3E (199.89 μg/mL) (Tabela 4.5., Slika 4.22.).



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 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, 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 kisjelina), 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 IC ₅₀ | Sadržaj ukupnih fenola | Literatura |
|--|--|--|------------|
| <i>H. officinalis</i> L. (samonikli, Iran); herba | <i>n</i> -butanolni ekstrakt 25 µg/mL | 246 mg GAE/g | [64] |
| | etil acetatni ekstrakt 103 µg/mL | 51 mg GAE/g | |
| <i>H. officinalis</i> L. ssp. <i>angustifolius</i> (samonikli, Turska); listovi | vodeni ekstrakt 18.80 µg/mL | 4.70±0.04%w/w | [43] |
| | metanolno-vodeni ekstrakt (1:1) 28.80 µg/mL | 4.26±0.06%w/w | |
| | hloroformski ekstrakt 250 µg/mL | 4.19±0.03%w/w | |
| <i>H. officinalis</i> L. subsp. <i>angustifolius</i> (samonikli, Turska); herba | metanolni ekstrakt 117 µg/mL | 75 mg GAE/g | [69] |
| <i>H. officinalis</i> L. subsp. <i>aristatus</i> (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] |
| <i>H. officinalis</i> L. subsp. <i>aristatus</i> (samonikli, Srbija); herba | deodorisani vodeni ekstrakt 540 µg/mL | 96.47 mg GAE/L | [31] |
| | deodorisani metanolni ekstrakt 820 µg/mL | 71.18 mg GAE/L | |
| | deodorisani etil acetatni ekstrakt 2970 µg/mL | 15.06 mg GAE/L | |
| <i>H. officinalis</i> L. (samonikli, Rumunija); herba | etanolni ekstrakt 125.44±4.70µg/mL | 77.72±1.83 mg GAE/g | [40] |
| <i>H. officinalis</i> subsp. <i>aristatus</i> (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 $> 500 \mu\text{g/mL}$ 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 $400 \mu\text{g/mL}$, kao i kod uzorka 6EO, kod kog je MIC vrijednost bila $500 \mu\text{g/mL}$;
- *Staphylococcus aureus* i to kod uzorka 3EO, gdje je MIC vrijednost bila $400 \mu\text{g/mL}$.

Rast *Candida albicans* je inhibiran pri minimalnoj koncentraciji od $500 \mu\text{g/mL}$ za sve uzorke.

Tabela 4.7. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) etarskih ulja herbe izopa i antibiotika (ceftriakson i amikacin) (DMSO $< 1\%$)

| Mikroorganizmi | MIC 1EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC 2EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC 3EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC 4EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC 5EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC 6EO ($\mu\text{g/mL}$) | MIC Ceftriaks- on ($\mu\text{g/mL}$) | MIC Amikacin ($\mu\text{g/mL}$) |
|---|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 | >500 | >500 | 400 | >500 | >500 | >500 | 4 | 4 |
| <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 2 | 0.5 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 | 400 | >500 | 400 | >500 | 400 | 500 | 2 | 1 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIMB 9111 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 4 | 0.25 |
| <i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 2 | 2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 | 8 | 2 |
| <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | 500 | / | / |

Etarska ulje komercijalnog uzorka iz Srbije (1EO) i 6EO (Cuce, 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 μ g/mL. Smatra se da bi mehanizam antigljivičnog dejstva etarskog ulja mogao da bude posljedica povećanja permeabiliteta 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- organizmi | MIC (µg/mL) | | | | | |
|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 1EO/ Amikacin | 2EO/ amikacin | 3EO/ amikacin | 4EO/ amikacin | 5EO/ amikacin | 6EO/ amikacin |
| <i>S. aureus</i> | 200/0.5 | 200/0.5 | 200/0.5 | 200/1 | 200/1 | 200/1 |
| <i>E. coli</i> | 200/0.5 | 200/0.5 | 200/0.5 | 200/1 | 200/1 | 200/1 |
| <i>K. pneumoniae</i> | 400/0.0625 | 400/0.0625 | 400/0.0625 | 200/0.5 | 200/0.5 | 200/0.5 |
| <i>S. typhi</i> | 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

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 vođeni, 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) | MIC 6E (µg/mL) |
|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>S. aureus</i> (ATCC 6538) | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 | 1000 |
| <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633) | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 |
| <i>E. coli</i> (ATCC 8739) | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 | 2000 |
| <i>S. Typhi</i> (ATCC 14028) | >2000 | 2000 | 2000 | >2000 | 2000 | >2000 |
| <i>K. pneumoniae</i> (NCIMB 9111) | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 |
| <i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027) | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 | >2000 |
| <i>C. albicans</i> (ATCC 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/ektrakta, 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

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

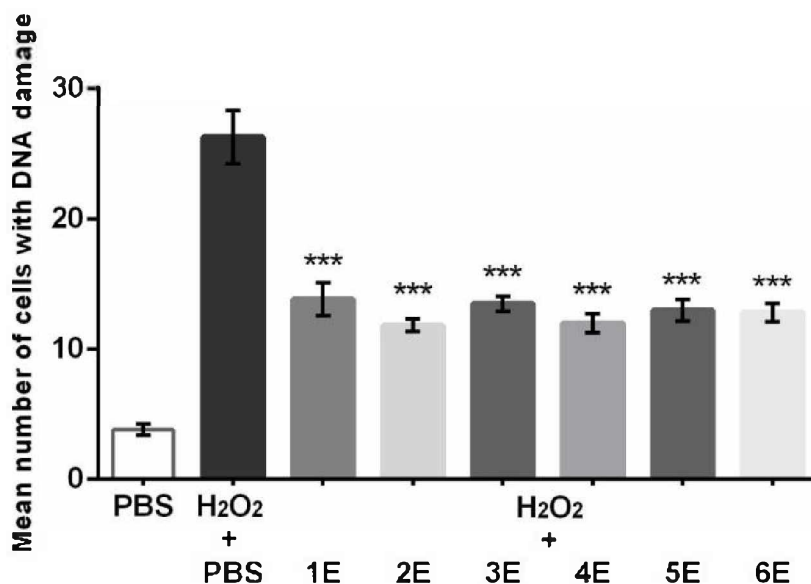
Potencijalna genotoksična i antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa je procijenjena Komet testom.

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.).



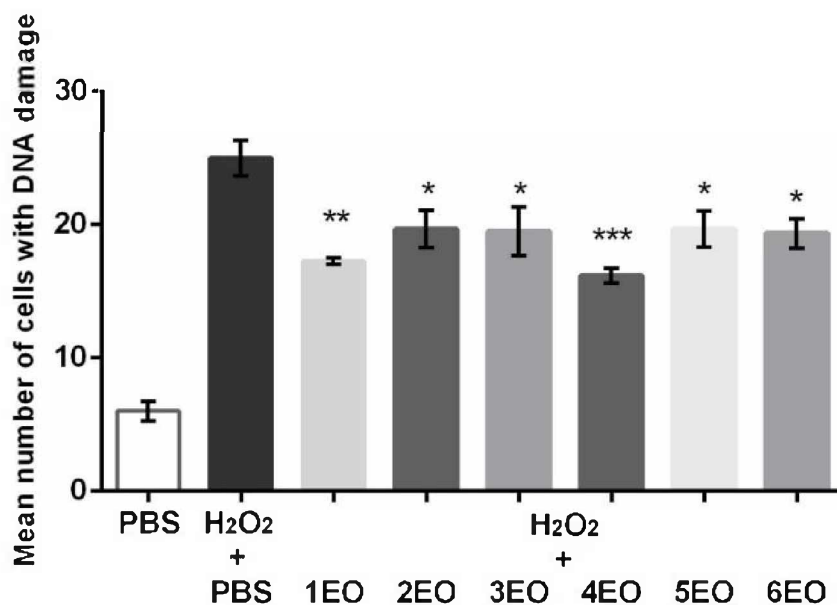
Slika 4.24. Antigenotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata herbe *H. officinalis* subsp. *aristatus* (1E-6E) na DNK oštećenja u humanim leukocitima periferne krvi, koja su prethodno izazvana tretiranjem vodonik peroksidom (H₂O₂) (eng. *post-treatment protocol*). Pravougaonici na slici predstavljaju 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 \pm standardna greška srednje vrijednosti, nasuprot kontroli koja je tretirana samo sa H₂O₂ (n=3). PBS - fiziološki rastvor sa fosfatnim puferom (eng. *phosphate-buffered saline*). * $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

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.

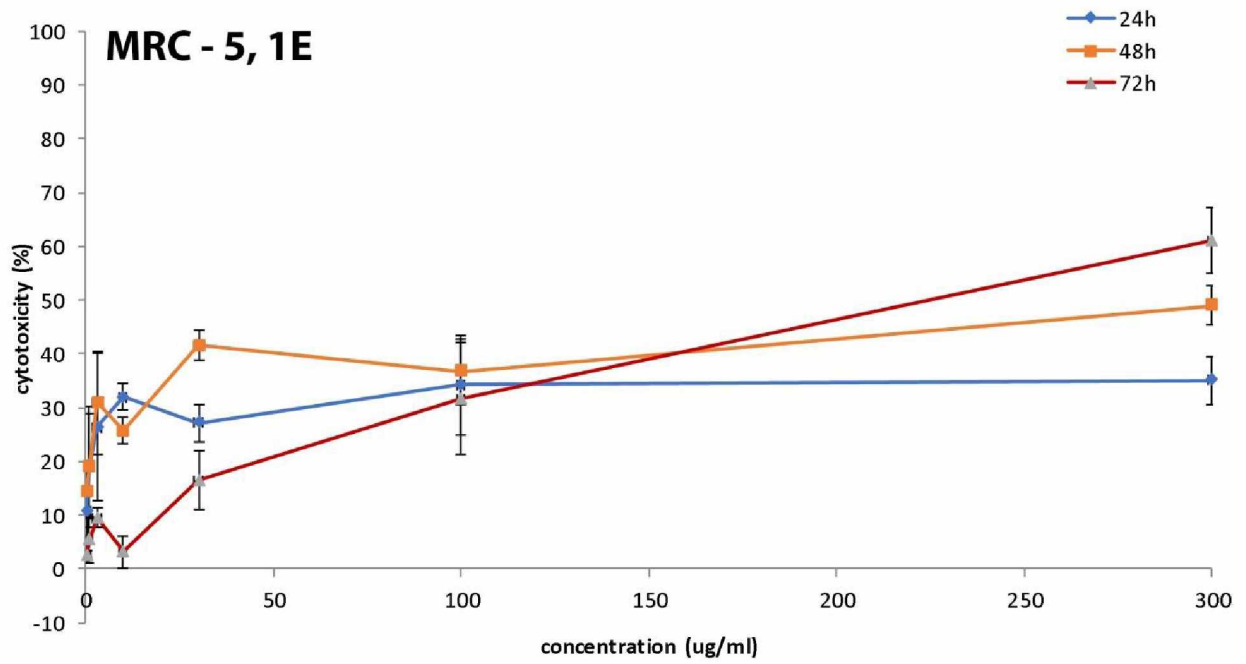
Dobijeni rezultati pokazuju da ekstrakti herbe izopa i etarska ulja ispoljavaju statistički značajnu antigenotoksičnu aktivnost, što bi moglo da ima praktični značaj u terapiji hroničnih degenerativnih oboljenja, koja u osnovi imaju oštećenja u genetskom materijalu. U vezi sa tim, potrebna su dalja istraživanja i sprovođenje *in vivo* eksperimenata, kako bi dobijeni rezultati o antigenotoksičnom djelovanju preparata *H. officinalis* postali pouzdaniji.

4.7. Citotoksična aktivnost

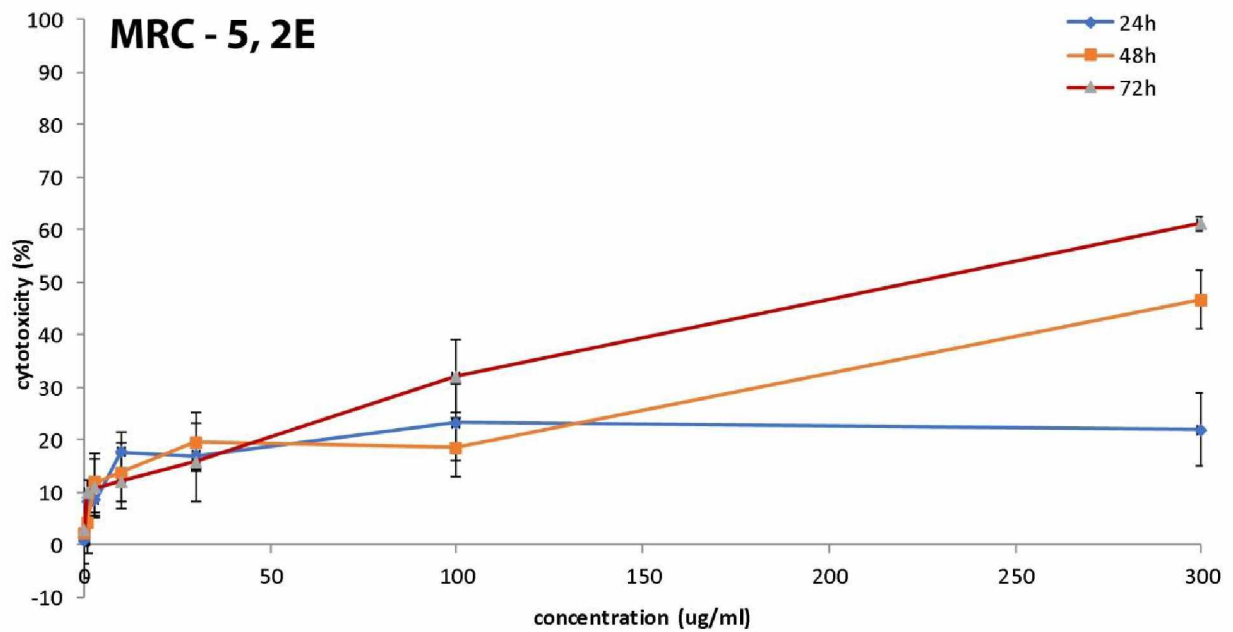
Citotoksični agens može izazvati ćelijsku smrt, tako što će dovesti do propadanja ćelije ili, sa druge strane, tako što će dovesti do reproduktivne ćelijske smrti, kroz inhibiciju rasta i proliferacije ćelija, pri čemu ćelija ostaje živa. Ispitivanje citotoksične aktivnosti ekstrakata herbe izopa je 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 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.

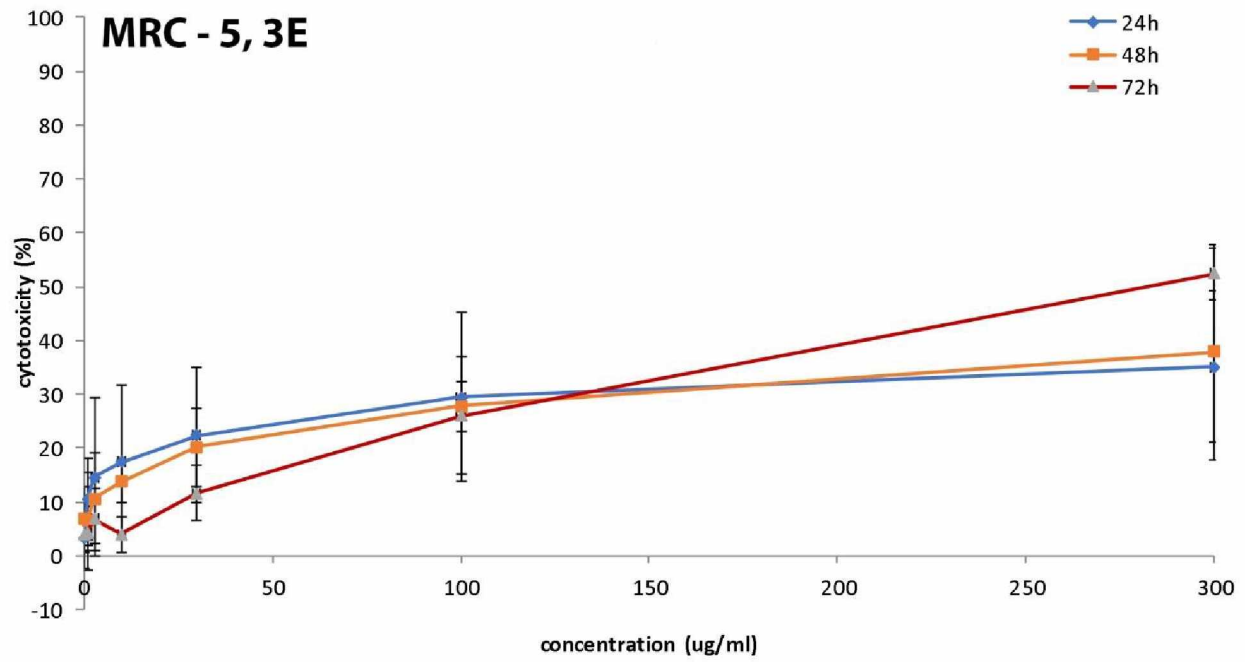
(a)



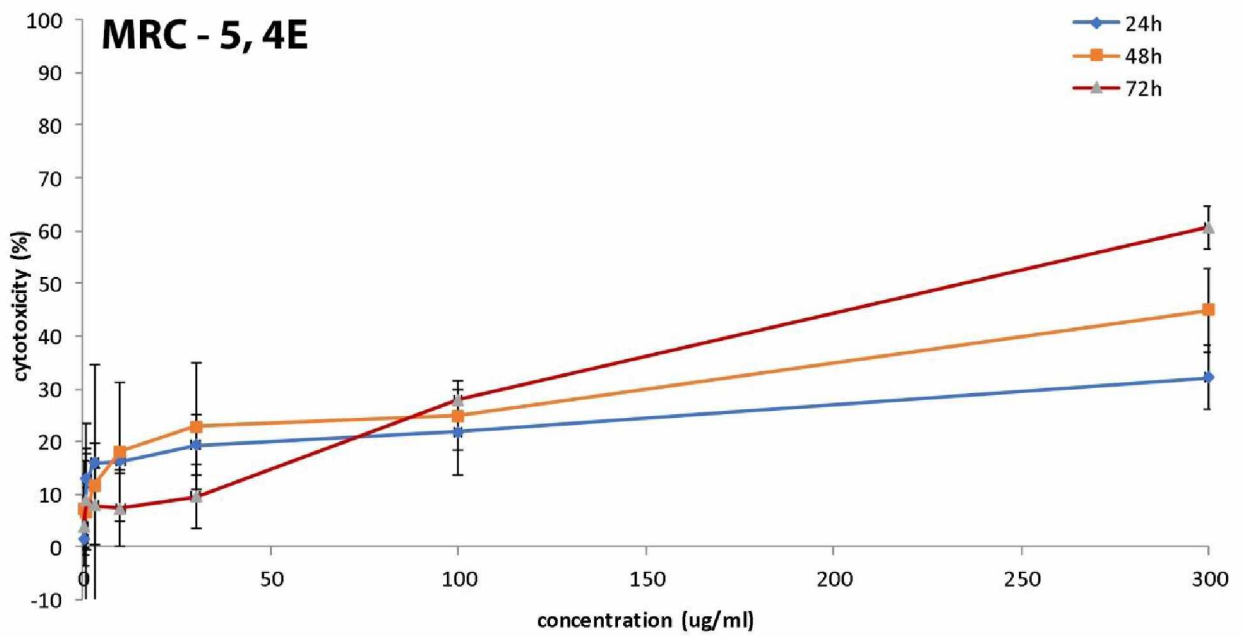
(b)



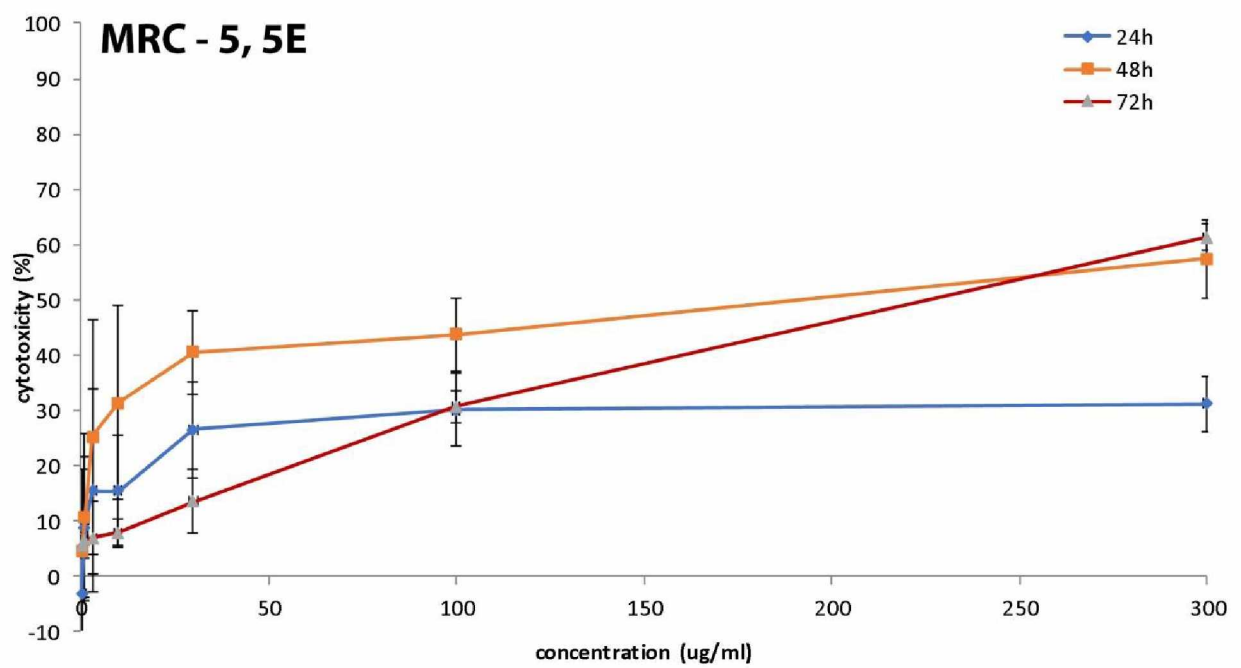
(c)



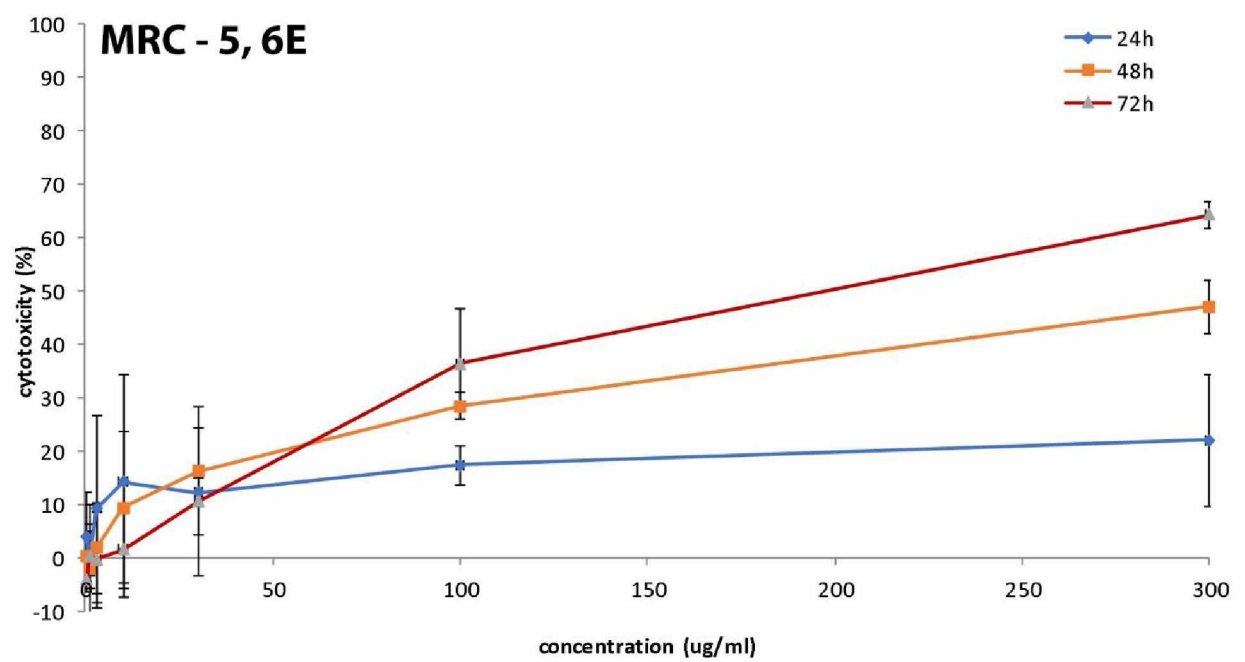
(d)



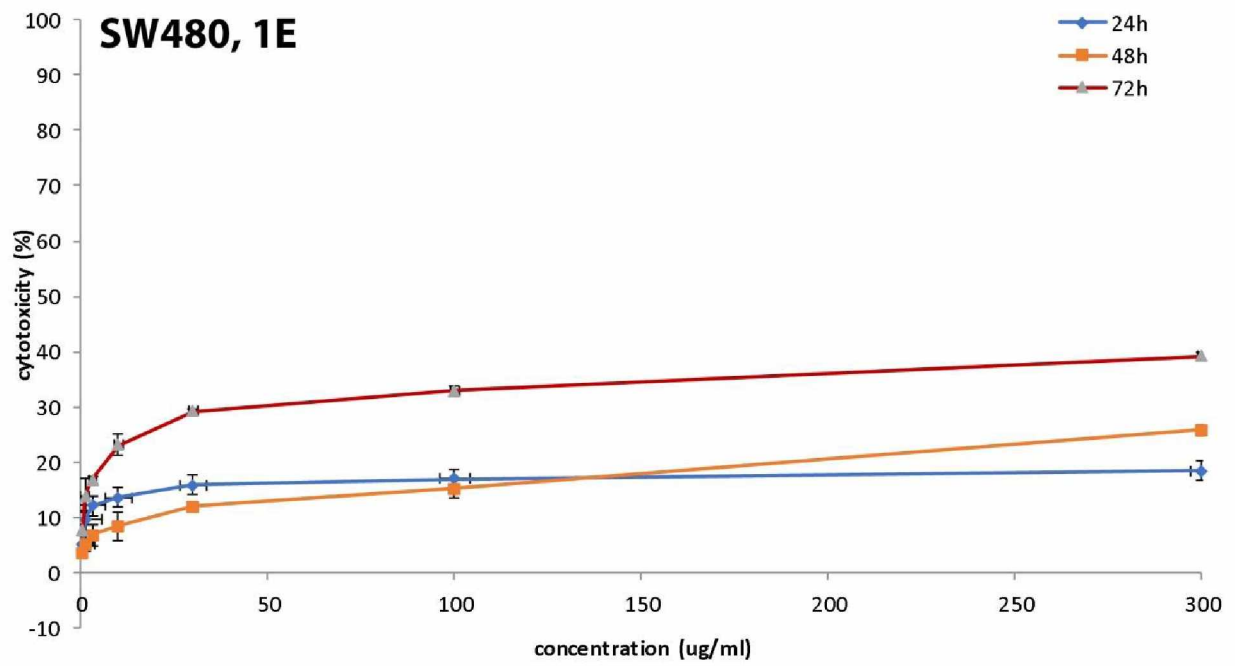
(e)



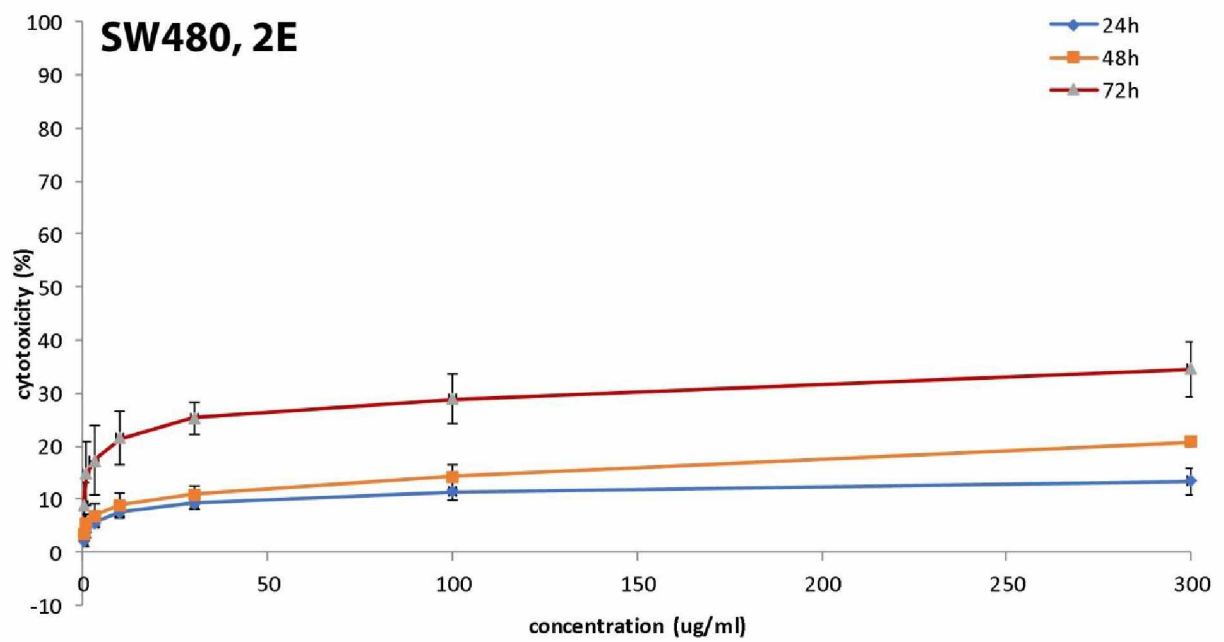
(f)



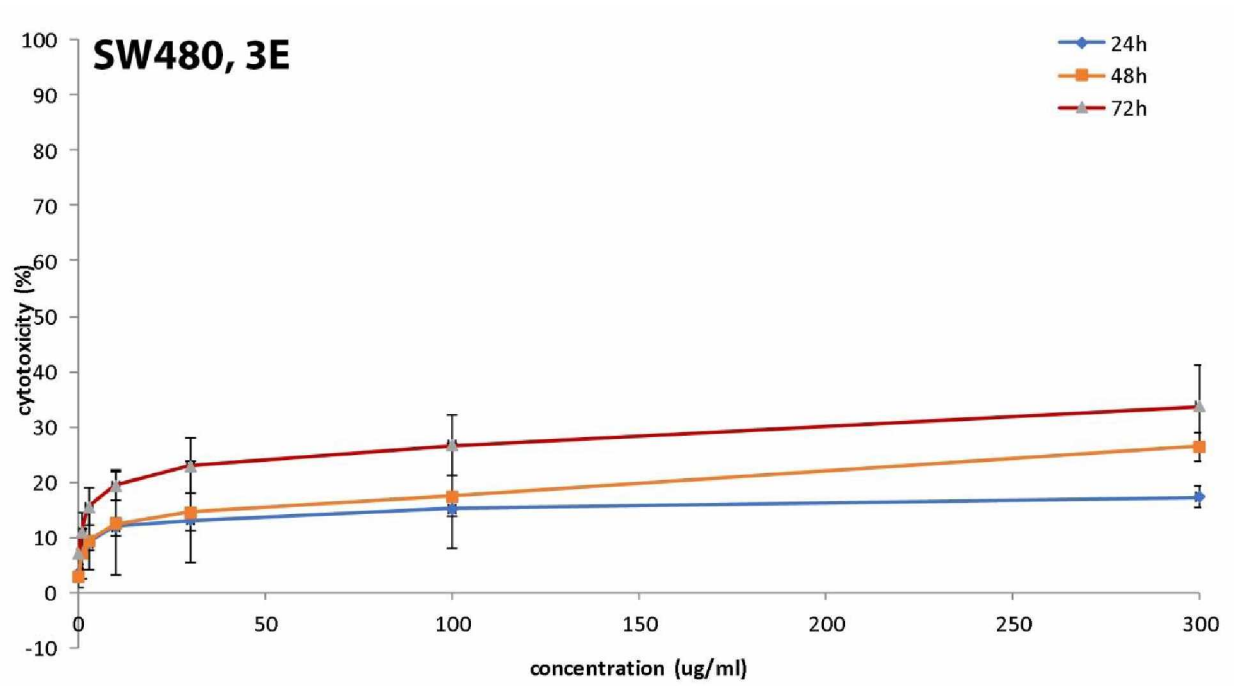
(g)



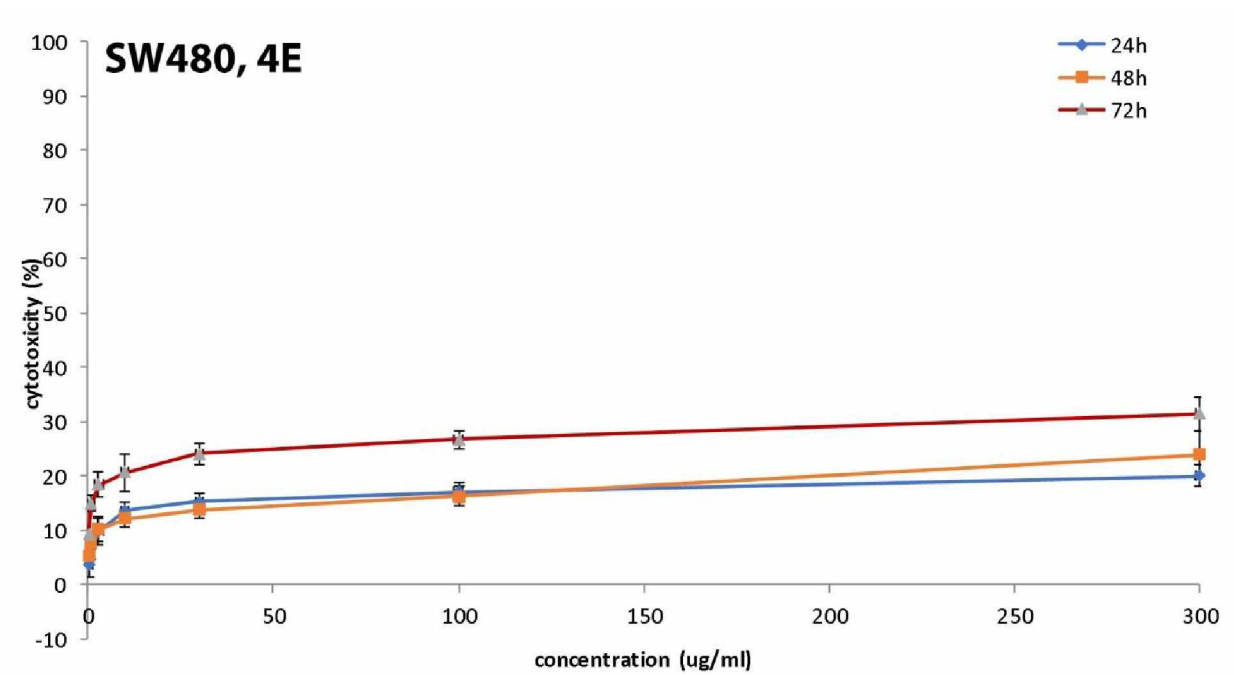
(h)



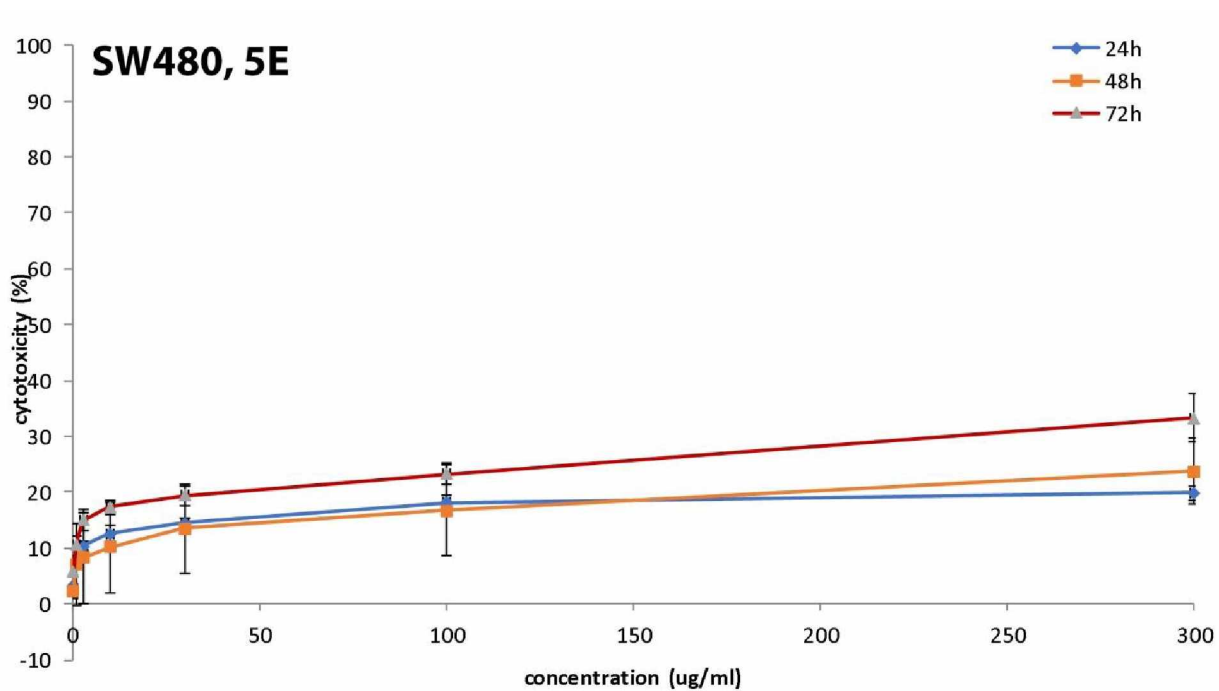
(i)



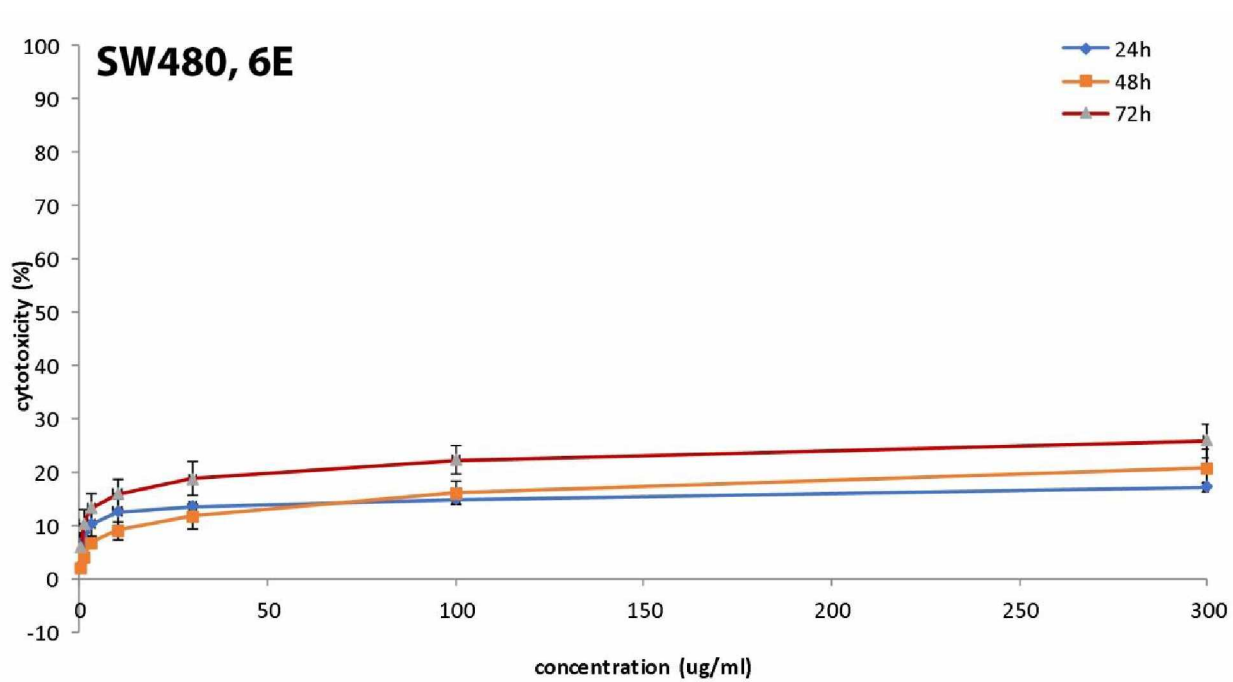
(j)



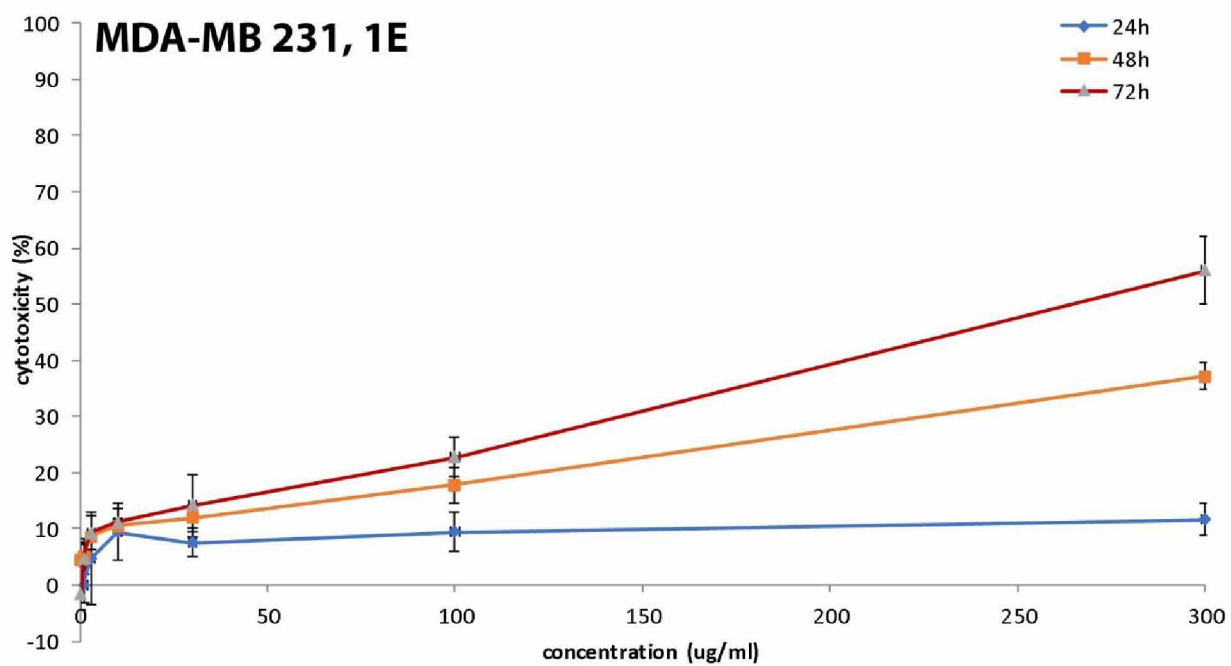
(k)



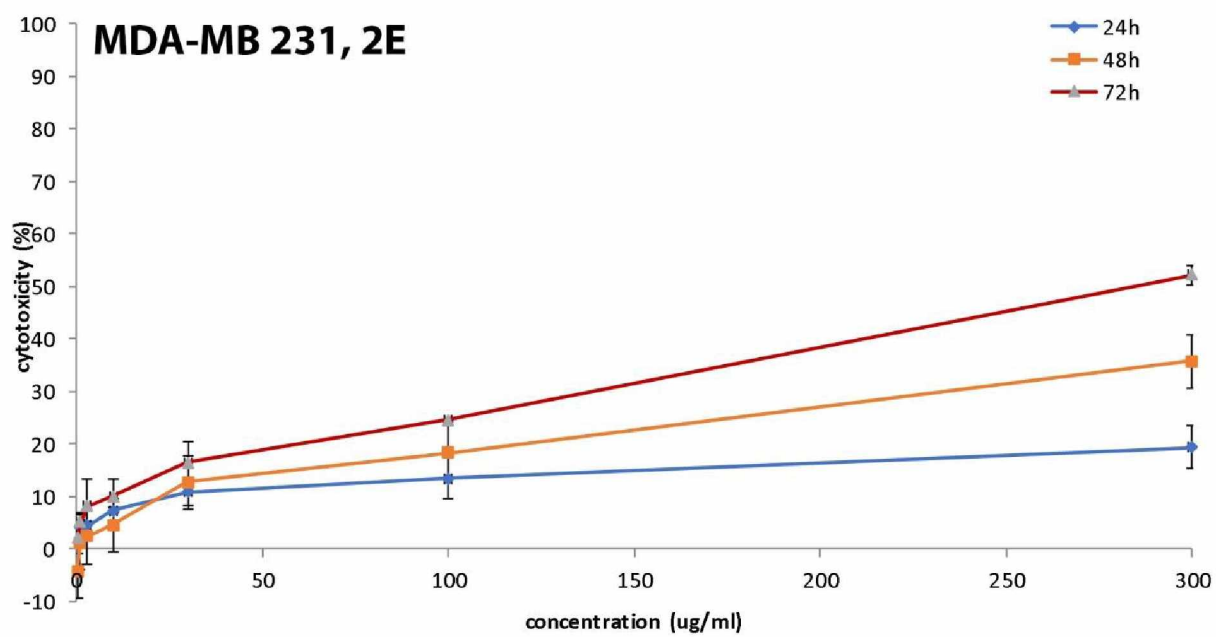
(l)



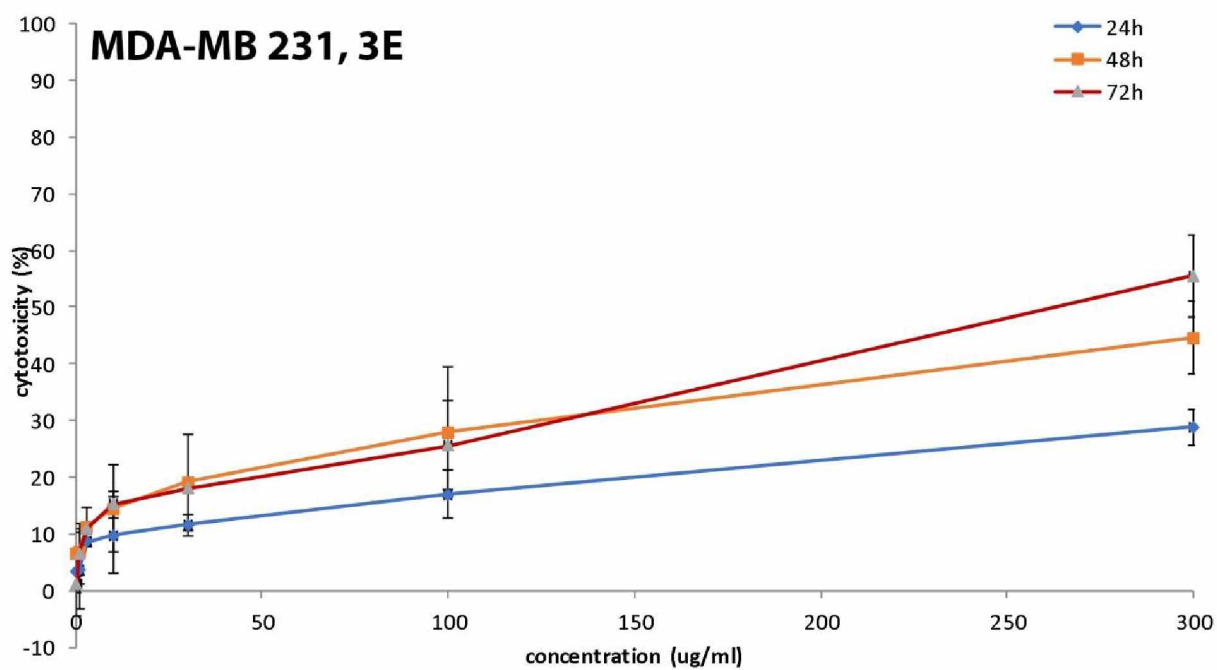
(m)



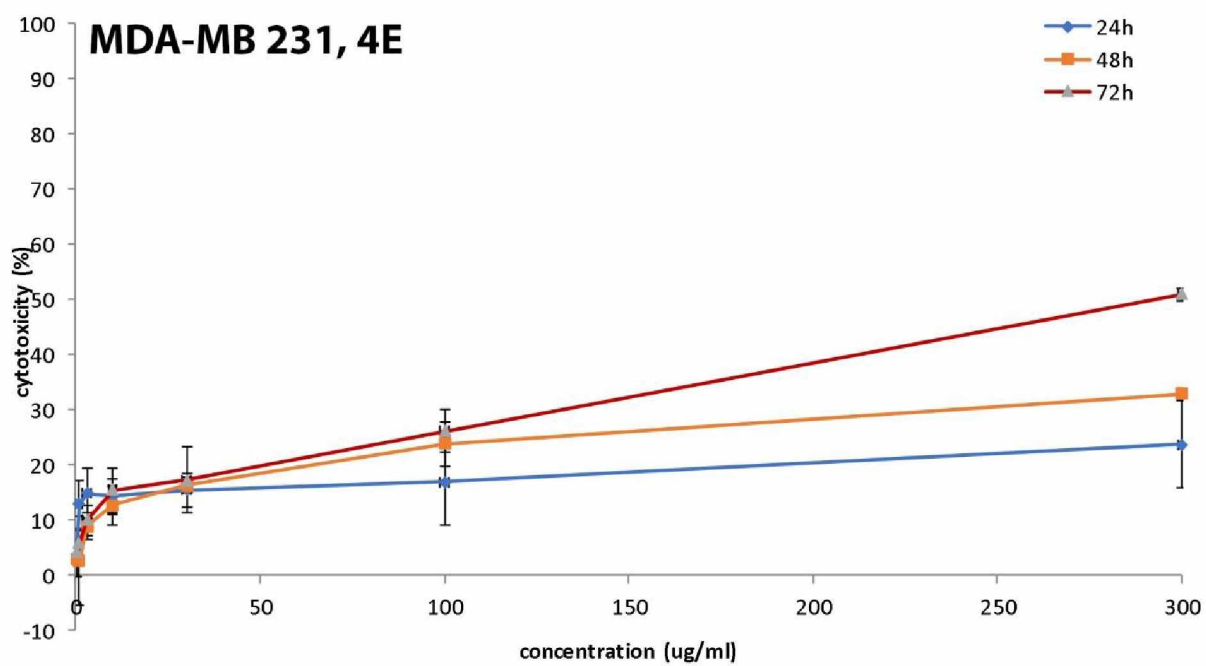
(n)



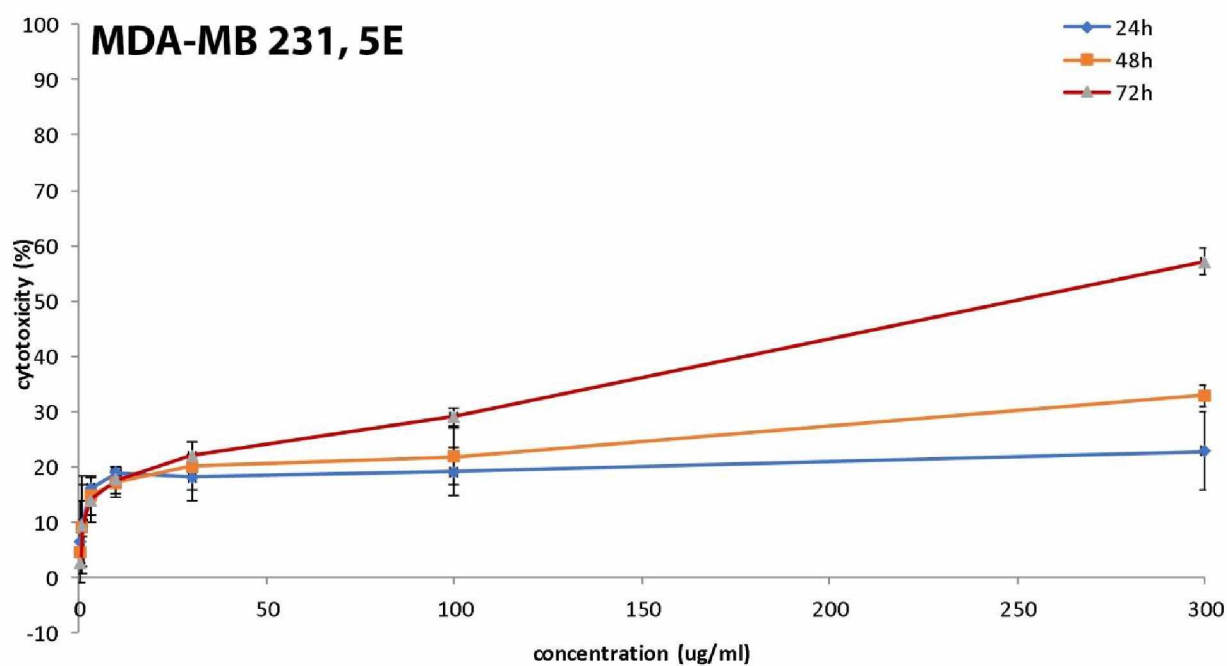
(o)



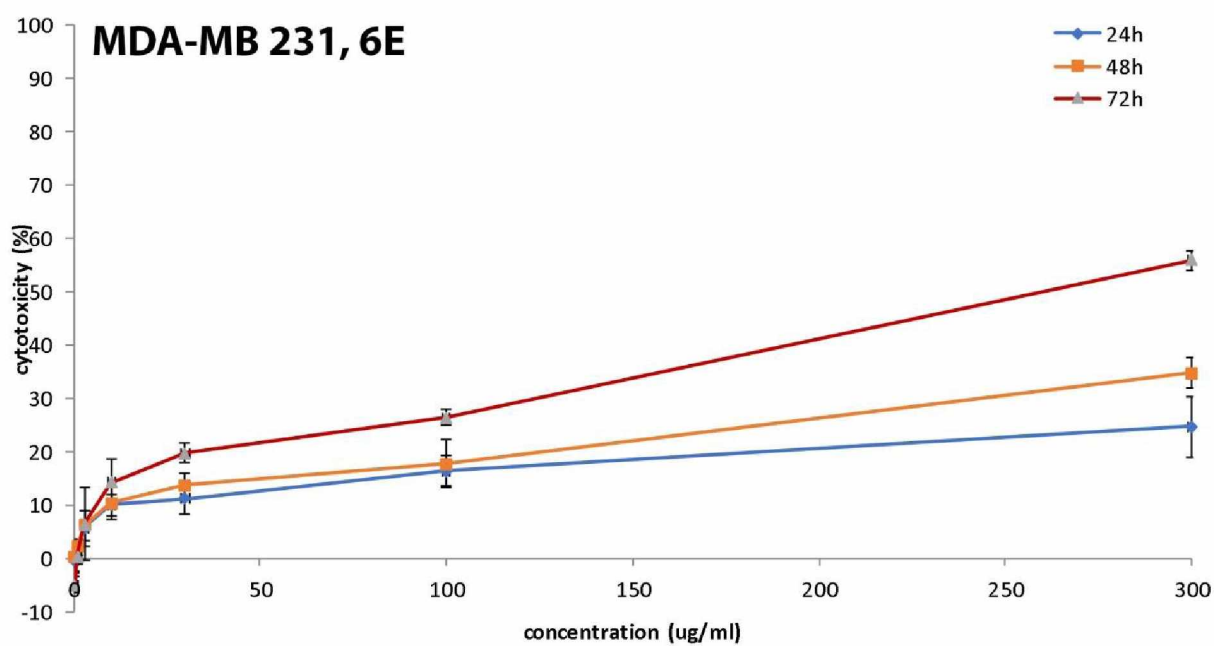
(p)



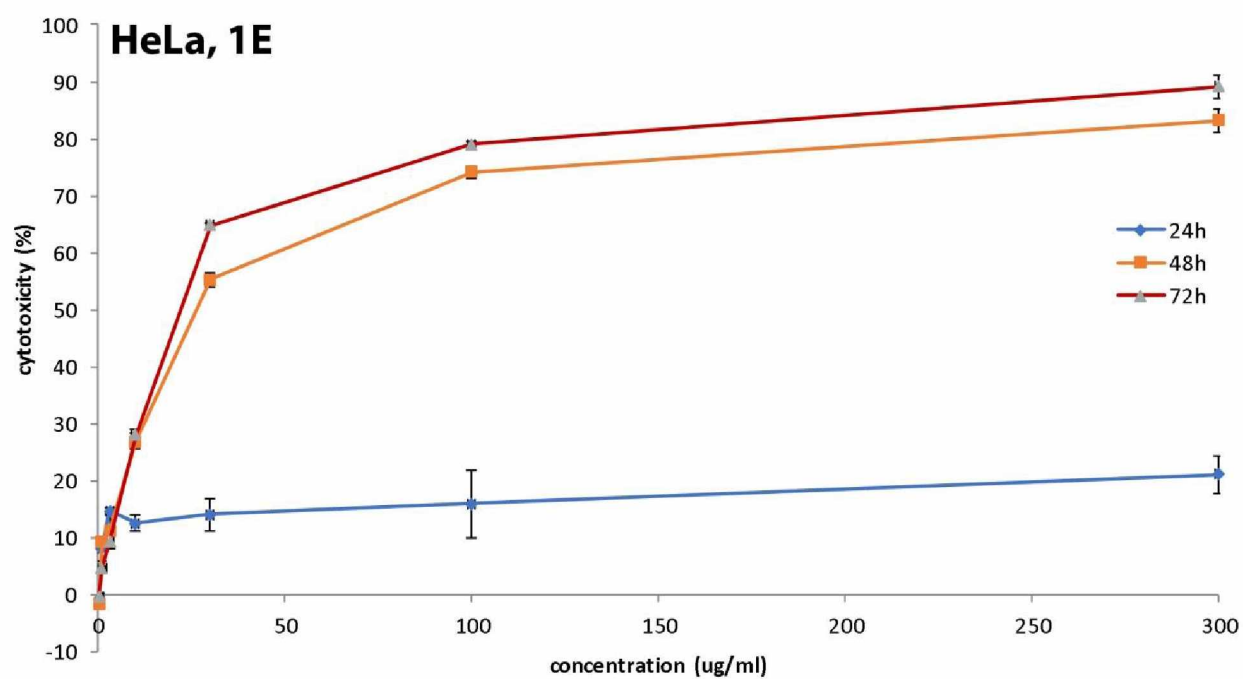
(q)



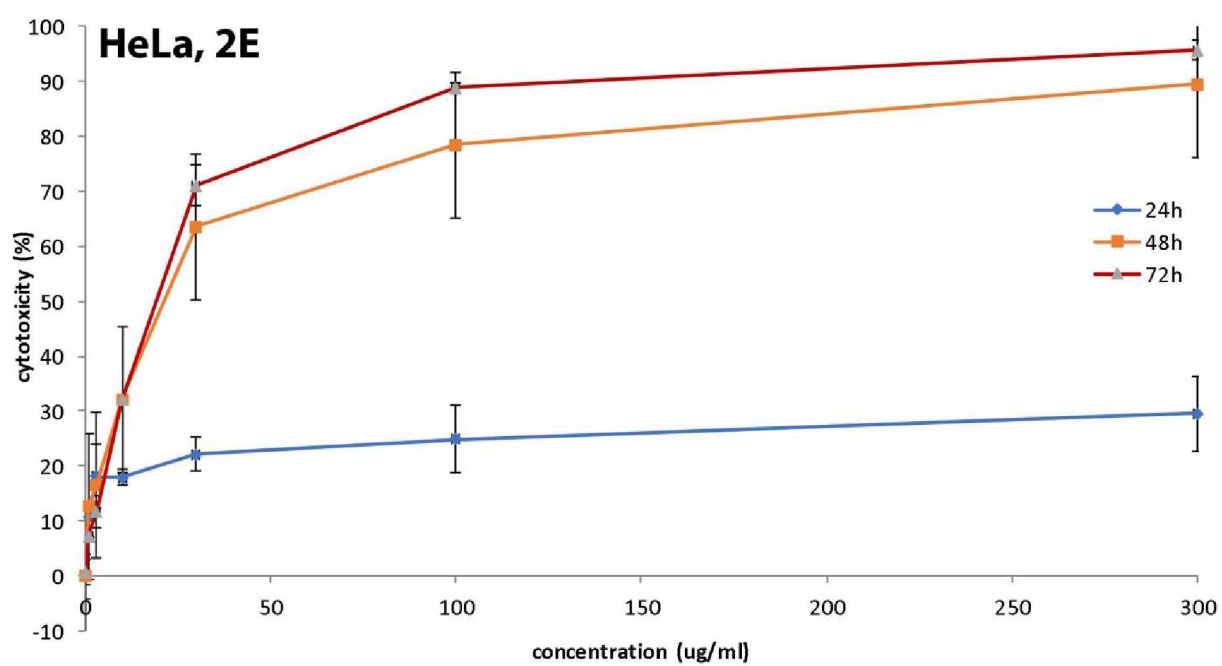
(r)



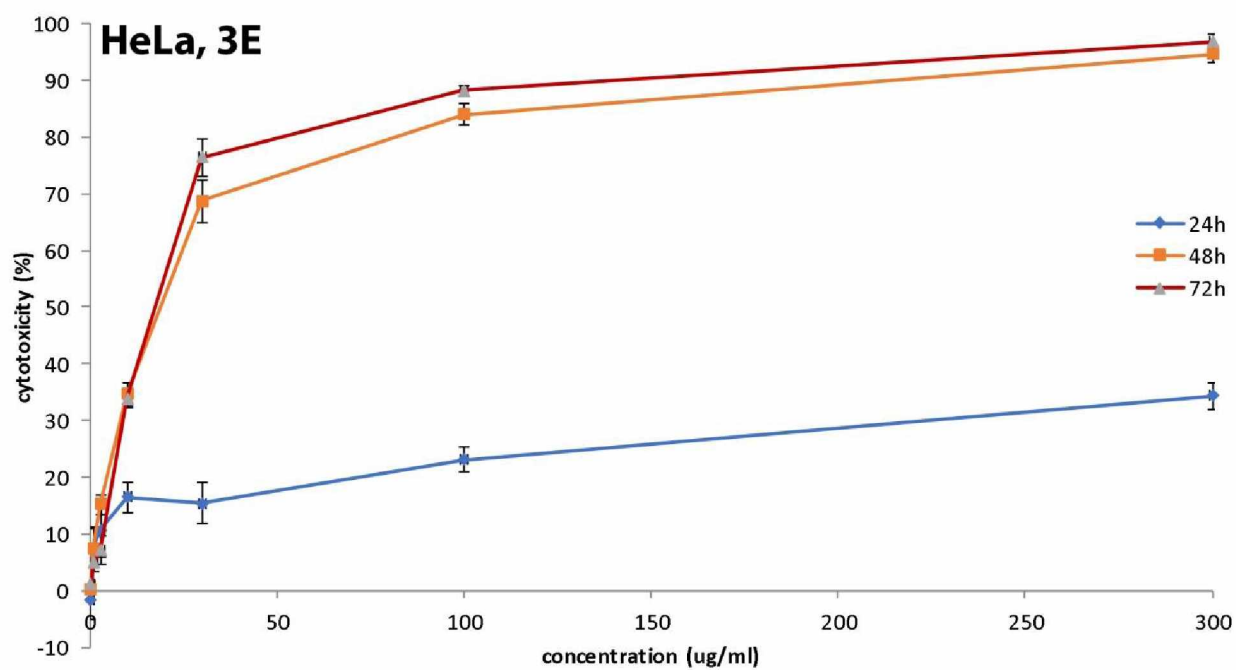
(s)



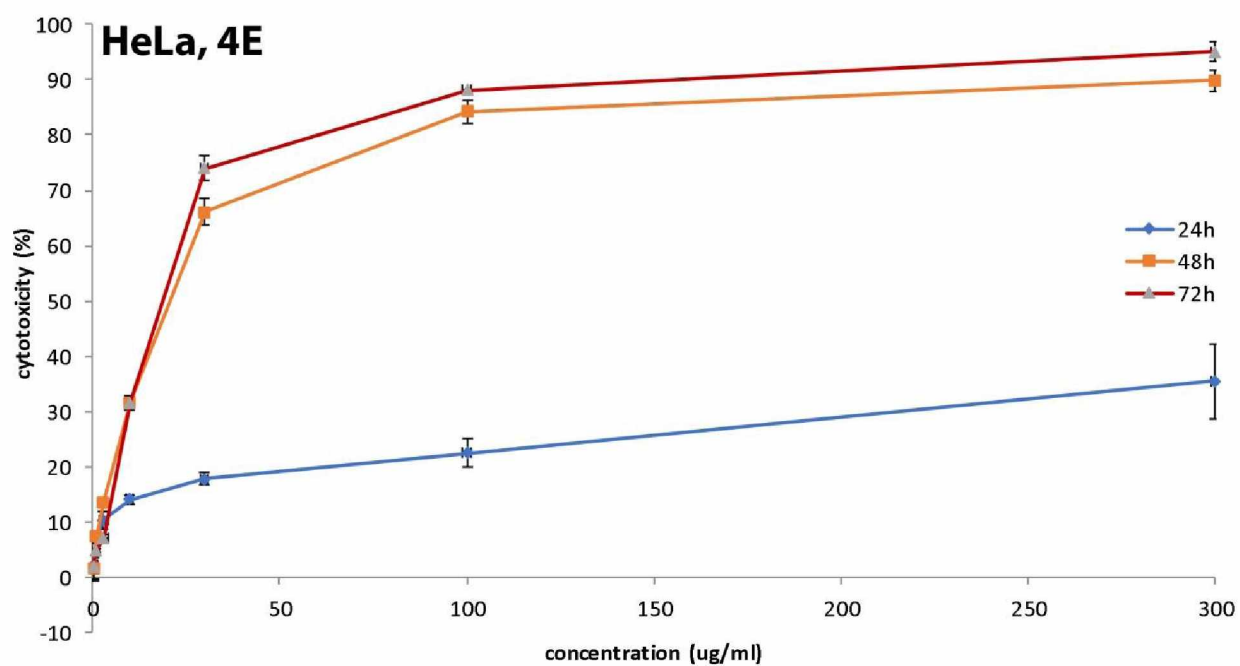
(t)



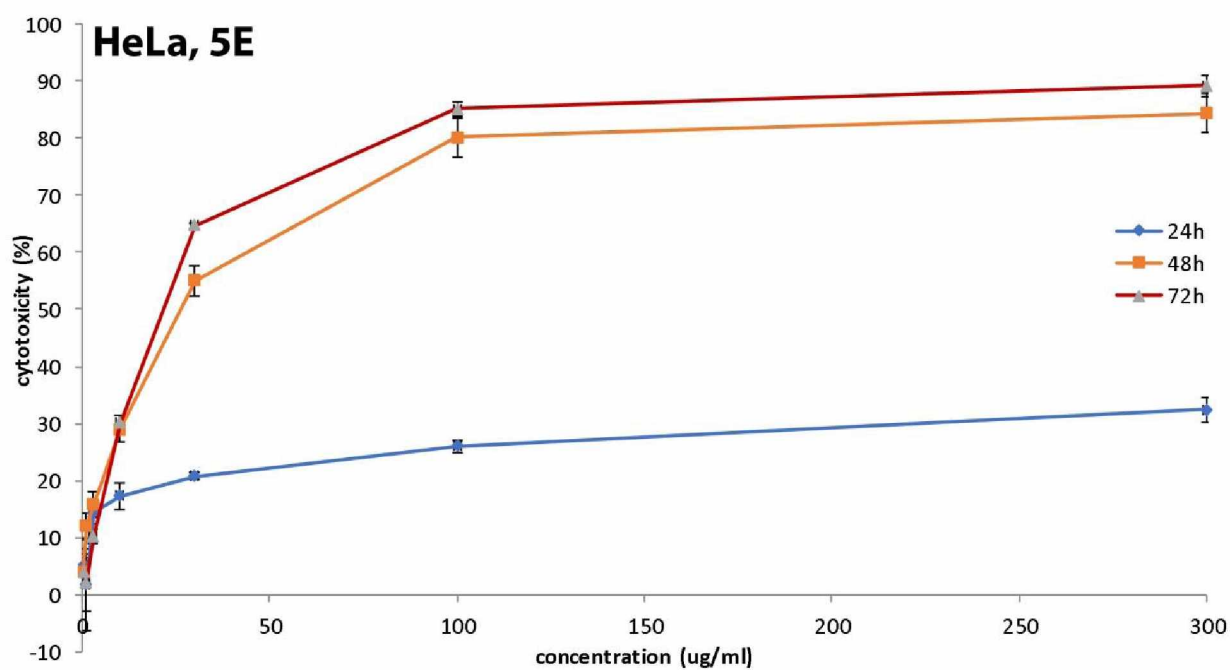
(u)



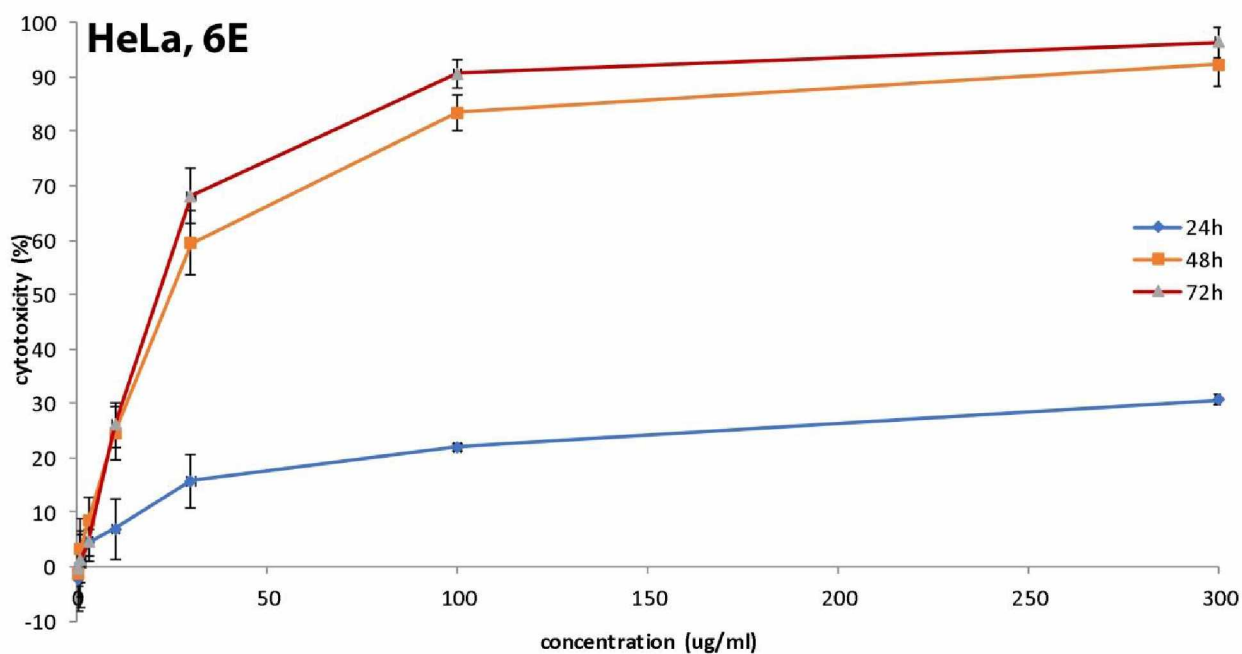
(v)



(w)



(x)



Slika 4.26. Krive doza-odgovor u MTT testu nakon 24, 48 i 72 h tretmana ćelijskih linija MRC-5 (a - f), SW480 (g - i), MDA-MB 231 (m - r) i HeLa (s - x) 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 (IC_{50}), izazivaju inhibiciju rasta kod 50% ćelija (GI_{50}), dovode do totalne inhibicije rasta ćelija (TGI) i dovode do smrtnosti 50% ćelija (LC_{50}) u HeLa ćelijskoj liniji, izražene kao $\bar{X} \pm \text{SD}$. SI: indeks selektivnosti.

| HeLa | | 1E | 2E | 3E | 4E | 5E | 6E |
|------------------|------|-------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| IC_{50} | 24 h | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| | 48 h | 22.72 ± 3.53 | 16.97 ± 2.10 | 44.38 ± 1.96 | 16.74 ± 1.43 | 25.90 ± 4.60 | 25.32 ± 7.80 |
| | 72 h | 19.53 ± 1.03 | 15.15 ± 1.72 | 33.43 ± 1.36 | 14.97 ± 0.78 | 18.73 ± 0.53 | 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 |
| GI_{50} | 24 h | 6.95 ± 0.95 | 6.00 ± 0.34 | 98.09 ± 11.08 | 5.56 ± 0.18 | 7.67 ± 1.45 | 7.46 ± 0.99 |
| | 48 h | 4.91 ± 0.84 | 3.49 ± 0.46 | 65.64 ± 3.66 | 2.54 ± 0.45 | 5.61 ± 1.22 | 5.75 ± 0.68 |
| | 72 h | 0.86 ± 0.51 | <0.3 | 59.38 ± 1.85 | <0.3 | 4.97 ± 0.54 | 4.76 ± 0.52 |
| TGI | 24 h | 16.90 ± 4.96 | 14.67 ± 0.58 | >100 | 12.91 ± 0.44 | 47.25 ± 5.66 | 27.55 ± 1.89 |
| | 48 h | 13.60 ± 1.75 | 11.00 ± 0.56 | >100 | 9.18 ± 0.59 | 19.90 ± 4.38 | 16.77 ± 1.52 |
| | 72 h | 13.27 ± 1.33 | 1.69 ± 0.36 | >100 | <0.3 | 18.42 ± 3.57 | 13.63 ± 1.26 |
| LC_{50} | 24 h | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 | >100 |
| | 48 h | 61.09 ± 16.15 | 35.65 ± 1.16 | >100 | 27.07 ± 1.56 | 63.66 ± 2.30 | 41.15 ± 6.75 |
| | 72 h | 43.19 ± 10.03 | 26.02 ± 2.88 | >100 | 20.28 ± 1.10 | 60.65 ± 1.59 | 31.20 ± 5.93 |

Naime, ekstrakti 1E-6E su pokazali statistički značajan procenat inhibicije rasta ispitivanih ćelijskih linija, na dozno zavisani 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 zavisni efekti 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 IC_{50} kao parametar 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 IC_{50} 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 IC_{50} . 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 IC_{50} 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 (GI_{50} , TGI) ili citocidni (LC_{50}) 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 GI_{50} , posebno ekstrakti 2E i 4E, koji su pokazali inhibiciju neto ćelijskog rasta za 50% pri koncentracijama nižim od minimalnih nakon 72 h tretmana ($GI_{50} < 0.3$ 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 LC_{50} 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

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 kisjelina, čiji je citotoksični potencijal ranije zabilježen [147,148]. Ekstrakt 4E je imao najveći sadržaj hlorogenske i rozmarinske kisjeline, 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 kisjeline. 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 kisjeline. Ekstrakti 2E i 4E su takođe pokazali antigenotoksičnu aktivnost u Komet testu.

Dakle, možemo zaključiti da hlorogenska i rozmarinska kisjelina 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]. Inflamatorni 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 asmatičnih 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].

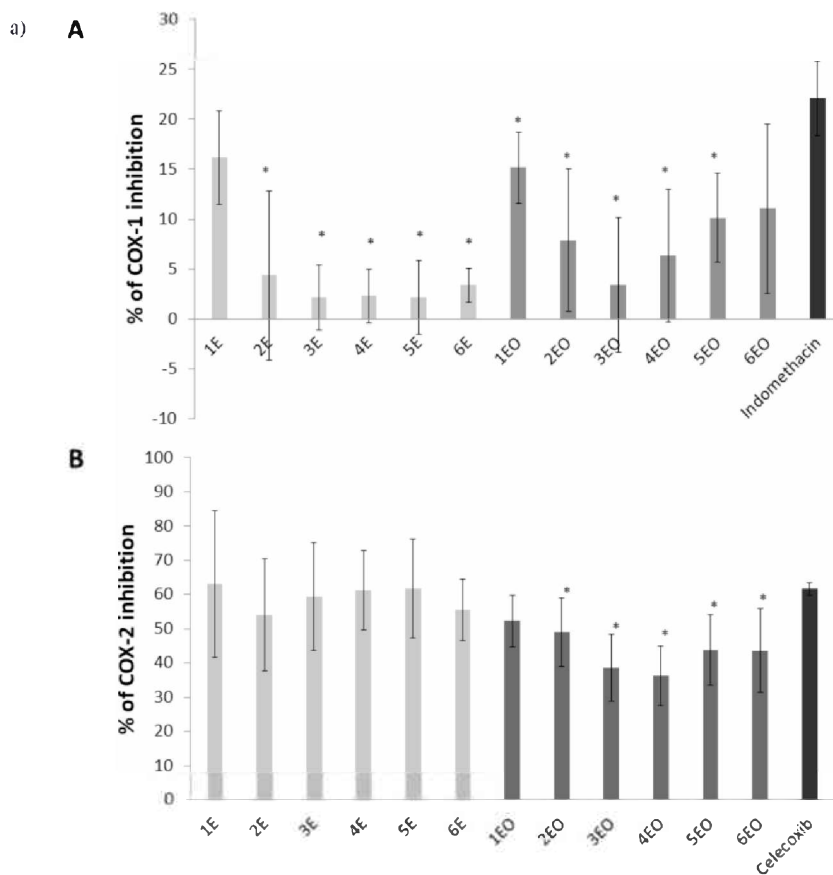
Tradicionalna primjena, kao i dosadašnji literaturni podaci daju osnov za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti preparata herbe izopa, što je upravo bio jedan od ciljeva ove disertacije. Naime, antiinflamatorna aktivnost metanolnih ekstrakata i etarskih ulja herbe izopa ispitana je *in vitro*, a zatim 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.



b)

| Sample | COX-1 Inhibition (%) | COX-2 Inhibition (%) |
|--------------|----------------------|----------------------|
| 1E | 16.15 ± 4.70 | 63.04 ± 21.44 |
| 2E | 4.34 ± 8.50 | 54.04 ± 16.28 |
| 3E | 2.15 ± 3.28 | 59.42 ± 15.75 |
| 4E | 2.31 ± 2.68 | 61.19 ± 11.47 |
| 5E | 2.14 ± 3.70 | 61.79 ± 14.44 |
| 6E | 3.36 ± 1.73 | 55.51 ± 8.98 |
| 1EO | 15.16 ± 3.56 | 52.37 ± 7.53 |
| 2EO | 7.90 ± 7.14 | 49.03 ± 10.00 |
| 3EO | 3.40 ± 6.72 | 38.52 ± 9.71 |
| 4EO | 6.35 ± 6.62 | 36.24 ± 8.72 |
| 5EO | 10.12 ± 4.47 | 43.77 ± 10.24 |
| 6EO | 11.04 ± 8.47 | 43.65 ± 12.26 |
| Indomethacin | 22.11 ± 3.76 | / |
| Celecoxib | / | 61.60 ± 1.77 |

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 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 enzimске 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 benzojeve kisjeline (siringinska kisjelina), hidroksicimetne kisjeline (hlorogenska (5-*O*-kefeoilhina kisjelina), feruloilhina i rozmarinska kisjelina, 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 kisjelina. Sadržaj hlorogenske kisjeline se kretao od 2.34 do 3.35%, dok je sadržaj rozmarinske kisjeline 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-kB, koji reguliše određene citokine, hemokine i molekule ćelijske adhezije uključene u upalni proces; flavonoidi npr. inhibirajući fosfodiesterazu cikličnog adenozin monofosfata (cAMP, eng.

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 kisjelina, u literaturi takođe postoje podaci koji govore u prilog antiinflamatornog djelovanja navedenih sastojaka. U radu Shin i sar. (2017) mehanizam antiinflamatornog djelovanja hlorogenske kisjeline u humanim intestinalnim epitelnim 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 kisjeline, koji se uglavnom zasnivao na uklanjanju ROS i RNS [157,158]. U radu Hwang i sar. (2014) su ispitivani efekti hlorogenske kisjeline 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 kisjelina 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 alpha*)), kao i drugih markera povezanih sa upalom, kao što je interleukin 6 (IL-6), na dozno zavisani 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 kisjelina 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 kisjelina, u literaturi su opisani različiti mogući mehanizmi antiinflamatornog djelovanja; međutim najviše se pominje interakcija rozmarinske kisjeline sa sistemom komplementa. Naime pokazano je da rozmarinska kisjelina inhibira aktivaciju sistema komplementa *in vivo* i *in vitro*, vezujući se kovalentno sa

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- κ B 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 [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- κ B [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 enzimske 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 \pm standardna devijacija ($X \pm SD$); * Statistički značajna razlika na nivou $p < 0.05$ u odnosu na kontrolnu grupu.

| Eksperimentalne grupe | Debljina šape pacova (mm)(% inhibicije) | | | | |
|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | 0h | 1h | 2h | 3h | 4h |
| 1E | 4.1 \pm 0.3 | 4.92 \pm 0.1 (18) | 5.5 \pm 0.2 (0) | 5.31 \pm 0.25 (28.82) | 5.15 \pm 0.15 (25) |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 1E | 4.3 \pm 0.2 | 4.95 \pm 0.3 (35) | 5.7 \pm 0.4 (0) | 5.75 \pm 0.2 (14.71) | 5.45 \pm 0.1 (17.86) |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 1E | 4.18 \pm 0.1 | 4.62 \pm 0.3 (56)* | 5.2 \pm 0.3 (27.14) | 5.12 \pm 0.2 (44.71)* | 4.95 \pm 0.4 (45)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| 2E | 4.05 \pm 0.2 | 4.83 \pm 0.1 (22) | 5.55 \pm 0.3 (-7.14) | 5.16 \pm 0.2 (34.71) | 4.95 \pm 0.13 (35.71) |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 2E | 4.13 \pm 0.1 | 4.55 \pm 0.2 (58)* | 5.62 \pm 0.2 (-6.43) | 5.1 \pm 0.2 (42.94) | 4.65 \pm 0.1 (62.86)* |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 2E | 3.98 \pm 0.1 | 4.65 \pm 0.1 (33)* | 5.45 \pm 0.2 (-5) | 4.72 \pm 0.3 (56.47)* | 4.6 \pm 0.3 (55.71)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| 3E | 4.2 \pm 0.1 | 4.87 \pm 0.2 (33) | 5.75 \pm 0.4 (-10.71) | 5.28 \pm 0.2 (36.47) | 5.1 \pm 0.1 (35.71) |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 3E | 4.25 \pm 0.2 | 5.07 \pm 0.1 (18) | 5.47 \pm 0.1 (12.86) | 5.2 \pm 0.1 (44.12) | 4.97 \pm 0.2 (48.57) |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 3E | 4.2 \pm 0.1 | 5 \pm 0.2 (20) | 5.44 \pm 0.1 (11.43) | 5.18 \pm 0.2 (42.35)* | 4.87 \pm 0.1 (52.14)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| 4E | 4.22 \pm 0.2 | 4.9 \pm 0.3 (32) | 5.35 \pm 0.2 (19.29) | 5.33 \pm 0.1 (34.71) | 5.05 \pm 0.2 (40.71)* |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 4E | 4.2 \pm 0.1 | 5.32 \pm 0.2 (-12) | 5.37 \pm 0.2 (16.43) | 5.32 \pm 0.1 (34.12) | 5.15 \pm 0.3 (32.14)* |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 4E | 4.25 \pm 0.4 | 5.45 \pm 0.3 (-20) | 5.52 \pm 0.2 (9.29) | 5.26 \pm 0.3 (40.59)* | 5.02 \pm 0.4 (45)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| 5E | 4.15 \pm 0.1 | 5.1 \pm 0.1 (5) | 5.22 \pm 0.3 (23.57) | 5.45 \pm 0.2 (23.53) | 5.18 \pm 0.2 (26.43) |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 5E | 4.08 \pm 0.3 | 5.3 \pm 0.1 (-22) | 5.5 \pm 0.2 (-1.43) | 5.37 \pm 0.3 (24.12) | 5.12 \pm 0.1 (25.71) |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 5E | 4.5 \pm 0.2 | 5.37 \pm 0.1 (13) | 5.6 \pm 0.4 (24.43) | 5.12 \pm 0.5 (63.53)* | 5.01 \pm 0.1 (63.57)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| 6E | 4.22 \pm 0.1 | 5.52 \pm 0.2 (-30) | 5.21 \pm 0.2 (29.29) | 5.25 \pm 0.3 (39.41)* | 4.87 \pm 0.3 (53.57)* |
| 50 mg/kg | | | | | |
| 6E | 4.12 \pm 0.2 | 5.45 \pm 0.1 (-33) | 5.65 \pm 0.1 (-9.29) | 5.25 \pm 0.1 (33.53)* | 5.3 \pm 0.1 (15.71) |
| 100 mg/kg | | | | | |
| 6E | 4.47 \pm 0.1 | 5.37 \pm 0.2 (10) | 5.32 \pm 0.3 (39.29) | 5.29 \pm 0.2 (51.76)* | 5.07 \pm 0.2 (57.14)* |
| 200 mg/kg | | | | | |
| Indometacin | 4.1 \pm 0.2 | 4.9 \pm 0.2 (20) | 5.2 \pm 0.3 (21.43) | 5.02 \pm 0.1 (45.88) | 4.7 \pm 0.1 (57.14) |
| 8 mg/kg | | | | | |
| Kontrola | 4.2 \pm 0.4 | 5.2 \pm 0.2 | 5.6 \pm 0.3 | 5.9 \pm 0.4 | 5.6 \pm 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 ($p < 0.05$) 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):

- U trećem satu (200 mg/kg), ekstrakti 2E (56.47%), 5E (63.53%) i 6E (51.76%) 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% 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 dozní 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].

NSAIL, 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

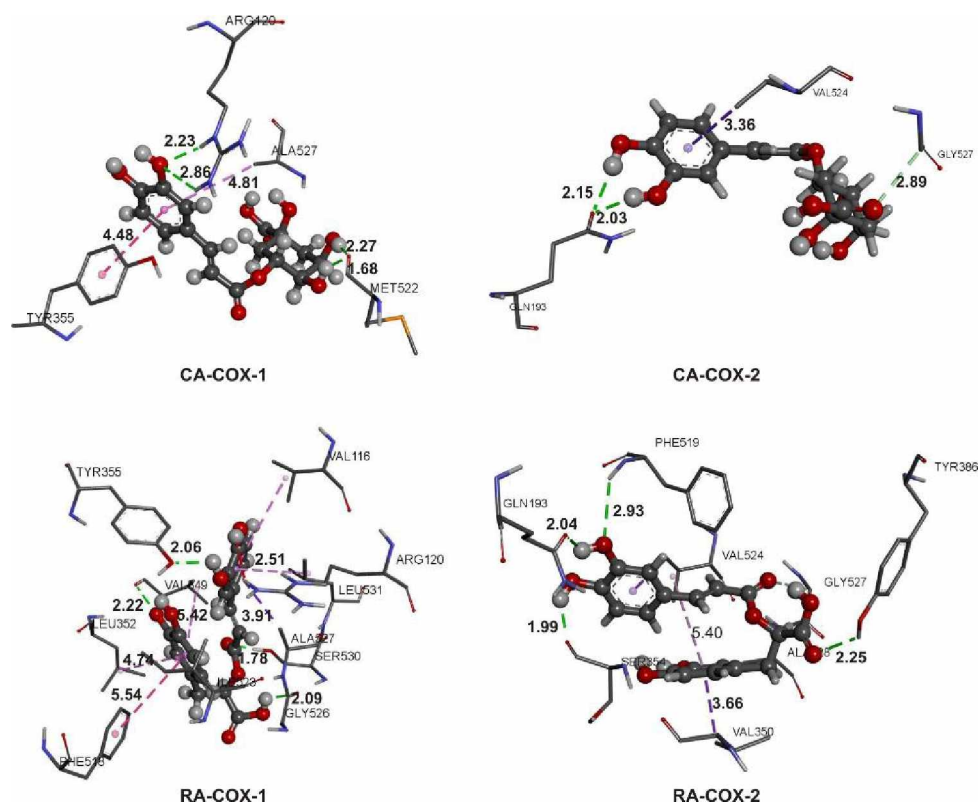
S obzirom da su ispitivani ekstrakti ispoljili zapaženo antiinflamatorno djelovanje u *in vitro* i *in vivo* studijama, ispitan je uticaj u ekstraktima kvantitativno dominantnih fenolnih jedinjenja (hlorogenske (CA) i rozmarinske kisjeline (RA)) na aktivnost COX-1 i COX-2 enzima, *in silico*.

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 ciljnih 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 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 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 kiselina, 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 ($\Delta G_{\text{bind}} = -31.3 \text{ kJ mol}^{-1}$ za COX-1 i $\Delta G_{\text{bind}} = -30.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ za COX-2), 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) | K_i (nM) | $\Delta G_{\text{Intermol Energy}}$ (vdw+hbond+desolv) (kJ mol ⁻¹) | ΔG_{elec} (kJ mol ⁻¹) | $\Delta G_{\text{Final Intermol Energy}}$ (kJ mol ⁻¹) | ΔG_{total} (kJ mol ⁻¹) | ΔG_{tor} (kJ mol ⁻¹) | ΔG_{unb} (kJ mol ⁻¹) | LE |
|------------------------|---|---------------|--|---|--|--|--|--|------|
| Ibuprofen-COX-1 | -31.3 | 3180 | -33.4 | 0.1 | -33.3 | -1.84 | 3.8 | 0.0 | -2.1 |
| Ibuprofen-COX-2 | -30.9 | 3840 | -32.3 | -0.4 | -32.7 | -2.05 | 3.8 | 0.0 | -2.1 |
| RA-COX-1 | -49.2 | 2.4 | -47.8 | -0.8 | -48.6 | -12.0 | 11.4 | 0.0 | -1.9 |
| RA-COX-2 | -50.8 | 1.3 | -47.6 | -1.1 | -48.7 | -13.5 | 11.4 | 0.0 | -2.0 |
| CA-COX-1 | -48.2 | 3.6 | -44.8 | -1.6 | -46.4 | -12.3 | 10.5 | 0.0 | -1.9 |
| CA-COX-2 | -50.6 | 1.4 | -46.1 | -0.9 | -46.9 | -14.1 | 10.5 | 0.0 | -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 zbira 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*.

❷ 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.

❸ Hemijski sastav je ispitan GC-MS metodom za etarska ulja, odnosno LC-DAD-MS metodom za ekstrakte. 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%). 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

hidroksicimetne 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 IC_{50} = 56.04–199.89 μ g/mL, FRAP = 0.667–0.959 mmol Fe^{2+} /g), koja je uglavnom bila u dobroj korelaciji sa sadržajem ukupnih polifenolnih jedinjenja u ekstraktima.
- Ⓢ 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 zavisn, 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 ekstrakate (*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 μ g/mL) su pokazali procenat inhibicije enzimске aktivnosti COX-2 koji se nije statistički značajno razlikovao od pozitivne kontrole, celekoksiba (pri koncentraciji 8.8 μ M).
 - ✓ *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.

- ✓ 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).

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 kiselina) 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, Mentheae)-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. *Grada 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.; Satovic, 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.; Rotsztein, 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.

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 Aeuroginosa*. *Imperial Journal of Interdisciplinary Research (IJIR).* 2016, *2*, 2454-1362.
73. Moro, A.; Librán, C.M.; Berruga, M.I.; Zalacain, A.; Carmona, M. Mycotoxicogenic 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 *Hyssop 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 Uygur 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.

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.; Gasparri, 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.

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. Vit.* 2017, *40*, 248–255.
139. Adımcılar, V.; Kalaycıoğlu, Z.; Aydoğdu, N.; Dirmenci, T.; Kahraman, A.; Erım, 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.; Tiperciuc, 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-NF κ B-IL-8 Signaling Pathway by Chlorogenic and Caffeic Acids in Human Intestinal Cells. *Nutrients* 2017, *9*, 165.

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- κ B 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.

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, 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 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. 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.

Od završetka studija (2014. godine), angažovana je i kao saradnik u nastavi na Medicinskom fakultetu u Podgorici (studijski program Farmacija); 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”).

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tijana Mićović

Broj indeksa/upisa 10/17

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

„Farmakognostička ispitivanja herbe izopa, *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae)
iz Crne Gore i Srbije“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija ni u cjelini ni u djelovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih ustanova visokog obrazovanja, da su rezultati korektno navedeni, i
- da nijesam povrijedila autorska i druga prava intelektualne svojine koja pripadaju trećim licima.

U Podgorici, 25.10.2022. godine

Potpis doktoranda

Tijana Mićović

Izjava o istovjetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tijana Mićović

Broj indeksa/upisa 10/17

Studijski program Doktorski studijski program Farmacija
(Medicinski fakultet u Podgorici Univerziteta Crne Gore)

Naslov rada „Farmakognoksijska ispitivanja herbe izopa,
Hyssopus officinalis L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije“

Mentor prof. dr Zoran Maksimović

Potpisani/a Tijana Mićović

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovjetna elektronskoj verziji koju sam predala za objavljivanje u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore.

Istovremeno izjavljujem da dozvoljavam objavljivanje mojih ličnih podataka u vezi sa dobijanjem akademskog naziva doktora nauka, odnosno zvanja doktora umjetnosti, kao što su ime i prezime, godina i mjesto rođenja, naziv disertacije i datum odbrane rada.

U Podgorici, 25.10.2022. godine

Potpis doktoranda

Tijana Mićović

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku da u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore pohrani moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Farmakognostijska ispitivanja herbe izopa, *Hyssopus officinalis* L. (Lamiaceae) iz Crne Gore i Srbije“

koja je moje autorsko djelo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni arhiv Univerziteta Crne Gore mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučila.

1. Autorstvo
- ☒ 2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – dijeliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – dijeliti pod istim uslovima

U Podgorici, 25.10.2022. godine

Potpis doktoranda

Tijana Micić

1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo - nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javnosaopštavanje djela, bez promjena, preoblikovanja ili upotrebe djela u svom djelu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja djela.
4. Autorstvo - nekomercijalno - dijeliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i prerade.
5. Autorstvo - bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, bez promjena, preoblikovanja ili upotrebe djela u svom djelu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela.
6. Autorstvo - dijeliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje djela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu djela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.