

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET



Dragana R. Pavlović

**Morfološka, hemijska i farmakološka
karakterizacija odabranih biljnih vrsta
rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb.,
Calluna Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae)**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY



Dragana R. Pavlović

**Morphological, chemical and
pharmacological characterization of
selected plant species of genus *Arbutus* L.,
Bruckenthalia Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica*
L. (Ericaceae)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

Doktorska disertacija urađena je u Institutu za farmakognoziju Farmaceutskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Delovi eksperimenata su izvedeni u laboratorijama: Instituta za botaniku Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Katedre za mikrobiologiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Instituta za fiziologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, Instituta za biomedicinska istraživanja Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu i Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Mentor:

dr Nada Kovačević, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije:

dr Branislava Lakušić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

dr Zoran Todorović, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu – Medicinski fakultet

Datum odbrane: _____

Danici, najsjajnijoj zvezdi mog sveta

Najiskrenije se zahvaljujem:

Mentoru, prof. dr. Nadi Kovačević (koja je predložila temu i rukovodila svim etapama izrade ove disertacije) na znanju koje mi je prenela i za put na koji me je usmerila svojom blagošću i racionalnošću.

Prof. dr. Branislavi Lakušić na stručnoj pomoći, korisnim savetima, razumevanju i izuzetnoj podršci koju mi je pružila u toku rada.

Prof. dr. Zoranu Todoroviću na ukazanom poverenju i spremnosti da pomogne u važnim trenucima.

Prof. dr. Silvi Dobrić na izuzetnoj profesionalnosti i realizaciji skrininga antiinflamatorne aktivnosti.

Prof. dr. Suzani Branković na saradnji i realizaciji skrininga spazmolitičke aktivnosti.

Prof. dr. Dušanki Kitić na razumevanju, korisnim idejama i savetima, i svemu što me je naučila.

Prof. dr. Branki Vuković-Gačić, na ljubaznosti i pomoći pri ispitivanju antimikrobne aktivnosti.

Dipl. ph. Mariji Tasić-Kostov na aktivnom učešću u analizi antiiritantne aktivnosti (od same ideje do pomoći pri obradi rezultata), kao i doc. dr. Snežani Savić na korisnim sugestijama kada je ovaj deo eksperimenta u pitanju.

Dipl. ing. Miroslavu Miljkoviću na izvršenom SEM mikroskopiranju.

Mr. ph. Mirjani Marčetić na ogromnoj pomoći i prijateljstvu; mojim nekadašnjim asistentkinjama doc. dr. Milici Drobac i mr. ph. Zvezdani Došlov-Kokoruš, ali i svim ostalim kolegama i osoblju sa Instituta za farmakognoziju Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, na bezuslovnoj pomoći i saradnji.

Doc. dr. Bojanu Zlatkoviću na nesebičnoj stručnoj i prijateljskoj pomoći; mladim koleginicama, mojim nekadašnjim studentima, dipl. ph. Milici Kostić i Milici Milutinović na podršci i pomoći u eksperimentalnom radu; svim kolegama sa Odseka za farmaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu, na čelu sa prof. dr. Goranom Nikolićem, za podstrek i podršku.

Svojim kumama: Mariji Tasić-Kostov, Mariji Vukelić-Nikolić, Jeleni Nikolić i Dragani Veljković-Perez na iskrenom prijateljstvu i podršci.

Tati, koji je uvek tu kada je to potrebno.

Mom suprugu Ivanu za strpljenje, ljubav i razumevanje, ali i ogromnu tehničku pomoć u toku izrade ovog rada.

Dragana Pavlović

Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae)

Sažetak

U okviru ovog rada je izvršeno ispitivanje pet vrsta porodice Ericaceae: *Arbutus unedo*, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* i *Erica carnea* u cilju njihovog međusobnog poređenja i poređenja sa terapijski najznačajnijom vrstom ove porodice, *Arctostaphylos uva ursi*. Do sada su samo neke od ovih vrsta delimično proučene.

Morfološko-anatomska analiza lista i stabla je ukazala na izvesne sličnosti u građi, pri čemu se veće odstupanje javlja kod vrste *Arbutus unedo*.

Hemijska ispitivanja su pokazala da sve proučavane vrste sadrže hidrohinske i fenilpropanoidne derivate, flavonoide i tanine. HPLC analiza je potvrdila prisustvo arbutina samo u uzorcima vrste *Arbutus unedo* (i to u uzorku iz Crne Gore u nešto većem procentu nego u uzorku iz Grčke) i odsustvo hidrohinona u svim uzorcima.

Semikvantitativnom HPLC analizom etanolnih ekstrakata je u svim uzorcima utvrđeno prisustvo kvercitrina, kvercetin-3-O-glukoziida i galne kiseline, dok su ostala identifikovana fenolna jedinjenja (klorogenska, elagna i ferulna kiselina, apigenin i apigenin 7-O-glukozid, rutin, kvercetin i kemferol) sporadično prisutna a ponegde i prvi put detektovana u ispitivanim vrstama.

U okviru farmakološke analize je ispitivana antioksidativna, antimikrobna, spazmolitička, antiinflamatorna i antiiritantna aktivnost.

Svi etanolni ekstrakti poseduju izuzetnu antioksidativnu aktivnost, pri čemu je *Arbutus unedo* naj snažnije redukovao jon gvožđa i uklanjao slobodne radikale a *Bruckenthalia spiculifolia* ispoljila najizraženiju inhibiciju lipidne peroksidacije u oba primenjena testa.

Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata prema 10 testiranih bakterijskih sojeva u agar difuzionom testu je veoma slaba.

Etanolni ekstrakti vrste *Arbutus unedo* pokazuju značajnu spazmolitičku aktivnost na izolovanom ileumu pacova, pri čemu je efekat ekstrakta biljnog materijala poreklom iz Grčke snažniji. Blokada kalcijumovih kanala je utvrđeni mehanizam spazmolitičkog dejstva. Etanolni ekstrakt vrste *Erica arborea* takođe značajno snižava bazalni tonus ileuma i redukuje kontrakcije indukovane acetilholinom, mada su efekti slabiji u odnosu na efekte ekstrakata vrste *Arbutus unedo*.

Svi testirani ekstrakti vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera pokazuju značajnu antiinflamatornu aktivnost u modelu akutne inflamacije edema šapice pacova

indukovane karageninom. Efekti su uporedivi, a ponegde i snažniji od efekta indometacina.

Hidrogelovi formulisani sa 2% odgovarajućeg etanolnog ekstrakta ispoljavaju pozitivne efekte na humanoj koži pretretiranoj natrijum laurilsulfatom: smanjuju iritaciju, hidriraju kožu i vraćaju pH vrednost kože na nivo pre veštački izazvane iritacije. Najbolji efekat ispoljava gel sa ekstraktom vrste *Erica carnea*.

Na osnovu sprovedenih ispitivanja se može zaključiti da samo vrsta *Arbutus unedo* može, pod uslovom višestrukog doziranja, poslužiti kao zamena za drogu *Uvae ursi folium*. Međutim, sve ispitivane vrste mogu ispoljiti pozitivne efekte u nekim indikacijama (npr. GIT poremećaji, inflamacije i kožne promene), pre svega zahvaljujući svom fenolnom sastavu i utvrđenim farmakološkim aktivnostima.

Ključne reči: Ericaceae, arbutin, HPLC, antioksidativna, antimikrobna, spazmolitička, antiinflamatorna, antiiritantna aktivnost

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakognozija

UDK: 615.322.01:588.688.3

Morphological, chemical and pharmacological characterization of selected plant species of genus *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae)

Abstract

In the present study comparative investigation of five species of Ericaceae family: *Arbutus unedo*, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* and *Erica carnea* were carried out. These species were compared between each other and with *Arctostaphylos uva ursi*, species of this family well known for its healthy properties. Until now, only few of these selected species are partly investigated.

Morphological and anatomical analysis of aerial parts of these species pointed out certain structure similarity, with exception of *Arbutus unedo*.

Preliminary chemical analysis showed the presence of hydroquinone and phenylpropanoid derivates, flavonoids and tannins in all investigated plant materials. Our results, obtained using HPLC method, confirmed presence of arbutin only in samples of *Arbutus unedo* (with higher content in plant material collected in Montenegro compared to one from Greece) and absence of hydroquinone in all tested samples.

Semiquantitative HPLC analysis of ethanolic extracts indicated the presence of quercitrin, quercetin 3-O-glucoside and gallic acid in all samples, while other identified phenolic compounds (chologenic, ellagic and ferulic acid, apigenin, apigenin 7-O-glucosid, rutin, quercetin and kaempferol) are sporadically presented and some of them for the first time found in selected species.

Pharmacological screening included the studies of antioxidant, antimicrobial, spasmolytical, anti-inflammatory and antiirritant activity of ethanolic extracts.

All samples showed exerted excellent antioxidant activity. The highest scavenging activity and ferri-ion reduction wer obtained with leaves extract of *Arbutus unedo*. *Bruckenthalia spiculifolia* herb extract was most potent inhibitor of lipid peroxidation in both applied tests.

Antimicrobial activity of the extracts against 10 tested strains of bacteria in disc-diffusion assay was generally weak.

Both *Arbutus unedo* extracts showed significant spasmolytic activity in isolated rat ileum, with stronger effects of extract from plant material collected in Greece. Spasmolytic activity is mediated through calcium channel inhibition. *Erica arborea* extract also produced considerable decrease of the ileal basal tonus and reduction in contractile response to acetylcholine, although weaker than extracts of *Arbutus unedo*.

All *Bruckenthalia spiculifolia* extracts showed significant activity in carrageenan-induced rat paw oedema model. The anti-inflammatory effects of the extracts were comparable to that of indomethacin.

Hydrogels, each containing 2% of one investigated extract, showed positive effects on the sodium lauryl sulfate-irritated human skin. All investigated samples significantly decreased the skin irritation level and reversed the pH of the skin disturbed by preirritation alongside with its hydration. Hydrogel loaded with *Erica carnea* extract displayed the best outcomes.

According to the results of chemical investigation, only *Arbutus unedo* could be treated as adequate substitute for herbal drug *Uvae ursi folium*. However, all investigated species could provide positive health benefits, due to high content of valuable plant phenols and demonstrated pharmacological activities.

Keywords: Ericaceae, arbutin, HPLC, antioxidant, antimicrobial, spasmolytical, anti-inflammatory, antiirritant activity

Scientific field: Pharmacy

Major in: Pharmacognosy

UDK: 615.322.01:588.688.3

Lista skraćenica

AA – antiinflamatorna aktivnost

A1E – etanolni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* CG

A1 – gel sa 2% A1E

A2E – etanolni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* G

A2 – gel sa 2% A2E

Ach – acetilholin

Arbutus unedo CG – biljni materijal vrste *Arbutus unedo* poreklom iz Crne Gore

Arbutus unedo G – biljni materijal vrste *Arbutus unedo* poreklom iz Grčke

ATCC – American Type of Culture Collection

ATP – adenzintrifosfat

B – gel sa 2% BE

BE – etanolni ekstrakt vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Kopaonika

BC – etanolni ekstrakt dobijen perkolacijom cvasti vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

BH – etanolni ekstrakt dobijen perkolacijom nadzemnog dela u cvetu vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

BHA – butilhidroksianizol

BHT – butilhidroksitoluol

BK – etanolni ekstrakt dobijen perkolacijom korena vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

BL – etanolni ekstrakt dobijen perkolacijom lista vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

C – gel sa 2% CE

CE – etanolni ekstrakt vrste *Erica carnea*

CFU/ml – Colony Forming Unit/ml

cGMP – ciklični guanozin monofosfat

COX – ciklooksigenaza

DMSO – dimetilsulfoksid

DNK – dezoksiribonukleinska kiselina

DPPH – 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

E – gel sa 2% EE

EE – etanolni ekstrakt vrste *Erica arborea*

EAB – etilacetatna frakcija etanolnog ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

EC – električna kapacitivnost kože

EI – eritema indeks

EPC – fosfatidilholin jajeta

ETB – etarska frakcija etanolnog ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine

F-C – Folin-Ciocalteu

FRAP – Ferric reducing/antioxidant power assay

GIT – gastrointestinalni trakt

HFF – Herbarijumu Katedre za botaniku Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

IC₅₀ – koncentracija koja inhibira (neutrališe) 50% kontrakcija (slobodnih radikala)

ICD – iritantni kontaktni dermatitis

IL – interleukin

Ips – izoprostan
IP₃ – inozitol trifosfat
L-NAME – L-nitroarginin metil estar
LDL – lipidi male gustine
LOX – lipookigenaza
LP – lipidna peroksidacija
MAO-A – monoaminooksidaza A
MDA – malondialdehid
MGDG – monogalaktozildiacylglicerol
MIC – minimalna inhibitorna koncentracija
NAD(P)H – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NCIMB – National Collection of Industrial Bacteria
NF-κB – nuklearni faktor kapa B
(i) NOS – (inducibilna) azot oksid sintetaza
NP – natural products reagens
NSAIL – nesteroidni antiinflamatorni lek
P – placebo gel
PAF – faktor agregacije trombocita
PB – petroletarska frakcija etanolnog ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine
PEG – polietilenglikol
PMN – polimorfonuklearni leukociti
PUFA – polyunsaturated fatty acids (polinezasićene masne kiseline)
PVPP – polivinil polipirolidon
RNK – ribonukleinska kiselina
ROS – reactive oxygen species (reaktivne kiseonične vrste)
SC – *stratum corneum*
SEM – skening elektronski mikroskop
SLS – sodium lauryl sulphate (natrijum lauril sulfat)
SOD – superoksid dismutaza
STAT – signal transducer and activator of transcription
TBA –thiobarbituric acid (2-tiobarbiturna kiselina)
TBARS – thiobarbituric acid reacting substances (supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom)
TNF-α – tumor nekroza faktor α
TPTZ – tripiridiltriazin
UCO (K) – kontrola pod okluzijom
UCW (U) – kontrola bez okluzije
UV – ultravioletno zračenje
V – gel sa 2% VE
VE – etanolni ekstrakt vrste *Calluna vulgaris*
VB – vodena frakcija etanolnog ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasine
WHO – World Health Organisation (Svetska zdravstvena organizacija)

SADRŽAJ

I OPŠTI DEO.....	1
ARBUTIN.....	1
1. Uloga arbutina u biljci	2
Tolerancija biljke na stres.....	2
Zaštita od patogena.....	3
2. Značaj arbutina za medicinu i farmaciju.....	3
Arbutin – sredstvo za izbeljivanje kože.....	3
Arbutin – uroantiseptik.....	3
3. Resorpcija, metabolizam i izlučivanje arbutina.....	4
Toksičnost hidrohinona.....	5
4. Uvae ursi folium – najznačajniji biljni izvor arbutina.....	6
FAMILIJA ERICACEAE DC.....	7
1. Rod <i>Arbutus</i> L.....	9
<i>Arbutus unedo</i> L.....	9
2. Rod <i>Bruckenthalia</i> Rchb.....	10
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i> (Salisb.) Rchb.....	10
3. Rod <i>Calluna</i> Salisb.....	10
<i>Calluna vulgaris</i> (L.) Hull.....	11
4. Rod <i>Erica</i> L.....	12
<i>Erica arborea</i> L.....	12
<i>Erica carnea</i> L.....	12
TRADICIONALNA UPOTREBA I DOSADAŠNJA ISPITIVANJA ODABRANIH VRSTA	
FAMILIJE ERICACEAE.....	14
1. Tradicionalna upotreba	14
<i>Arbutus unedo</i>	14
<i>Calluna vulgaris</i>	15
Rod <i>Erica</i>	15
2. Dosadašnja hemijska ispitivanja	16
<i>Arbutus unedo</i>	16
<i>Calluna vulgaris</i>	16
Rod <i>Erica</i>	17
3. Dosadašnja farmakološka ispitivanja.....	17
<i>Arbutus unedo</i>	17
<i>Calluna vulgaris</i>	18
<i>Erica arborea</i>	19
II CILJ RADA	20
III MATERIJAL I METODE	21
1. BILJNI MATERIJAL I EKSTRAKTI.....	21
<i>Biljni materijal</i>	21
<i>Ekstrakcija biljnog materijala</i>	21
2. MORFOLOŠKO-ANATOMSKA ANALIZA	22
3. HEMIJSKA ANALIZA.....	22
3.1. Osnovna hemijska ispitivanja	22
Određivanje sadržaja vlage (gubitka sušenjem)	22
Određivanje pepela.....	23
Određivanje ukupnog pepela.....	23

Određivanje pepela nerastvornog u hlorovodoničnoj kiselini.....	24
Određivanje ekstraktivnih materija	24
Određivanje vrednosti sluznih droga.....	25
3.2. Kvalitativna hemijska analiza.....	25
3.2.1. Kvalitativna analiza fenolnih heterozida	26
TLC fenolnih heterozida	26
TLC dokazivanje arbutina.....	27
3.2.2. Kvalitativna analiza flavonoida	27
TLC flavonoida	27
Dvodimenziona TLC sa hidrolizom heterozida	28
TLC šećera	28
3.2.3. Kvalitativna analiza tanina	29
3.2.4. HPLC analiza fenolnih jedinjenja	29
3.3. Kvantitativna hemijska analiza.....	30
3.3.1. Određivanje arbutina	30
Spektrofotometrijsko određivanje hidrohinskih derivata	30
HPLC određivanje arbutina.....	31
3.3.2. Određivanje flavonoida	32
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina	33
Folin-Ciocalteu metoda.....	33
3.3.4. Određivanje sadržaja fenilpropanoidnih derivata	35
4. SKRINING FARMAKOLOŠKE AKTIVNOSTI.....	35
4.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti.....	35
4.1.1. Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP-metodom	40
FRAP-metoda.....	40
4.1.2. Određivanje intenziteta inhibicije lipidne peroksidacije	41
Test inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima	41
Test inhibicije obezbojavanja β -karotena.....	44
4.1.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala	44
DPPH metoda.....	44
4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti.....	46
Testovi antimikrobne osetljivosti	47
4.3. Ispitivanje spazmolitičke aktivnosti	49
4.3.1. Određivanje uticaja ekstrakta na spontane kontrakcije	51
4.3.2. Određivanje uticaja ekstrakta na acetilholinom indukovane kontrakcije	52
4.3.3. Određivanje mehanizma spazmolitičkog dejstva	52
4.4. Ispitivanje antiinflatatorne aktivnosti	52
4.5. Ispitivanje antiiritantne aktivnosti	56
5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	59
6. REAGENSI I INSTRUMENTI	59
IV REZULTATI I DISKUSIJA	61
1. ANATOMSKO-MORFOLOŠKA ANALIZA.....	61
<i>Arbutus unedo</i>	61
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	62
<i>Calluna vulgaris</i>	63
<i>Erica arborea</i>	64
<i>Erica carnea</i>	66
2. OSNOVNA HEMIJSKA ISPITIVANJA	68
3. BILJNI MATERIJAL I ETANOLNI EKSTRAKTI	69
4. KVALITATIVNA HEMIJSKA ANALIZA.....	71

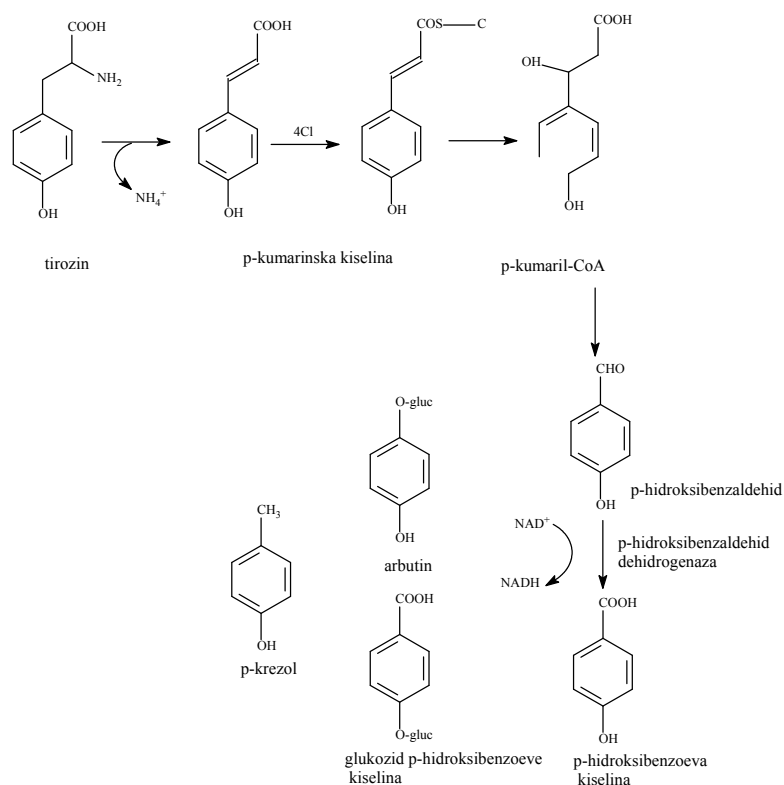
4.1. Dokazne hemijske reakcije.....	71
4.2. TLC određivanja.....	71
4.3. Semikvantitativna HPLC analiza fenolnih jedinjenja.....	73
5. KVANTITATIVNA HEMIJSKA ANALIZA.....	75
5.1. Određivanje arbutina.....	75
Spektrofotometrijsko određivanje hidrohinoskih derivata po Ph. Jug. V.....	75
HPLC određivanje arbutina.....	76
5.2. Određivanje flavonoida.....	76
5.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina.....	77
5.4. Određivanje sadržaja fenilpropanoidnih derivata.....	78
6. FARMAKOLOŠKA ISPITIVANJA.....	80
6.1. Antioksidativna aktivnost.....	80
Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP-metodom.....	80
Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u lipozomima.....	81
Određivanje sposobnosti inhibicije obezbojavanja β -karotena.....	82
Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala DPPH testom.....	84
Veza antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja.....	86
6.2. Antimikrobna aktivnost.....	88
6.3. Spazmolitička aktivnost.....	90
<i>Arbutus unedo</i>	90
<i>Erica arborea</i>	94
6.4. Antiinflamatorna aktivnost.....	95
6.5. In vivo određivanje antiiritantne aktivnosti.....	98
Određivanje električne kapacitativnosti kože (EC).....	99
Određivanje eritema indeksa kože (EI).....	101
Određivanje pH vrednosti kože.....	103
VII ZAKLJUČAK.....	107
LITERATURA.....	110
DODATAK I.....	120
PUBLIKOVANI RADOVI IZ DOKTORATA.....	120
DODATAK II.....	121
NAJZNAČAJNIJI BIOLOŠKI IZVORI ARBUTINA.....	121
<i>Literatura II:</i>	124
DODATAK III: HPLC HROMATOGRAMI I SPEKTRI.....	126
LISTA ILUSTRACIJA.....	132
LISTA TABELA.....	134
BIOGRAFIJA AUTORA.....	135
PRILOZI 1-3.....	136

I OPŠTI DEO

Arbutin

Arbutin ($C_{12}H_{16}O_7$; molarna masa = 272,25; ostali nazivi: β - arbutin, arbutozid, β -D-glukopiranozid-4-hidroksifenil, hidrohinton- β -D-glukopiranozid, hidrohinton glukoza, 4-hidroksifenil- β -D-glukopiranozid, ursin i uvasol) je široko rasprostranjen u biljnom svetu (Dodatak II). Obično je prisutan zajedno sa metilarbutinom, posebno u vrstama familije Ericaceae (1).

Proučavanjem sintetskih metaboličkih procesa obolelog krompira potvrđeno je da arbutin nastaje iz tirozina – Slika 1.1. Enzim monooksigenaza, u *in vivo* uslovima, može da katalizuje hidroksilaciju aromatičnog prstena reakcionim mehanizmom koji uključuje šikimatni metabolički put; tako se fenilalanin hidroksiluje u p-položaju do tirozina u prisustvu enzima fenilalaninmonooksigenaze (2,3).



Slika 1.1. Nastanak arbutina iz tirozina

Sadržaj arbutina (kao i odnos arbutina i metilarbutina) zavisi od ontogenetske faze (obično je znatno viši u jesen u fazi ploda) i geografskog porekla biljne vrste (1,4,5).

1. Uloga arbutina u biljci

Tolerancija biljke na stres

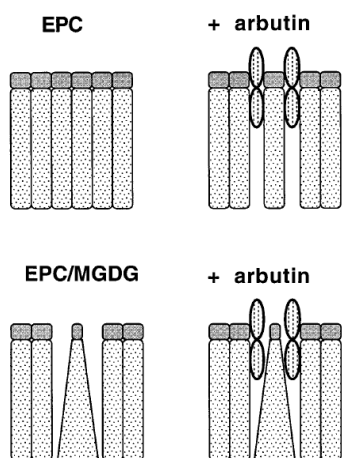
Na osnovu visokih koncentracija arbutina u biljkama otpornim na veoma visoke ili veoma niske temperature staništa, antioksidativne aktivnosti i sposobnosti inhibicije fosfolipaze A2 (PLA2), pretpostavljeno je da arbutin igra važnu ulogu u toleranciji biljke na stres (6).

Vrsta *Myrothamnus flabellifolia* Welw. (Myrothamnaceae), koja za razliku od većine ostalih poikilohidričnih biljaka (koje su zeljaste, male i niske) predstavlja žbun visok i preko 1 m, sadrži do 25% arbutina računato na suhu masu listova. Arbutin se kod zimzelene vrste *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch (Saxifragaceae), koja raste u surovim uslovima Sibira, akumulira u većoj količini u jesen; javlja se u visokoj koncentraciji i u drugim vrstama koje su adaptirane na uslove kao što su arktičke niske temperature (*Vaccinium* spp., *Arctostaphylos* spp.), pa se smatra da doprinosi otpornosti biljaka na niske temperature (6-8).

Smatra se da arbutin doprinosi i zaštiti komponenata membrane u uslovima suše (subcelularna stabilizacija i oporavak tokom rehidratacije), a potvrđeno je da je snažan antioksidant i da inhibira PLA2 u sistemima sa najvećom dehidratacijom (9,10).

Arbutin kao izvor hidrohina može redukovati peroksidaciju nezasićenih lipida membrane, što je jedan od ključnih događaja u propadanju biljne ćelije tokom starenja ili izlaganja stresu (8). Kao amfifilni molekul može imati ulogu inhibitora akumulacije slobodnih masnih kiselina (11).

Arbutin, dakle, ima važnu ulogu u toleranciji biljke na stres tako što direktno ili indirektno stabilizuje ćelijsku membranu. Međutim, protektivni efekat je strogo zavisn od prisustva nedvoslojnog lipida (kao što je monogalaktozildiacilglicerol – MGDG) u membrani. Dramatično različiti efekti arbutina na membrane različitog lipidnog sastava se mogu razumeti pomoću spektroskopskih podataka na osnovu “koncepta oblika” polimorfizma lipida – Slika 1.2. (6).



Slika 1.2. Šematski prikaz preseka spoljašnjeg sloja lipozomske membrane koji sadrži ili samo fosfatidilholin jajeta (EPC) – cilindrično prikazani molekuli ili smešu EPC-a i MGDG-a – konično prikazani molekuli, u odsustvu i prisustvu arbutina. Tamnije osenčeni delovi lipida predstavljaju hidrofobne glave, a svetliji regione kiselinskih lanaca. Arbutin je predstavljen kao dve elipse, gde donji deo predstavlja fenolni prsten a gornji glukozu. Arbutin se ugrađuje u prazne prostore membrane koje stvara prisustvo MGDG-a što smanjuje “krivljenje” i u niskim koncentracijama arbutina smanjuje nefuzogeno oštećenje. Međutim, kod visokih koncentracija arbutina, kapacitet membrane da se prilagodi je postignut i ponovo dominira efekat pucanja.

Zaštita od patogena

Rezistencija krušaka na soj *Erwinia amylovora* je blisko povezana sa visokim nivoom arbutina/hidrohinona, antibakterijske komponente koja je prisutna u spoljašnjim slojevima pupoljaka, koje bakterija najčešće napada. Hidrohinon se oslobađa iz arbutina (nema *de novo* formiranja) dejstvom β -glukozidaze, čija je aktivnost posebno pojačana upravo u spoljašnjim slojevima pupoljaka. Zato se arbutin ne smatra fitoaleksinom (iako je hidrohinon, koji se iz njega oslobađa, glavni antimikrobni agens kruške) već predstavlja tipičan *prodrug*-molekul pošto se aktivira tek kada je jedinka ugrožena (12-14).

Oksidacija arbutina, zahvaljujući nastanku toksičnih supstanci, učestvuje u otpornosti nekih varijeteta krušaka na plamenjaču. Takođe, degradacija arbutina se smatra mogućim uzrokom inkompatibilnosti pri kalemljenju krušaka i dunja (10,15).

2. Značaj arbutina za medicinu i farmaciju

Arbutin se nalazi u hrani, biljnim dodacima ishrane, pomoćnim lekovitim sredstvima i kozmetičkim proizvodima za izbeljivanje kože. U terapiji se primenjuje kao uroantiseptik i kao agens za izbeljivanje kože.

Arbutin – sredstvo za izbeljivanje kože

Arbutin ispoljava efekat izbeljivanja kože na taj način što smanjuje aktivnost ćelijske tirozinaze (najvažnijeg enzima u sintezi melanina), bez promene funkcije same ćelije. Kada se doda kulturi humanih melanocita pokazuje dozno-zavisnu redukciju aktivnosti tirozinaze i značajno smanjenje nivoa melanina, uz izuzetno nisku citotoksičnost. Ćelije tretirane arbutinom pokazuju smanjenje pigmentacije i aktivnosti tirozinaze bez promene u ekspresiji tirozinaznih gena. Kao potvrđeni inhibitor sinteze melanina i sredstvo za izbeljivanje kože, često se uključuje u grupu lekova koji se primenjuju kod karcinoma kože. Arbutin čak može sprečiti nastanak ozbiljnih sunčanih opekotina izazvanih akumulacijom melanina (nastalog u subkutanom tkivu metaboličkim putem katalizovanim tirozinazom). Međutim, pošto je istovremeno i izuzetno fotosenzitivna supstanca, u preparate je neophodno inkorporirati veću količinu sredstava za zaštitu od sunca da bi se sprečila njegova razgradnja (1,16).

U kozmetičkim preparatima se koristi u koncentracijama koje ne prelaze 2% (17).

Arbutin – uroantiseptik

Efikasnost arbutina kao uroantiseptika je, između ostalog, potvrđena u kliničkoj studiji gde je *in vitro* korišćeno 74 sojeva bakterija, uključujući vrste *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus*. Arbutin (prisutan u urinu nakon oralne primene 1 g čiste supstance ili infuza droge koji sadrži ekvivalentnu količinu arbutina) je bio aktivan protiv svih testiranih sojeva, odnosno registrovana je jaka antibakterijska aktivnost u uzorcima urina posle podešavanja pH na 8,0. *In vivo*, nakon

primene samo jedne doze ekstrakta listova *Arctostaphylos uva ursi* standardizovanog na 800 mg arbutina, nije uočen rast bakterija u urinu narednih 5 dana (18,19).

Opšta preporuka za najbolju efikasnost uroantiseptične terapije preparatima koji sadrže arbutin je da se pospeši izlučivanje urina alkalne reakcije (što se postiže izostavljanjem namirnica bogatih kiselinama iz ishrane ili uzimanjem sode bikarbone – 0,5 g uz dozu preparata sa arbutinom) (17). Međutim, jedna novija studija metabolizma arbutina i njegovog efekta na bakteriju *E. coli*, navodi na zaključak da je alkalizacija urina (podešavanje pH na 8,0) suvišna, a da se konjugati hidrohina mogu smatrati njegovim prekursorima. Bakterije koje su uzročnici urinarne infekcije učestvuju u dekonjugaciji i oslobađanju toksičnog slobodnog hidrohina – što bi se moglo nazvati samoubilačkim mehanizmom (izmerena je 2,3 puta veća koncentracija slobodnog dekonjugovanog hidrohina u uzorcima urina sa suspenzijom *E. coli* u odnosu na one kojima je dodat enzima heterozidaza) (20).

Komisija E daje napomenu da preparate koji sadrže arbutin ne bi trebalo uzimati duže od nedelju dana niti više od pet puta godišnje bez saveta lekara. Primena je kontraindikovana kod: trudnica, dojilja i dece mlađe od 12 godina (18).

Nakon dugotrajne interne upotrebe moguće je oštećenje jetre. Iako nema podataka o kancerogenosti, kogenotoksičnosti niti o antigenotoksičnosti arbutina, pošto se on metaboliše do hidrohina, neophodno je razmotriti njegovu bezbednost sa aspekta toksičnosti ovog fenola (1).

3. Resorpcija, metabolizam i izlučivanje arbutina

Arbutin se resorbuje preko nosača glukoze (Na^+ -zavisnim putem resorpcije šećera) u nižim delovima intestinuma, a biorasploživ je kao hidrohinon. Preuzimanje arbutina je u direktnoj zavisnosti od morfološkog stanja mukoze ispitivane vrste kao i od prisutnih mikroorganizama (gram-pozitivne koke – *Staphylococcus saprophyticus* i Enterobacteriaceae – *Salmonella paratyphi* B, *Shigella* i *Proteus* vrste ne utiču značajnije, dok gram-pozitivne bakterije – *Lactobacillus* i svi sojevi *E. coli* i gljivica *Candida albicans* inhibiraju resorpciju arbutina) (1,19,21). Arbutin odlaže postprandijalni porast nivoa glukoze u krvi pa može biti koristan kao dopuna u tretmanu dijabetesa (22).

Ispitivanjem ekskrecije kod ženki pacova, uočeno je izlučivanje nepromenjenog arbutina (82% i 100% posle 16, odnosno 30 sati) ali i njegov diuretički efekat (21).

U studiji koja je pratila raspoloživost ukupnih hidrohinskih ekvivalenata u urinu zdravih dobrovoljaca (unosili *per os* 3 x 140 mg arbutina iz suvog ekstrakta uve), najveći deo izlučenih supstanci su bili konjugati hidrohina sa glukuronskom i sumpornom kiselinom. Tokom 6 sati od prve doze, samo 0,21% hidrohina je izlučen urinom. Nakon 36 sati je izlučeno 0,99 mg, što odgovara 0,5% primenjene doze. Nakon pojedinačne doze ekstrakta koji je sadržao 100 mg arbutina, oko 80 mg arbutinskih ekvivalenata je izlučeno u toku 24 h (tokom prvih 6 h 44%, a u okviru prvih 9 h 67%) (19).

Toksičnost hidrohina

U prirodi se slobodan hidrohinao javlja u nekim biljnim vrstama, a predstavlja veoma biodegradabilno i fotodegradabilno jedinjenje. Izlaganje hidrohinao se uglavnom javlja u industriji: koristi se kao intermedijer u industriji gume i pri stabilizaciji monomera, u litografiji, za izradu fotografskih crno-belih, filmova u boji i bolničkih filmova za rentgensko zračenje, kao stabilizator boja, izbeljivača, motornih ulja i kao antioksidant u industriji ulja i masti. Primenjuje se i za sprečavanje nastanka rđe u postrojenjima za hlađenje vode (23,24).

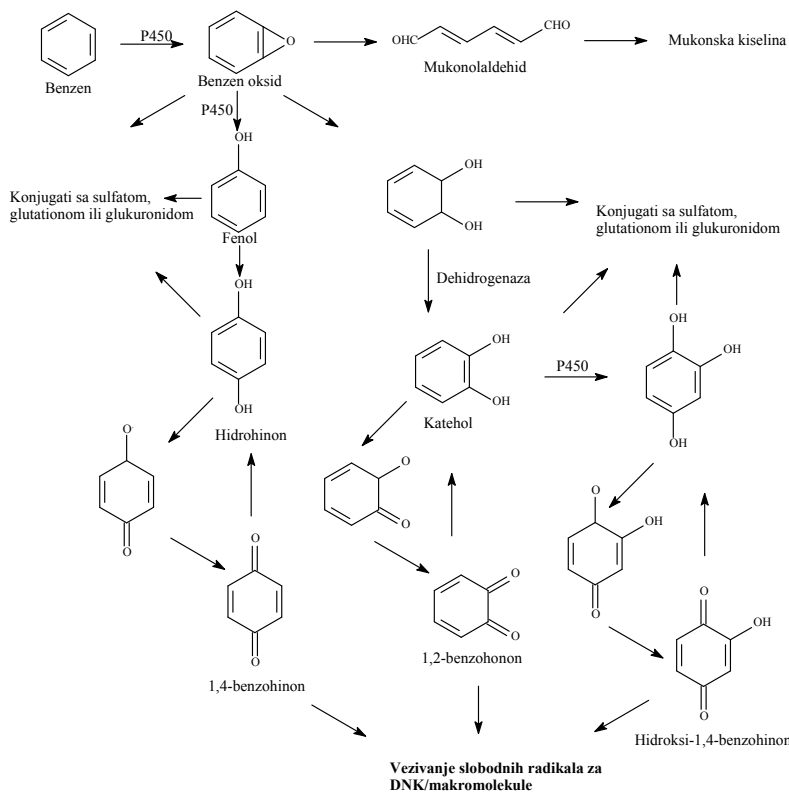
Hidrohinao se metaboliše uglavnom konjugacijom ali se mali procenat konvertuje u 1,4-benzohinao koji se *in vitro* može konjugovati sa glutationom ili delovima DNK. To deluje toksično na veći broj organa, posebno na bubrege i gornje delove gastrointestinalnog trakta (GIT). Hidrohinao pokazuje mutagenost u mnogim *in vitro* sistemima, a nakon intraperitonealne primene izaziva i genotoksičnost ili hromozomske aberacije u koštanoj srži.

Grupa radnika, koja je konstantno u toku dužeg vremenskog intervala bila izložena hidrohinao, je imala nisku incidencu karcinoma u poređenju sa dve kontrolne grupe, što još uvek nije razjašnjeno. U grupi litografičara u samo 2 od 5 slučajeva malignog melanoma oboleli radnici su bili izloženi hidrohinao. Pošto nema adekvatnih dokaza za kancerogenost hidrohinao u humanoj populaciji, a broj izvedenih studija na eksperimentalnim životinjama je ograničen, hidrohinao je svrstan u Grupu 3, odnosno u supstance koje se ne mogu klasifikovati kao kancerogene po ljude (24).

Fenol i hidrohinao se mogu povezati sa pojavom leukemije koja je posledica izlaganja benzenu, pošto oni predstavljaju hematotoksične proizvode benzena, oštećuju DNK i hromozome, inhibiraju topoizomerazu II i selekciju klonova. Međutim, visoki nivoi fenola i hidrohinao u krvi se javljaju i usled direktnog unošenja hranom, katabolizma tirozina i drugih supstrata crevnim bakterijama, uzimanja namirnica bogatih arbutinom, konzumiranja cigareta i nekih lekova koji se nalaze u slobodnoj prodaji. Postavljena je hipoteza da su ovi izvori fenola i hidrohinao veoma važni u nastanku nekih formi *de novo* leukemije u širokoj populaciji, što potvrđuju i epidemiološke studije koje povezuju leukemiju sa ishranom bogatom mesom i proteinima, korišćenjem antibiotika (koji poremete normalnu crevnu floru), odsustvom ishrane majčinim mlekom i smanjenom aktivnošću NAD(P)H hinon oksidoreduktaze (vrši detoksikaciju hinona i štiti od benzenske hematotoksičnosti). Ova hipoteza bi mogla da objasni zašto mnoge osobe koje nisu bile izložene benzenu, a nisu ni pušači, ipak oboljevaju od leukemije. Naglašava se značaj ishrane, unošenja lekova, genetske komponente i sastava crevne flore, a kako je na poslednja dva faktora veoma teško uticati ostaje mogućnost promene načina ishrane i kontrolisano korišćenje lekova koji povišavaju nivo fenola, kao najbolja strategija za smanjenje rizika za nastanak leukemije.

Jednom unet u organizam, fenol se, najvećim delom u jetri, transformiše u hidrohinao. Fenol, hidrohinao i srodni molekuli se krvlju transportuju do udaljenih tkiva, uključujući i koštanoj srži. Intenzivna istraživanja mehanizama leukemogeneze ukazuju na

to da je sam hidrohinion ili hidrohinion u kombinaciji sa fenolima i njihovim metabolitima, uključen u nastanak kancera i njegovu progresiju (25).



Slika 1.3. Metabolizam benzena i primarni putevi karcinogeneze. Enzimi: P450 - citohrom P450, MPO – mijeloperoksidaza, NQO1 – NAD(P)H hinon oksidoreduktaza (25)

4. *Uvae ursi folium* – najznačajniji biljni izvor arbutina

List uve (*Uvae ursi folium*, *Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) se zahvaljujući sadržaju arbutina tradicionalno koristi u tretmanu urinarnih infekcija, kao što je npr. akutni cistitis, kada je bakteriurija ispod 10^5 /ml bez faktora rizika i kod asimptomatske bakteriurije kada nije neophodno uključiti antibiotike (19). Najčešće se primenjuju sprášeni ili usitnjeni listovi u obliku infuza, hladnog macerata ili tečnog ekstrakta koji obezbeđuju 400-840 mg arbutina dnevno. Kao suvi ekstrakt najčešće se dozira na 100-210 mg arbutina. Na tržištu postoje i kapsule, čaj i tinktura. Utvrđeno je da osoba koja 4 puta dnevno popije čaj od uve (3 g listova što odgovara 6% hidrohinionskih glukozida) unese 720 mg arbutina (1).

Danas je *Arctostaphylos uva-ursi* oficijalna u farmakopejama Austrije, Češke Republike, Egipta, Francuske, Nemačke, Bugarske, Japana, Rusije i Švajcarske, odnosno nalazimo je u Ph.Eur. 6, DAB 10, BHP. 1990, Ph.Jug. V (18,26,27,28).

Kako su najvažniji biljni izvor arbutina predstavnici familije Ericaceae, u tradicionalnoj medicini se pored *Arctostaphylos uva-ursi* i neke druge vrste ove familije koriste u tretmanu urinarnih infekcija. Što se tiče vrsta koje su rasprostranjene u flori Balkana, uroantiseptično i diuretično dejstvo se pripisuje plodu, listu i korenu vrste *Arbutus unedo* (29-33) i herbama vrsta *Calluna vulgaris* (18,26,34-36), *Erica arborea* (37,38) i *Erica carnea* (39).

Srodne biljne vrste obično proizvode slične hemijske supstance, a što je bliža taksonomska povezanost veća je verovatnoća da se slične supstance nađu u okviru ovih taksona. Kada je neka od nađenih supstanci od medicinskog ili farmaceutskog značaja, teži se pronalaženju sličnih ili povezanih supstanci u srodnim biljkama (npr. drugi varijeteti u okviru iste vrste, druge vrste u okviru istog roda, čak i drugi rodovi u okviru iste familije) (40). Stoga je racionalno ispitati vrste familije Ericaceae u cilju pronalaženja eventualne zamene za veoma traženu vrstu *Arctostaphylos uva-ursi*, koja je zaštićena na teritoriji Srbije prema „Pravilniku o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva“, koji je objavljen u „Službenom glasniku RS“ br. 5/2010.

FAMILIJA ERICACEAE DC.

Familija *Ericaceae* obuhvata zimzelene i listopadne žbunove ili ređe, nisko drveće, rasprostranjene na obe hemisfere, od arktičkih i antarktičkih do tropskih krajeva, izuzev vlažnotropskih oblasti i kontinentalnih pustinja i stepa.



Slika 1.4. Areal karta familije Ericaceae

Listovi predstavnika ove familije su celi i vrlo često zimzeleni, ponekad veoma redukovani, naizmenični, ređe naspramni ili pršljenasti, bez zalistaka, lancetasti ili ljuspasti. Cvetovi su dvopolni, aktinomorfni, retko zigomorfni, pojedinačni ili u vršnim ili bočnim štitovima, gronjama, grozdovima ili metlicama. Čašica iz 4-5 dela, ili sa 4-5 zubaca, ostaje na plodu, dok je krunica sa (3) 6, često gotovo odeljenih, listića koji opadaju ili ređe ostaju na plodu. Prašnika ima koliko i listića krunice ili dva puta više, prašni konci su slobodni ili srasli u donjem delu, dok su prašne kesice sa otvorima a ređe se otvaraju pukotinom. Plodnik je sa 4-5 okaca, semeni zameci su učvršćeni centralno, po jedan ili više u svakom okcu. Stubić je valjkast ili koničan sa celim sitnorežnjevitim žigom. Pod plodnikom je disk koji luči nektar i na čijem spoljnjem kraju su učvršćeni prašni konci i krunica. Plod je višesemena čaura, ređe bobičasta višesemena koštunica sa vrlo sitnim semenom koje je sa endospermom, 1-2 mm dugo, različitog oblika, ponekad krilato.

Svi evropski predstavnici su mikorizni i javljaju se na siromašnom zemljištu koje je obično kisele reakcije (35,41,42).

Familija Ericaceae broji više od 70 rodova sa više od 1500 vrsta. Flora Europea vodi 18 a Flora Srbije 5 rodova ove familije (*Rhododendron*, *Arctostaphylos*, *Calluna*, *Erica*, *Bruckenthalia*) (41,42). Uporedni pregledi vrsta rodova *Arbutus*, *Bruckenthalia*, *Calluna* i *Erica* opisanih u Flori Evrope i Flori Srbije dati su u Tabelama 1.1., 1.2, 1.3. i 1.4.

Tabela 1.1. Vrste roda *Arbutus*

Rod <i>Arbutus</i> L.	
Flora Europea	Flora SR Srbije
<i>A. unedo</i> L.	/
<i>A. andrachne</i> L.	
<i>A. x andrachnoides</i> Link	

Tabela 1.2. Vrste roda *Bruckenthalia*

Rod <i>Bruckenthalia</i> Reichenb.	
Flora Europea	Flora SR Srbije
<i>B. spiculifolia</i> (Salisb.) Rchb.	<i>B. spiculifolia</i> Rchb.

Tabela 1.3. Vrste roda *Calluna*

Rod <i>Calluna</i> Salisb.	
Flora Europea	Flora SR Srbije
<i>C. vulgaris</i> (L.) Hull	<i>C. vulgaris</i> (L.) Hull

Tabela 1.4. Vrste roda *Erica*

Rod <i>Erica</i> L.	
Flora Europea	Flora SR Srbije
<i>E. herbacea</i> L.	<i>E. carnea</i> L.
<i>E. ciliaris</i> L.	
<i>E. mackaiana</i> Bab. In Mackay	
<i>E. tetralix</i> L.	
<i>E. terminalis</i> Salisb.	
<i>E. cinerea</i> L.	
<i>E. australis</i> L.	
<i>E. umbellata</i> L.	
<i>E. arborea</i> L.	
<i>E. lustinica</i> Rudolphi in Schrader	
<i>E. vagans</i> L.	
<i>E. manipuliflora</i> Salisb.	
<i>E. multiflora</i> L.	
<i>E. sicala</i> Guss.	
<i>E. erigena</i> R.Ros.	
<i>E. scoparia</i> L.	

1. Rod *Arbutus* L.

Zimzeleni grmovi ili drveće sa spiralno raspoređenim listovima na lisnim drškama. Cvetovi su sa petočlanim perjantom, u terminalnim metličastim cvastima sa braktejama. Čašični listići su srasli u bazi. Krunica peharasta, sa kratkim izvnutim režnjevima, opadajuća. Prašnika je 10 sa dlakavim filamentima. Plod je loptasta bobica (42).

U flori Evrope se javljaju dve vrste: *Arbutus unedo* i *Arbutus andrachne* L., ali i njihov hibrid *Arbutus x andrachnoides* Link, koji je fertilan i čest na mestima gde ove dve *Arbutus* vrste rastu zajedno (42).

Arbutus unedo L.

(syn. *Arbutus salicifolis* Hoffmanns., *Arbutus serratifolia* Salisb)

Arbutus unedo je zimzelen grm visok do 3 m, ređe nisko drvo do 12 m, sa uspravnim granama i širokom krošnjom. Kora izdanaka je crvenosmeđa, a kod starijih grana je sivosmeđa ili crvenkasta i ljušti se u uskim uzdužnim ljuskama. Mladi izdanci su, makar delimično, žlezdasto dlakavi. Listovi su spiralno raspoređeni, kožasti, sjajni, ovalno-lancetasti, dugi 4-11 cm i obično 2-3 puta duži nego što su široki. Nalaze se na do 10 mm dugoj, crvenkastoj peteljci. Cvetovi su u terminalnim, visećim grozdastim cvastima zvonastog oblika, pojavljuju se u jesen. Čašica je sa zaobljenim režnjevima, petočlana, bela i obično oivičena bledozelenim ili bledoružičastim. Plod je jestiva bobica, unutra sočna, mesnato-brašnjava a spolja bradavičasta – pokrivena koničnim papilama, žute do tamnocrvene boje. Sazreva tek nakon godinu dana pa se zreli plodovi mogu videti zajedno sa novim cvetovima. Cveta u jesen a seme je smeđe, sitno i izduženo.

Raste na toplim krečnjačkim terenima, deo je makije i crnikinih šuma (42,43).

Opšte rasprostranjenje. Mediteran i severozapadna Evropa sve do severozapadne Irske. Zabeležena je u: Portugaliji, Španiji, Balearskim ostrvima, Francuskoj, Korzici, Sardiniji, Siciliji, Italiji, Albaniji, Grčkoj, Kritu i Karpatosu, Istočnim Egejskim ostrvima, Turskoj, Azijskom delu Turske, Kipru, Libanu i Siriji, Tunisu, Alžiru i Maroku (43).

Na prostorima bivše Jugoslavije se sreće od Istre do južnog primorja, kako na obali tako i na ostrvima Mljetu, Braču, Korčuli, Šipanu, Lokrumu, poluostrvu Pelješcu. Osetljiva je na hladnoću i zato ne zalazi u priobalno područje Jadrana (30,35,43).

Narodna imena (u engleskom govornom području se čitav rod *Arbutus* naziva Madrones):
planika, bela planika, planičac, mečije grožđe, maginja, jagodnjak, jagodičica, jagodica-rast (srpski),

Strawberry-tree, *Arbutus* (engleski)

arbousier (francuski)

Erdbeerbaum (nemački)

albatro, corbezzolo (španski)

земляничное дерево (bugarski)

Планика (makedonski) (30,31,44).

2. Rod *Bruckenthalia* Rchb.

Rod je veoma sličan rodu *Erica* ali je čašica zvonasta. Cvetna drška je bez brakteola i disk je odsutan (42).

U rodu je samo jedna vrsta, koja raste i u Srbiji.

Bruckenthalia spiculifolia (Salisb.) Rchb.

(syn. *Erica spiculifolia* Salisb., *Bruckenthalia spiculiflora* Drude)

Bruckenthalia spiculifolia je zimzeleni žbunić visok do 25 cm, polegao, sa ustajućim tankim granama, pokriven tankim grančicama. Grančice su pokrivene vrlo kratkim dlačicama, listovi su po 4-5 u pršljenu ili nepravilno spiralno raspoređeni. Listovi su linearni, blago zašiljeni, sa nešto povijenim obodom, fino dlakavi, dugi 3-4 (-6) mm, široki oko 0,4 mm. Cvetovi su u gustim, terminalnim grozdovima dugim do 3 cm. Cvetovi su na peteljka, imaju zvonastu čašicu koja je do sredine deljena u 4 režnja, ružičasta, trajna i kraća od krunice. Krunica je zvonasta, četvorodelna, ružičasta, ostaje na plodu. Prašnika ima 8, pričvršćeni su pri osnovi kruničnih listića. Tučak je duži od perijanta a valjkasti stubić gornjim delom štrči iz cveta. Plod je okruglasta čaura duga oko 2 mm, sa vrlo sitnim, izduženim semenom. Cveta od juna do avgusta. Plod zri od avgusta do septembra (41,42,45).

Naseljava subalpski i alpski pojas silikatnih masiva, dajući pečat planinskim vrištinama jugoistočnog dela Balkanskog poluostrva i Male Azije, pa se po njoj ova vegetacija i naziva *Bruckenthalion spiculifoliae* Horv. Podlogu na staništima ove vrste čine vulkanske stene, najčešće kiselog karaktera (pH-vrednost između 4 i 6). Staništa su izložena fiziološkoj suši od oktobra do maja ili juna. Raste u bukovom pojasu od 1000 m (Ostozub), pa sve do 2400 m nadmorske visine, na planinskim vrištinama, zajedno sa *Vaccinium uliginosum*, *Daphne mezereum* i drugim vrstama (41,45).

Opšte rasprostranjenje. Jugozapadna Azija i Jugoistočna Evropa a severnim pravcem do severne Grčke (41,46). Javlja se na prostorima bivše Jugoslavije, u Albaniji, Bugarskoj, Rumuniji, Grčkoj i u azijskom delu Turske (43).

Rasprostranjenje u Srbiji. Rasprostranjena je na silikatnim visokoplaninskim masivima: Stara planina, Zlatibor, Kopaonik, Ošljak, Šar-planina, Rugovsko-metohijske planine (Žljeb, Mokra planina) (41,46).

Narodna imena. Brukentalija (srpski)
Връшняк (bugarski) (45,46).

3. Rod *Calluna* Salisb.

U ovom rodu se nalazi samo jedna vrsta, koja raste i u Srbiji.

***Calluna vulgaris* (L.) Hull**

(syn. *Erica vulgaris* L., *Calluna erica* DC.)

Calluna vulgaris je polegli ili ustajući zimzelen žbun, gusto granat, visok 20-60 (-100) cm. Grane su tanke, uspravne, polegle ili povijene, šibolike, guste, lako lomljive. Kora je sivosmeđa i tanka. Na izdancima, koji izbijaju iz jakog korenovog sistema (koji je toliko gusto razgranat da otežava razvoj drugih biljaka), se razvijaju sitni pupoljci sa brojnim ljuspama. Grančice su gusto pokriveno, ukršteno-naspramno u 4 reda raspoređenim, listovima koji su gušći na spoljašnjim grančicama koje ne nose cvetove. Listovi su sitni, ljuspasti, trobridi, dugi oko 2 mm a široki oko 0,6 mm, manje-više polegli po grančicama, zatupasti, goli a zimi menjaju zelenu boju u smeđu. Cvetovi sa kratkim peteljkama, obično su okrenuti na jednu stranu i skupljeni u guste grozdaste, lisnate, uspravne cvasti duge do 25 cm. Pri osnovi cveta su 4 jajasta, fino dlakava pricvetna listića, čašica duboko četvorodelna, sjajna i opnasta, duža od krunice a iste ružičaste do lila boje. Krunica je četvorodelna, zvonasta, duga do 3 mm i kao i čašica ostaje na plodu. Prašnika je 8, kraći su od krunice. Tučak je duži od čašice. Cveti jula i avgusta. Plod je okruglasta, fino dlakava čaura, sa malo veoma sitnih, smeđih, jajastih semenki. Zri od septembra do oktobra (41).

To je heliofitna vrsta, siromašnih, ispranih kiselih zemljišta. U Srbiji se nalazi na staništima gde su nekada bile acidofilne šume sladuna i cera (30,41).

Opšte rasprostranjenje. Široko je rasprostranjena u Evropi i Aziji, dopire do severozapadne obale Afrike. Javlja se i u Sredozemlju, Maloj Aziji, zapadnom i istočnom Sibiru, Uralu i severozapadnim primorskim oblastima Severne Amerike (Atlantsko priobalje) (30,41,46). Javlja se u Portugaliji, Španiji, Francuskoj, Korzici, na prostorima bivše Jugoslavije, Bugarske, Grčke, Turske (evropski i Azijski deo) i Maroka (43).

Rasprostranjenje u Srbiji. Retka je u zapadnoj Srbiji: Sakar (Podrinje), oko rudnika Zajača (kod Loznice), Gučevo; Crni vrh (između Brodareva i Pljevalja), na granici Srbije i Crne Gore (41). S obzirom da se na teritoriji Srbije nalaze svega dva lokaliteta gde se može pronaći ova vrsta, *Calluna vulgaris* se nalazi na Preliminarnoj crvenoj listi flore Srbije i Crne Gore (47) i strogo je zaštićena na teritoriji Srbije prema „Pravilniku o proglašenju i zaštiti strogo zaštićenih i zaštićenih divljih vrsta biljaka, životinja i gljiva“, koji je objavljen u „Službenom glasniku RS“ br. 5/2010 od 05.02.2010.

Narodna imena. Naziv ovog roda potiče od grčke reči *kallynein* = čistiti, jer se od biljke mogu praviti metle (41). Nazivi za jedinu vrstu ovog roda su:

Vres, vresak, vrijes, vresina, vrijesak, vrišt (srpski),

vressek, jesenska vresa (slovenački),

калуна (bugarski),

Вресина (makedonski),

Heather, Heather herb, Ling, Scotch Heather, White Heather (englesko govorno područje),

Heidekraut, Heidekrautblüten, Besenheide (nemački) (26,30,34,43,44,46) .

4. Rod *Erica* L.

Naziv *Erica* potiče od grčke reči *ereiko* koja znači lomiti, zbog nekih predstavnika koji su krti (41). Ovaj rod obuhvata zimzelene žbunove ili nisko drveće sa sitnim, pršljenasto ili naizmenično raspoređenim, linearnim, ljuspastim ili igličastim listovima povijenog oboda. Lisne drške su kratke, prilegle. Cvetovi su pojedinačni ili u siromašnim ili bogatim terminalnim grozdastim ili štitastim cvastima na krajevima brojnih grančica. Cvetne drške su sa dve ili većim brojem brakteola. Cvetovi su obično bele, ružičaste ili crvene boje, ređe žute. Čašica je duboko, gotovo do osovine deljena na 4 dela i kraća od krunice, zelena ili rozikasta. Krunica je zvonasta, posudasta ili levkasta, sa četvorozubim obodom i ostaje na plodu. Prašnika je 8 (-10) sa tankim koncima učvršćenim na disku ispod tučka dok su prašnice sa tankim na dole usmerenim izraslinama, mada mogu biti i bez njih. Tučak je prav sa četvorookim plodnikom i mnogim semenim zamecima. Plod je čaura koja se otvara na 4 dela sa mnogo izduženih semenki.

Rod ima preko 500 vrsta, najviše ih je u južnoj Africi (kopska oblast) dok je sekundarni centar rasprostranjenja u severnoj i zapadnoj Evropi. U Srbiji u prirodi raste jedna vrsta – *Erica carnea*, dok se u Crnoj Gori javlja i *Erica arborea* (41,42,48).

Erica arborea L.

Zimzelen, uspravni žbun ili nisko drvo 0,5-2 (7) m visoko. Stablo je sa glatkom braon korom, grane sivosmeđe, gusto čekinjasto dlakave. Listovi 3-4 (6) mm dugački, tesno-linearni, igličasti, goli, slabo ušiljeni ka vrhu, jako savijenog oboda. Lisna drška je 0,5-0,7 mm duga, plitko žljebasta, prilegla ka grani. Cvetovi na tankim cvetnim drškama u kratkim grozdovima. Cvetne drške gole, sa po 2-3 lancetaste brakteje. Čašica četvorodelna sa jajastim, skoro do osnove slobodnim delovima. Krunica četvorodelna do jedne trećine, bela, zvonasta. Prašnika je 10, pričvršćenih u osnovi plodnika. Antere izduženo jajaste, purpurne, otvaraju se ispod vrha. Stubić je kraći od cevi krunice (44,46).

Opšte rasprostranjenje. Južna i jugoistočna Evropa, Sredozemlje i jugozapadna Azija (mala Azija) (46). Javlja se u Portugaliji, Španiji, Francuskoj, Italiji, Albaniji, Bugarskoj, Grčkoj, Turskoj (evropski i azijski delovi), Tunisu, Alžiru, Maroku, na Korzici, Islandu, Kritu, Sardiniji, Siciliji, Istočnim Egejskim i Jadranskim ostrvima, poluostrvu Pelješcu i u okolini Dubrovnika i Splita (41,43,44).

Narodna imena. Veliki vres, vrijes (srpski)
Drevesasta resa (slovenački)
Ерика (makedonski)
Tree Heath, briar root (engleski) (43,44).

Erica carnea L.

(syn. *Erica herbacea* L., *Erica saxatilis* Salisb.)

Erica carnea je zimzelen, plegli žbunić sa ustajućim granama, visok do 70 cm, gusto i fino granat. Grančice su gole, lako lomljive, na njima se na kratkim drškama, obično po 4 u pršljenu nalaze igličasti, zašiljeni, sa lica spljošteni i tamnozeleni, sjajni,

dosta kruti, a sa naličja svetliji, listovi jako otklonjeni od stabla. Cvetovi su u terminalnim, lisnatim grozdovima, većinom jednostrano orjentisani, cvetovi vise na tankim drškama. Čašica je do osnove podeljena u 4 režnja, dva puta kraća od krunice. Krunica je jajasta, sa 4 kratka režnjića po obodu i kao i čašica crvena. Prašnika je 8, prirasli su za cvetište, duži su od krunice dok su prašnice bez izraslina i otvaraju se sa 2 eliptične pore. Tučak je duži i od krunice i od prašnika, ima jedan vrat sa jednim žigom. Čaura je elipsoidna, zatvorena u krunici, puca od vrha na 4 dela; seme je izduženo, brazdasto, smeđe boje. Cveta vrlo rano, često dok još ima snega (zimocvet) februara-aprila, često i ranije (30,41).

Raste najčešće u različitim bazifilnim borovim šumama, crnog i belog bora, ređe krivulja, zatim u crnograbovoj šumi; izrazita kalcifilna vrsta, ali se sem na krečnjaku i dolomitu često javlja i na serpentinu, a takođe i u šumama omorike, crnog bora i kitnjaka. Raste na prostorima do 2000 m nadmorske visine. Izuzetno se sreće i na kiselom zemljištu zajedno sa vrstom *Calluna vulgaris* (30,41).

Opšte rasprostranjenje. Južne padine krečnjačkih Alpa i Apeninsko i Balkansko poluostrvo: severna i centralna Evropa, severnim pravcem do istočne i centralne Nemačke i istočnim do istočne Austrije a lokalno se prostire severom do centralne Italije i Makedonije (41,42). Javlja se u Portugaliji, Španiji, Francuskoj, Malti, Italiji, Albaniji, Grčkoj, Maroku i na prostorima bivše Jugoslavije (43).

Rasprostranjenje u Srbiji. Rasprostranjena uglavnom u zapadnoj Srbiji (Tara, Zlatibor, Stolovi, Goč, Kopaonik i drugi masivi), najčešće u borovim šumama, obično na serpentinu (39,41).

Narodna imena. Crnjuša, zimocvet, crnjuša rumena (srpski)
Spomladanska resa (slovenački)
Bruyère incarnate (francuski)
Frühlings-, Schneeheide, Alpenhederich (nemački)
Springer heath (engleski)
Scopa carnicina (španski)
Верес, вереск (bugarski)
Црњуша (makedonski) (30,39,44).

TRADICIONALNA UPOTREBA I DOSADAŠNJA ISPITIVANJA ODABRANIH VRSTA FAMILIJE ERICACEAE

Od ispitivanih vrsta porodice Ericaceae, neke se spominju u narodnoj medicini kao lekovite, a samo 2 (*Arbutus unedo* i *Calluna vulgaris*) su detaljnije ispitane sa aspekta hemijskog sastava i farmakološkog dejstva.

1. Tradicionalna upotreba

Iako zimzeleni žbunovi, vrste porodice Ericaceae zahvaljujući visokoj koncentraciji tanina (u biljkama predstavljaju zaštitu od herbivora), nemaju veliki značaj u zimskoj ishrani divljih životinja. Količine ukupnih kondenzovanih tanina variraju u zavisnosti od godišnjeg doba, ali je njihov sadržaj u vrstama *Calluna vulgaris* i *Erica arborea* viši od vrednosti za koje se smatra da nisu štetne za herbivore (više od 176 g ekvivalenta kondenzovanih tanina po kg suve materije) (49).

Odabrane vrste porodice Ericaceae su značajne medonosne biljke: cvetovi *Erica* vrsta predstavljaju prvu, a cvetovi vrsta *Arbutus unedo* i *Calluna vulgaris* najkasniju pčelinju pašu (44,50). Med čiji su biljni izvor cvetovi predstavnika porodice Ericaceae ima visok nivo aromatičnih karboksilnih kiselina (cimetna kiselina je pronađena u opsegu 85 – 3300 ng/g u medu poreklom iz nemačkih i škotskih predstavnika), pa može služiti za popravljavanje različitih vrsta meda bez mirisa. Med poreklom sa cvetova vrste *E. arborea* kao glavnu komponentu arome ima 4-metoksibenzaldehid (p-anisaldehyd), *Arbutus unedo* – homogenističnu kiselinu (2,5-dihidroksifenil sirćetna kiselina), a *Calluna vulgaris* – fenilsirćetnu kiselinu (44,50-52).

Bruckenthalia spiculifolia, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* i *Erica carnea* čuvaju i vezuju zemljište (na vrlo strmim, plitkim, skeletnim zemljištima, gde je šumska vegetacija devastirana, a zemljište izloženo degradaciji), a svih 5 odabranih vrsta se gaje kao dekorativne (41).

Arbutus unedo

Plodovi vrste *Arbutus unedo*, crvene ili narandžaste bobice – maginje se upotrebljavaju za jelo, izradu pekmeza, voćnog soka, vitaminskih koncentrata i rakije a smatra se da mogu delovati i štetno izazivajući zamagljenje vida (30,31,53). U narodnoj medicini Turske koriste se zbog svoje adstringentne, diuretske i antiseptičke aktivnosti (29).

U narodnoj medicini se list i koren upotrebljavaju kao direktik, urinarni antiseptik, adstringento, antiinflamatorno sredstvo, antidijabetik, hipotenziv, antidijaroiik i za lečenje kožnih bolesti (dekokt listova je cenjen vulnerar na Sardiniji) (30-33). U severoistočnom Maroku je *Arbutus unedo* (i to dekocija korena 5 – 10 mg/kg dnevno) jedna od tri najčešće

korišćena lekovite biljke (odmah iza vrsta *Allium sativum* i *Olea europea*) u tradicionalnoj terapiji arterijske hipertenzije (54).

Zbog visokog sadržaja tanina, hidrohina, fenolnog heterozida arbutina i drugih polifenolnih jedinjenja, list se koristi umesto lista *Arctostaphylos uva ursi* za dezinfekciju mokraćnih kanala (30,31).

Calluna vulgaris

Tokom Srednjeg veka je korišćena kao komponenta smeše koja se nazivala "gruit" a koja je korišćena pre hmelja u proizvodnji piva (55).

Kao droga, poznata pod nazivom *Herba Ericae cum floribus*, se koriste grančice sa listovima i cvetovima, a upotrebljavaju se uglavnom samo u narodnoj medicini. *C. vulgaris* se koristi kao pomoćno sredstvo za olakšavanje zarastanja rana a pripisuju joj se i diuretički, antimikrobni, holagogni i antireumatični efekti, mada ova dejstva tek treba dokumentovati. U narodnoj medicini se primenjuje kao diuretik, dijaforetik, ekspektorans, vazokonstriktor, kod gastrointestinalnih poremećaja, dijareje, kolika, spazma, oboljenja jetre i žučne kesice, gihta, reumatizma, poremećaja i bolesti respiratornog sistema, kod prehlade i kašlja, nesаницe, umora, uznemirenosti, za kupke kod upale oka i za lečenje rana i groznice. U kombinaciji sa drugim biljnim vrstama se koristi u terapiji dijabetesa, premenstrualnog sindroma i simptoma menopauze, kod nervne iscrpljenosti, za stimulaciju digestije i regulaciju cirkulacije (26, 34-36).

Nisu poznata nikakva neželjena dejstva ako se droga primenjuje u skladu sa preporukama i u terapijskim dozama. Obično se koristi cela, sečena ili sprášena droga za spoljašnju ili unutrašnju primenu i to kao:

dekoka – najčešće se 1,5 g droge i 250 ml vode kuvaju 3 minuta (3 šolje dnevno između obroka),

kupka – 500 g droge se kuva u nekoliko litara vode a zatim procedi, tečni ekstrakt (1:1) (1 – 2 kafene kašičice dnevno) (34).

Komisija E je negativno ocenila ovu drogu, odnosno nije potvrđeno da droga poseduje delovanja koja joj se pripisuju (26).

Od svežih grančica vrste *Calluna vulgaris* se priprema homeopatski lek koji se propisuje kod reumatizma, artritisa i nesаницe (36).

Rod *Erica*

Ovaj biljni rod se spominje u prastarom receptu iz Dioskoridovih spisa koji opisuje lečenje ujeda zmije kataplazmom pripremljenom od listova *Erica* vrsta (37,38).

U narodnoj medicini Turske se nadzemni deo biljne vrste *Erica arborea* koristi kao diuretik, adstringent, protiv konstipacije i za lečenje urinarnih infekcija. Posle obroka se preporučuje ispijanje šolje sa 5% infuzom ili dekoktom listova u cilju uklanjanja otoka tokom kura mršavljenja (37,56).

U narodnoj medicini se *Erica carnea* koristi kao sedativ, adstringens i diuretik i to najčešće protiv upale mokraćnih kanala i bubrega, kod uvećane prostate, protiv reume i gihta. Drogu predstavlja *Ericae flos*, ređe *Ericae herba* prema HAB 1 (Deutsches Homöopathisches Arzneibuch iz 1991). Koristi se u homeopatiji (39).

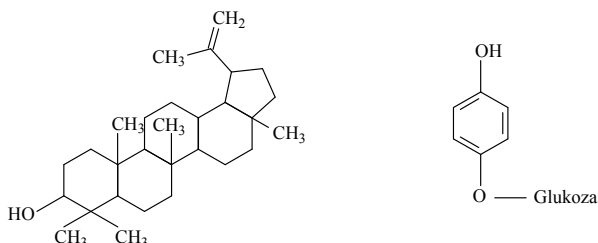
2. Dosadašnja hemijska ispitivanja

Predstavnici familije Ericaceae sintetišu fenolne kiseline, fenolne glikozide (arbutin), aukubin glikozide, diterpenoide (grajanotoksin), triterpenoide (ursolna kiselina), ciklitol i leukoantocijane. Nekoliko vrsta sadrži i cijanogena jedinjenja a saponini su odsutni (57). Orcinol (5-metilrezorcinol) je prvi put u višim biljkama identifikovan u 10 vrsta familije Ericaceae (kao β -glukozid u listovima *Erica arborea* var. *alpina*); može se smatrati retkim ali rasprostranjenim u ovoj familiji (51).

Arbutus unedo

Plodovi sadrže do 10% šećera, vitamin C, organske kiseline (glikolnu, mlečnu, jabučnu, fumarnu), antocijane, karotenoide; dosta Ca, Mg, Na i P (2,82% pepela u suvom plodu) i malo etarskog ulja (0,02%) (31,51,53). Od flavonoida, čiji je sadržaj (0,10 – 0,29%) znatno niži nego u listovima (0,52 – 2,00 %), TLC metodom je identifikovan izokvercitrin (58).

U korenu su detektovane sledeće grupe jedinjenja: tanini, flavonoidi, hinoni, antocijani i redukovani antrahinoni (59).



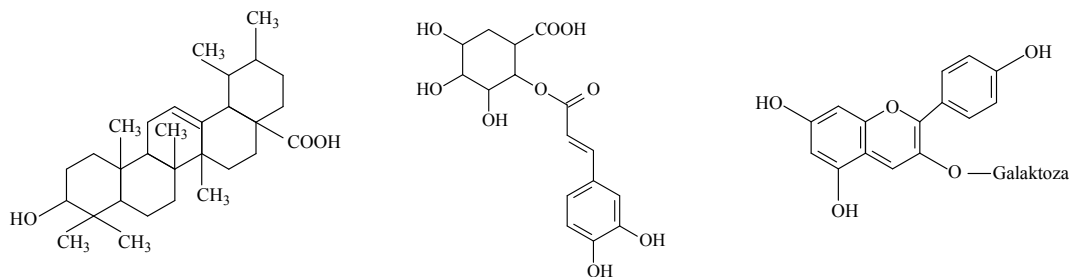
Slika 1.5. Lupeol i arbutin – jedinjenja odgovorna za veliki deo efekata koje ispoljava *Arbutus unedo*

Iz listova su izolovani: glikozidi flavonola – kvercetina i kemferola (kvercitrin, izokvercitrin, hiperozid, rutin, avikularin, afzelin i juglanin) (58,60,61), fenolni glikozidi (arbutin i piceozid) (53), triterpeni (lupeol i ursolna i betulinska kiselina) (53), iridoidni glikozidi (monotropein, monotropein metilestar, unedid, unedozid, stilberikozid i genipozid) (53,60), tanini (epikatehin, katehin, katehin galat i galna kiselina) (63,64), lipidi i vitamin E (do 0,01328%) (63,65).

Calluna vulgaris

Fitohemijском analizom herbe je utvrđeno prisustvo: flavonolnih aglikona (kemferol, kvercetin i miricetin) i glikozida (glikozidi kemferola, kvercetina, galangina i herbacetina), acildiglikozida, dihidroflavonola (taksifolin-3-glukozid, kalunin, 3-dezoksikalunin i 2''-acetilkalunin), flavona (apigenin 7-(2-acetil 6-metil)glukuronid),

hromona i antocijana (cijanidin 3-glukozid) (34,36,66,67). Od fenolkarbonskih kiselina su prisutni derivati kafene kiseline (uključujući hlorogensku) (34). Detektovani su i: katehinski tanini ((+)-katehin i (-)-epikatehin, 3-7% mase listova) (34,49), oligomerni proantocijanidini (leukocijanidin) (34,68), derivati rezorcina (orcinol i orcin) (34,51), šećerne komponente (2-O-metilksiloza i 3-O-metilksiloza) (55), triterpeni (ursolna kiselina – 2,5%), steroidi (beta-sitosterol) (34) i hidrohinijski glikozidi (0,6 – 0,68%, uključujući i arbutin) (34,69).



Slika 1.6. Ursolna kiselina, hlorogenska kiselina i kemferol-3O-β-D-galaktozid – jedinjenja odgovorna za veliki deo efekata koje ispoljava *Calluna vulgaris*

Rod *Erica*

Najvažniji pigmenti cvetova vrsta roda *Erica* su 3-glukozidi, 3-galaktozidi i 3-arabinozidi cijanidina, delfinidina, malvidina i pelargonidina, dok su 3-biozidi prisutni u malim količinama kod nekih predstavnika (68). U vrstama roda *Erica* su prisutni: flavonoidi, antocijani, kumarini, triterpenoidi (ursolna kiselina) i malo etarskog ulja (37).

U nadzemnom delu vrste *Erica arborea* prisutna je značajna količina ukupnih fenola, flavonoida i tanina (49,56). Izolovana su sledeća jedinjenja: katehinski tanini ((-)-epikatehin), fenilpropanoidni glikozid ericarbin i flavonoidni glikozidi (derivati kvercetina, apigenina, tricetina i dihidromircetina) (49,70,71)

Erica carnea sadrži flavonoide, saponine i ursolnu kiselinu (39).

3. Dosadašnja farmakološka ispitivanja

Arbutus unedo

Različiti ekstrakti listova pokazuju vazorelaksantno, diuretičko, natriuretičko, antihemoragično i antiagregaciono dejstvo, a da pri tom ne ispoljavaju akutne toksične efekte (61).

Antioksidativna aktivnost. Za izuzetnu antioksidantnu aktivnost su najverovatnije odgovorni flavonolni glikozidi i tanini. Sadržaj fenolnih jedinjenja i antioksidativna aktivnost plodova su niži u odnosu na listove (62,72,73).

Antihipertenzivna aktivnost. Vodeni ekstrakt korena i vodeni ekstrakt lista ispoljavaju snažnu endotel-zavisnu vazorelaksantnu aktivnost koja se može pripisati polifenolnim jedinjenjima kao što su oligomerni kondenzovani tanini i katehin galat. Oba ekstrakta odlažu razvoj hipertenzije, dok ventrikularnu hipertrofiju redukuje samo ekstrakt korena (koren je bogatiji taninima, dok su listovi bogatiji flavonoidima). Hronična primena zaustavlja razvoj hipertenzije, poboljšava kardiovaskularne i renalne funkcije u NO deficijentnoj hipertenziji (54,61,64,74).

Antiagregaciona aktivnost. Sirovi vodeni ekstrakta korena snažno inhibira agregaciju trombocita pacova (verovatno usled antioksidativne aktivnosti koja inhibira fosforilaciju tirozina i inluks Ca^{2+} u trombocite) zahvaljujući prisutnim taninima i flavonoidima; a osetljivost humanih trombocita je još veća (75-77).

Antiinflamatorna aktivnost. Vodeni ekstrakt značajno ublažava akutnu inflamaciju pluća miša, pri čemu glavne identifikovane komponente (arbutin, katehin i kvercetin) ne inhibiraju aktivaciju prenosioca signala i aktivatora transkripcije STAT1 i STAT3. Mehanizam antiinflamatornog dejstva je povezan sa: redukcijom proizvodnje IL-6, uticajem na popunjavanje neutrofila i ekspresijom enzima iNOS i COX-2, što sve dovodi do smanjenja povrede tkiva (78).

Antihiperглиkemička aktivnost. Vodeni ekstrakt značajno snižava glikemiju kod pacova usled inhibicije resorpcije glukoze u jejunumu (79).

Antimikrobna aktivnost. Vodeni ekstrakt i fenolna frakcija korena pokazuju umerenu antimikrobnu aktivnost prema sojevima *E. coli* i *S. aureus* (59).

In vitro je etanolni ekstrakt listova efikasan protiv parazita *Leishmania tropica* (80), a etilacetatni pokazuje izuzetnu aktivnost protiv *Trichomonas vaginalis* (100% inhibicija rasta pri koncentraciji ekstrakta 500 $\mu\text{g/ml}$) (81). Ni etanolni ni etilacetatni ekstrakt nisu ispoljili citotoksičnost u bioispitivanju letalnosti na morskim račićima (za razliku od n-heksanskog i vodenog ekstrakta) (80).

Potencijalna hemopreventivna aktivnost. Lupeol, [lup-20(29)-en-3b-ol], prisutan u plodu, *in vitro* i *in vivo* ispoljava brojne farmakološke efekte (antiinflamatorni, antiartritični, antimutageni) pa se smatra antineoplastičnom supstancom koja obećava (82).

Calluna vulgaris

Antioksidativna aktivnost. U više različitih test sistema je potvrđena snažna antioksidativna aktivnost različitih ekstrakata herbe (55,83).

Antiinflamatorna aktivnost. Antiinflamatorna aktivnost herbe je potvrđena u dve *in vitro* i jednoj *in vivo* studiji. *In vitro* je utvrđena sposobnost snažne inhibicije ciklooksigenaze (84) i lipooksigenaze (zahvaljujući ursolnoj kiselini koja već u koncentraciji od 1 μM blokira metabolizam arahidonske kiseline, a inhibira i humanu leukocitnu elastazu) (85). Izražena *in vivo* antiinflamatorna aktivnost (u modelu karageninom izazvanog edema šapice miša) se može pripisati kemferol-3-O- β -D-galaktozidu (za koji nije registrovana akutna toksičnost niti pojava oštećenja u GIT u preliminarnom ispitivanju bezbednosti na miševima) (36).

Antinociceptivna aktivnost. Etilacetatna frakcija etanolnog ekstrakta herbe *in vivo* ispoljava antinociceptivnu aktivnost na eksperimentalnim životinjama (36).

Antibakterijska aktivnost. Metanolni ekstrakt semena inhibira rast sojeva *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus hominis* (sa MIC 0,1 µg/ml) (86).

MAO-A inhibicija. Različiti ekstrakti herbe inhibiraju aktivnost MAO-A, a kvercetin (izolovan iz najaktivnije frakcije metanolnog ekstrakta) prolazi krvno-moždanu barijeru i snažno inhibira MAO-A (87).

Fotohemopreventivna aktivnost. Iako su lezije na koži eksperimentalnih životinja pretretiranoj etanolnim ekstraktom herbe bile znatno blaže u odnosu na kontrolu, *C. vulgaris* ne pruža značajnu zaštitu od UVB-zračenjem izazvanog oštećenja DNK (83,88).

Poslednjih decenija XX veka *Calluna vulgaris* se pojavljuje i kao kozmetička sirovina koja se preporučuje za negu problematične i normalne kože (89). Heather Extract AQ (CTFA/INCI naziv: Heather extract; CAS broj: 84603-54-3; EINECS/ELINCS br. 283-255-2; pH: 4,15 – 5,20) sadrži vodu, butilenglikol i ekstrakt čitave biljke *Calluna vulgaris*, a navodi se da pokazuje antiinflamatorno, antimikrobno i *antiage* (inhibira elastazu a time i enzimsku razgradnju elastina) dejstvo. Ekstrakt cvetova vrste *Calluna vulgaris* i Cvetna voda *Calluna vulgaris* (vodeni rastvor destilata dobijenog od cvetova) su dostupni pod istim CAS i EINECS/ELINCS brojem (90).

Erica arborea

Farmakološke studije su ukazale na antiulceroznu, antimikrobnu, citotoksičnu i hipolipidemijsku aktivnost nekih predstavnika roda *Erica* (37,38).

Antioksidativna aktivnost. Najsnažniju antioksidativnu aktivnost pokazuje etilacetatna frakcija metanolnog ekstrakta listova vrste *Erica arborea* pošto je najbogatija ukupnim fenolima i flavonoidima (56).

Antiinflamatorna aktivnost. Etilacetatna frakcija metanolnog ekstrakta listova vrste *Erica arborea* pokazuje značajnu antiinflamatornu aktivnost u 3 *in vivo* testa na miševima, inhibirajući i inicijalnu i sekundarnu fazu inflamatornog odgovora što ukazuje na inhibiciju sinteze histamina, serotonina ili prostaglandina (37).

Antinociceptivna aktivnost. U *in vivo* modelu na miševima, etilacetana frakcija metanolnog ekstrakta listova pokazuje snažnu antinociceptivnu aktivnost (gotovo identičnu kao primenjena pozitivna kontrola – acetilsalicilna kiselina). Nije uočena nikakva akutna toksičnost prilikom primene različitih ekstrakata *Erica arborea* listova (37).

Ekstrakt korena vrste *Erica arborea* predstavlja komercijalnu kozmetičku sirovinu (CAS broj: 90028-36-7; EINECS/ELINCS br. 289-826-2) koja se koristi kao korigens mirisa i za aromatizaciju (90).

II CILJ RADA

Familija Ericaceae obuhvata oko 70 rodova sa više od 1500 vrsta koje su široko rasprostranjene na obe hemisfere. U Flori Evrope familija Ericaceae je zastupljena sa 18, a u Flori Srbije sa 5 rodova.

Najvažniji i zdravstvenim radnicima najpoznatiji predstavnik ove familije je medvede grožđe ili uva, *Arctostaphylos uva ursi* (L.) Spreng. List i ekstrakti ove biljne vrste se koriste kao antiseptici, naročito kod infekcija i donekle upale organa urogenitalnog trakta. U literaturi se često spominje da, pored medvedeg grožđa, i druge vrste iz iste familije sadrže iste sastojke odgovorne za antiseptičko delovanje. U tradicionalnoj medicini se i ostale vrste drugih rodova familije Ericaceae koriste u tretmanu urinarnih infekcija, mada u zvaničnoj medicini imaju mali značaj i retko se spominju kao lekovite.

Predmet ove doktorske disertacije su biljke koje pripadaju rodovima: *Arbutus* L. (vrsta *Arbutus unedo* L.), *Bruckenthalia* Rehb. (vrsta *Bruckenthalia spiculifolia* Rehb.), *Calluna* Salisb. (vrsta *Calluna vulgaris* (L.) Hull.) i *Erica* L. (vrste *Erica arborea* L. i *Erica carnea* L.), a rasprostranjene su u flori Balkana. Osnovna ideja rada je da se proverí prisustvo i količina jedinjenja antiseptičkog delovanja (arbutina) u ovim biljnim vrstama.

Postoje određeni podaci u narodnoj medicini o korišćenju ovih biljnih vrsta za lečenje nekih stanja i oboljenja. Takođe, publikovani su i rezultati eksperimentalnih radova o sastojcima i/ili farmakološkoj aktivnosti nekih od njih. Cilj eksperimentalnog rada u okviru ove doktorske disertacije je da uporedi biljne vrste međusobno i sa vrstom *Arctostaphylos uva ursi*. Nakon morfološke karakterizacije nadzemnih delova biljaka, sledi hemijska i farmakološka analiza sekundarnih metabolita koji su nosioci farmakološke aktivnosti (arbutin i hidrohinoski derivati, fenilpropanoidi, flavonoidi, polifenoli, tanini) i skrining antimikrobne, antioksidativne, spazmolitičke, antiinflamatorne i antiiritantne aktivnosti.

III MATERIJAL I METODE

1. Biljni materijal i ekstrakti

Biljni materijal

Biljni materijal je prikupljan u periodu od 2004. do 2011. godine na teritoriji Srbije, Crne Gore i Grčke:

<i>Arbutus unedo</i>	Crna Gora, Luštica – Krašići (29.07.2004.)	1173 HFF
	Grčka, Halkidiki – Sitonia (28.08.2006.)	2906 HFF
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	Kopaonik – Pančićev vrh (12.08.2004.)	1217 HFF
	Vlasinsko jezero (10.07.2011.)	3364 HFF
<i>Calluna vulgaris</i>	Loznica – Gučevo (08.09.2004.)	1272 HFF
<i>Erica arborea</i>	Crna Gora, Luštica (29.07.2004.)	1430 HFF
<i>Erica carnea</i>	Mokra gora (07.08.2004.)	1431 HFF

Herbarski primerci istraživanih vrsta se nalaze se u Herbarijumu Katedre za Botaniku Farmaceutskog fakulteta (HFF) Univerziteta u Beogradu.

Ekstrakcija biljnog materijala

Osušen biljni materijal je usitnjavan do konzistencije grubog praška (*pulvis grossus*), sito 0,75 po Ph. Jug. IV (otvor ivice sita 0,75 mm), neposredno pred ispitivanja biljnog materijala, odnosno pred ekstrakciju.

Ekstrakcija je vršena postupkom perkolacije sa 70% (V/V) etanolom.

Perkolacija:

Usitnjena droga se dobro izmeša sa delom rastvarača za ekstrakciju i ostavi da stoji određeno vreme. Smeša se prenese u perkolator i omogući spor perkolacioni protok na sobnoj temperaturi, koji obezbeđuje da biljna droga bude ekstrahovana tako što je uvek prekrivena slojem preostalog rastvarača za ekstrakciju. Ostatak iz perkolatora se može ispresovati i dobijena tečnost se sjedini sa perkolatom (91,92).

Deo biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera je podvrgnut višestrukoj ekstrakciji po sledećoj šemi:

- usitnjavanje suvog biljnog materijala
- obezmaščivanje petroletrom (1:10, 3 x) (po uparavanju dobijen petroletarski ekstrakt)
- sušenje biljnog materijala
- ekstrakcija 70 % etanolom – maceracija (1:10, 3 x)
- uparavanje do suva (po uparavanju odvojen deo punog etanolnog ekstrakta)
- rastvaranje etanolnog ekstrakta u mlakoj vodi
- tečno – tečna ekstrakcija do obezbojavanja ekstrakata etrom (po uparavanju dobijen etarski ekstrakt)

etilacetatom (po uparavanju dobijen etilacetatni ekstrakt)
vodom (po uparavanju dobijen vodeni ekstrakt)

Maceracija:

Usitnjena droga se dobro izmeša sa propisanim rastvaračem za ekstrakciju i smeša ostavi da stoji određeno vreme u zatvorenom sudu. Ostatak se odvoji od ekstrahovane tečnosti i, kada je potrebno, ispresuje. Ako se primeni presovanje, dobijena tečnost se sjedini sa ekstrahovanom tečnošću dobijenom maceracijom (91,92).

Svi izrađeni ekstrakti su uparavani pod sniženim pritiskom (pomoću vakuum-uparivača), na temperaturi do 45°C, do suva. Suvi ekstrakti (nakon utvrđivanja prinosa) su preneti i do analize čuvani u dobro zatvorenim staklenim posudicama u frižideru.

2. Morfološko-anatomska analiza

Histološki preseci lista i stabla napravljeni su od biljnog materijala, fiksiranog u etanolu (50%, V/V), sečenjem na klizećem mikrotomu, debljine između 10 i 15 µm. Dobijeni preseci su prosvetljavani parazonom, a zatim bojeni safraninom i alician plavim. Odbojavanje je vršeno u seriji alkohola rastuće koncentracije, a fiksiranje u Kanada balzamu. Na taj način su dobijeni trajni histološki preparati.

Istraživanje anatomske građe lista i stabla je vršeno posmatranjem trajnih histoloških preparata. Takođe su posmatrani i nativni histološki preparati koji su tretirani opštim reaktivom po Tucakovu.

Za analizu površinskih struktura stabla i lista korišćen je skening elektronski mikroskop (SEM) i suvi, herbarski materijal prekriven provodljivim filmom pare zlata pred analizu.

3. Hemijska analiza

3.1. Osnovna hemijska ispitivanja

Ispitivanje opšteg kvaliteta biljnog materijala obuhvata, pored određivanja prisustva stranih primesa i stepena usitnjenosti, i opšta hemijska ispitivanja koja se nazivaju i osnovna gravimetrijska ispitivanja, a obuhvataju određivanja: vlage (gubitka sušenjem), ukupnog pepela, sulfatnog pepela, pepela nerastvornog u HCl i ekstraktivnih materija.

Određivanje sadržaja vlage (gubitka sušenjem)

Sušenje je najlakši način konzerviranja biljnih organa (droga). Gubitak sušenjem predstavlja gravimetrijsko ispitivanje koje se primenjuje u farmakopeji za određivanje sadržaja vlage. Pravilno čuvana droga ne sadrži veći procenat vlage od maksimalno dozvoljenog. Za najveći broj droga maksimalna dozvoljena količina vlage koju propisuje Farmakopeja iznosi između 8 i 12%. Za droge sa veoma nestabilnim aktivnim principima

taj procenat je niži. Sadržaj vlage u biljnom materijalu se određuje gravimetrijski iz razlike mase droge pre i posle sušenja (28,91,93).

Postupak (prema Ph. Jug. V): Odmeri se 1 g droge u prašku u staklenu posudicu sa brušenim poklopcem (vegeglas) i drži otklopljeno 2h u sušnici na 100 – 105°C, zatim izvadi, ohladi u eksikatoru, meri i ponovo suši po pola časa, do konstantne mase. Posle svakog sušenja, posudica sa drogom se hladi u eksikatoru.

Izračunavanje:

$$\% \text{ vlage} = 100 (a - b) / a$$

a = masa droge (g) pre sušenja (1 g)

b = masa droge (g) posle sušenja (odmerena masa droge nakon sušenja do konstantne mase) (28).

Rezultati dobijeni ovim određivanjem su korišćeni pri preračunavanju količine određivanih sastojaka na apsolutno suhu drogu.

Određivanje pepela

Ostatak nakon žarenja – pepeo označava količinu primesa koje zaostaju nakon žarenja isparljivih neorganskih i pri spaljivanju i žarenju organskih preparata, zavojnog materijala ili droga (91).

Prema propisu Svetske Zdravstvene Organizacije – WHO pepeo koji ostaje nakon spaljivanja se može odrediti trima različitim metodama koje određuju ukupan pepeo, pepeo nerastvoran u kiselini i pepeo rastvoran u vodi (93), dok Ph. Jug. V propisuje određivanje ukupnog pepela, sulfatnog pepela i pepela nerastvorljivog u hlorovodoničnoj kiselini (28).

Određivanje ukupnog pepela

Metoda određivanja ukupnog pepela se zasniva na merenju ukupne količine materijala koji zaostaje nakon sagorevanja. On uključuje i "fiziološki pepeo", koji daje samo biljno tkivo, i "nefiziološki pepeo", koji je posledica prisustva eksternih materija (npr. pesak i zemljište) sa površine biljke (93).

WHO preporučuje izražavanje sadržaja ukupnog pepela kao mg po g suvog materijala (93) dok Ph. Jug. V propisuje izražavanje u % biljnog materijala (28).

Postupak (Ph. Jug. V): Porcelanski ili platinski lončić za žarenje (tigl), zagreva se 30 min u peći za žarenje na temperaturi tamnocrvenog usijanja (700°C ± 25°C), zatim ohladi u eksikatoru i izmeri. Ukoliko nije drugačije propisano, 1 g droge u prašku se ravnomerno rasporedi u lončiću za žarenje, suši u sušnici na 100–105°C 1h, žari na rešou sve dok dimi, zatim prebaci u peć za žarenje i žari do konstantne mase na 600°C ± 25°C. Posle svakog žarenja lončić sa sadržajem se hladi u eksikatoru i meri. Za vreme procesa određivanja, sadržaj u lončiću ni jednog trenutka ne sme da se zapali. Ako i posle dužeg žarenja pepeo još uvek sadrži crne čestice, prelije se toplom vodom, filtrira kroz kvantitativni filter-papir, zatim se ostatak i filter-papir žare. Filtrat i pepeo se spoje, sadržaj pažljivo upari do suva i žari do konstantne mase. Količina ukupnog pepela se izražava u % odmerene suve droge.

Izračunavanje:

$$\% \text{ pepela} = 100 b / a$$

a = masa droge (g)

b = masa pepela (g) (28).

Određivanje pepela nerastvornog u hlorovodoničnoj kiselini

Pepeo nerastvoran u kiselinama se dobija nakon kuvanja ukupnog pepela u razblaženoj hlorovodoničnoj kiselini i sagorevanjem nerastvornog ostatka. Njime se određuje količina prisutnog silicijuma, posebno u slučaju peska i silikatnog zemljišta (93). WHO preporučuje izražavanje sadržaja pepela nerastvornog u kiselinama kao mg po g suvog materijala (93). Prema Ph. Jug. V, pepeo nerastvoran u HCl predstavlja ostatak dobijen obradom ukupnog ili sulfatnog pepela sa HCl i izračunava se u odnosu na 100 g droge, propis Ph. Jug. IV je isti, ali se sadržaj SiO₂ izražava u odnosu na pepeo (28,91).

Postupak (Ph. Jug. IV): U porcelanski ili platinski lončić za žarenje, u kome se nalazi ostatak posle određivanja sulfatnog ili ukupnog pepela, doda se 15 ml vode i 10 ml koncentrovane HCl. Lončić se prekrije sahatnim staklom, postepeno zagreva do ključanja tokom 10 min, zatim ostavi da se ohladi, sadržaj filtrira preko kvantitativnog filter-papira i ostatak ispira vodom do neutralne reakcije filtrata. Filter-papir sa ostatkom se prenese u posudu za žarenje, suši, sagoreva i žari na temperaturi crvenog usijanja. Posle hlađenja u eksikatoru, posuda se odmeri. Postupak se ponavlja do konstantne mase (razlika između dva merenja ne sme biti veća od 1 mg).

Izračunavanje:

$$\% \text{ pepela nerastvorljivog u HCl} = c / b \times 100$$

c = masa SiO₂ (pepela nerastvorljivog u HCl)

b = masa ukupnog pepela (91).

Određivanje ekstraktivnih materija

Određivanje ekstraktivnih materija predstavlja određivanje aktivnih komponenata droge koji se mogu ekstrahovati rastvaračem iz propisane količine biljnog materijala. Propisuje se najčešće za materijale za koje još uvek ne postoji odgovarajuće hemijsko ili biološko ispitivanje (93). Ekstrakt je jedan od parametara za procenu kvaliteta droga. Pod ekstraktom se podrazumeva onaj deo droge koji se propisanim rastvaračem (najčešće se izrađuju vodeni i etanolni ekstrakti) i uz navedene uslove može ekstrahovati iz droge, a farmakopeje za pojedine droge propisuju minimalne dozvoljene količine ekstrakta, odnosno, droga je kvalitetnija što je sadržaj ekstrakta veći.

Preporučene procedure za određivanje ekstraktivnih materija prema WHO su topla ekstrakcija i hladna ekstrakcija.

Topla ekstrakcija: u erlenmajeru odmeriti 4,0 g sprasene, na vazduhu osušene droge, dodati 100 ml vode i izmeriti ukupnu masu. Energično promućkati i ostaviti da stoji 1h, zatim lagano kuvati 1h uz povratni kondenzator, ohladiti i meriti. Dopuniti do ukupne mase rastvaračem koji je propisan za ekstrakciju, dobro promućkati i filtrirati kroz suvi filter papir. Preneti 25 ml filtrata u tariranu posudicu za uparavanje i uparavati na vodenom

kupatilu do suva. Sušiti 6h na 105°C, hladiti 30 minuta u eksikatoru i odmah meriti. Sadržaj ekstraktivnih materija se izražava kao mg po g suve droge.

Hladna ekstrakcija: u erlenmajeru odmeriti 4,0 g sprasene, na vazduhu osušene droge, macerirati 6h sa 100 ml rastvarača propisanog za biljni materijal, uz češće mućkanje, a zatim ostaviti 18h. Filtrirati brzo bez gubitaka, preneti 25 ml filtrata u posudu za uparavanje i upariti do suva na vodenom kupatilu. Sušiti ostatak 6h na 105°C, hladiti 30 minuta u eksikatoru i odmah meriti. Sadržaj ekstraktivnih materija se izražava kao mg po g suve droge (93).

Postupak određivanja vodenog ekstrakta (Ph. Jug. IV): 5 g droge u prašku (sito 0.75), prelije se u erlenmajeru sa 50 g vode (1:10) i, uz češće mućkanje, ostavi 24 časa. Zatim se filtrira i prvih 10 ml filtrata baci (prve količine filtrata su razblaženije, jer se filtriranje vrši kroz vodom nakvašen filter-papir). Narednih 10 g filtrata odmeri se u porculanskoj posudi za uparavanje, promera oko 5 cm, i upari na vodenoj pari do suva. Ostatak se suši do konstantne mase.

Izračunavanje:

$$\% \text{ ekstrakta} = 100 \cdot b \cdot d / a \cdot c$$

a = masa droge (g)

b = masa rastvarača (g)

c = masa filtrata (g)

d = masa suvog ostatka (g) dobijenog posle uparavanja filtrata (91).

Određivanje vrednosti sluznih droga

Broj bubrenja je veličina kojom se vrednuju droge sa sluzima. To je zapremina koju zauzima 1 g droge određenog stepena usitnjenosti (uključujući i sluzavi sloj na njenoj površini) posle 4h bubrenja u vodi, a izražava se u ml. Predstavlja srednju vrednost 3 ponavljanja (28,91,93).

Postupak (Ph. Jug. V): U menzuru od 25 ml (unutrašnji dijametar menzure bi trebalo da bude 16 mm, dužina graduisane skale 125 mm, sa podeocima od 0,2 ml od 0 do 25 ml) sa brušenim zatvaračem, prenese se 1 g droge. Ispitivanje se izvodi sa neusitnjenom ili drogom stepena usitnjenosti propisanog u monografiji. Ukoliko nije drugačije propisano, droga se navlaži sa 1,0 ml alkohola, doda 25 ml vode i menzura zatvori. Svakih 10 min, tokom prvog sata, menzura se snažno mućka, a zatim ostavi da stoji naredna tri sata. Veći volumen tečnosti, zaostao u sloju droge, kao i čestice droge koje plivaju po površini, uklanjaju se 90 min posle početka ispitivanja, pažljivim okretanjem menzure oko uzdužne ose. Očita se zapremina u ml koju zauzima biljni materijal, uključujući i sloj sluzi koji zaostaje na njemu. Izračunava se srednja vrednost tri paralelna određivanja i izrazi na 1 g droge (28).

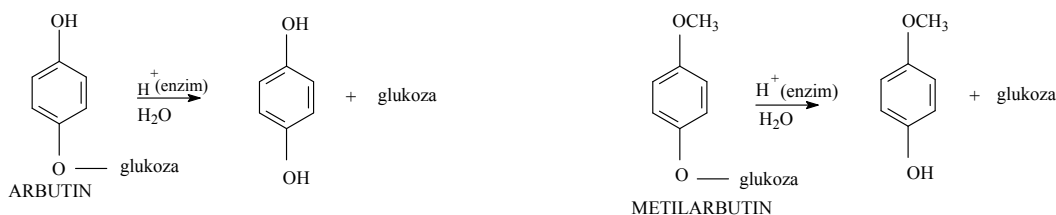
3.2. Kvalitativna hemijska analiza

U okviru kvalitativne hemijske analize ispitivano je prisustvo fenolnih heterozida, flavonoida i tanina u biljnom materijalu. Korišćene su uobičajene dokazne reakcije i hromatografija na tankom sloju silikagela. Izvršena je i semikvantitativna HPLC analiza fenolnih jedinjenja u etanolnim ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta.

3.2.1. Kvalitativna analiza fenolnih heterozida

Fenolni heterozidi se sa jonima gvožđa boje crveno, a hidrohionon izdvojen mikrosublimeracijom sa srebro-nitratom daje crn talog. Sprašena droga (0,5 g) se prokuva sa 10 ml vode i nakon hlađenja filtrira. Kada se 1 ml filtrata doda kristalić FeSO_4 tečnost se oboji najpre crveno, zatim ljubičasto i na kraju tamnoljubičasto (5).

Arbutin je veoma higroskopan, lako hidrolizuje u prisustvu razblaženih kiselina ili emulzina, dajući D-glukoza i hidrohionon u molnom odnosu 1:1 (1).



Slika 3.1. Hidroliza arbutina i metilarbutina

Arbutin hidrolizom daje glukoza i hidrohionon, a metilarbutin glukoza i metilhidrohionon; nakon hidrolize (u kiselom sredini) se fenolni aglikoni mogu dokazati na osnovu crvenoljubičaste boje sa Fe^{3+} jonima (17). Termalna razgradnja arbutina počinje na 200°C i završava se na 288°C. Neisparljivi proizvodi razgradnje su: hidrohionon, 1,6-anhidro- β -D-glukopiranoza, 1,6-anhidro- β -D-glukofuranoza i α - i β -glukoza (94).

Identifikacija arbutina se može vršiti i mikrosublimeracijom: zagrevanjem heterozidi hidrolizuju (iz sprašene droge nakvašene hlorovodoničnom kiselinom), a oslobođeni hidrohionon sublimuje na 160°C u obliku bezbojnih igličastih kristala, koji posle rastvaranja u metanolu (0,5 ml) i reakcije sa srebro-nitratom (2 kapi) daju sivo-crni talog (5,17).

TLC fenolnih heterozida

Najvažniji hidrohiononski derivati prisutni u drogama su arbutin i metilarbutin, a u malim količinama mogu biti prisutni i 2-O-galoil-arbutin, 6-O-acetil-arbutin i slobodan hidrohionon. Za ove droge je obično karakteristično i prisustvo galo- i elagotanina (69).

Postupak (DAB 8): Ekstrakcija biljnog materijala: sprašena droga (5 g) se ekstrahuje sa 75% metanolom (50 ml), uz povratni hladnjak, 30 minuta a zatim se filtrira. Filtrat se upari na zapreminu od 12 ml i prenese u levak za odvajanje sa 50 ml vode. Ovaj rastvor se dva puta ekstrahuje sa po 30 ml etra (etarski slojevi se bacaju) a zatim tri puta sa po 50 ml etilacetata. Etilacetatni slojevi se sakupe i upare do suva, a suvi ostatak se rastvori u 10 ml metanola. Ovako dobijen ekstrakt je pogodan za određivanje fenolnih glikozida i flavonoida. Na TLC ploče se aplikuje 20 μ l ekstrakta.

Referentni rastvori: 25 mg hidrohionona, 25 mg galne kiseline i 25 mg arbutina se rastvara u po 10 ml metanola i aplikuje po 10 μ l.

Adsorbent: Silikagel 60 F₂₅₄ (Merck, Darmstadt).

Mobilna faza: etilacetat – mravlja kiselina – voda (88:6:6, V/V/V)

Detekcija: bez hemijskog tretmana se javlja izraženo gašenje fluorescencije u UV 254 nm u prisustvu arbutina i drugih fenolnih jedinjenja.

Sprej reagensi za detekciju: sveže pripremljen reagens za Berlinsko plavo reakciju (10 g FeCl₃ i 0,5 g kalijum-heksacijanoferata se rastvori u 100 ml destilovane vode) sa arbutinom, metilarbutinom, hidrohinsonom i metilhidrohinsonom u VIS oblasti daje plavo obojene zone (69).

TLC dokazivanje arbutina

Aglikoni fenolnih heterozida sa sumpornom kiselinom, uz zagrevanje, grade crvenoljubičaste proizvode (93).

Postupak (Ph. Eur. 5.0): TLC metodom uz 1% 2,6 – dihlorhinonhlorimid u metanolu kao rastvor za detekciju, arbutin se izdvaja u vidu ljubičaste zone. Priprema se metanolni ili etanolni ekstrakt droge i razdvaja u mobilnoj fazi kisele reakcije (kiselina sredina sprečava disocijaciju fenola).

Referentni rastvor: 25 mg hidrohina, 25 mg galne kiseline i 25 mg arbutina u 10 ml metanola.

Adsorbens: silica gel G ploče za TLC.

Mobilna faza: mravlja kiselina – voda – etilacetat (6:6:88, V/V/V) (92).

3.2.2. Kvalitativna analiza flavonoida

Flavonoidi se u kiseloj sredini u prisustvu elementarnog Mg ili Zn redukuju do crveno obojenih antocijanidina – Cijanidinska ili Sinoda reakcija. Ova reakcija oksido-redukcije se zasniva na veoma izraženim antioksidativnim karakteristikama flavonoida.

Izrada ekstrakta: 0,5 g sprasene droge se ekstrahuje sa 10 ml metanola, uz povratni hladnjak, 10 minuta na vodenom kupatilu. Vruć rastvor se profiltrira pa filtrat razblaži sa 10 ml vode. Posle hlađenja i prečišćavanja sa 5 ml petroletra, vodeno-metanolni sloj se odvaja i uparava pod sniženim pritiskom. Suvi ostatak se rastvori u 5 ml etilacetata.

Cijanidinska (Sinoda) reakcija: 1 ml etilacetatnog rastvora se upari do suva pa ostatak rastvori u 1 ml etanola. U etanolni rastvor se doda 0,1 mg opiljaka magnezijuma (Mg) i 10 kapi koncentrovane hlorovodonične kiseline (36% HCl). Flavoni, flavanonoli i njihovi heterozidi se u prisustvu nascentnog vodonika redukuju do crvenih antocijanidina, a flavanoni daju ljubičasti polimetanski katjon (95,96).

TLC flavonoida

Ekstrakcija biljnog materijala: sprasena droga (1 g) se ekstrahuje 5 minuta sa 10 ml metanola na vodenom kupatilu. Bistar filtrat se koristi za hromatografiju, pošto se ovom brzom metodom ekstrahuju i lipofilni i hidrofilni flavonoidi.

Referentni rastvori: standardne supstance se pripremaju kao 0,05% rastvori u metanolu i nanose u zapremini od 10 µl. Prosečni detekcioni limit za flavonoide je 5 – 10 µg (ukoliko je koncentracija flavonoida u drogi između 0,5 i 1,5% dovoljno je naneti 25 – 30 µl ekstrakta). Najčešće se koriste standardi rutina, hlorogenske kiseline i hiperozida.

Adsorbens: silikagel 60 F₂₅₄ TLC ploče (Merck, Darmstadt).

Mobilna faza: etilacetat – mravlja kiselina – glacijalna sirćetna kiselina – voda (100:11:11:27, V/V/V/V); priprema se tako što se prvo pomešaju etilacetat, mravlja kiselina i glacijalna sirćetna kiselina, a zatim se postepeno, uz intenzivno mućkanje, dodaje voda. Ovakva mobilna faza je pogodna za TLC ispitivanje flavonoidnih glikozida.

Detekcija: bez hemijskog tretmana na UV-254 nm svi flavonoidi gase fluorescenciju, što se vidi kao tamno plave mrlje na zelenoj površini TLC ploče. Na UV-365 nm, u zavisnosti od strukture, flavonoidi fluoreskuju žuto, plavo ili zeleno.

Sprej reagens za detekciju: Natural products reagent (NP) nakon prskanja izaziva intenzivniju fluorescenciju na UV-365 nm koja traje oko 15 minuta. Dodatkom polietilenglikola (PEG) se detekcioni limit smanjuje sa 10 µg na 0,5 µg. Fluorescencija zavisi od strukture: glukozi kvercetina i mircetina daju narandžastu, glukozi kemferola i izoramnetina žuto-zelenu, glukozi luteolina narandžastu a glukozi apigenina žuto-zelenu boju.

Sastav NP odnosno NP/PEG reagensa:

rastvor A: 1% rastvor difenilboriloksietilamina u metanolu

rastvor B: 5% PEG 400 u etanolu (69).

Dvodimenziona TLC sa hidrolizom heterozida

Metanolni ekstrakt (isti kao za TLC flavonoida) se nanosi na jedan kraj tankog sloja Si-gela i razvija u mobilnoj fazi 1. Nakon sušenja hromatogram se posmatra pod UV svetlošću na 365 nm i obeleže se izdvojeni heterozidi. Kisela hidroliza razdvojenih heterozida se vrši direktno na tankom sloju adsorbensa prskanjem koncentrovanom HCl i zagrevanjem na 105°C tokom 15 minuta. Pod pravim uglom u odnosu na prvo razvijanje, vrši se drugo u mobilnoj fazi 2. Vizuelizacija i detekcija izdvojenih aglikona se vrši na isti način kao i kod slobodnih aglikona (97).

Mobilna faza 1: etilacetat – metanol – voda (100:17:13, V/V/V)

Mobilna faza 2: petroletar – etilacetat – glacijalna sirćetna kiselina (90:10:6, V/V/V).

TLC šećera

Nakon kisele hidrolize heterozida vrši se TLC analiza oslobođenih monosaharida i njihova identifikacija poređenjem sa hromatogramom standarda monosaharida.

Ekstrakcija biljnog materijala: sprášena droga (1 g), 40 ml 60% metanola i 5 ml 6M HCl se kuva na vodenom kupatilu, uz povratni hladnjak, 2h. Aglikoni se preuzimaju etilacetatom a kiseli vodeno-metanolni ekstrakt služi za analizu šećernih komponenata heterozida.

Silika gel ploče za hromatografiju (DC-Alufolien, Kiesegel 60, F₂₅₄, Merck).

Mobilna faza: etilacetat:sirćetna kiselina:metanol:voda (60:15:15:10, V/V/V/V)

Standardi: glukoza, aloza, galaktoza, ramnoza i manosa se nanose kao 0,05% rastvori u metanolu u zapremini od 10 – 20 µl.

Razvijen hromatogram se suši 30 minuta ispod digestora pa 15 minuta na 80°C, a zatim prska timol-sulfatna kiselina reagensom (0,5 g timola, 95 ml etanola i 5 ml sumporne kiseline). Nakon zagrevanja u trajanju od 5 minuta na 120°C, hromatogram se posmatra na dnevnoj svetlosti (96).

3.2.3. Kvalitativna analiza tanina

Tanini se mogu dokazati taložnim i bojenim reakcijama, kojima se može i izvršiti razlikovanje hidrolizujućih (galnih) i kondenzovanih (katehinskih) tanina.

Tabela 3.1. Reagensi i proizvodi njihove reakcije sa taninima

REAGENSI	TANINI		
	GALNI	KATEHINSKI	MEŠOVITI
Želatin (1%)	talog	talog	talog
Strihnin-sulfat (1%)	talog	talog	talog
Pb(CH ₃ COO) ₂	talog	talog	talog
FeCl ₃ (1%)	plavo	zeleno	plavo-zeleno
FeNH ₄ (SO ₄) ₂ (1%)	plavo	zeleno	plavo-zeleno
Bromna voda (5%)	-	talog	talog
Formaldehid/HCl	-	talog	talog

Izrada ekstrakta: 0,5 g sprašene droge (sito 0,75) se zagreva sa 100 ml destilovane vode 50 min na 90° C. Dokazne reakcije se izvode sa profiltriranim, ohlađenim dekoktom.

Formadehidna (tanofarmska) proba: 50 ml dekokta droge zagreva se sa 5 ml koncentrovane HCl i 10 ml 40% formaldehida, u erlenmajeru od 100 ml, 30 min na vodenom kupatilu. Katehinski tanini se talože u vidu smeđe-crvenog taloga (tanofarm, metilen ditanin). Da bi se dokazali galni pored katehinskih tanina, u 5 ml filtrata koji se dobija taloženjem katehinskih tanina pomoću formaldehida i HCl, doda se pažljivo, bez mućkanja epruvete, 1 g kristalnog natrijum-acetata i 1 ml rastvora gvožđe(III)-amonijumsulfata. Pojava plavo-ljubičastog prstena na mestu odgovarajuće pH vrednosti potiče od galne kiseline i ukazuje na prisustvo galnih tanina (95).

3.2.4. HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Fenolna jedinjenja se visoko-efikasnom tečnom hromatografijom reverznih faza (RP-HPLC) identifikuju poređenjem UV spektara i retencionih vremena uzorka i standarda pod istim uslovima (98). Kvantifikacija je vršena na osnovu površine pika.

Test rastvor: suvi etanolni ekstrakt rastvoren u acetonitrilu (5 mg/ml za sve testirane uzorke, izuzev ekstrakta BE koji je analiziran u koncentraciji od 2,5 mg/ml) i filtriran preko membranskog mikrofiltera prečnika 0,45 µm neposredno pred analizu

Referentni rastvor: odgovarajući standard rastvoren u smeši acetonitril/voda (1:1, V/V) (1 mg/ml)

Kolona: Zorbax Eclipse XDB-C18, dimenzija 4,6 × 250mm sa 5 µm veličinom čestica punjenja.

Mobilna faza: faza A = voda/fosforna kiselina (99,97:0,03, V/V), pH = 2,75
faza B = 10% A u acetonitrilu

Protok: 0,8 ml/min.

Temperatura: 25°C.

Detekcija: spektrofotometrijski na 350 nm.

Tabela 3.2. Gradijent elucije pri HPLC analizi fenolnih jedinjenja

Vreme (min)	Faza A (%)	Faza B (%)
0	90	10
5	75	25
20	70	30
25	50	50
30	30	70
35	90	10

3.3. Kvantitativna hemijska analiza

3.3.1. Određivanje arbutina

Polarimetrijsko određivanje arbutina se baziralo na optičkoj aktivnosti arbutina, a korišćeno je za jedno od prvih određivanja arbutina na našim prostorima (Milojević, Mihajlov i Tucakov su određivali ukupni sadržaj arbutina i metilarbutina u *Uvae ursi folium*, *Myrtilli folium* i *Vitis idaeae folium*, polarimetrijskom metodom prema Lindpaintner-u oficinalnom u, tada važećoj, Ph. Jug. II) (4,99). Jodimetrijska metoda, oficinalna u devetoj Farmakopeji SSSR-a (100), se zasniva na veoma izraženim redoks osobinama para hidrohionon-hionon.

Spektrofotometrijsko određivanje, koje je propisano za određivanje arbutina, između ostalih, i u: Četvrtoj Jugoslovenskoj Farmakopeji (91), Britanskoj Farmakopeji iz 1998. (101) i Petoj Jugoslovenskoj Farmakopeji (u monografiji *Uvae ursi folium*) (28), zapravo omogućava kvantifikaciju ukupnih hidrohiononskih derivata.

Peta Evropska farmakopeja propisuje HPLC određivanje arbutina u drogi *Uvae ursi folium* (92).

Spektrofotometrijsko određivanje hidrohiononskih derivata

Fenoli grade sa aminopirazolonom, u prisustvu kalijum-heksacijanoferata (III) (oksidaciono sredstvo) i u baznoj sredini, crvene hinonimine (Emersonova reakcija) (93). Reakcijom arbutina sa 4-aminofenazonom i amonijačnim rastvorom kalijum-heksacijanoferata (III) nastaje crveno obojen, liposolubilan hinonimin. Nakon ekstrakcije nastalog jedinjenja metilenhloridom iz reakcione smeše, na osnovu spektrofotometrijskog merenja intenziteta njegove boje, određuje se sadržaj arbutina.

Reagensi:

Aminopirazolon R: 20 g aminopirazolona rastvoreno u 1000 ml destilovane vode.

Amonijak R2: 14 g koncentrovanog amonijaka rastvoreno u 100 ml destilovane vode.

Kalijum-heksacijanoferat (III): 80 g kalijum-heksacijanoferata (III) rastvoreno u 1000 ml destilovane vode.

Postupak (Ph. Jug. V): Prenese se 0,400 g sprasene droge (suvog ekstrakta) u erlenmajer od 250 ml sa šlifom. Doda se 50 ml H₂O i zagreva 30 minuta uz povratni hladnjak. Kada se ohladi, dopuni se vodom do 250 ml. Ostavi se da se čestice stalože, a zatim prenese 5 ml rastvora u levak za odvajanje. Sukcesivno se dodaje, uz mešanje posle svakog dodavanja,

45 ml vode, 1 ml rastvora 20 g/l aminopirazolona R, 0,5 ml amonijaka R2 i 1 ml rastvora 80 g/l kalijum-heksacijanoferata (III). Ostavi se da stoji 5 minuta, a zatim izmućka sa 25 ml metilenhlorida. Metilenhloridni sloj se procedi, kroz pamučnu vatu natopljenu metilenhloridom, u normalni sud od 100 ml. Vodeni sloj se izmućka još 3 puta sa po 25 ml metilenhlorida, pa se spojeni metilenhloridni slojevi dopune do 100 ml istim rastvaračem. Aporbancija se meri na 455 nm uz vodu kao slepu probu. Sadržaj hidrohinskih derivata se izračunava u %, izraženo kao bezvodni arbutin, prema izrazu:

$$\% \text{ hidrohinskih derivata} = A \times 7,716 / m$$

uzimajući da je vrednost specifične apsorpcije bezvodnog arbutina 648.

A = apsorpcija na 455 nm

m = masa droge (g) (28).

HPLC određivanje arbutina

Najviše korišćena analitička separaciona tehnika danas je HPLC, a razlog za njenu popularnost je velika osetljivost, mogućnost kvantitativne determinacije i separacije neisparljivih i termolabilnih supstanci. Kvantifikacija se može vršiti na više načina: analizom koja se bazira na visini ili površini pika, kalibracijom uz standard, metodom internog standarda ili metodom normalizacije površine.

Postupak (Ph. Eur. 5). Test rastvor: u erlenmajeru ravnog dna od 100 ml se prenese 0,800 g prašene droge, doda se 20 ml vode R (destilovana voda) i zagreva, uz povratni kondenzator, na vodenom kupatilu 30 minuta. Nakon hlađenja se filtrira kroz sloj pamučne vate. Ostatku u erlenmajeru se doda vata kroz koju je vršeno filtriranje i ponovo ekstrahuje sa 20 ml vode R na vodenom kupatilu tokom 30 minuta. Nakon hlađenja se filtrira kroz filter papir. Filtrati se sjedine i dopune do 50 ml vodom R.

Referentni rastvor: rastvoriti 50 mg arbutina R (standard arbutina) u mobilnoj fazi pa razblažiti mobilnom fazom do 50 ml.

Kolona: l = 0,25 m, Ø = 4 mm, stacionarna faza = bazom dezaktivisan oktadecilsilil silikagel za hromatografiju R (5µm).

Mobilna faza: metanol R, voda R (10:90, V/V).

Protok: 1,2 ml/min.

Detekcija: spektrofotometrijski na 280 nm.

Sadržaj arbutina, u procentima, se računa korišćenjem sledećeg izraza:

$$F_1 \times m_2 \times 100 / F_2 \times m_1$$

F₁ = površina pika arbutina sa hromatograma test rastvora

F₂ = površina pika arbutina sa hromatograma referentnog rastvora

m₁ = masa ispitivane droge, u gramima

m₂ = masa arbutina R u referentnom rastvoru, u gramima

Rastvori standarda su pripremani rastvaranjem 10 mg arbutina (Sigma, čistoća min. 98%), odnosno 2 mg hidrohina (Sigma, čistoća min. 99%) u 10 ml prečišćene vode za HPLC.

Količina arbutina i hidrohina u uzorcima računata je u odnosu na odmerenu masu droge, bez korekcije u pogledu sadržaja vlage (92).

3.3.2. Određivanje flavonoida

Spektrofotometrijskim određivanjem flavonoida (DAB 10, monografija *Crataegi folium et flores*) se određuju ukupni flavonoidi, a rezultat se izražava u procentima biljnog materijala. Ekstrakcija flavonoida se vrši acetonom uz kiselu hidrolizu flavonoidnih heterozida. Flavonoidni aglikoni, preuzeti etilacetatom, sa AlCl_3 grade intenzivno žuto obojene helate, čija se apsorbcija meri na 425 nm (95).

Reagensi:

Urotropin (0,5%): rastvor urotropina (metenamin, heksametilentetramin) u destilovanoj vodi. Dodaje se da spreči oksidaciju eventualno prisutnih leukoantocijanidina u antocijanidine, koji sa AlCl_3 daju plave helate, što bi reakcionu smesu umesto žuto obojilo zeleno.

Aluminijum-hlorid reagens: 2 g AlCl_3 u 100 ml 5% rastvora sirćetne kiseline u metanolu. Za analizu se koristi sveže pripremljen rastvor.

5% rastvor sirćetne kiseline u metanolu: 50 ml 98% sirćetne kiseline se dopuni metanolom do 1000 ml.

Postupak (DAB10): Odmeri se 600 mg droge u prašku, prelije sa 20 ml acetona u erlenmajeru sa šlifom, doda se 1 ml 0,5% rastvora urotropina i 2 ml 25% HCl i zagreva do ključanja 30 min uz povratni hladnjak. Posle hlađenja, smeša se procedi preko malo vate u normalni sud od 100 ml. Ostatak droge i vata se kuvaju još dva puta po 10 min sa po 20 ml acetona uz povratni hladnjak. Ohlađeni ekstrakti se zatim procede preko malo vate natopljene acetonom u isti normalni sud i sadržaj dopuni acetonom do 100 ml.

U levku za odvajanje se pomeša 20 ml ovog rastvora sa 20 ml vode i izmućka jednom sa 15 ml i tri puta sa po 10 ml etil-acetata. Spojeni etilacetatni ekstrakti se u levku za odvajanje isperu dva puta sa po 50 ml vode, prebace u normalni sud od 50 ml i sadržaj dopuni do oznake etilacetatom.

U normalni sud od 25 ml se prebaci 10 ml ovog rastvora, doda 1 ml aluminijum-hlorid-reagensa i dopuni do oznake 5% rastvorom sirćetne kiseline u metanolu (ispitivani rastvor).

Istovremeno se 10 ml ovog rastvora razblaži do 25 ml 5% rastvorom sirćetne kiseline u metanolu (slepa proba).

Apsorbancija ispitivanog rastvora se meri na 425 nm posle 30 min u odnosu na slepu probu. Sadržaj flavonoida se izračunava u odnosu na specifični apsorpcioni koeficijent hiperozida, $A_{1\%/1\text{cm}} = 500$.

$$C \% = A_A \times F / D$$

A_A = apsorpcija analize

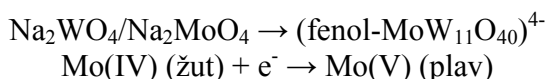
D = odmerena količina droge u gramima

$F = 1,25$ (102).

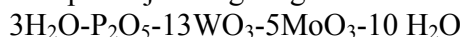
3.3.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina

Folin-Ciocalteu metoda

Folin-Ciocalteu (F-C) ispitivanje se godinama koristi za određivanje ukupnih fenola u prirodnim proizvodima ali, pošto se bazira na činjenici da su fenoli redukujući agensi i u osnovi je oksido-redukciona reakcija, može se smatrati i antioksidativnom metodom. Originalna F-C metoda je razvijena još davne 1927. godine za analizu tirozina, pri čemu oksidacija fenola molibdotungistatom daje obojene proizvode sa maksimumom apsorpcije na 745-750 nm:



Metoda je jednostavna, osetljiva i precizna. Međutim, reakcija je spora na niskoj pH i nedostaje joj specifičnost. Modifikacijom metode i korišćenjem molibdotungstofosfornog heteropolianjonskog reagensa:



postiže se specifičnija redukcija fenola a λ_{max} proizvoda je 765 nm. Takođe su uvedeni obavezni koraci koji obezbeđuju dobijanje pouzdanih i reproduktivnih podataka: odgovarajući odnos zapremina baze i F-C reagensa, optimalno reakciono vreme i temperatura za razvoj boje, merenje na talasnoj dužini od 765 nm i korišćenje galne kiseline kao referentnog standardnog fenola (103).

F-C reagens meri sposobnost bilo koje smeše da redukuje fosfomolibdensku i fosfotungistinsku kiselinu do plavo obojenog kompleksa. Prisustvo askorbinske kiseline ili drugih supstanci koje veoma lako oksidišu, a koje nisu fenolna jedinjenja, takođe može dovesti do pojave plavog obojenja sa F-C reagensom, što vodi lažno visokim vrednostima sadržaja ukupnih fenola, pa se smatra da je ovaj reagens neodgovarajući kada su u pitanju ekstrakti sa visokim sadržajem lako oksidišućih supstanci. Visoke koncentracije šećera mogu značajno reagovati sa ovim reagensom pa dovesti do greške u određivanju, dok male količine šećera ne interaguju. Takođe, reakcija F-C reagensa sa fruktozom je intenzivnija nego sa drugim šećerima. Postoji veliki broj interferirajućih supstanci (šećeri, aromatični amini, sumpor dioksid, askorbinska kiselina i drugi reduktanti, Fe(II) i organske kiseline) pa se mora izvršiti korekcija za prisutne interferirajuće supstance. Dodatne nefenolne supstance koje reaguju sa F-C reagensom su adenin, adenzin, alanin, alinin, aminobenzoeva kiselina, benzaldehid, kreatinin, cistein, cistidin, dimetilamin, difenilamin, EDTA, fruktoza, guanin, guanozin, glicin, histamin, histidin, indol, metilamin, nitriloacetnska kiselina, oleinska kiselina, feniltiourea, proteini, piridoksin, saharoza, sulfanilna kiselina, tiourea, timin, timidin, trimetilamin, triptofan, uracil, urična kiselina i ksantin. Takođe, neke neorganske supstance kao što su hidrazin, hidrosiamonijumhlorid, gvožđe amonijum sulfat, magnezijum sulfat, KNO_3 , NaCN, Na-metabisulfit, Na-fosfat, Na-sulfat, mogu reagovati sa F-C i dati lažno povišene koncentracije fenola (103,104).

Svi tanini su fenoli ali nisu svi fenoli tanini. F-C određivanje se može izvesti uz korišćenje nerastvornog matriksa (kao delimično hemijsko ali delimično i fizičko određivanje), polivinil polipirolidona (PVPP), da bi se odredio sadržaj tanina pošto PVPP vezuje tanine. Razlika ukupnih i ne-taninskih polifenola predstavlja sadržaj tanina (105).

Kao standard za izradu kalibracione krive se može koristiti katehin ili galna kiselina, pa se rezultati obično izražavaju kao ekvivalenti katehina ili galne kiseline (g ekvivalent na 100g suve materije) ili kao % polifenola (ili tanina) u suvom uzorku (105,106).

Tabela 3.3. Priprema uzoraka za izradu kalibracione krive

	Rastvor katehina (µl)	Destilovana voda (µl)	F-C reagens (µl)	Rastvor Na ₂ CO ₃ (µl)	Katehin (µg)
Slepa proba	0	500	250	1250	0
S1	20	480	250	1250	2
S2	40	460	250	1250	4
S3	60	440	250	1250	6
S4	80	420	250	1250	8
S5	100	400	250	1250	10

Reagensi:

F-C reagens: razblažiti komercijalno dostupan F-C reagens (2 N) jednakom zapreminom destilovane vode (1:1, V/V). Do upotrebe čuvati u tamnoj boci u frižideru. Reagens treba da bude zlačkaste boje, nije više za korišćenje ako se boja promeni u maslinasto zelenu.

Natrijum-karbonat (20 %): Na₂CO₃ x 10H₂O se rastvori u destilovanoj vodi.

Nerastvorni polivinil polipirrolidon: komercijalno dostupan reagens PVPP.

Katehin standard (0,1 mg/ml): 25 mg katehina se rastvori u 25 ml destilovane vode, zatim se dobijeni rastvor razblaži destilovanom vodom 10 puta za izradu radnog rastvora (uvek se koristi sveže pripremljen rastvor za izradu kalibracione krive)

Kalibraciona kriva se konstruiše na osnovu izmerenih apsorbaneci rastućih koncentracija katehina (1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml i 5 µg/ml) uz slepu probu, koja umesto rastvora katehina sadrži destilovanu vodu. Na osnovu kalibracione krive se izračunava sadržaj ukupnih polifenola i tanina.

Postupak:

Određivanje ukupnih polifenola: 0,02 ml uzorka (razblaženog ekstrakta) se dopuni destilovanom vodom do 0,5 ml, doda se 0,25 ml FC reagensa i 1,25 ml presičenog rastvora natrijum karbonata. Sadržaj epruvete se dobro promućka a apsorbanacija meri spektrofotometrijski na 725 nm nakon 40 minuta. Sadržaj ukupnih fenola se izračunava pomoću kalibracione krive i izražava u % suve materije (105).

Određivanje ukupnih tanina: Tanini se vezuju na nerastvorni PVPP. Odmeri se 100 mg PVPP u epruvetu, doda 1 ml destilovane vode i 1 ml uzorka (100 mg PVPP je dovoljno da veže 2 mg tanina, ako je sadržaj tanina veći od 10 %, uzorak se mora razblažiti) i dobro promućka. Nakon 15 minuta na 4°C smeša se ponovo promućka, a zatim centrifugira (10 minuta na 3000 obrtaja/min). U supernatantu se nalaze sva fenolna jedinjenja izuzev tanina (tanini su se vezali za PVPP – a još bolje vezivanje tanina za PVPP se postiže na pH 3) pa se on koristi za određivanje ne-taninskih polifenola po istom postupku za određivanje ukupnih polifenola. Međutim, pošto se početni uzorak na početku razblažuje 1:1 vodom i kako u supernatantu nema više tanina, preporučuje se da se za ispitivanje koristi dva ili tri puta veća zapremina uzorka. Sadržaj ne-taninskih polifenola se izražava takođe u % na suhu materiju a iz razlike se dobija % tanina (105).

3.3.4. Određivanje sadržaja fenilpropanoidnih derivata

Sadržaj ukupnih fenilpropanoida se može odrediti spektrofotometrijski, metodom po Arnou-u koja se zasniva na reakciji derivata o-dihidroksicimetne kiseline sa natrijum molibdatom. Sadržaj fenilpropanoida se izražava kao sadržaj odgovarajućeg derivata hidroksicimetne kiseline (107). Postupak određivanja fenilpropanoida u nekim drogama daje Ph. Eur. 6.0. U monografiji droge *Fraxini folium* spektrofotometrijski određen sadržaj fenilpropanoida se izražava kao % hlorogenske kiseline.

Reagensi:

Hlorovodonična kiselina 0,5 M

Reagens rastvor: 10 g natrijum-nitrita i 10 g natrijum-molibdata rastvoreno u 100 ml vode

Natrijum hidroksid 2M

Postupak (Ph. Eur. 6.0.): 300 mg sprasene droge se ekstrahuje sa 95 ml etanola (50%, V/V), uz povratni hladnjak, na vodenom kupatilu 30 minuta a zatim hladi i filtrira. Ekstrakt se prenese u normalni sud od 100 ml i dopuni etanolom (50%, V/V) do crte (osnovni rastvor).

Test rastvor: 1 ml osnovnog rastvora se prenese u normalni sud od 10 ml, doda 2 ml hlorovodonične kiseline (0,5 M), 2 ml reagens rastvora i 2 ml natrijum hidroksida (2M) i dopuni vodom do crte.

Slepa proba: 1 ml osnovnog rastvora se prenese u normalni sud od 10 ml, doda 2 ml hlorovodonične kiseline (0,5 M) i 2 ml natrijum hidroksida (2M) i dopuni vodom do crte.

Apsorbancija uzoraka se meri uz slepu probu na 525 nm, uzimajući da je vrednost specifične apsorbancije hlorogenske kiseline 188, a sadržaj fenilpropanoida se izražava kao sadržaj derivata hidroksicimetne kiseline, prema formuli:

$$\text{hlorogenska kiselina (\%)} = A \times 5,3 / m$$

A = apsorbancija na 525 nm

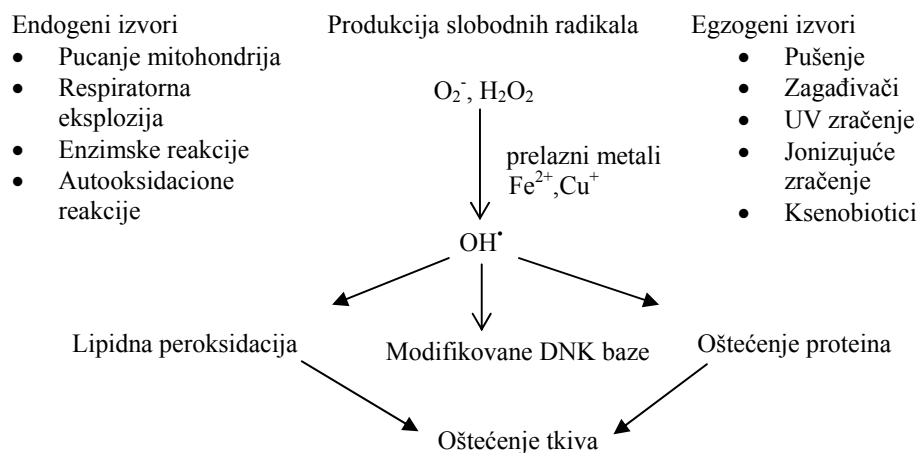
m = masa droge u gramima (27).

4. Skrining farmakološke aktivnosti

4.1. Ispitivanje antioksidativne aktivnosti

Kiseonik je od vitalne važnosti za sve žive organizme, osim za striktne anaerobe. Ipak, paradoks aerobnog načina života je oksidativno oštećenje ključnih bioloških molekula, koje ugrožava strukturu i funkcionisanje živog organizma. Čak i savremeni metabolički putevi poseduju svega par enzima "zaduženih" za molekul kiseonika, iako snabdevanje energijom kompletno zavisi od transfera elektrona ovom akceptoru (108,109).

Postoji mnogo vrsta slobodnih radikala u živom svetu, ali se najviše pažnje (pošto su najvažniji u patološkim poremećajima) posvećuje kiseoničnim radikalima (110,111). Veoma često korišćen termin reaktivne kiseonične vrste – ROS (reactive oxygen species) uključuje ne samo kiseonične radikale već i neke neradikalske derivate kiseonika, tako da su svi kiseonični radikali ROS ali nisu svi ROS radikali (108,112).



Slika 3.2. Glavni izvori slobodnih radikala u telu i posledice njihovog delovanja (110)

Subtoksični nivoi ROS imaju važnu fiziološku ulogu u biološkoj signalizaciji (npr. superoksid radikal je antibiotik izuzetno širokog spektra, medijator inflamacije, prenosnik signala i regulator genske ekspresije). ROS se smatraju mogućim signalnim molekulima za utvrđivanje koncentracije kiseonika u okruženju, pošto se i koncentracija kiseonika (uključujući i hipoksiju) i ROS registruju preko istog mehanizma (108,113,114).

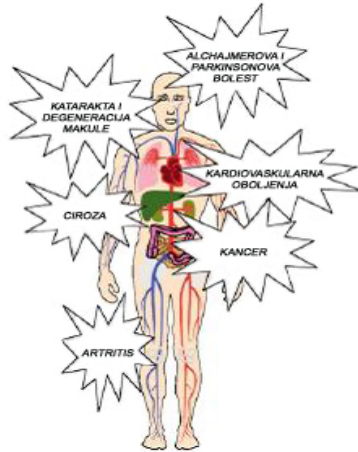
Tabela 3.4. Najvažniji reaktivni oblici kiseonika (ROS)

Radikali		Ne-radikalni oblici	
suproksidni anjon	$O_2^{\cdot-}$	singlet kiseonik	1O_2
peroksidni	HOO^{\cdot}	vodonik peroksid	H_2O_2
hidroksi	HO^{\cdot}	organski peroksidi	ROOH
alil	R^{\cdot}	ozon	O_3
alkoksi	RO^{\cdot}	hipohlorna kiselina	HOCl
peroksi	ROO^{\cdot}		

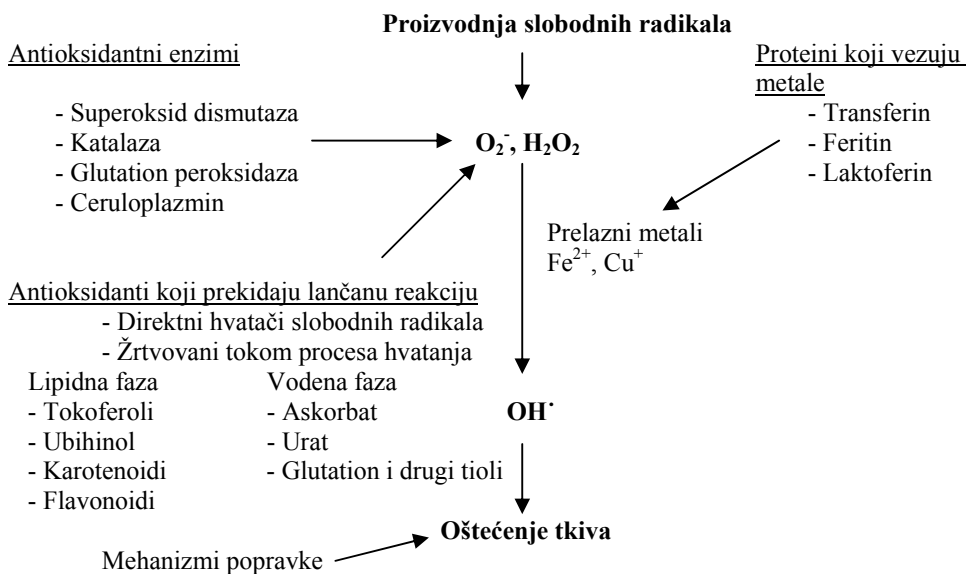
”Antioksidantne strategije” su potrebne da bi se ograničila štetna reakcija između ROS i raspoloživih supstanci – dragocenih supstrata kao što su tiolne grupe proteina, DNK baze i polinezasićene masne kiseline – PUFA (polyunsaturated fatty acids). Oksidativno oštećenje ovih molekula dovodi do inaktivacije enzima, mutacija, pucanja membrana, povećanja aterogenosti LDL-a, disfunkcije mitohondrija i ćelijske smrti. Ovi toksični efekti kiseonika su uključeni u proces starenja i razvoj hroničnih, inflamatornih, degenerativnih i bolesti vezanih za starenje (108,115). Oksidativni stres je uključen i u razvoj gotovo polovine svih humanih karcinoma, a utvrđena je veoma dobra korelacija antioksidativne i antimutagene aktivnosti (116).

Smatra se da oksidativni stres značajno doprinosi razvoju i pogoršanju svih inflamatornih oboljenja (arthritis, vaskulitis, glomerulonefritis, lupus, respiratorni distres sindrom odraslih), ishemijskih oboljenja (bolesti srca, udari, intestinalna ishemija), hemohromatoza, AIDS-a, emfizema, komplikacija transplantacije organa, gastričnog ulcera, hipertenzije i preeklampsije, neuroloških oboljenja (multiple skleroze, amiotrofične lateralne skleroze, mišićne distrofije, Alchajmerove bolesti, Parkinsonove bolesti),

alkoholizma, imunosupresije, dijabetesa, opadanja kose, bolesti povezanih sa pušenjem i mnogih drugih. Razlog što je hiperprodukcija slobodnih radikala osobina tako širokog spektra oboljenja je to što je oksidativni metabolizam neraskidivi deo metabolizma svake ćelije. Kada je ćelija povređena ili obolela to rezultira mitohondrijalnim oštećenjem (influks kalcijuma, cepanje membrana i sl.), pa raste proizvodnja superoksida (108,117-119).



Slika 3.3. ROS izazivaju oštećenje proteina, lipida i DNK menjajući strukturu i funkciju ključnih bioloških molekula i dovodeći do bolesti i poremećaja kao što su: Alchajmerova i Parkinsonova bolest, katarakta i degeneracija makule, kardiovaskularna oboljenja, ciroza jetre, kancer i artritis (117).



Slika 3.4. Antioksidativna odbrana od napada slobodnih radikala. Antioksidantni enzimi katalizuju uništavanje slobodnih radikala. Proteini koji vezuju prelazne metale sprečavaju njihovu interakciju sa vodonik peroksidom i superoksidom, koja bi dovela do nastanka visoko reaktivnih hidroksi radikala. Antioksidanti koji prekidaju lančanu reakciju – snažni donori elektrona reaguju sa slobodnim radikalima pre nego što se oštete ciljni molekuli, sami se oksiduju i moraju biti regenerisani ili zamenjeni. Radikali antioksidanasa su nereaktivni i ne mogu da napadnu druge molekule (110).

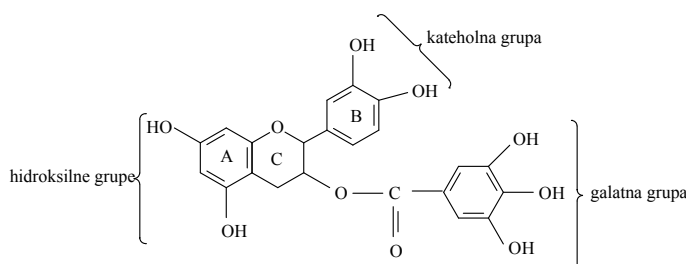
Antioksidanti se mogu podeliti na "endogene" (sastavni deo organizma) i "egzogene" (uneti hranom), a javljaju se i "popravni" antioksidanti (sposobni da poprave nastalo oštećenje koje ROS načine, a to su uglavnom proteaze, lipaze, transferaze i DNK

reper-enzimi) (112). Prema drugoj podeli antioksidativni sistemi odbrane se mogu razvrstati u tri glavne grupe: antioksidantne enzime, proteine koji vezuju prelazne metale i antioksidante koji prekidaju lančanu reakciju (110).

Tabela 3.5. Mehanizmi antioksidativnog dejstva (109)

Mehanizam antioksidativnog dejstva	Primer antioksidanta
Fizička barijera sprečava nastajanje ROS ili njihov prilaz važnim biološkim mestima	UV filtri, ćelijske membrane
Hemijske zamke/tuneli apsorbuju energiju i elektrone, suzbijajući ROS	karotenoidi, antocijanidini
Katalitički sistemi neutrališu ili skreću ROS	antioksidantni enzimi: SOD, katalaza i glutathion reduktaza
Vezujući/inaktivirajući metalne jone sprečavaju stvaranje ROS u Haber-Weiss-ovoj reakciji	feritin, ceruloplazmin, katehini
Žrtveni i antioksidanti koji prekidaju lančanu reakciju, hvataju i uništavaju ROS	askorbinska i urična kiselina, tokoferoli, glutathion, flavonoidi

Opšte je prihvaćeno da sposobnost neutralizacije slobodnih radikala fenolne supstance duguju svojoj osobini donacije vodonika: što je veći broj hidroksilnih grupa to je veća verovatnoća za aktivnost uklanjanja slobodnih radikala (120). U slučaju derivata benzojeve i cimetine kiseline, flavonola i antocijanidina, sa povećanjem broja hidroksilnih grupa raste i antioksidativna aktivnost. Supstance sa 3 OH grupe na fenil prstenu fenolnih kiselina ili na B prstenu flavonoida imaju izraženu antioksidantnu aktivnost. Gubitak jedne hidroksilne grupe blago smanjuje, dok gubitak dve OH grupe drastično utiče na smanjenje aktivnosti. Međutim, ne pokazuju sve OH grupe fenolnih jedinjenja istu reaktivnost. Položaj i stepen hidroksilacije flavonoida, posebno u B prstenu, je od najvećeg značaja kada je u pitanju antioksidativna aktivnost, pri čemu 3',4'-dihidroksi konfiguracija pokazuje aktivnost. Uvođenje metoksi grupe u fenolnu kiselinu povećava antioksidantnu aktivnost (120,121). Raspoloživost hidroksilnih grupa je tesno povezana sa hemijskom strukturom i prostornom konformacijom, koje mogu modifikovati reaktivnost molekula (čak i orijentacija hidroksilne grupe ima uticaja). Efikasnost u neutralisanju slobodnih radikala zavisi od sposobnosti antioksidanta da formira stabilan radikal, pa različiti molekuli šećera mogu ili povećati ili smanjiti stabilnost radikala i uticati na antioksidantnu moć (122).

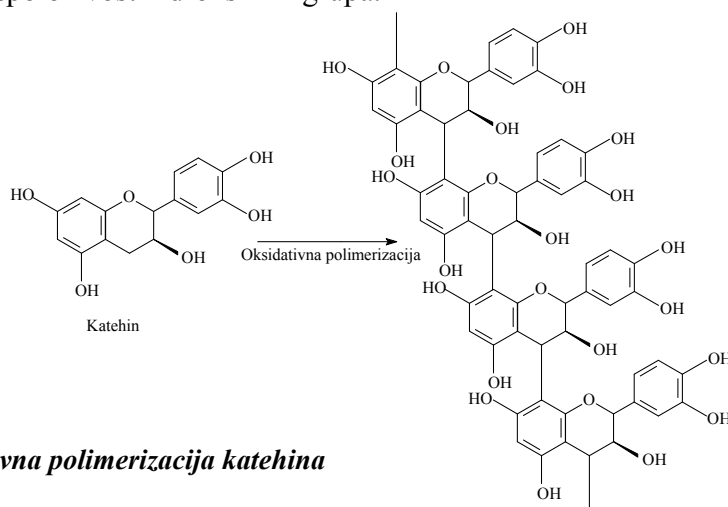


Slika 3.5. Funkcionalne grupe katehina odgovorne za antioksidativnu aktivnost

OH grupa u *orto* položaju se smatra najvažnijom i za tanine kada je u pitanju inhibicija slobodnih radikala. Aktivnost tanina se povećava sa porastom molekulske mase i broja galoilnih grupa. Dimerni, trimerni i polimerni tanini generalno pokazuju jaču aktivnost protiv DPPH radikala u odnosu na monomere i derivate malih molekula (124).

Antioksidativna aktivnost tanina na autooksidaciju PUFA se pripisuje stabilnosti njihovih slobodnih radikala, koji pokazuju dobar efekat neutralizacije drugih radikalskih vrsta (2).

Antiradikalska aktivnost rastvora katehina raste za 50% nakon 2 dana na 25°C, što se objašnjava reakcijama polimerizacije. Niži antiradikalski kapacitet monofenola u odnosu na njihove oligomere se objašnjava većom površinom za delokalizaciju naelektrisanja. Kada stepen polimerizacije pređe kritičnu vrednost, povećanje kompleksnosti molekula smanjuje antioksidantni kapacitet, verovatno usled sternih smetnji koje umanjuju raspoloživost hidroksilnih grupa.



Slika 3.6. Oksidativna polimerizacija katehina

Grupa autora, koja je proučavala antioksidativnu aktivnost fenola hrane, je došla do zaključka da aktivnost fenola u različitim rastvaračima po vrednostima sledi redosled: etanol > metanol > voda, odnosno da sa porašću polarnosti rastvarača raste i antioksidativna aktivnost (123).

I oksidanti i antioksidanti imaju različite hemijske i fizičke karakteristike. Pojedinačni antioksidanti mogu, u nekim slučajevima, delovati različitim mehanizmima u istom sistemu ili se jedan mehanizam dejstva može razlikovati u zavisnosti od reakcionog sistema. Antioksidanti čak mogu na različite načine da odgovore na različite radikale ili izvore oksidanata. Zbog višestrukih karakteristika reakcije i mehanizama dejstva, kao i različitih faza i lokalizacija u kojima se reakcije dešavaju, pojedinačno ispitivanje nikada neće u potpunosti rasvetliti sve izvore radikala ili sve antioksidante u kompleksnim sistemima. Ne postoji jednostavna, univerzalna metoda kojom se ukupan antioksidantni kapacitet može kvantitativno i precizno izmeriti (103).

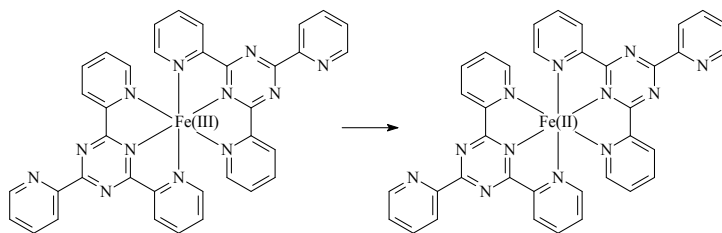
Postoje brojni testovi za određivanje antioksidativnog potencijala, ali se svi oni mogu podeliti u dve grupe: ispitivanje sposobnosti uklanjanja radikala i ispitivanje sposobnosti inhibicije lipidne peroksidacije – LP pod uslovima koji je favorizuju. Test sistemi za procenu sposobnosti uklanjanja radikala mere redukciju ili stabilnih radikala ili radikala generisanih radiolizom, fotolizom ili Fentonovom reakcijom. Ubrzani test sistemi za ispitivanje sposobnosti inhibicije LP uglavnom uključuju lipide koji se brzo oksiduju, da bi se oponašao dugi indukcionni period za kratko vreme, a za ubrzavanje oksidacije koristi se povišena temperatura (125).

U cilju ispitivanja antioksidativne aktivnosti ekstrakata odabranih vrsta porodice Ericaceae korišćeno je određivanje ukupnog redukcionog potencijala ekstrakata (FRAP-metodom), dva test sistema za ispitivanje sposobnosti inhibicije LP (određivanje intenziteta inhibicije LP u lipozomima i određivanje sposobnosti inhibicije obezbojavanja β -karotena) i test sistem za utvrđivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (uz stabilan DPPH[•] radikal).

4.1.1. Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP-metodom

FRAP-metoda

Benzie i Strain su 1996. godine razvili i prvi put izveli merenje redukcionog statusa plazme u cilju utvrđivanja njene antioksidantne sposobnosti. Ova jednostavna metoda određuje redukciju feri-tripiridiltriazin kompleksa (feri-2,4,6-tripiridil-s-triazina ili Fe(III)-TPTZ) u njegov intenzivno plavo obojen fero oblik (Fe(II)-TPTZ) na niskoj pH u prisustvu antioksidanata plazme, odnosno sposobnost plazme da redukuje feri jone (Ferric reducing ability of plasma ili FRAP). Test uslovi favorizuju redukciju feri-kompleksa i razvijanje intenzivno plave boje sa maksimumom apsorpcije na 593 nm. Na početku dizajnirana za određivanje antioksidantne sposobnosti plazme, metoda se ubrzo primenjuje i na druge supstrate pa se naziv menja u: ispitivanje antioksidantne moći redukcijom gvožđa (Ferric reducing/antioxidant power assay), pri čemu skraćenica ostaje FRAP. Metoda je pogodna za merenje ukupnog antioksidantnog kapaciteta lekovitog bilja i biljnih ekstrakata (103,126-128).



Slika 3.7. Šema reakcije: Fe^{3+} -TPTZ + redukujući antioksidant \rightarrow Fe^{2+} -TPTZ (intenzivno plave boje na 593 nm)

Pošto se redukcija feri oblika gvožđa u fero oblik javlja veoma brzo u slučaju reduktanata sa redukcionim potencijalom nižim od potencijala Fe^{3+}/Fe^{2+} (reakcijom se određuju supstance sa redoks potencijalom manjim od 0,7 V – redoks potencijal Fe^{3+} -TPTZ), FRAP vrednosti odgovaraju koncentraciji elektron-donirajućih antioksidanasa. FRAP koristi antioksidante kao reduktante u redoks reakciji koja je i kolorimetrijska. Nije potrebna duga i komplikovana priprema uzorka, steometrijski faktori su konstantni a linearnost se održava u veoma širokom opsegu. Sposobnost redukcije je povezana sa stepenom hidroksilacije i konjugacije u polifenolima. Ipak, FRAP ne može detektovati komponente koje deluju neutralisanjem radikala (H transfer), pogotovo ako se radi o tiolima (glutation) i proteinima, što je priličan nedostatak kada je serum uzorak. Ovaj nedostatak (reakcija se ne odvija sa tiolima pošto je njihov redukcionni potencijal ispod potencijala para Fe^{3+}/Fe^{2+}) nije toliko važan kada se ispituje biljni materijal. Samo ograničene količine biljnog glutaciona se apsorbuju u GIT, a gotovo da i nema drugih antioksidantnih tiola u biljkama zastupljenim u ishrani (izuzetak je beli luk), pa je FRAP pogodna metoda za utvrđivanje količine ukupnih biljnih antioksidanata (103,129).

FRAP se izvodi na niskoj pH vrednosti (pH 3,6 – da bi se održala rastvorljivost gvožđa) što snižava jonski a povećava redoks potencijal. Međutim, pošto redukovani metali aktivno šire broj slobodnih radikala tako što redukuju hidroperoksidi do RO[•], treba ispitati da li visoke FRAP vrednosti koreliraju sa tendencijom polifenola da postanu prooksidanti u nekim uslovima (ovo je utvrđeno za neke flavone i flavonoide sa visokim FRAP vrednostima) (103).

Reagensi:

Acetatni pufer, 300 mmol/l, pH = 3,6 (3,1 g NaCH₃COO x 3H₂O i 16 ml koncentrovane sirćetne kiseline za 1 l rastvora pufera)

40 mmol/l HCl (0,62 ml koncentrovane HCl se razblaži destilovanom vodom do 500 ml)

TPTZ – reagens: 10 mmol/l TPTZ (2,4,6 – tripiridil – S – triazin) rastvoren u 40 mmol/l HCl (0,078 g TPTZ u 25 ml razblažene HCl)

FeCl₃ x 6H₂O: 20 mmol/l FeCl₃ x 6H₂O (1,3515 g FeCl₃ x 6H₂O rastvoreno u destilovanoj vodi do zapremine od 250 ml)

FeSO₄ x 7 H₂O: 1 mmol/l (0,0695 g FeSO₄ x 7 H₂O rastvoreno u 250 ml destilovane vode)

FRAP reagens se priprema mešanjem sva tri rastvora u odnosu 10:1:1 (FRAP radni rastvor: 50 ml acetatnog pufera, 5 ml TPTZ rastvora i 5 ml rastvora FeCl₃ x 6H₂O, se uvek priprema svež).

Kalibracija: vodeni rastvori poznatih koncentracija Fe (II) jona (razblaženja 1 mmol/l rastvora FeSO₄ x 7 H₂O) se koriste za konstruisanje kalibracione krive (u opsegu koncentracija 100-1000 µmol/l).

Postupak: U 100 µl ekstrakta droge (ili rastvorenog suvog ekstrakta droge) dodaje se 3000 µl FRAP reagensa i nakon 5 minuta se meri apsorbanacija na 593 nm u odnosu na slepu probu (100 µl rastvarača u kome je rastvaran ekstrakt i 3000 µl FRAP reagensa) (130).

Izračunavanje ukupnog antioksidativnog potencijala ispitivanog ekstrakta se vrši na osnovu kalibracione krive. Relativna aktivnost uzoraka se može dobiti poređenjem njihove aktivnosti sa aktivnošću Troloksa ili L-askorbinske kiseline (127).

4.1.2. Određivanje intenziteta inhibicije lipidne peroksidacije

Test inhibicije lipidne peroksidacije u lipozomima

LP oksidacija se javlja kada kiseonik reaguje sa lipidima u seriji slobodnoradikalnih lančanih reakcija koje vode složenim hemijskim promenama. Oksidacija lipida hrane narušava njen kvalitet. *In vivo*, LP može učestvovati u razvoju koronarnih oboljenja, ateroskleroze, kancera i starenja (121).

LP je metabolički proces normalno prisutan u aerobnim uslovima, a predstavlja i najistraženiju posledicu aktivnosti ROS na membransku strukturu i funkciju. PUFA, najvažniji lipidi membrane, su lako podložne peroksidaciji (114). Krajnji efekti LP su smanjenje fluidnosti membrane, olakšavanje razmene fosfolipida između dva sloja dvostrukog omotača, porast propustljivosti membrane za supstance koje obično prolaze kroz nju isključivo kroz specifične kanale (npr. K⁺ i Ca²⁺), i oštećenje membranskih proteina, inaktivacija receptora, enzima i jonskih kanala. Neki krajnji proizvodi LP i sami pokazuju štetna dejstva (izoprostani – Ips, ciklični peroksidi nastali iz PUFA sa bar tri

dvostruke veze, uključujući linolensku, arahidonsku – F₂Ips, eikozapentanoičnu – F₃Ips i dokozaheksanoičnu kiselinu – F₄Ips, ponekad zvane i neuroprostani). Pojačano formiranje Ips je uočeno kod mnogih bolesti i nakon izlaganja eksperimentalnih životinja velikom broju toksina, a neki Ips deluju kao vazokonstriktori i oštećuju tkivo. Fitoprostani (Ips iz linoleata) su zastupljeni u biljkama, ali njihovi efekti nisu toliko proučeni kao efekti životinjskih Ips (111).

Razlaganje lipidnih peroksida ubrzano jonima gvožđa ili bakra ili zagrevanjem (npr. korišćenje oksidisanih ulja za kuvanje) daje složenu smešu toksičnih proizvoda, uključujući epoksidge, zasićene aldehide, nezasićene aldehide, ketone i ugljovodonike kao što su etan i pentan. Posebno toksični aldehidi su malonildialdehid – MDA (nastaje peroksidacijom iz linolenske, arahidonske ili dokozaheksanoične kiseline) i 4-hidroksinonenal (nastaje iz peroksida linolenske i arahidonske kiseline). Oba se intenzivno vezuju za membranske proteine, inaktivirajući enzime i receptore, a mogu napasti i DNK i stvoriti mutagene lezije (111).

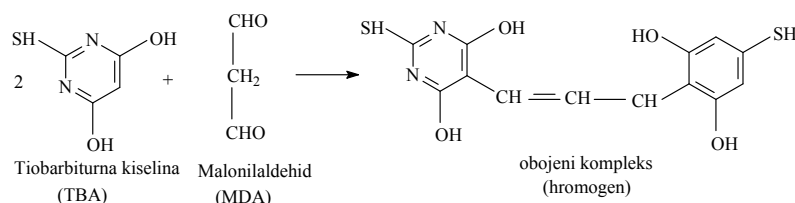
Postojanje LP se može utvrditi ukoliko se pri zagrevanju uzorka (hrana, biološko tkivo ili tečnost) sa 2-tiobarbiturnom kiselinom – TBA (thiobarbituric acid) u kiseloj sredini razvije jasna ružičasta boja. Supstance koje reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom – TBARS (Thiobarbituric Acid Reacting Substances) su sekundarni proizvodi LP; to su uglavnom aldehidi, pri čemu je najzastupljeniji upravo toksični MDA (113,123).

Iako TBA test ima značaj za ispitivanje oksidacije u definisanom lipidnom sistemu (hrana, mikrozomi – pokazuju izuzetnu sposobnost da *in vitro* podležu LP i sl.), ne može se koristiti za poređenje peroksidacije različitih sistema sa različitim PUFA sastavom (različite PUFA daju različite nivoe TBARS), pa ako se koristi sam on je nepouzdan indeks nivoa LP u ćelijama, tkivima ili telesnim tečnostima (113).

Određivanje intenziteta LP u prisustvu kiseoničnih slobodnih radikala se često koristi u medicinskim i biološkim istraživanjima. Metoda određivanja antioksidativnog kapaciteta na osnovu sposobnosti inhibicije LP se zasnivana na merenju nivoa TBARS u Fentonovoj reakciji, pri čemu se detektuje neenzimska autooksidacija. Fe(II)-EDTA kompleks u vodenom rastvoru polako daje O₂⁻ koji brzo prelazi u H₂O₂ na pH 7,4 a H₂O₂ interaguje sa Fe²⁺ i formira OH• u prisustvu askorbinske kiseline kao katalizatora:

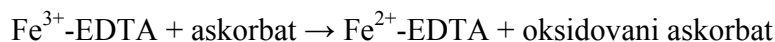


Slobodni radikal OH• napada nezasićene lipide membrane i gradi MDA, koji se može detektovati na osnovu osobine da reaguje sa TBA i formira ružičasti hromogen.



Slika 3.8. Šema reakcije nastajanja ružičasto obojenog hromogena u reakciji MDA i TBA

Uloga askorbata je da redukuje Fe^{3+} u Fe^{2+} i na taj način favorizuje Fentonovu reakciju:



Količina MDA je srazmerna odigranoj LP. U reakciji MDA sa TBA nastaje kompleks koji se može određivati spektrofotometrijski, pa se LP u uzorku može proceniti na osnovu proizvodnje TBARS (131,132).

Praćenje nastajanja MDA iz lipida tokom oksidacije je najšire i najčešće korišćena *in vitro* metoda za određivanje LP (133). Ranije su se TBARS *in vitro* određivali neenzimatskom peroksidacijom mikrozoma jetre pacova, međutim, metoda je bila nepogodna za višestruka određivanja, složena i skupa zbog pripreme mikrozoma. Linolenska kiselina (C 18:3), bilo slobodna ili esterifikovana u fosfolipidima, je efikasan hvatač $\text{OH}\cdot$ u lipidnoj autooksidaciji uz formiranje MDA. Linolna kiselina (C 18:2) je nešto manje efikasna, ali je stabilnija na svetlosti. U cilju postizanja stabilnijeg i reproduktivnijeg sistema, koriste se sintetske membrane (lipozomi) pa je odgovarajuća metoda inhibicija LP u lipozomima (132).

Reagensi:

Rastvor za ekstrakciju: 10 ml 10% HClO_4 zasiti se na hladno sa TBA i doda 30 ml 20% trihlorsirćetne kiseline (TCA) (ili za 100 ml TBA reagensa: 0,375 g TBA, 15 g TCA i 2,1 ml HClO_4 se rastvori u destilovanoj vodi i dopuni do 100 ml)

0,075 mol/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$: 0,2085 g $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ do 10 ml dopunjeno vodom

0,1 mol/l askorbinske kiseline (0,0882 g askorbinske kiseline do 5 ml dopunjeno vodom)

0,1 mol/l EDTA (3,72 g kompleksona III dopunjeno do 100 ml vodom)

Fosfatni pufer pH = 7,4 (17,6 ml 0,5 mol/l KH_2PO_4 i 60,8 ml 0,5 mol/l Na_2HPO_4 dopunjeno destilovanom vodom do 1000 ml)

Lipozomi (0,03 g lecitina/ml): komercijalni preparat lipozoma (30%) se razblaži destilovanom vodom (1:10) na ultrazvučnom kupatilu na sobnoj temperaturi 30 minuta.

Postupak: Lipozomi (50 μl) se inkubiraju 60 min na 37°C sa 0,075 mol/l FeSO_4 (20 μl), rastvorom ekstrakta (10 μl) i 0,1 mol/l askorbinske kiseline (20 μl). Za svaki ispitivan ekstrakt uzeto je 5 različitih koncentracija i sa njima je izvršeno ispitivanje u 3 ponavljanja. Nakon inkubacije reakcija se prekida dodavanjem 1,5 ml rastvora za ekstrakciju (TBA-reagens) i 0,2 ml EDTA, a zatim zagreva na ključalom vodenom kupatilu 15 min, ohladi i centrifugira na 3000 obrtaja 10 minuta. Apsorbancija se očitava na 533 nm.

Istovremeno se radi i kontrola u 3 ponavljanja (ona sadrži sve reagense sem ekstrakta), kao i slepa proba (sadrži pufer, lipozome i rastvarač u kome je rastvaran ekstrakt).

Analiza: 3,9 ml fosfatnog pufera + 20 μl rastvora FeSO_4 + 50 μl rastvora lipozoma + 10 μl ekstrakta odgovarajućeg razblaženja + 20 μl rastvora askorbinske kiseline

Kontrola: 3,9 ml fosfatnog pufera + 20 μl rastvora FeSO_4 + 50 μl rastvora lipozoma + 10 μl rastvarača u kome je ekstrakt rastvaran + 20 μl rastvora askorbinske kiseline

Slepa proba: 3,95 ml fosfatnog pufera + 50 μl rastvora lipozoma + 10 μl rastvarača u kome je ekstrakt rastvaran

Izračunavanje:

$$\text{nmol (MDA)/g} = A \times 32,54 \times \text{razblaženje}$$

Inhibicija LP se određuje iz razlike apsorbance uzorka i kontrole prema sledećoj formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = 100 - A \times 100 / K$$

A = apsorbanca analize

K = apsorbanca kontrole (134).

Test inhibicije obezbojavanja β -karotena

Pored direktnih metoda baziranih na praćenju lančane reakcije LP (kao što je određivanje intenziteta inhibicije LP u lipozomima), postoje i direktne kompetitivne metode koje se baziraju na praćenju kinetike ne-lančanih procesa. U ovakvim kinetičkim modelima, prirodni antioksidanti se takmiče za peroksi radikal sa referentnim hvatačem slobodnih radikala (135).

Metoda određivanja sposobnosti inhibicije obezbojavanja β -karotena se bazira na kompetitivnom izbeljivanju β -karotena tokom autoksidacije linolne kiseline u vodenim emulzijama, pri čemu se prati opadanje apsorbance u vidljivoj oblasti. Karotenoidi su antioksidanti koji veoma efikasno *in vitro* prekidaju lančane reakcije, a β -karoten snažno uklanja singletni kiseonik. Dodatak uzorka koji sadrži antioksidante, pojedinačnog antioksidanta ili prirodnih ekstrakata rezultira u zaustavljanju raspadanja β -karotena. Međutim, antioksidativna aktivnost se može izraziti samo kao procenat inhibicije a oksidacija se dešava pod nekontrolisanim uslovima koji otežavaju ponovljivost (135,136).

Reagensi: β -karoten, linolna kiselina, hloroform, Tween 20

Priprema reakcione emulzije: 1 mg β -karotena se rastvori u 5 ml hloroforma. U 1 ml ovog rastvora se doda 25 μ l linolne kiseline i 200 mg emulgatora Tween 20, pa se smeša upari pod vakumom na temperaturi do 40°C. U ostatak se doda 50 ml sveže kiseonikom zasićene vode (voda u koju je 30 minuta uveden kiseonik) i emulzija mućka do izbistravanja.

Postupak:

U polje mikrotitarske ploče sa 96 mesta za uzorke se unosi 25 μ l ekstrakta odgovarajućeg razblaženja i 200 μ l reakcione emulzije. Kontrola sadrži 25 μ l rastvarača umesto rastvora ekstrakta. Apsorbance se očitava na ELISA čitaču na talasnoj dužini od 450 nm nakon mućkanja ploče na mikroplejt-šejkeru. Nakon očitavanja početne apsorbance, ploča se smešta u inkubator na 55°C na 120 minuta, nakon čega se ponovo očitava apsorbance (137). Sposobnost inhibicije obezbojavanja β -karotena se izražava u procentima inhibicije prema formuli (138):

$$\% \text{ inhibicije} = (A_{120} / A_0) \times 100$$

A_{120} = apsorbance očitana u t=120 min

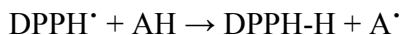
A_0 = apsorbance očitana u t=0 min.

4.1.3. Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala

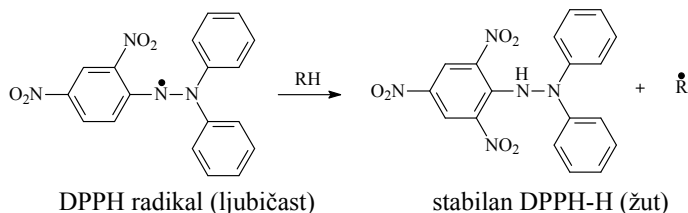
DPPH metoda

2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal je jedan od par stabilnih organskih azotnih radikala (široko se koristi u studijama antioksidativne aktivnosti pojedinačnih supstanci, biljnih ekstrakata, hrane i sl.), komercijalno je dostupan a odlikuje se tamno ljubičastom bojom. Metoda se bazira na redukciji alkoholnog rastvora DPPH[•] na 517 nm u

prisustvu antioksidanta (AH), uz formiranje ne-radikalskog oblika DPPH-H i smanjenje apsorbanca – obezbojavanje DPPH[•] koje se prati spektrofotometrijski (137):



Preostali DPPH[•], izmeren nakon određenog vremena, je obrnuto srazmeran sposobnosti antioksidanta da uklanja radikale. Osetljivost metode se zasniva na snažnoj apsorpciji DPPH[•].



Slika 3.9. Šema redukcije DPPH[•] u DPPH-H

Koncentracija koja snižava početnu koncentraciju DPPH[•] za 50% se definiše kao IC₅₀. Test je brz i jednostavan, zahteva samo UV/VIS spektrofotometar, ali je interpretacija rezultata otežana kada spektar ispitivane supstance prekriva spektar DPPH (tako npr. interferiraju karotenoidi). Test nije kompetitivna reakcija, pošto je DPPH i radikal i oksidant, a boja se može izgubiti i radikalskom reakcijom (transfer elektrona) i redukcijom (transfer atoma vodonika), kao i drugim nevezanim reakcijama. Sterna dostupnost je najvažnija determinanta reakcije (mali molekuli koji imaju bolji prilaz radikalu ispoljavaju veći antioksidantni potencijal). Reakcija je linearna u relativno uskom opsegu, DPPH je stabilan azotni radikal koji nema sličnosti sa visoko reaktivnim i pokretnim peroksi radikalima koji su uključeni u LP, mnogi antioksidanti koji brzo reaguju sa peroksilnim radikalima mogu reagovati sporo ili biti inertni prema DPPH radikalu usled sterne nepristupačnosti, pa antioksidativni kapacitet nije u potpunosti srazmeran sposobnosti antioksidanta da reaguje sa DPPH[•] (103).

Ipak, brza i jednostavna DPPH metoda ne zahteva skupe reagensne i opremu i veoma je korisna u traženju novih antioksidanata u fitohemijskim ispitivanjima. Pozitivne strane su i to što hidrofilnost/lipofilnost uzorka ne utiče na aktivnost uklanjanja DPPH radikala i što se reakcija odvija na sobnoj temperaturi pa se eliminiše rizik od termalne degradacije testiranih molekula (137,139).

Reagens: 0,05 mmol/l DPPH (2,2 – diphenil – 1 – picril – hidrazil) (9,86 mg dopunjeno do 50 ml etanolom ili metanolom)

Postupak I: U epruvete se prenesu rastuće zapremine (0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml i 1 ml) rastvora ekstrakta (rastvorenog u etanolu ili metanolu) odgovarajuće koncentracije, epruvete se dopune rastvaračem do 1 ml, doda se još po 3 ml rastvarača i na kraju i po 1 ml sveže pripremljenog DPPH reagensa u svaku epruvetu. Epruvete se ostave 30 minuta u mraku i nakon toga se očitava apsorbanca na 517 nm u odnosu na korišćeni rastvarač (metanol ili etanol) kao slepu probu. Paralelno se radi i kontrola koja sadrži 4 ml rastvarača i 1 ml DPPH reagensa (140).

Postupak II (prilagođen očitavanju na ELISA čitaču): U polja mikrotitarske ploče sa 96 mesta se pipetira po 40 µl odgovarajućeg razblaženja ekstrakta (rastvorenog u etanolu ili metanolu), 120 µl rastvarača i, na kraju, po 40 µl svežeg DPPH reagensa. Ploča se ostavi 30 minuta u mraku i nakon toga se očitava apsorbancija na 540 nm u odnosu na korišćeni rastvarač (metanol ili etanol) kao slepu probu. Paralelno se pipetira i očitava i kontrola koja sadrži 160 µl rastvarača i 40 µl DPPH reagensa.

Izračunavanje procenta neutralizacije slobodnog radikala se vrši na osnovu jednačine:

$$\% = (A_k - A_a) / A_k \times 100$$

A_k = apsorbancija kontrole

A_a = apsorbancija analize

Sposobnost neutralizacije slobodnog radikala se može odrediti na osnovu vrednosti IC50, odnosno koncentracije ekstrakta koja uklanja (neutrališe) 50% stabilnog DPPH radikala iz rastvora (140).

4.2. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti

Infektivne bolesti izazvane bakterijama, gljivicama, virusima i parazitima su, uprkos ogromnom napretku u medicini, još uvek velika pretnja zdravlju čoveka. Od otkrića penicilina, 1941. godine, započela je moderna era (neracionalne) upotrebe antibiotika. Tokom poslednje tri dekade drastično raste rezistencija patogena na mnoge od njih, pa se neprekidno traga za novim antimikrobnim agensima (bilo sintetskim molekulima bilo prirodnim proizvodima), kojima bi se prevazišao problem rezistencije i neželjenih efekata trenutno raspoloživih antimikrobnih sredstava. Iako je većina prirodnih antibiotika izolovana iz mikroorganizama zemljišta, ova ispitivanja uključuju i biljke (kao najstariji i najdostupniji izvor farmakološki aktivnih jedinjenja), bakterije, gljive, morske organizme i životinje. Uprkos tome što čovek do kraja 18. veka nije znao ništa o prirodi infektivnih bolesti, još od starog doba je koristio biljke za njihovo lečenje (najraniji pisani tragovi: Pen Tsao 3000. p.n.e., Eberesov papirus 1500. god. p.n.e. i "De Medicina" Kalzijusa), a neki od tradicionalnih lekova su još uvek uključeni u uobičajeni tretman različitih oboljenja. Ispitivanje biljnih vrsta, posebno onih koje se koriste u narodnoj medicini, obezbeđuje značajnu početnu informaciju u traganju za novim lekovima (40,141,142).

S obzirom na količinu fitopatogenih mikroorganizama u zemljištu, vazduhu i vodi, postojanje zaštitnih mehanizama omogućava biljkama normalan životni ciklus. Biljke proizvode širok spektar sekundarnih metabolita, od kojih mnogi poseduju antimikrobnu aktivnost. Ova jedinjenja se mogu podeliti na konstitutivne – preinfektivne i fitoaleksine – postinfektivne agense. Često su konstitutivne supstance u jednoj vrsti fitoaleksini u drugoj. Postoji i termin "fitoanticipini" (predložen od strane Mansfield-a 1983. i Van Etten-a 1995.) koji obuhvata ostale biljne antimikrobne supstance koje nisu pravi fitoaleksini, odnosno nisu rezultat *de novo* sinteze enzima nakon napada patogena (40,143).

Distribucija antimikrobnih supstanci u biljkama je često tkivno-specifična. Postoji tendencija da se ove supstance koncentrišu u spoljašnjim slojevima biljnog organizma, što ukazuje na to da oni zaista predstavljaju odbranu od patogena i parazita. Ipak, kod zdravih

biljaka su antimikrobne supstance najčešće smeštene u vakuolama ili organelama. Priroda i nivo antimikrobnih agensa će veoma zavistiti od faktora kao što su: genotip, faza razvoja biljke i brojni faktori okoline (vrsta zemljišta, klimatski uslovi i sl.) (40,144).

Obično su fenolna jedinjenja aktivne komponente biljaka sa antimikrobnim efektom, pri čemu su Gram (+) bakterije najosetljiviji mikroorganizmi (145).

Supstance prirodnog porekla (polifenoli, terpenoidi, alkaloidi i poliacetileni) mogu delovati na bakterije, viruse, protozoe i gljivice. Izolovan je veliki broj jedinjenja sa značajnom antimikrobnom aktivnošću, ali se najčešće ne mogu koristiti zbog visoke toksičnosti (57). Međutim, timol je jači antiseptik od fenola a pri tom manje toksičan; upravo su etarska ulja obično najefikasnija prema mikroorganizmima (koji izazivaju infektivna oboljenja respiratornog, urinarnog, gastrointestinalnog sistema, žučnih puteva i kože) od brojnih prirodnih proizvoda koji pokazuju antibakterijsko dejstvo (145,146).

Tanini i drugi polifenoli pokazuju i antiviralan efekat, a puno biljaka sadrži i etarska ulja i polifenole. Nasuprot antibioticima, u mnogim slučajevima ove supstance pokazuju širok spektar dejstava. Polifenoli se obično primenjuju i interno i eksterno, dok se etarska ulja aplikuju spolja ili, izuzetno, mogu biti ingestirane manje količine (146).

Testovi antimikrobne osetljivosti

Pored klasičnog testa antimikrobne osetljivosti (na bakterijama izolovanim iz kliničkih uzoraka za koje se smatra da su uzročnik infekcije, a ne zna se kako na njih deluje poznati antimikrobni agens), testovi antimikrobne osetljivosti se izvode i na komercijalno dostupnim mikroorganizmima ili izolovanim i definisanim mikroorganizmima, a u cilju ispitivanja antimikrobnog potencijala različitih agenasa (ispitivanja mogućnosti korišćenja medicinskog bilja, ekstrakata i prirodnih proizvoda bilo samostalno, u kombinaciji ili zajedno sa antibioticima) (147).

Metode antibakterijskih i antifungalnih testova se klasifikuju u tri glavne grupe: diluciona, difuziona i bioautografska metoda. Četvrta metoda koja će tek naći svoju širu primenu je konduktometrijsko ispitivanje (detektuje rast mikroorganizama kao promenu u električnoj provodljivosti ili promenu otpora medijuma) (142).

Disk difuzioni metod (poznat i pod nazivom Kirby Bauer test) se intenzivno koristi u kliničkim laboratorijama još od 1966, kada je prvi put opisana standardizovana metoda. McFarland-ova 0,5 standardizovana suspenzija (suspenzija koja sadrži $1,5 \times 10^8$ CFU/ml – Colony Forming Unit/ml) se prelije preko površine petrijevke sa agarom a zatim se na površinu podloge inokulišu pojedinačne koncentracije antimikrobnog agensa koji se testira. Nakon inkubacije tokom noći, očitava se prečnik zona inhibicije bakterijskog rasta, a zatim se bakterijski izolat ocenjuje kao osetljiv, intermedijeran ili rezistentan na ispitivan antimikrobni agens u skladu sa važećim kriterijumima.

Kod disk difuzionog metoda se javlja gradijent antimikrobne koncentracije kako antimikrobni agens difunduje u agar – koncentracija opada kako raste rastojanje od diska. Na kritičnoj tački, količina agensa na datoj lokaciji nije u stanju da inhibira rast testiranog organizma, i zona inhibicije je formirana. Prečnik zone inhibicije koji okružuje postavljeni

antibiotik smatra se merom inhibitorne snage antibakterijske supstance u odnosu na određeni testirani mikroorganizam. Pored jednostavne interakcije leka i mikroorganizma, ova metoda zavisi i od mnogih drugih fizičkih i hemijskih faktora (npr. priroda hranjive podloge i difuzibilnost, veličina molekula i stabilnost leka). Ipak, standardizacija uslova pruža mogućnost kvantitativnog testiranja snage testiranog uzorka ili osetljivosti mikroorganizma. Mala zapremina uzorka i mogućnost testiranja do 6 ekstrakata po ploči na jedan mikroorganizam su specifične prednosti ove metode, međutim, ona nije pogodna za testiranje nepolarnih uzoraka ili uzoraka koji ne difunduju lako u agar. Opšte uzevši, relativni antimikrobni potencijal različitih uzoraka se ne može uvek porediti, pre svega zbog razlika u fizičkim karakteristikama kao što su rastvorljivost, isparljivost ili difuzione karakteristike u agaru (142,144,147).

Difuzioni metod je pogodan za ispitivanje polarnih supstanci male ili srednje molekulske mase i određivanje antimikrobnog spektra, pošto omogućava testiranje različitih komponenata protiv jednog mikroorganizma. Ipak, metod tečne dilucije je najbolji način da se utvrdi realan potencijal čiste supstance, ali je neophodno da ona bude rastvorljiva (145).

Dilucioni antimikrobni test osetljivosti se obično koristi u cilju određivanja minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), odnosno najniže koncentracije antimikrobnog agensa koja inhibira rast bakterijskog izolata. Različite koncentracije antimikrobnog agensa se dodaju u tečni ili u čvrsti medijum. Hranjive podloge se zatim inokulišu bakterijskim slojevima i inkubiraju. Pod graničnom tačkom se podrazumeva količina antibakterijske supstance koja je dovoljna da inhibira ili ubije testirane bakterije. Prednost mikrodilucionog testa je što pruža kvantitativan rezultat, ukazujući na količinu određene antibakterijske supstance koja je potrebna da se inhibira (ili ubije) testirani mikroorganizam (142,147).

Postupak: Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata vrsta familije Ericaceae je ispitivana disk – difuzionom metodom, korišćenjem 10 sojeva mikroorganizama. Kontrolu su predstavljali: rastvarač u kome je rastvaran ekstrakt (70% etanol), kristal-violet (1mg/ml) i antibiotik na koji je ispitivan mikroorganizam osetljiv (gotovi fabrički diskovi tetraciklina, streptomcina ili penicilina). Korišćeni su standardni mikroorganizmi iz kolekcija ATCC (American Type of Culture Collection) i NCIMB (National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen), kao i dva laboratorijska soja:

Gram (+) bakterije:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC29213
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC12228
<i>Micrococcus flavus</i>	ATCC10240
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC10707
<i>Sarcina lutea</i>	ATCC9391

Gram (–) bakterije:

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC9027
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NCIB9111
<i>Escherichia coli (E. coli)</i>	ATCC25922

E. coli
E. coli

SY252 (laboratorijski soj oslabljenog zida)
LPCA (laboratorijski soj divlje *E. coli*)

Sojevi su zasejani u tečnu podlogu (u epruvetama) i inkubirani preko noći (prekonoćne kulture). Korišćene su top agar (6 g agara, 5 g NaCl i destilovana voda za 1000 ml podloge) i Mueller – Hinton hranjiva podloga (38 g čvrste podloge se rastvara u destilovanoj vodi za 1000 ml podloge). Napravljene podloge se zajedno sa papirnim diskovima sterilisu u autoklavu. Pre početka ispitivanja antibakterijske aktivnosti pertijeve šolje sa razlivenom podlogom se preko noći inkubiraju na 37°C, radi provere sterilnosti. Inkubira se i 10 obeleženih petrijevki sa podlogom na koju su naneti odabrani sojevi bakterija za proveru viabilnosti 10 kultura mikroorganizma (išarane ploče prekonoćnih kultura mikroorganizama koji će se koristiti za ispitivanje).

Na sterilnu postojeću podlogu u petrijevim šoljama se nanosi smeša od 3 ml top agara i 0,1 ml prekonoćne kulture mikroorganizma. Po očvršćavanju podloge se nanose sterilni papirni diskovi, a na njih ekstrakt odgovarajućeg razblaženja, rastvarač i rastvor kristalvioleta ili čvrst disk antibiotika. Čitav eksperiment se izvodi uz otvoreni plamenik, da bi se izbegla kontaminacija. Zapremine uzoraka koji se nanose su 10 ili 20 µl.

Sledećeg dana se očitavaju zone inhibicija i precizno mere njihovi dijometri. Veličina zone inhibicije se očitava milimetarskim meračem (pri čemu rezultujuća zona inhibicije uključuje i prečnik papirnog diska).

Antibakterijska aktivnost se određuje upoređivanjem zona inhibicije uzoraka sa kontrolom, a rezultati se izražavaju kao prečnici zona inhibicije rasta mikroorganizama i kao % aktivnosti komercijalnog antimikrobnog sredstva (odgovarajući antibiotik i kristalviolet).

4.3. Ispitivanje spazmolitičke aktivnosti

Tanko crevo čoveka ima važnu ulogu u sekreciji i resorpciji vode i elektrolita, skladištenju, a zatim transportu crevnog sadržaja i preuzimanju nekih nutrijenata nakon bakterijskog metabolisanja ugljenih hidrata. Ono poseduje unutrašnju i spoljašnju inervaciju. Unutrašnja inervacija obuhvata mijenterični (reguliše funkciju glatkih mišića), submukozni i mukozni (regulišu sekreciju i resorpciju) pleksus, koji čine enterički nervni sistem. On prima impulse iz simpatičkog i parasimpatičkog sistema, ali može da deluje i sam za sebe u kontroli motornih i sekretornih funkcija creva (neki enterički neuroni deluju kao mehanoreceptori ili hemoreceptori, obezbeđujući lokalne refleksne puteve koji mogu da kontrolišu gastrointestinalnu funkciju bez spoljašnjih uticaja). Enterički nervni sistem je farmakološki kompleksniji od simpatičkog ili parasimpatičkog sistema i uključuje, pored acetilholina i noradrenalina, mnoge neuropeptide i druge transmitere, kao što su 5-hidroksitriptamin (5-HT, serotonin), azotoksid (NO) i adenzintrifosfat (ATP). Spoljašnja inervacija tankog creva i kolona je deo autonomnog nervnog sistema, a takođe utiče i na motornu i na sekretornu funkciju. Preganglijska parasimpatička vlakna su većinom holinergička i ekcitatorna, a manjim delom inhibitornog karaktera. Dolazna simpatička vlakna su većinom postganglijska, i osim što inervišu krvne sudove, glatke mišiće i neke žlezdane ćelije direktnim putem, mogu da se završavaju u pleksusima, gde inhibiraju oslobađanje acetilholina (148,149).

Promene motornih i senzornih funkcija, odnosno poremećaji gastrointestinalne pokretljivosti, mogu rezultirati različitim poremećajima kao što su sindrom iritabilnih creva, dijareja, spazam i konstipacija. Spazmi i grčevi predstavljaju epizode nevoljnih kontrakcija jednog ili više mišića abdominalne muskulature, uz koje se javljaju bolovi (grčevi su obično bolni a spazmi ne moraju biti) i smetnje u funkciji. Nevoljni grčevi mišića se javljaju usled poremećaja na nivou CNS-a, nižih motornih neurona ili mišića (148,150). Dijareja je i dalje jedna od glavnih pretnji po zdravlje populacija tropskih i subtropskih siromašnih zemalja. U zemljama u razvoju oralna rehidrataciona terapija spašava hiljade života svake godine, dok lekovite biljke (uključujući i one koje regulišu poremećenu intestinalnu pokretljivost i ubrzan tranzit) predstavljaju važno sredstvo u terapiji dijareje. Stoga je racionalno ispitati efikasnost biljaka u ovoj indikaciji, pošto i sama WHO ohrabruje studije tretmana i prevencije dijareje lekovima tradicionalne medicine (151,152).

Tokom gladovanja, tanko crevo karakteriše migracioni motorni kompleks koji vrši ciklično uklanjanje preostalog sadržaja creva. Ova serija kontrakcija obično traje 4 minuta, pojavljuje se na 60 do 90 minuta i uključuje čitavo tanko crevo. Nakon unošenja hrane tanko crevo proizvodi nepravilne kontrakcije relativno male amplitude, osim na nivou distalnog ileuma gde se neprekidno javljaju snažne kontrakcije koje obezbeđuju pražnjenje ileuma (148). Upravo zbog ovakvih kontrakcija duodenum i ileum eksperimentalnih životinja (najčešće pacova) predstavljaju korisne eksperimentalne modele za ispitivanje efekata ekstrakata i lekova na gastrointestinalni sistem (npr. proučavanje spazmolitičkih efekata na spontane ili indukovane kontrakcije glatkih mišića) (150).

Moguća su 3 mehanizma spazmolitičkog dejstva:

- prekidanje puta azot oksid/ciklični guanozin monofosfat (NO/cGMP) (utvrđuje se uz L-NAME – inhibitor NOS: L-argininski analog koji kompetitivnim vezivanjem za NO sintetazu slabi proizvodnju i metaboličke puteve NO).

Nakon što je utvrđeno prisustvo azotoksid sintetaze (NOS) u mijenteričnom pleksusu, azotoksid (NO) se smatra jednim od najvažnijih (neadrenergičkih-neholinergičkih) medijatora relaksacije glatkih mišića GIT-a. Relaksacija izazvana NO-om je povezana sa povišenjem intracelularnog cGMP.

- interakcija sa muskarinskim acetilholinskim receptorima – mAChR ili 5-hidroksitriptaminskim receptorima – 5-HT₁ (utvrđuje se uz karbahol ili serotonin i atropin).

Muskarinski agonisti izazivaju kontrakciju glatkih mišića GIT-a, dolazi do povećanja peristaltičke aktivnosti koja može dovesti do pojave spazama i grčeva. Svi muskarinski receptori (pa i M₃ koji dovode do kontrakcije viscelarnih glatkih mišića) se aktiviraju acetilholinom, a blokiraju atropinom. 5-HT je ekscitatorni neurotransmiter za glatke mišiće GIT-a: agonisti 5-HT₁ povećavaju motilitet GIT, direktnom ekscitacijom glatke muskulature i indirektnim dejstvom preko enteričnih neurona.

- interakcija sa jonima Ca²⁺ (utvrđuje se uz medijume različitog sadržaja Ca²⁺ i K⁺)
- Postoje 4 važna puta kojima Ca²⁺ ulazi u ćelije prolazeći kroz plazmatsku membranu:
- voltažni kalcijumski kanali (kanali koji zavise od promene napona), od kojih su L-kanali posebno značajni za regulaciju kontraktilnosti glatkih mišića
 - ligand-zavisni kanali (kanali koje aktivira vezivanje liganada)
 - razmena Na⁺ - Ca²⁺ (razmenjuju se 3 Na⁺ za 1 Ca²⁺)

- depo-zavisni kalcijumski kanali (aktivira ih pražnjenje depoa kalcijuma) (149,151).

U glatkom mišiću, do kontrakcije može doći posle ulaska Ca^{2+} kroz voltažne ili ligand-zavisne kalcijumske kanale, ili posle oslobađanja Ca^{2+} iz sarkoplazmatskog retikuluma pod uticajem inozitol trifosfata (IP_3). IP_3 je glavni sekundarni glasnik uključen u oslobađanje intacelularnog Ca^{2+} , a nastaje aktivacijom nekih tipova receptora vezanih za G-proteine. Dakle, do oslobađanja Ca^{2+} i kontrakcije u glatkom mišiću može doći nezavisno od električnih događaja i ulaska ekstracelularnog Ca^{2+} kroz plazmatsku membranu, aktivnošću ovih receptora (149,151).

Flavonoidi najčešće ispoljavaju spazmolitičku aktivnost preko blokade kalcijumovih kanala koja se potvrđuje korišćenjem visokih koncentracija K^+ (80 mmol/l) za depolarizaciju preparata. Dodavanjem jona K^+ u organsko kupatilo se postižu stabilne kontrakcije. Relaksacija preparata tkiva prekontrahovanog kalijumom, usled efekta biljnog ekstrakta, se izražava kao procenat kontrolnog odgovora dobijenog samo sa K^+ . Da bi se potvrdio efekat blokade kalcijumovih kanala, konstruišu se krive zavisnosti odgovora od doze u prisustvu i odsustvu ekstrakta i sa Ca^{2+} i K^+ bogatim medijumom (150). Efekat ekstrakata na kalcijumove kanale se proverava testiranjem efekata verapamila u istim uslovima (u medijumu bez kalcijuma uz postepeno dodavanje CaCl_2) (152).

Sve eksperimentalne procedure se izvode u skladu sa pravilima Evropske Unije (European Union Normative 86/609/EEC), uz odobrenje lokalnih Etičkih komiteta (br. 5/11 od 02.11.2011. i 01-7289-1 od 14.10.2011.).

Spazmolitička aktivnost može biti procenjena na osnovu uticaja ekstrakata na spontane i acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova.

Životinje: odrasli muški pacovi soja Wistar, teški od 200 do 250 g, koji su na standardnoj ishrani uz slobodan pristup hrani i vodi.

Priprema preparata izolovanog tkiva: Nakon gladovanja tokom noći, životinje se anesteziraju etrom i žrtvuju. Terminalni ileum se odseca i ispiranjem čisti od crevnog sadržaja. Segmenti ileuma dugi oko 2 cm se potapaju u organsko kupatilo (zapremine 20 ml), napunjeno Tirodovim rastvorom temperature 37°C , u koje se konstantno uvodi smeša ugljen-dioksida i kiseonika (1:19, V/V).

Sastav Tirodovog rastvora: 136,89 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,05 mM MgCl_2 , 1,80 mM CaCl_2 , 0,42 mM NaH_2PO_4 , 11,09 mM NaHCO_3 , i 5,55 mM glukoze; pH 7,4.

Segment ileuma se zakači kukicom od nerđajućeg čelika pod odgovarajućom tenzijom (1 g) i ostavi da se stabilizuje 30 minuta pre početka eksperimenta. Intestinalni odgovori se prate preko transdjusera i beleže pomoću sistema za praćenje. Nakon svakog ispitivanja, tkivo se ispira svežim Tirodovim rastvorom i ostavlja da se stabilizuje desetak minuta. Ileum pacova pokazuje spontane ritmične kontrakcije (153).

4.3.1. Određivanje uticaja ekstrakta na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova

Nakon perioda stabilizacije tkiva, u organsko kupatilo se dodaju rastuće koncentracije ekstrakata (0,01 – 10 mg/ml), uz praćenje tonusa spontanijih kontrakcija ileuma i izražavanje promene tonusa u procentima u odnosu na vrednosti bazalnog tonusa.

Rezultati se prikazuju kao koncentracija uzorka potrebna da inhibira 50% kontraktibilnosti ileuma (IC_{50}) (153).

4.3.2. Određivanje uticaja ekstrakta na acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova

U prisustvu različitih koncentracija ekstrakata (0,3 – 3 mg/ml) u organskom kupatilu, kumulativno se dodaju rastuće koncentracije acetilholina (6,9 nM – 69000 nM Ach). Acetilholin, putem muskarinskih M_3 receptora, dovodi do kontrakcije viscelarnih glatkih mišića (149). Kontrakcije koje se registruju se izražavaju kao procenat promene u odnosu na kontrolu koja predstavlja odgovor na sam acetilholin (153).

4.3.3. Određivanje mehanizma spazmolitičkog dejstva

U cilju testiranja mogućeg efekta blokade kalcijumovih kanala, izolovanom ileumu se dodaje visoka koncentracija K^+ (80 mM) da bi se dobile ustaljene kontrakcije. Zatim se u organsko kupatilo kumulativno dodaju rastuće koncentracije ekstrakta (0,01 – 3 mg/ml). Relaksacija ileuma, koji je prethodno kontrahovan jonima kalijuma, se izražava kao procenat promene u odnosu na kontrolnu gde je dodato samo 80 mM K^+ . Visoke koncentracije K^+ (>30 mM) izazivaju kontrakcije glatkih mišića usled otvaranja sporih voltažnih kalcijumskih kanala i ulaska ekstracelularnog Ca^{2+} u ćeliju (154).

Da bi se potvrdila potencijalna kalcijum-antagonistička aktivnost uzoraka, ileumu se nakon stabilizacije (45 min) u Tirodovom rastvoru, eksterni Ca^{2+} eliminiše Tirod-0Ca rastvorom (50 mM KCl, 91,04 mM NaCl, 1,05 mM $MgCl_2$, 11,90 mM $NaHCO_3$, 0,42 mM NaH_2PO_4 , 5,55 mM glukoze i 0,1 mM EDTA), a mišić depolarizuje izoosmotskim Tirodovim-0Ca-80 mM K^+ rastvorom. Kumulativnim dodavanjem $CaCl_2$ (od 0,01 pa sve do 10 mmol/l), u prisustvu i odsustvu ispitivanih ekstrakata (razblaženja 0,3 – 3 mg/ml) i verapamila, dobijaju se krive zavisnosti doza/odgovor (155). Verapamil predstavlja Ca antagonist koji direktno utiče na voltažne kalcijumske kanale (149).

Sa kriva zavisnosti primenjene koncentracije ekstrakta (mg/ml) i efekta (% relaksacije) su određivane koncentracije koje inhibiraju kontrakcije za 50% (IC_{50}), a kako su svi eksperimenti vršeni u 6 ponavljanja, određivana je i standardna devijacija.

4.4. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti

Izvori zapaljenja mogu biti biološki, fizički ili hemijski i veoma su brojni (infekcije, autoimuna i hronična oboljenja, fizičke povrede, izlaganje alergenima, radijaciji i toksičnim supstancama...). Zapaljenska kaskada vodi razvoju oboljenja kao što su hronična astma, reumatoidni artritis, multipla skleroza, inflamatorno oboljenje creva i psorijaza. Široko korišćeni sintetski antiinflamatorni lekovi često imaju brojne neželjene efekte, pa tradicionalni lekovi i prirodni proizvodi predstavljaju značajan izvor novih antiinflamatornih supstanci.

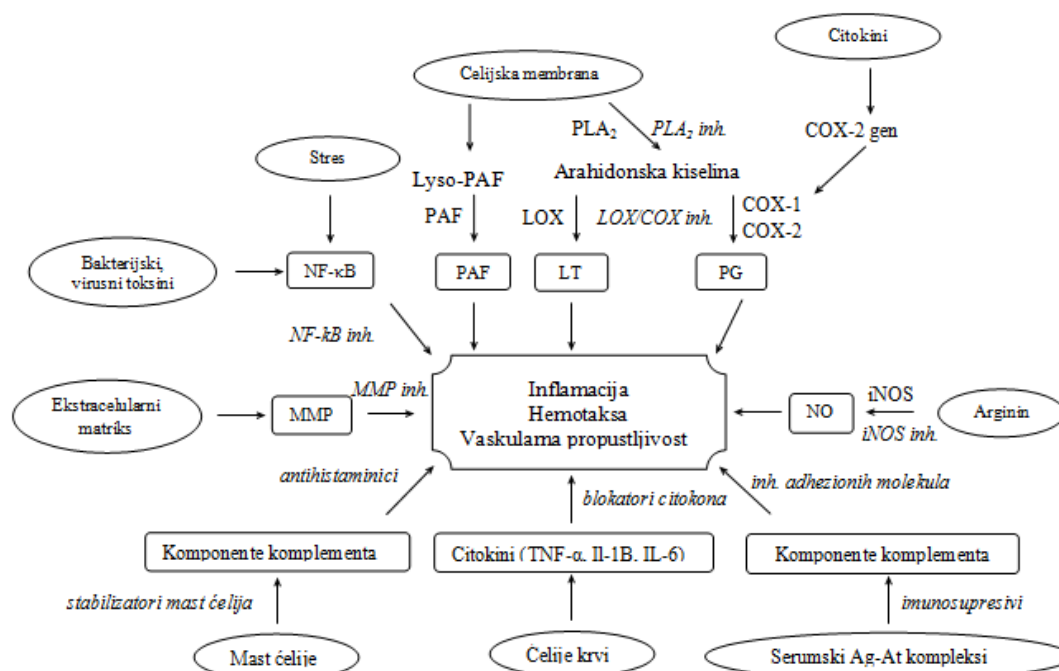
Akutna zapaljenska reakcija je odgovor tkiva na invazivni patogen ili prisustvo štetne supstance i značajna je za preživljavanje (mada može biti i štetna ukoliko se razvije na neodgovarajući način). Ishod ove protektivne reakcije je zaceljenje (sa ili bez formiranja ožiljnog tkiva) ili, u slučaju trajnog dejstva patogena ili štetne supstance, hronično zapaljenje. Hronično zapaljenje može pogodovati razvoju različitih hroničnih oboljenja, uključujući i karcinom (149,156,157).

Na makroskopskom nivou, zapaljeno područje je crveno, otečeno, toplo i bolno, a javlja se i ometanje ili izmena funkcija. Sa aspekta lokalnih dešavanja u okviru tkiva, promene se mogu podeliti na celularne i vaskularne događaje. Vaskularni događaji obuhvataju inicijalnu dilataciju malih arteriola, povećanje, a zatim usporavanje protoka i stazu krvi, sa povećanjem permeabilnosti poskapilarnih venula i eksudacijom tečnosti. Kada plazma iscuri u tkivo dolazi do aktivacije četiri kaskade proteolitičkih enzima: komplemента, koagulacije, fibrinolitičkog i kininskog sistema. Od ćelija uključenih u proces zapaljenja, neke (vaskularne endotelne ćelije, mastociti i tkivni makrofagi) su normalno prisutne u tkivima, dok druge (trombociti i leukociti) stižu u zahvaćeno područje iz krvi. Medijatori inflamacije se generišu kako iz plazme, tako i iz ćelija, i oni povratno modifikuju i regulišu vaskularne i celularne reakcije. Najvažniji medijatori su:

- histamin i serotonin (biogeni amini)
- medijatori nastali iz fosfolipida: proizvodi metabolizma arahidonske kiseline i faktor agregacije trombocita (PAF). Prostaglandini i tromboksani nastaju aktivnošću ciklooksigenaze (COX-1 je konstitutivni enzim a COX-2 se indukuje u inflamatornim ćelijama tokom zapaljenja) a leukotrijeni aktivnošću 5-lipooksigenaze iz arahidonske kiseline.
- bradikinin (nastaje iz kininogenina plazme pod dejstvom proteolitičkog enzima kalikreina)
- NO (skoro sve inflamirane ćelije kao odgovor na stimulaciju citokinima ekspimiraju inducibilni oblik NO sintaze – iNOS)
- citokini (peptidi koje oslobađaju imune i inflamatorne ćelije u imunim i inflamatornim reakcijama, a koji regulišu aktivnost tih ćelija): interleukini, hemokini, interferoni, faktori stimulacije rasta kolonija i faktori rasta i nekroze tumora. IL-1 i TNF- α su važni primarni inflamatorni citokini, jer indukuju stvaranje drugih citokina (149).

Zbog kompleksnosti i broja medijatora akutne zapaljenske reakcije, postoje različita ciljna mesta za dejstvo antiinflamatornih supstanci (Slika 3.10.) (156).

Sekundarni metaboliti biljaka koji ispoljavaju značajno antiinflamatorno delovanje pripadaju različitim hemijskim klasama jedinjenja (alkaloidi, steroidi, terpenoidi, polifenoli, fenilpropanoidi, masne kiseline i lipidi), a ciljna mesta njihovog delovanja su brojna: lipooksigenaze, metabolizam arahidonske kiseline, NO, NF-kB, TNF-a, citokini, hemokini i adhezioni molekuli (156).



Slika 3.10. Različita ciljna mesta supstanci koje utiču na inflamatornu kaskadu (156)

Tokom inflamacije, mastociti i leukociti se nagomilavaju na mestu povrede što vodi "respiratornom prasku" – pojačanom utrošku kiseonika i porastu oslobađanja i akumulacije ROS na mestu oštećenja. Sa druge strane, inflamirane ćelije takođe proizvode medijatore, kao što su metaboliti arahidonske kiseline, citokini i hemokini, koji dalje regrutuju inflamatorne ćelije na mesto oštećenja i proizvodi se još ROS. U slučaju hemijskih/fizičkih faktora koji izazivaju zapaljenje okidač je često upravo oksidativni stres – ROS mogu i da pokrenu zapaljensku reakciju. Ovakvo inflamatorno/oksidativno okruženje vodi začaranom krugu i može oštetiti okolne zdrave ćelije, a nakon dužeg perioda dovesti i do kancerogeneze (inicijacija kancerogeneze posredovana ROS može biti direktna: oksidacija, nitracija, halogenacija nuklearne DNK, RNK i lipida, ili posredstvom signalnih puteva aktiviranih ROS). Kako oslobođeni radikali dalje oštećuju tkivo, nekada je antiinflamatorno dejstvo indirektna posledica uklanjanja ROS. Upravo zbog snažne veze antioksidativnog i antiinflamatornog dejstva, ispitan je uticaj ekstrakata i frakcija etanolnog ekstrakta biljne vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (koja je ispoljila najsnažniju antioksidativnu aktivnost među testiranim vrstama familije Ericaceae) u modelu akutne zapaljenske reakcije (149,156,157).

Karageninom indukovano zapaljenje je klasičan test model koji se intenzivno koristi za ispitivanje novih antiinflamatornih supstanci. Karagenin sadrži sulfatirane polisaharide za koje se zna da aktiviraju komplement. U patogenezi karageninskih edema učestvuju svi osnovni medijatori zapaljenskog procesa: histamin, serotonin, bradikinin i prostaglandini. Edem šapice izazvan karageninom predstavlja akutni lokalni inflamatorni odgovor koji se opisuje kroz dva stadijuma. U ranom stadijumu (javlja se u okviru prvog sata) se oslobađaju mnoge vazoaktivne supstance (histamin, 5-hidroksitriptamin, bradikinin i, u manjoj meri, prostaglandini), razvija se nefagocitni edem (može se meriti već nakon 20-60 minuta) a neutrofilni se u ovoj fazi ne detektuju pri histološkoj sekciji

tkiva. U kasnijem stadijumu (nakon više od 1h) dolazi do infiltracije polimorfonuklearnih leukocita (PMN) i nastavka proizvodnje prostaglandina. Karagenin aktivira makrofage i PMN koji sekretuju brojne proinflamatorne medijatore. U drugom stadijumu karageninom indukovane inflamacije, PMN oslobađaju slobodne radikale i ROS, azot oksid i citokine (kao što su TNF- α i IL-6) koji imaju važnu ulogu u različitim oblicima inflamacije. Sam edem šapice se javlja veoma brzo nakon subplanarne injekcije karagenina, obično se zapremina šapice uveća za 50% u toku prvog sata, maksimum se dostiže za 3 (6)h i ostaje na tom nivou do 24h od izazivanja. Nakon 3h se razvija intenzivna fagocitna inflamacija sa velikim brojem neutrofila i otokom tkiva. Inhibicija edema predstavlja dokaz antiinflamatornog dejstva (158,159).

Studija na životinjama je izvedena u skladu sa pravilima Evropske Unije (European Union Normative 86/609/EEC) koja su prihvaćena od strane Etičkog komiteta Vojnomedicinske akademije u Beogradu.

Postupak: antiinflamatorna aktivnost u karageninskom testu inflamirane šapice pacova može biti procenjena na osnovu inhibicije edema šapice.

Životinje: odrasli muški pacovi soja Wistar, teški od 220 do 280 g, odgajani na Farmi za eksperimentalne životinje Vojnomedicinske akademije u Beogradu, na standardnoj ishrani uz slobodan pristup hrani i vodi. Životinjama je 18 h pre eksperimenta ukinuta hrana, uz slobodan pristup vodi.

Sredstvo za izazivanje inflamacije: 0,1 ml 0,5% rastvora karagenina u fiziološkom rastvoru.

Formirane su grupe od 6 životinja za svaku dozu. Ispitivani ekstrakti su rastvarani u dimetilsulfoksidu (DMSO) i davani *per os* gastričnom sondom u dozi od 50, 100, i 200 mg/kg telesne mase, 60 minuta pre izazivanja inflamacije. Edem je izazivan injektovanjem rastvora karagenina u zadnju desnu šapicu pacova. Ista zapremina (0,1 ml) fiziološkog rastvora injektovana je u levu zadnju šapicu pacova. Tri sata posle injekcije karagenina, odnosno fiziološkog rastvora, a 4 sata od davanja ekstrakata, životinje su žrtvovane, šapice su im amputirane (svaki put na tačno određenom anatomskom delu) i izmerene na analitičkoj vagi. Kontrolne životinje tretirane su na isti način, samo što su umesto ekstrakata dobijale peroralno DMSO u dozi od 1 ml/kg. Razlika u masi između desne i leve šapice, tretiranih naspram netretiranih pacova, označavala je veličinu edema, odnosno stepen inflamacije. Antiinflamatorna aktivnost – AA (procenat inhibicije edema šapice) računata je prema formuli:

$$AA (\%) = \frac{k - e}{k} \times 100$$

k – razlika između desne i leve šapice pacova u kontrolnoj grupi

e – razlika između desne i leve šapice pacova u eksperimentalnoj grupi (158).

Kao pozitivna kontrola korišćen je indometacin, NSAIL (nesteroidni antiinflamatorni lek) koji ispoljava snažno antiinflamatorno delovanje putem neselektivne inhibicije ciklooksigenaze. NSAIL su među najviše korišćenim lekovima širom sveta. Međutim, svi trenutno raspoloživi, a naročito "klasični" NSAIL, mogu ispoljiti značajne neželjene efekte, što je posebno izraženo kod starijih osoba. Usled inhibicije zaštitnog, "kućepaziteljskog" enzima, COX-1 javlja se, pre svega, oštećenje sluzokože koje uključuje eroziju, hemoragiju i pojačana želudačna mikrokrvarenja (149).

Indometacin je pre primene rastvaran u DMSO i davan *per os* gastričnom sondom u dozi od 4 mg/kg (1h pre injekcije karagenina pozitivnoj kontrolnoj grupi životinja).

4.5. Ispitivanje antiiritantne aktivnosti

Koža je najveći organ ljudskog tela i predstavlja omotač koji je u neposrednom dodiru sa spoljašnjom sredinom. Njena primarna funkcija je da služi kao fizička barijera i štiti organizam od gubitka vode, UV-zračenja i ulaska toksičnih materija, alergena, iritanata i mikroorganizama. Sastoji se iz tri sloja: epidermisa (spoljašnji, nevaskularizovani sloj), dermisa (unutrašnji, vaskularizovani sloj koji naleže na epidermis) i hipodermisa (takođe vaskularizovani sloj koji naleže na dermis i sastoji se pretežno od masnog tkiva) (160,161).

Stratum corneum (SC) predstavlja poslednji stupanj u diferencijaciji ćelija epiderma, a čini ga 10-25 slojeva izumrlih keratinocita – korneocita, uronjenih u lipidni matriks. SC se neprekidno obnavlja (kod zdrave kože za 4-6 nedelja ćelija prođe ceo životni put od diferencijacije u bazalnom sloju epidermisa do konačnog odstranjivanja). U literaturi se struktura ovog sloja kože predstavlja tzv. modelom "cigle i maltera", gde su cigle korneociti a malter intercelularni lipidni matriks koji, zbog svog jedinstvenog sastava i strukturnog uređenja prisutnih sastojaka, predstavlja odličnu barijeru (162,163). Međutim, keratinociti (uz fibroblaste, endotelijalne ćelije i imune ćelije) igraju važnu ulogu i u inicijaciji, modulaciji i regulaciji inflamacije (160).

Natrijum lauril sulfat – SLS (sodium lauryl sulphate), poznati anjonski surfaktant, se koristi kao najpopularniji model-iritant za ispitivanje iritacije kože i utvrđivanje antiiritantnog potencijala topikalnih preparata, pošto izlaganje surfaktantima dovodi do iritantnog kontaktnog dermatitisa (ICD). SLS je iritant koji oštećuje kožu direktnim citotoksičnim dejstvom, bez sistemske toksičnosti ili prethodne senzibilizacije, nema ekstremnu pH vrednost niti kancerogena svojstva (164).

Klinički, iritacija kože predstavlja 70% svih slučajeva kontaktnog dermatitisa. Prisustvo eritema, edema, suvoće, fisura, perutanja, svraba i bola je karakteristično i za iritantni i za alergijski kontaktni dermatitis, ali se ICD definiše kao neimunološka inflamatorna reakcija koja se javlja lokalno, ubrzo nakon stimulacije, i nestaje u roku od nekoliko dana (160).

Hemijski indukovane iritacije kože se mogu podeliti na 3 vrste: akutnu, kumulativnu i odloženu akutnu iritaciju kože (160). Provokativni test iritacije kože ima za cilj da izazove reakciju iritacije, ali bez pojave opekotina, kod svih testiranih subjekata, u cilju proučavanja same reakcije iritacije ili mogućnosti njene modifikacije terapijskim i profilaktičkim merama (165). Opšte je prihvaćeno da hemijski agensi mogu inicirati i modifikovati iritaciju putem 2 mehanizma: oštećenjem barijerne funkcije SC i direktnim uticajem iritanta na ćelije kože. Oba mehanizma vode iritaciji, bilo samostalno ili zajedno (160). ICD rezultira pojačanim transdermalnim gubitkom vode koji prati dehidracija kože i ubrzan protok krvi, što se klinički manifestuje kao eritem, a može se pratiti objektivnim metodama bioinženjeringa kože. Radi se o objektivnim, neinvazivnim

tehnikama koje su dobile naziv tehnike bioinženjeringa kože, jer se baziraju na biofizičkim svojstvima kože (električne karakteristike vode u koži, mehanička svojstva kože, itd.).

Merenje električnih karakteristika kože, pre svega njene kapacitativnosti (EC), se koristi kao bioinženjerska metoda za procenu stanja vlažnosti kože. Metoda se zasniva na određivanju kapacitativnosti kondenzatora pri kontaktu sa površinom kože. Obzirom da je dielektrična konstanta vode mnogo veća od dielektrične konstante keratina i epidermalnih lipida, smatra se da dielektrične osobine SC u velikoj meri zavise od sadržaja vlage u SC, odnosno da su promene kapacitativnosti SC pokazatelj promene vlažnosti kože. Ovom metodom merenja kapacitativnosti omogućava se poređenje efikasnosti različitih proizvoda u pogledu uticaja na stepen hidratacije SC, kao i stepena hidratacije SC u određenim vremenskim intervalima nakon aplikacije (166,167).

Pigmenti melanin, hemoglobin, bilirubin i karoten, na koje mogu uticati različiti faktori (UV zračenje, lekovi, iritanti), determinišu boju kože. Kvantifikacija eksperimentalno izazvanih promena boje kože je široko korišćena metoda u dermatokozmetičkim istraživanjima. Promena boje kože je indikator stanja kože (integriteta barijere i senzitivnosti), osobina leka (koncentracije, bioraspoloživosti) i nosača (formulacije), kao i zaštite kože (od sunca). Jednostavni instrumenti (uskopojasni reflektujući spektrofotometri) koji se koriste u dermatološkim istraživanjima se baziraju na različitoj apsorpciji melanina i hemoglobina na odabranoj talasnoj dužini, a mere eritema i melanina indekse. Eritema indeks (EI) se izračunava na osnovu intenziteta apsorbovane (na 568 nm) i reflektovane (na 660 nm) svetlosti, a predstavlja objektivnu meru stepena iritacije kože (168).

Koža predstavlja zaštitni kiseo omotač, pri čemu kiselost potiče iz egzogenih (mikroorganizmi, lojne i znojne žlezde) i endogenih izvora (slobodne masne kiseline iz fosfolipida i izmena jona Na i protona). Izlaganje SC bazama ili neutrališućim puferima remeti homeostazu kože, utičući, pre svega, na njenu permeabilnost, pa je održanje kisele reakcije kože od vitalne važnosti (164).

Termin "antiiritant" je prvi put iskoristio, 1965. godine, Goldemberg da opiše raznorodnu grupu sastojaka topikalnih preparata koji aktivno redukuju iritacioni potencijal drugih komponenata istog preparata. Ovaj termin je podrazumevao supstance koje se koriste uz poznate iritante kože ili očiju, da bi redukovale potencijal iritanta dovoljno da obezbede toleranciju pri aplikaciji. Međutim, antiiritantima se sve više smatraju sastojci kozmetičkih proizvoda namenjeni redukovanju postojeće iritacije kože. Danas ovaj pojam obuhvata komponente koje smiruju i leče (efekat lečenja iritirane kože), odnosno, antiiritanti se dodaju u kozmetičke formulacije sa ciljem da zaštite i izleče osetljivu ili iritiranu kožu. Preporuka je da se supstance sa potencijalnim antiiritantnim dejstvom ispituju na humanoj koži u modelu koji imitira ICD (169).

U provokativnom test modelu se koža zdravih dobrovoljaca izlaže visokoj koncentraciji SLS, a u skladu sa smernicama ESCD (Guidelines of the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis), pošto na intenzitet iritacione reakcije utiču konstitucionni faktori (godine, rasa, pol, anatomska mesto nanošenja iritanta)

i faktori okoline (godišnje doba i klima) (165,167,170). Unutrašnji deo podlaktice se najčešće koristi kao mesto za aplikaciju preparata i merenje parametara kože (167).

Postupak: Procena uticaja ispitivanih uzoraka na veštački izazvanu iritaciju se vrši neinvazivnim metodama bioinženjeringa kože, koje obuhvataju određivanje električne kapacitativnosti (EC), eritema indeksa (EI) i pH vrednosti kože.

Iritant: SLS (čistoća >99%, Merck, Darmstadt, Germany), 12% rastvor u destilovanoj vodi.

Izrada gelova: 2 g odgovarajućeg suvog etanolnog ekstrakta se rastvori u 97,5 ml destilovane vode na ultrazvučnom kupatilu. Geliranje se vrši pomoću mešalice, tako što se nakon 2 minuta mešanja rastvora ekstrakta u vodi (500 rpm) 0,5 g ksantan gume disperguje 10 minuta (800 rpm). Gelovi se konzerviraju korišćenjem Euxyl-a K[®]300, a zatim pakuju u bočice od 10 ml sa kapalicom i signiraju odgovarajućom oznakom. Gelovi se koriste za ispitivanje tek nedelju dana nakon izrade.

Ispitivani uzorci:

P – placebo (sadrži samo destilovanu vodu, ksantan gumu i konzervans)

A1 – 2% A1E u placebo

A2 – 2% A2E u placebo

B – 2% BE u placebo

C – 2% CE u placebo

E – 2% EE u placebo

V – 2% VE u placebo

Koncentracija od 2% ekstrakta u gelovima je odabrana pošto je predlog proizvođača da se komercijalna kozmetička sirovina Heather extract AQ (vodeni ekstrakt nadzemnog dela vrste *Calluna vulgaris*) inkorporira u topikalne preparate u koncentracijama od 0,5 do 3% (90).

Ispitanici: Studija se sprovodi kao randomizirana i dvostruko slepa, a u skladu sa Helsinškom deklaracijom i odobrenjem lokalnog Etičkog komiteta (br. 01-7289-1 od 14.10.2011.). Dobrovoljci, bez istorije atopijskog ekcema ili drugih kožnih oboljenja, koji u poslednjih mesec dana nisu koristili nikakve sistemske niti lokalne lekove, se uključuju u studiju, uz potpisan dobrovoljni informativni pristanak. Ispitanicima se daju instrukcije da ne koriste nikakve kozmetičke proizvode na test mestima nedelju dana pre početka, kao ni u toku studije, i da izbegavaju izlaganje suncu.

Kriterijum za isključivanje: odsustvo reakcije na primenjen pretretman SLS-om ili nepridržavanje dogovorenog načina primene.

Protokol ispitivanja: Efekti gelova se ispituju na unutrašnjoj strani podlaktice. Po 75 µl rastvora iritanta se nanosi pod okluzijom od 6h (nakon čega se okluzija uklanja i tretirana koža ispira vodom) na ukupno 5 tačno određenih mesta na obe podlaktice. Nanošenje iritanta se vrši pomoću filter papira (9 cm²), koji se zatim prekriva okluzivnim filmom (Parafilm[®]) i fiksira adhezivnim pamučnim flasterom (Sensifix[®]).

Ispitanici se randomizirano dele u dve test grupe, uz davanje jasnih instrukcija da ispitivane uzorke nanose u određenoj količini na iritirana mesta ujutru i uveče (uz

napomenu da gelove nanose nakon tuširanja). Prva grupa ispitanika testira uzorke A1, A2 i P, a druga grupa uzorke B, C, V i E. Po jedno test mesto na svakoj ruci u obe grupe se ostavlja kao netretirana kontrola, bilo da se radi o kontroli pod okluzijom (UCO) na levoj ruci – gde se prati stanje kože nakon iritacije a bez ikakvog tretmana, ili o kontroli bez okluzije (UCW) na desnoj ruci – gde se prati stanje kože bez prethodne iritacije.

Merenje vrednosti EC, EI i pH se vrši pre nanošenja iritanta (bazalne vrednosti), 24h nakon uklanjanja okluzije, kao i nakon 3, 5 i 7 dana od početka studije, i to uvek pre jutarnje aplikacije. Sva merenja se vrše u klimatizovanim uslovima ($21\pm 1^{\circ}\text{C}$). Rezultati merenja se izražavaju kao procenat promene u odnosu na netretiranu kontrolu. Poređenje efikasnosti primenjenih gelova se vrši međusobno, sa placebo i sa obe kontrole.

5. Statistička obrada podataka

Dobijeni podaci su obrađeni pomoću statističkog softverskog paketa SPSS for Windows 17.0. Svi rezultati predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 (za ispitivanje spazmolitičke i antiinflamatorne aktivnosti najmanje 6) ponavljanja \pm standardna devijacija.

IC_{50} vrednosti su dobijene grafički sa logaritamskih krivih zavisnosti doze i efekata. Grafici su crtani u programima Microsoft Origin 8.0. i Microsoft Excel 2007.

Statistička analiza za ispitivanje spazmolitičke i antiinflamatorne aktivnosti je izvršena analizom varijanse (ANOVA) uz Studentov t-test za utvrđivanje statističke značajnosti. Vrednost $p < 0,05$, odnosno vrednosti $p < 0,05$, $p < 0,01$ i $p < 0,001$ su smatrane statistički značajnim i prikazivane uz odgovarajuće podatke.

Parametri dobijeni *in vivo* merenjem su izražavani kao relativne promene u odnosu na bazalne vrednosti (%), a ispitivani uzorci su poređeni sa obe kontrole (UCO i UCW) i sa placebo. Vrednosti parametara 24h nakon iritacije, nakon 3, 5 i 7 dana studije su poređeni sa odgovarajućim bazalnim vrednostima korišćenjem t-testa za uparene uzorke. Podaci dobijeni sa mesta tretiranih uzorcima su poređeni sa odgovarajućim vrednostima dobijenih za obe kontrole i placebo uzorak korišćenjem t-testa za neuparene uzorke.

6. Reagensi i instrumenti

Za ispitivanja su korišćeni reagensi analitičke i HPLC čistoće.

Za morfoanatomsku analizu je korišćen svetlosni mikroskop Olympus i skening elektronski mikroskop Jeol JSM – 5300.

Spektrofotometrijska određivanja su vršena na spektrofotometru Spekol 11 (Carl Zeiss, Jena), spektrofotometru Evolution 60 Thermo scientific spectrophotometer (Fisher Scientific, UK) i mikropolejt čitaču – ELISA reader MULTISCAN ASCENT No354

(ThermoLabsystems, Finland). Inkubacija je rađena u inkubatoru Incuterm Raypa® trade (Catalonia, Spain), a šejkovanje mikropolejtova na Vibramix 30 (Tehtnica, Slovenia).

Za HPLC analizu je korišćen HPLC uređaj Agilent 1100 HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), sa binarnom pumpom G1312A, Zorbax Eclipse XDB-C18 kolonom (4,6 × 250mm, veličina čestica 5 μm) i fotodioda (photodiode array – DAD) detektorom G1315B.

Ispitivanje spazmolitičke aktivnosti je vršeno registrovanjem kontrakcija izolovanog ileuma pomoću transdjusera FSG-01 (Experimetria, Hungary) i TSZ-04-E na kompjuterizovanom sistemu Spellso (Experimetria Ltd).

Gelovi su pripremani pomoću mešalice RW16 basic (IKA®WERKE, Germany). Parametri kože su praćeni pomoću aparata Multi Probe Adapter MPA®9 (Courage & Khazaka Electronic GmbH, Germany) koji uključuje 3 probe: Mexameter® MX 18 probe (EI), Corneometer® CM 825 (EC) i pHmeter 900 (pH). Kalibracija aparata je vršena prema preporukama proizvođača.

IV Rezultati i diskusija

1. Anatomsko-morfološka analiza

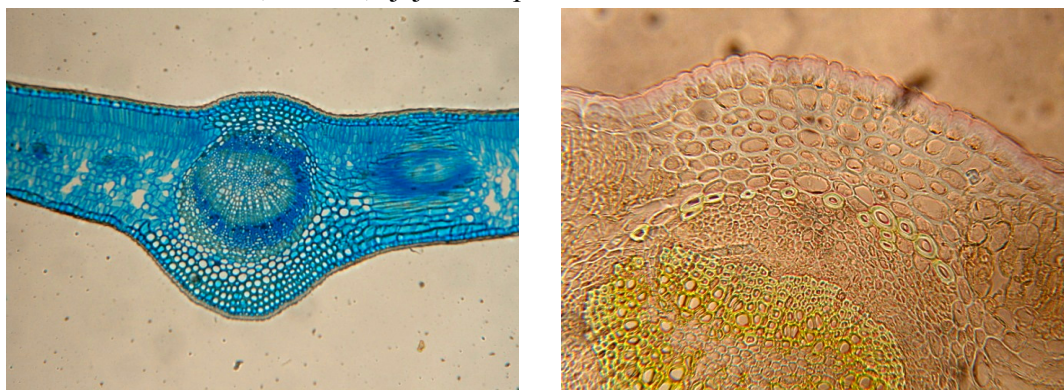
Građa lista. Kod svih istraživanih vrsta, izuzev vrste *Arbutus unedo* koja se odlikuje krupnim ovalno-lancetastim listovima, list je erikoidne građe, ivice lista se savijaju ka naličju i formiraju udubljenje – kriptu, u kojoj je jednoćelijski epidermis sa stomama i jednoćelijskim dlakama. Na površini listova je uglavnom debeo sloj kutikule, spoljašnji ćelijski zidovi epidermisa su zadebljali. Mezofil lista je diferenciran na palisadno i sunderasto tkivo. U centralnom delu lista je veliki, glavni provodni snopić, dok su bočni snopići uglavnom samo od ksilema obavijeni krupnim ćelijama provodnog parenhima.

Građa mladog stabla (primarna građa). Stablo je na poprečnom preseku različitog oblika, golo do gusto prekriveno različitim tipovima dlaka. Epidermis je jednoslojan. U građi stabla dominira parenhimsko tkivo, kako u kori i srži, tako i u vidu različitog broja širokih sržnih zrakova.

Građa višegodišnjeg stabla (sekundarna građa stabla). Za sekundarno debljanje stabla je karakteristično da se felogen, sekundarno meristemsko tkivo, formira u parenhimskim slojevima kore blizu floema, tako da u kori gotovo nema elemenata primarne građe. Srž zadržava oblik iz primarne građe, a uočavaju se dve vrste sržnih zrakova: mnogobrojni uski i nekoliko jako širokih.

Arbutus unedo

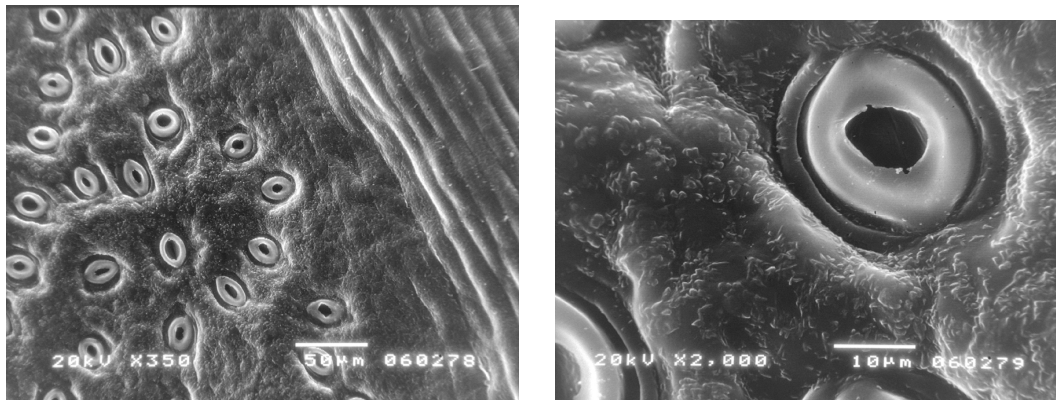
Tamno zeleni, kožasti, sjajni i krupni ovalno-lancetasti listovi sa lisnim drškama.



Slika 4.1. *A. unedo* – poprečni presek lista i detalj lista

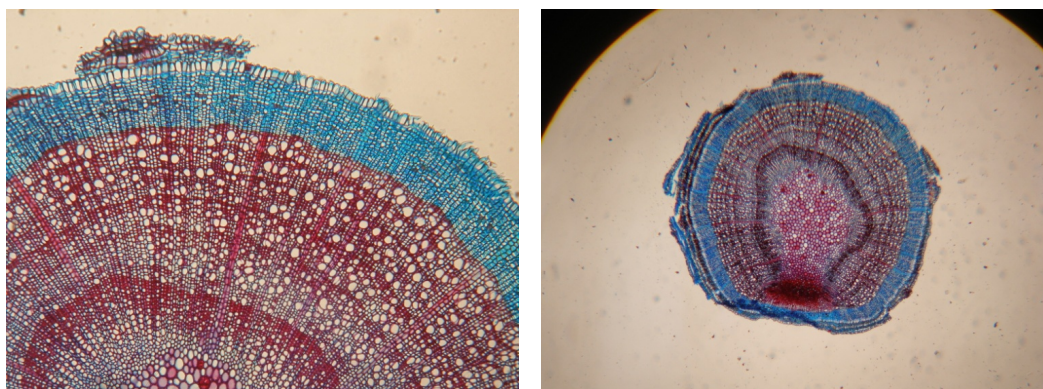
Građa lista. List je dorzoventralne građe, prekriven debelim slojem kutikule. Čelije epidermisa su krupne i ovalne, sa vidno zadebljalim spoljašnjim ćelijskim zidovima. Mezofil lista je diferenciran na palisadno i sunderasto tkivo. Palisadno tkivo dominira i sastoji se od dva sloja izduženih, gusto zbijenih ćelija ispod epidermisa lica i jednog do dva sloja kraćih, palisadnih ćelija ispod epidermisa naličja lista. U centralnom delu lista je manje ili više rastresito sunderasto tkivo u kome su prisutni kristali Ca-oksalata i tanini. U centralnom delu lista je glavni, jako izražen provodni snopić sa sklerenhimskim vlaknima

ispod i iznad snopića, kao i kolenhimom koji dopire do epidermisa i lica i naličja. Bočni provodni snopići su mnogo slabije razvijeni, ali sa puno sklerenhima oko njih (Slika 4.1.). Trihomi su odsutni. List je hipostomatski, sa velikim brojem stoma (Slika 4.2.).



Slika 4.2. Naličje lista A. unedo – SEM

Sekundarna građa stabla. Stablo je na poprečnom preseku okruglo. Na površini stabla su ostaci epidermisa i periderma. U sekundarnom drvetu su vidljivi godovi. Od dobro razvijene srži se pružaju mnogobrojni dvoslojni sržni zraci (Slika 4.3.).



Slika 4.3. A. unedo – poprečni presek stabla

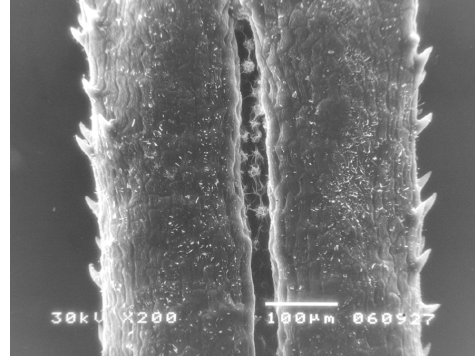
Bruckenthalia spiculifolia

Građa lista. List je erikoidne građe sa povijenim ivicama i gustim dlakama u kripti (Slika 4.4., 4.5.). Na površini lista, osim u kriptama, je debeo sloj kutikule. Epidermis je od jednog sloja krupnih ćelija, osim u kripti gde su ćelije epidermisa znatno sitnije. Mezofil lista je od jednog sloja palisadnih ćelija ispod epidermisa lica, sve do mesta gde počinje prostor koji pripada kripti, kao i ispod epidermisa naličja lista, ispod glavnog provodnog snopića. Vrlo mali deo mezofila je od sunderastog tkiva. U listu su tri provodna snopića: jedan veliki centralni i dva manja bočna. Uočavaju se idioblasi sa kristalima Ca-oksalata i zatamnjenja koja se mogu pripisati prisustvu tanina (Slika 4.4.).

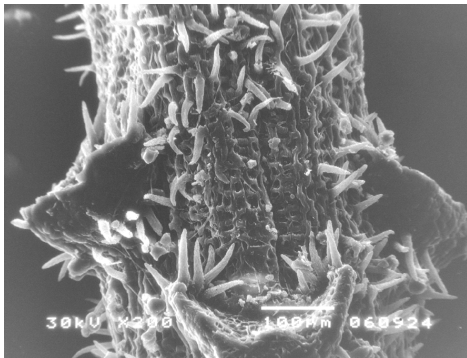
Sekundarna građa stabla. Stablo je na poprečnom preseku okruglo sa ostacima epidermisa i jednoćelijskim nežlezdanim dlakama (Slika 4.6.). U stablu dominira ksilem i srž od krupnih parenhimskih ćelija (Slika 4.7.).



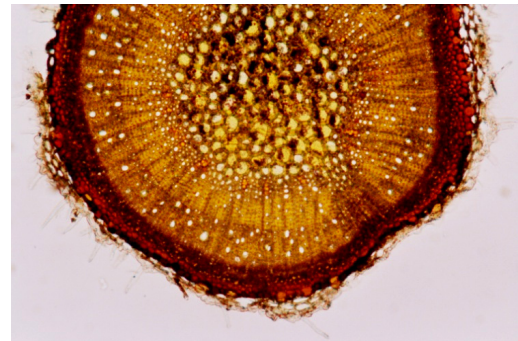
Slika 4.4. *B. spiculifolia* – poprečni presek lista



Slika 4.5. Naličje lista *B. spiculifolia* – SEM



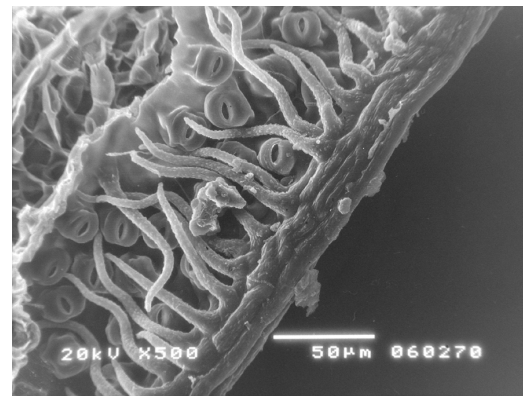
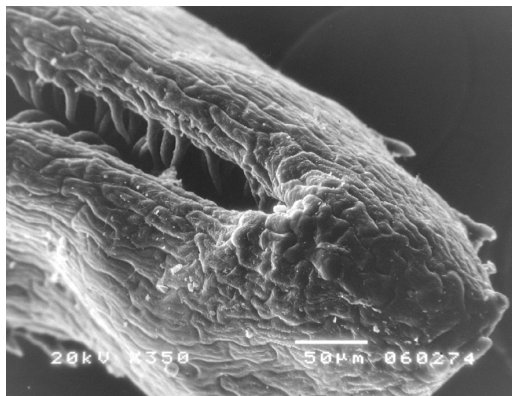
Slika 4.6. Stablo sa ožiljcima od lisnih drški *B. spiculifolia* – SEM



Slika 4.7. *B. spiculifolia* – poprečni presek stabla sekundarne građe

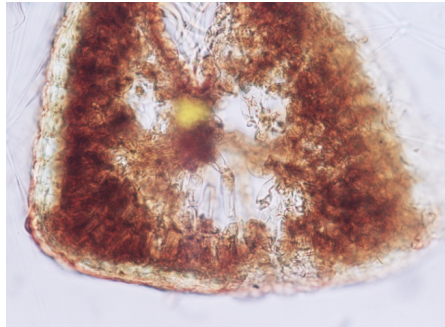
Calluna vulgaris

Listovi su sitni, ljuspasti i trobridi, a zimi menjaju zelenu boju u smeđu.



Slika 4.8. Površine naličja lista i kripte *C. vulgaris* – SEM

Građa lista. List je veoma sitan, ivice lista jako povijene ka naličju gde formiraju gotovo zatvorenu kriptu u kojoj se nalaze dugačke, jednoćelijske, nežlezdane dlake i brojne stome (Slika 4.8.). Na površini lista je debeo sloj kutikule, a jednoćelijski epidermis je od veoma krupnih ćelija (Slika 4.9.). Mezofil je od palisadnog i sunderastog parenhima.

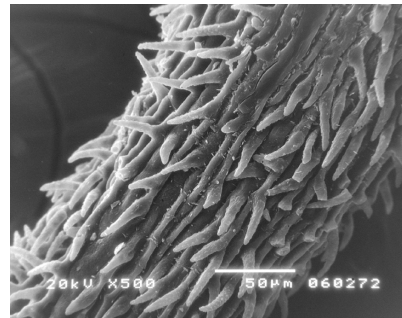


Slika 4.9. C. vulgaris – poprečni presek lista

Građa stabla. Stablo je ovalnog oblika sa nešto ekscentrično postavljenom srži od krupnih ćelija. Uočavaju se radijalni sržni zraci i diferencirani godovi u drvetu (Slika 4.10.). Površina mladog stabla je gusto pokrivena blago poleglim jednoćelijskim nežlezdanim dlakama (Slika 4.11.).



Slika 4.10. C. vulgaris – poprečni presek stabla sekundarne građe

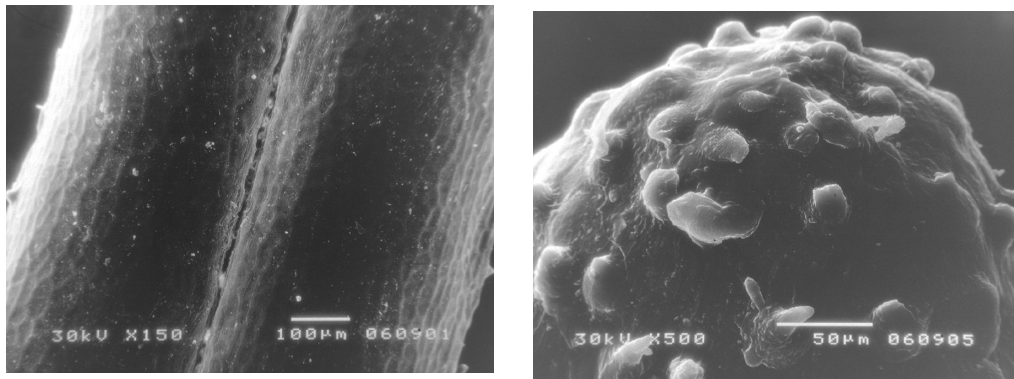


Slika 4.11. Površina stabla C. vulgaris – SEM

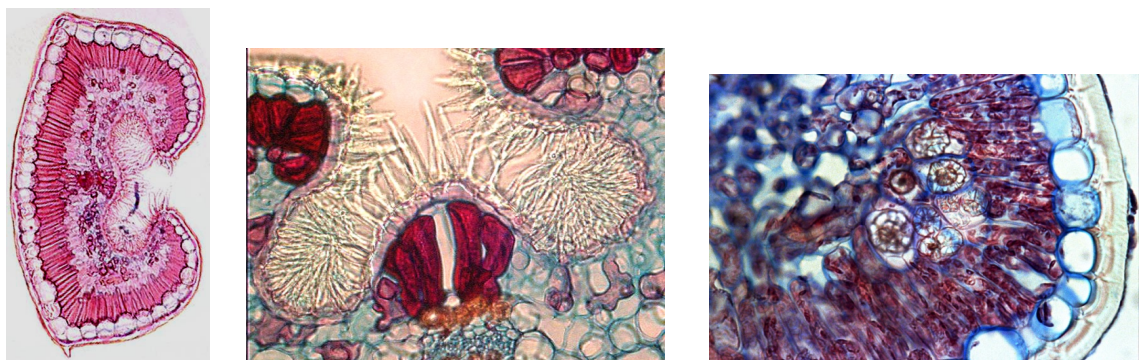
Erica arborea

Listovi su po 3 do 4 u pršljenu, linearni, uspravni, goli, i tamno zeleni. Margine listova su jako savijene tako da gotovo zatvaraju kriptu na donjoj strani (Slika 4.12).

Građa lista. Na površini erikoidnog lista je debeo sloj kutikule. Jednoslojan epidermis je od jako krupnih ćelija, upadljivo zadebljanih spoljašnjih zidova, dok su unutrašnji zidovi bogati sluzima. Mezofil je od jednog do dva sloja palisadnih ćelija, prvi sloj je od dugačkih a drugi od znatno kraćih ćelija, koje čine postepen prelaz ka sunderastom parenhimu. Na granici palisadnog i sunderastog parenhima su krupne ćelije čiji je lumen gotovo u potpunosti ispunjen kristalnim druzama. Povijene ivice lista formiraju kriptu u kojoj su prisutne jednoćelijske nežlezdane dlake (Slika 4.13).

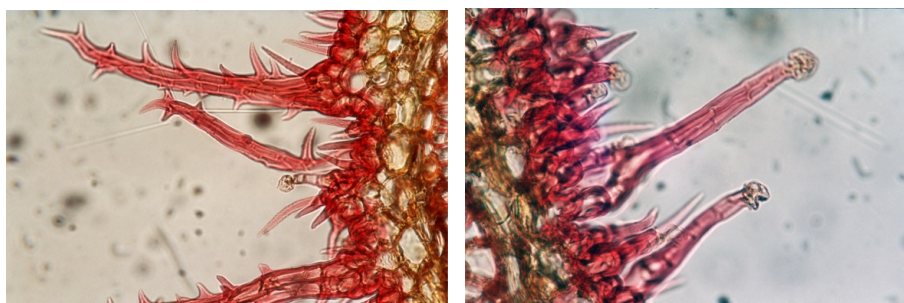


Slika 4.12. Površine naličja i vrha lista E. arborea – SEM



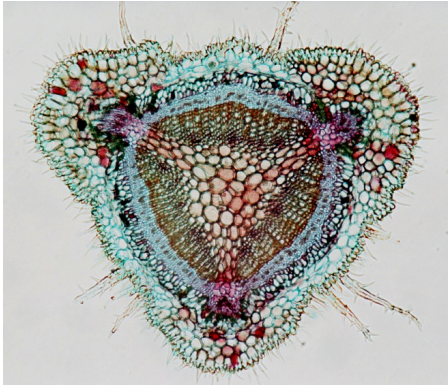
Slika 4.13. E. arborea – poprečni presek i detalji preseka lista

Primarna građa stabla. Na poprečnom preseku stablo je u obliku trougla (Slika 4.16.). Jednoslojni epidermis je sa mnogobrojnim dlakama (Slika 4.14., 4.15.). Nežlezdane dlake su jednoćelijske i višećelijske, biserijatne, a žlezdane kapitatnog tipa. Provodni elementi su u cilindru koji je na tri mesta presečen jako širokim sržnim zraccima (Slika 4.16.). U ćelijama srži su idioblasi sa kristalima kalcijum-oksalata.

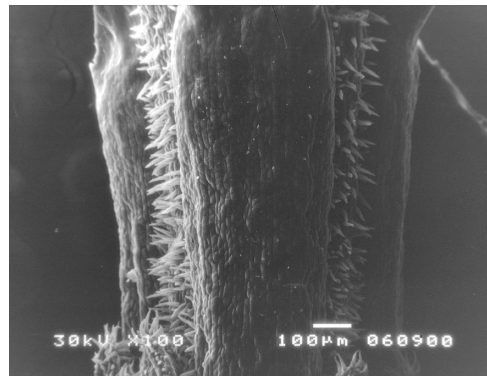


Slika 4.14. E. arborea – nežlezdane i žlezdane višećelijske biserijatne dlake

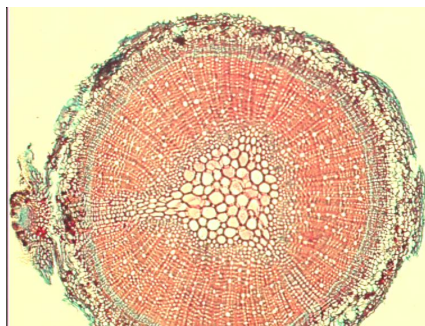
Sekundarna građa stabla. Sekundarna kora je od parenhimskih ćelija zadebljelih ćelijskih zidova i sporadičnih grupa sklereida. Sitasti elemenati floema se naizmenično smenjuju sa sklerenhimskim vlaknima. Sekundarno drvo je od ksilemskih elemenata i dva tipa sržnih zraka, mnogobrojnih uskih (od jednog do dva sloja ćelija), i tri jako široka zraka (od desetak nizova parenhimskih ćelija). Oblik srži je kao i u primarnoj građi stabla (Slika 4.17.).



Slika 4.15. Površina stabla *E. arborea*



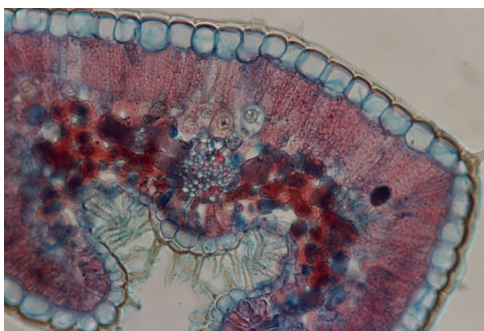
Slika 4.16. *E. arborea* – primarna građa stabla SEM



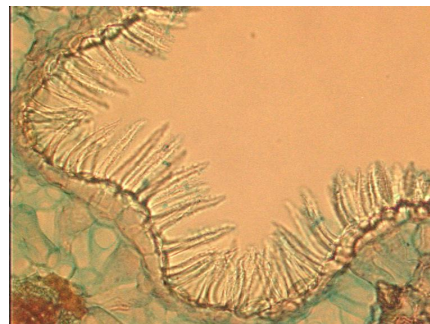
Slika 4.17. *E. arborea* – poprečni presek stabla

Erica carnea

Listovi su tamno zeleni, sitni, po 4 u pršljenu, linearni, manje ili više zašiljeni na vrhu, povijenog oboda.



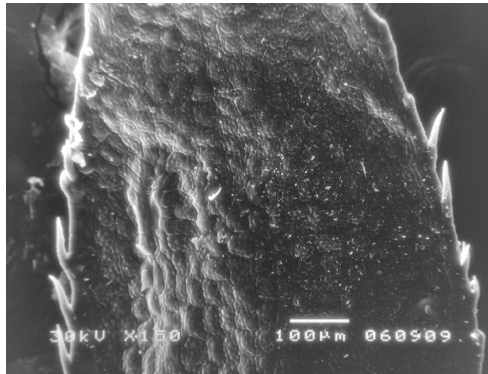
Slika 4.18. *E. carnea* – poprečni presek lista



Slika 4.19. *E. carnea* – detalj lista

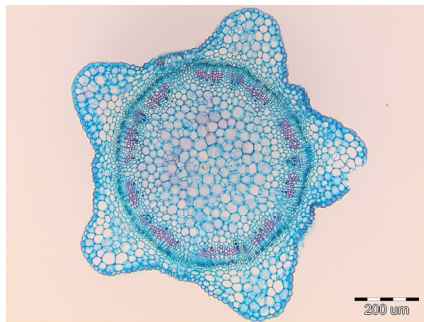
Građa lista. List je erikoidne građe. Na površini lista je deo sloj kutikule. Epidermis je jednoslojan, od krupnih ćelija čiji su spoljašnji zidovi zadebljali, a unutrašnji sa puno sluzi. Mezofil je od jednog do dva sloja palisada i sunderastog parenhima (Slika 4.18, 4.19.). Rastresiti sunderasti parenhim ispunjava centralni deo lista u kome dominira centralni provodni snopić okružen sklerenhimom. Bočni provodni snopići su samo od ksilema i obavijeni su provodnim parenhimom. Epidermis naličja u kripti je sa stomama, i jednoćelijskim nežlezdanim dlakama koje imaju bradavičasta, kutikularna zadebljanja po

površini. I po spoljašnjem obodu lista su prisutne jednoćelijske nežlezdane dlake (Slika 4.20.).

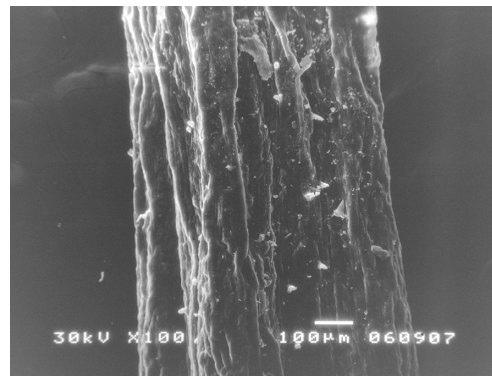


Slika 4.20. Površina lista E. carnea–SEM

Primarna građa stabla. Mlodo stablo je na poprečnom preseku petougaono i golo (Slika 4.21, 4.22.). Epidermis je jednoslojan, a izraženi uglovi su od parenhimskih ćelija. Ispod uglova su provodni snopići razdvojeni širokim sržnim zracima, koji se nalaze tačno ispod ulegnuća stabla. Najveći deo centralnog cilindra ispunjavaju parenhimske ćelije srži.



Slika 4.21. E. carnea –presek primarne građe



Slika 4.22. Površina stabla E. carnea – SEM

Sekundarna građa stabla. U sekundarnoj građi stabla dominira drvo od ksilemskih elemenata i srž petougaonog oblika (Slika 4.23.).



Slika 4.23. E. carnea – poprečni presek stabla sekundarne građe

2. Osnovna hemijska ispitivanja

Rezultati opštih hemijskih ispitivanja biljnog materijala odabranih vrsta su prikazani u Tabeli 4.1., a predstavljaju srednju vrednost najmanje 3 paralelna određivanja.

Tabela 4.1. Rezultati opštih hemijskih ispitivanja

	Gubitak sušenjem (%)	Ukupni pepeo (%)	Pepeo nerastvorljiv u HCl (%)	Ekstraktivne materije (%)	Broj bubrenja
<i>Arbutus unedo</i> CG	8,12±0,43	4,05±0,01	4,44±0,29	29,45±1,17	3,33±0,24
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	7,92±0,48	4,31±0,19	4,29±1,46	22,50±3,88	3,83±0,24
<i>Calluna vulgaris</i>	8,54±0,56	3,77±0,06	28,79±1,09	20,73±0,44	7,83±0,24
<i>Erica arborea</i>	7,27±0,19	3,06±0,09	2,39±0,20	23,12±3,97	3,80±0,24
<i>Erica carnea</i>	9,31±0,34	4,52±0,12	14,23±2,16	21,05±4,27	4,5±0,00

Gubitak sušenjem se u ispitivanim uzorcima kretao od 7 – 9,5%, a količina ukupnog pepela od 3 – 4,5%. Ovakve vrednosti za sadržaj vlage i ukupni pepeo su u skladu sa zahtevima monografije WHO za drogu *Uvae ursi folium* (18): maksimalno 10% vlage i 5% ukupnog pepela. Ista monografija propisuje maksimalnu količinu pepela nerastvornog u kiselinama (1,5%) i minimalnu količinu od 25% ekstraktivnih materija u kvalitetnoj drogi *Uvae ursi folium*.

Sadržaj u vodi ekstrahovanih materija u uzorcima se kretao od 20 – 30%, pri čemu je samo vrsta *Arbutus unedo* (sa staništa u Crnoj Gori) dala prinos vodenog ekstrakta veći od 25%. Za one vrste za koje je utvrđen najveći prinos etanolnog ekstrakta (*Erica arborea* i *Arbutus unedo*) najveći je i prinos vodenog ekstrakta, što je očekivano.

Količina pepela nerastvornog u kiselinama, kada se izrazi na masu suve droge (prema obrascu za izračunavanje koji predlaže WHO) a ne na masu ukupnog pepela, je i za ispitivane uzorke niža od 1,5% (čak i kada je u pitanju biljni materijal vrste *Calluna vulgaris* koji ima najveću količinu u kiselinama nerastvornih materija: 28,79% ukupnog pepela odnosno 1,08% suvog biljnog materijala).

Interesantno je da vrste koje daju dosta pepela nerastvornog u hlorovodoničnoj kiselini imaju i najveći broj bubrenja: *Erica carnea* 4,5 a *Calluna vulgaris* čak 7,83. Vodeni ekstrakt herbe vrste *Calluna vulgaris* se otežavano filtrirao i bio izuzetno sluzav, što se može objasniti upravo ovako visokim brojem bubrenja. Poređenja radi, prema zahtevima Ph.Jug. IV broj bubrenja za sluzne droge *Althaeae radix* i *Althaeae folium* ne sme biti manji od 7 (zahtev Ph. Eur. 6 je stroži: minimalno 10 za koren i 12 za list belog sleza), tako da se *Callunae herba* može smatrati i sluznom drogom (27,91).

3. Biljni materijal i etanolni ekstrakti

Biljni materijal je nakon sušenja čuvan u papirnim kesama, na suvom mestu, do analize. Za ekstrakciju je korišćen 70% etanol, pošto se on, odnosno ekstrakti različite konzistencije izrađeni sa njim, mogu koristiti bez većih ograničenja u obliku jednostavnih galenskih proizvoda. Takođe, ovakav rastvarač, smeša etanola i vode, obezbeđuje ekstrakciju i polarnih i nepolarnih jedinjenja.

Prinos ekstrakta (Tabela 4.2.) je varirao od 32 – 47%. Najveći prinos etanolnog ekstrakta daju vrste *Erica arborea* i *Arbutus unedo* (i to biljni materijal iz Crne Gore, *Arbutus unedo* CG, nešto viši u odnosu na biljni materijal poreklom iz Grčke, *Arbutus unedo* G). Skraćenice kojima su obeležavani suvi etanolni ekstrakti su takođe date u tabeli 4.2. Ekstrakt BE je dobijen perkolacijom biljnog materijala *Bruckenthalia spiculifolia* sakupljenog na Kopaoniku 2004. godine.

Tabela 4.2. Prinos etanolnih ekstrakata dobijenih perkolacijom sa 70% (V/V) etanolom i skraćenice za dobijene ekstrakte

Biljna vrsta	Droga	Naziv ekstrakta	Prinos (%)
<i>Arbutus unedo</i> CG	<i>Arbuti folium</i>	A1E	45,05
<i>Arbutus unedo</i> G	<i>Arbuti folium</i>	A2E	41,20
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	<i>Bruckenthaliae folium et flores</i>	BE	32,35
<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Callunae folium et flores</i>	VE	33,84
<i>Erica arborea</i>	<i>Ericae arboreae folium</i>	EE	38,98
<i>Erica carnea</i>	<i>Ericae carneae folium</i>	CE	38,61

Ekstrakti A1E, A2E, BE, VE, EE i CE su korišćeni za skrining farmakološke aktivnosti (antioksidativne i antimikrobne aktivnosti kao i za *in vivo* ispitivanje uticaja na veštački iritiranu kožu). Ekstrakti vrste *Arbutus unedo* korišćeni su za ispitivanje spazmolitičke aktivnosti, pošto je na osnovu dosadašnjih *in vitro* i *in vivo* ispitivanja pretpostavljeno da će ova biljna vrsta ispoljiti i spazmolitičku aktivnost. Ispitivan je i uticaj ekstrakta vrste *Erica arborea* na motilitet GIT-a.

Istraživanja biljne vrste *Bruckenthalia spiculifolia* do sada nisu rađena (nema podataka o tradicionalnoj upotrebi, hemijskom sastavu niti farmakološkoj aktivnosti). Pošto je ekstrakt BE dao odlične rezultate u preliminarnim ispitivanjima farmakološke aktivnosti (najizraženija antioksidativna aktivnost), drugi deo eksperimenta je rađen sa ekstraktima biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sakupljenog 2011. na lokaciji Vlasinskog jezera. Deo ovog biljnog materijala je ekstrahovan perkolacijom sa 70% etanolom (dobijeni: ekstrakti korena, lista, cveta i herbe) a ekstrakcija preostalog biljnog materijala (list) je vršena prema proceduri primerenoj istraživačkim zahtevima – primenjena je ekstrakcija po polarnosti (višestruka ekstrakcija). Skraćenice kojima su obeležavani suvi ekstrakti dobijeni perkolacijom i frakcionisanjem biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sakupljenog na Vlasini 2011. su dati u Tabeli 4.3.

Od ekstrakata dobijenih perkolacijom, najveći prinos je dalo list – *Bruckenthaliae folium*, koji je korišćen i za višestruku ekstrakciju. Prinos ekstrakta BE (dobijen perkolacijom *Bruckenthaliae folium et flores* sa Kopaonika) je veći od prinosa ekstrakta

BH (dobijen perkolacijom *Bruckenthaliae folium et flores* sa Vlasine). Svih 9 ekstrakata biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sakupljenog 2011. na lokaciji Vlasinskog jezera (veći deo ekstrakta B, dobijenog maceracijom lista nakon obezmaščivanja, je rastvoren u cilju fracionisanja, a manji deo je ostavljen za ispitivanja) je korišćeno za ispitivanja antioksidativne i antiinflamatorne aktivnosti.

Tabela 4.3. Prinos ekstrakata dobijenih perkolacijom i višestrukom ekstrakcijom biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera i skraćenice za dobijene ekstrakte

Droga	Rastvarač	Naziv ekstrakta	Prinos (%)
<i>Bruckenthaliae radix</i>	Etanol 70% (V/V)	BK	11,5
<i>Bruckenthaliae folium</i>	Etanol 70% (V/V)	BL	25,92
<i>Bruckenthaliae flos</i>	Etanol 70% (V/V)	BC	21,65
<i>Bruckenthaliae folium et flores</i>	Etanol 70% (V/V)	BH	25,88
<i>Bruckenthaliae folium</i>	Petrol etar	PB	4,73
	Etanol 70% (V/V) maceracija nakon obezmaščivanja	B	22,83
	Etar	ETB	2,55
	Etilacetat	EAB	3,78
	Voda	VB	14,24

4. Kvalitativna hemijska analiza

4.1. Dokazne hemijske reakcije

U sprašenom biljnom materijalu svih ispitivanih vrsta je utvrđeno prisustvo flavonoida (*Arbutus unedo* CG i *Arbutus unedo* G – crvena, *Bruckenthalia spiculifolia* – krv crvena, *Calluna vulgaris* i *Erica carnea* – cigla crvena, *Erica arborea* – bordo crvena boja). Pojava narandžaste, crvene ili bordo boje u Sinoda (cijanidinskoj) reakciji ukazuje na prisustvo različitih tipova flavonoida (osnovna crvena boja ovih reakcija ukazuje na prisustvo flavona, flavanonola i njihovih heterozida).

U reakciji dekokta sprašenog biljnog materijala ispitivanih vrsta sa rastvorom FeCl_3 dobijeni su tamni, gotovo crni rastvori. Pozitivna reakcija tanina može da maskira pozitivnu reakciju eventualno prisutnih fenolnih heterozida (crveno-smeđe obojenje) sa ovim reagensom. Rezultati reakcija dekokta ispitivanih vrsta sa opštim taložnim i specifičnim bojenim reagensima za tanine (želatin, strihnin-sulfat, $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, FeCl_3 , $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$ i bromna voda) ukazuju na prisustvo tanina. Pozitivnim reakcijama su smatrani i slabi talozi i zamućenje.

Arbutus unedo nakon pozitivne tanoformske (formaldehidne) probe (koju daju svi ispitivani uzorci) daje i pozitivnu reakciju sa natrijum-acetatom i gvožđe(III)-amonijum sulfatom (izražen plavičast prsten), što uz tamno plavu boju reakcije sa rastvorom gvožđe-hlorida ukazuje na prisustvo mešovityh tanina, za razliku od ostalih ispitivanih vrsta gde su dokazani katehinski tanini.

Ovakvi rezultati dokaznih reakcija za tanine su u skladu sa prethodnim ispitivanjima ovih biljnih vrsta: za vrstu *Arbutus unedo* se navodi prisustvo i katehinskih i galnih (63,64), a za vrste *Calluna vulgaris* i *Erica arborea* samo katehinskih tanina (34,49).

U drogi *Uvae ursi folium* dominiraju galni tanini (18,171), ali se navodi i prisustvo katehinskih tanina (34).

4.2. TLC određivanja

Tankoslojnom hromatografijom su ispitivani uzorci sprašenog biljnog materijala koji je ekstrahovan prema odgovarajućim propisima. Vršena je kvalitativna analiza fenolnih heterozida, flavonoidnih heterozida i njihovih aglikona kao i prisutnih šećera. Dobijeni hromatogrami su posmatrani i slikani u UV svetlosti (254 nm i 365 nm) pre i posle prskanja propisanim reagensima.

Podaci o R_f vrednosti za jedno isto jedinjenje u određenom sistemu rastvarača se razlikuju u literaturi, pa je najsigurnije identifikaciju vršiti uz standardne supstance. Zato su identifikovane samo mrlje koje odgovaraju standardima nanošenim paralelno sa ispitivanim uzorcima, što podrazumeva isti sistem i iste uslove razvijanja hromatograma.

Arbutin ne fluorescira u UV svetlosti na 365 nm, a nakon prskanja Berlinskim plavim daje izražene plave zone (69). TLC analizom arbutina i hidrohina, uz standarde ovih jedinjenja, utvrđeno je da samo *Arbutus unedo* daje mrlju na Rf vrednosti za arbutin (0,41), a ni jedna od ispitivanih vrsta ne sadrži hidrohina. Moguće je da su fenolni heterozidi prisutni u tragovima ili malim količinama koje nisu detektovane ovom analizom.

Rezultati TLC analize flavonoidnih jedinjenja su prikazani u Tabeli 4.4. TLC hromatogram je slikan pre (svi flavonoidi gase fluorescenciju na UV-254 nm što se vidi kao tamnoplave mrlje na svetloj TLC ploči) i nakon prskanja NP reagensom. Plavičaste zone blizu startne linije se mogu pripisati taninima, koji su kao molekuli velike mase veoma slabo pokretljivi. Raspored mrlja ekstrakata vrste *Arbutus unedo* iz Crne Gore i Grčke je identičan (iste Rf vrednosti i iste boje, odnosno ponašanje pod UV svetlošću i nakon prskanja NP reagensom: najizraženije mrlje na Rf 0,50; 0,68 i 0,76), samo se razlikuju u intenzitetu i debljini, što ukazuje na različit sadržaj pojedinih flavonoida. Velika sličnost u flavonoidnom sastavu (jedna mrlja razlike) uočena je i između vrsta *Bruckenthalia spiculifolia* i *Calluna vulgaris*, ali se na osnovu TLC analize flavonoidnih jedinjenja može izvesti i opšti zaključak da ispitivane vrste imaju veći broj zajedničkih komponenata.

Tabela 4.4. Rezultati uporedne TLC analize flavonoidnih jedinjenja ispitivanih vrsta

Rf flavonoida	<i>Arbutus unedo</i> CG	<i>Arbutus unedo</i> G	<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Erica arborea</i>	<i>Erica carnea</i>
0,48*	-	-	-	+	+	+
0,50	+	+	-	-	+	+
0,59	-	-	-	-	+	-
0,61	-	-	+	+	-	+
0,68	+	+	-	-	+	-
0,71	+	+	+	+	+	-
0,76	+	+	-	-	-	-
0,79	-	-	+	+	+	-
0,81	+	+	-	-	-	-
0,86	+	+	+	+	-	-

* mrlja po položaju i svetlozelenoj fluorescenciji odgovara standardu hlorogenske kiseline

Dvodimenzionom TLC analizom uz hidrolizu heterozida direktno na ploči, koja je vršena u cilju razdvajanja aglikona flavonoida (svi uzorci su dali negativnu Borntrigerovu reakciju, odnosno nije dokazano prisustvo antrahinonskih heterozida), uočeno je nekoliko zajedničkih, ali i prisustvo aglikona karakterističnih za pojedine ispitivane vrste. Aglikon na Rf 0,08 se javlja u svim uzorcima (u *Calluna vulgaris* ekstraktu dva puta), osim kod vrste *Erica arborea*. Ova vrsta, sa druge strane, ima zajednički aglikon sa vrstama *Calluna vulgaris* i *Erica carnea*, kao i jedan aglikon sa vrstom *Bruckenthalia spiculifolia*.

TLC analizom je utvrđena i izuzetna sličnost u sastavu šećera ispitivanih vrsta. Po sastavu šećernih komponenata se izdvajaju 4 vrste koje su i u morfološkom smislu slične: *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* i *Erica carnea*, pri čemu je utvrđena kompozicija šećera u vrstama *Bruckenthalia spiculifolia* i *Erica arborea* identična. Glukoza i ramnoza (identifikovane na osnovu standarda nanošenih paralelno sa

uzorcima) i šećer koji je u primenjenom TLC sistemu imao Rf vrednost 0,79 su prisutni u svim uzorcima.

4.3. Semikvantitativna HPLC analiza fenolnih jedinjenja

Na osnovu poređenja retencionih vremena i izgleda UV pikova analiziranih uzoraka i standarda, identifikovano je 11 fenolnih jedinjenja, a utvrđeno je i prisustvo još jedne fenolne kiseline i još jednog glikozida kvercetina (Tabela 4.5.). Semikvantitativna analiza je izvršena prevođenjem površine ispod odgovarajućeg pika u znak + ili – (ako jedinjenje nije detektovano). Kvantifikacija hlorogenske kiseline i kvercitrina je vršena na osnovu površine pika (uz odgovarajuću površinu standarda hlorogenske kiseline, odnosno kvercitrina). Hromatogrami i spektri najznačajnijih jedinjenja su dati u Dodatku III.

Tabela 4.5. Rezultati HPLC analize ekstrakata biljnih vrsta *Bruckenthalia spiculifolia*, *Erica arborea*, *Erica carnea*, *Calluna vulgaris*, *Arbutus unedo CG* i *Arbutus unedo G*

RT (min)	Fenolno jedinjenje	BE	EE	CE	VE	A1E	A2E
4,4	Galna kiselina	tr	tr	tr	tr	+	tr
7,4	Fenolna kiselina	-	-	++	++	-	-
7,7	Hlorogenska kiselina	tr	++	+++	+++	-	-
10,1	Rutin	+	+	+	-	-	-
10,9	Izokvercitrin	++	+	+	++	++	+
11,4	Elagna kiselina	-	-	-	-	++	-
12,7	Kvercetin glikozid	++	++	-	-	-	-
14,0	Kvercitrin	+++	+++	tr	+	+++	+
14,3	Ferulna kiselina	-	-	-	+	-	-
15,5	Apigenin 7-O-glukozid	-	-	-	+	-	-
26,7	Kvercetin	+	+	tr	++	tr	-
28,8	Apigenin	-	-	-	tr	-	-
29,3	Kemferol	-	-	-	+	tr	-

Kvantifikacija prisutnih fenolnih jedinjenja na osnovu površine ispod pika na HPLC hromatogramu: +++ = najzastupljenije, ++ = veoma zastupljeno, + = prisutno, tr = u tragu prisutno, - = nije detektovano.

Flavonoidi kvercitrin i kvercetin-3-O-glukozid (izokvercitrin) kao i fenolna kiselina – galna kiselina su bili prisutni u svim ispitivanim uzorcima. Kvercitrin je dominantna komponenta u ekstraktima BE, EE i A1E, a hlorogenska kiselina u CE i VE. Hlorogenska kiselina je samo u tragovima detektovana u ekstraktu BE, a odsutna je u ekstraktima A1E i A2E.

Aglikon kvercetin je prisutan u 4 ekstrakta (BE, EE, VE i A1E), a apigenin i kemferol u samo 1, odnosno 2 uzorka. Apigenin i apigenin-7-O-glukozid su detektovani samo u VE, a rutin u uzorcima BE, CE i EE.

Fenolna kiselina na RT 7,4 min i glikozid kvercetina na RT 17,7 min (za koje nisu postojali odgovarajući standardi) su detektovani u CE i VE, odnosno BE i EE.

Sastav ispitivanih fenolnih jedinjenja u okviru testiranih uzoraka je prilično raznovrstan; ne samo u okviru odabranih vrsta porodice Ericaceae već i u okviru istog roda (EE i CE), pa i iste vrste sa različitih staništa (A1E i A2E).

Prisustvo kvercetina i kemferola i njihovih glikozida (29,60,61), kao i galne kiseline (63,64) u listovima vrste *Arbutus unedo* je već potvrđeno, a elagna kiselina je ovde prvi put detektovana i to samo u biljnom materijalu poreklom iz Crne Gore. Moguće je da se ona javlja samo sporadično u predstavnicima ove vrste. Izračunati sadržaj kvercitrina (dominantnog flavonoida) u ekstraktu A1E je 26,91 mg/g.

Prisustvo kvercetina, kemferola i njihovih glikozida kao i apigenin-7-O-glukozida (mada ne i slobodnog aglikona apigenina) u herbi vrste *Calluna vulgaris* se pominje u literaturi (34,36,66,67). Takođe, već je izolovano više derivata kafene kiseline (34), pa je uz hlorogensku i ferulnu, i nepoznata fenolna kiselina verovatno neki derivat kafene kiseline. Prisustvo galne kiseline je sada prvi put registrovano u ovoj vrsti. Preračunavanjem površine dominantnog fenolnog jedinjenja ekstrakta VE utvrđeno je da sadrži 35,48 mg hlorogenske kiseline/g.

Rutin, hlorogenska i galna kiselina su prvi put detektovani u vrsti *Erica arborea*, dok je prisustvo kvercetina i njegovih glikozida već poznato (70,71). Kvantifikacijom dominantnih jedinjenja hromatograma ekstrakta EE, utvrđeno da sadrži: 21,47 mg hlorogenske kiseline/g i 51,42 mg kvercitrina/g.

Kako vrste *Erica carnea* i *Bruckenthalia spiculifolia* do sada nisu ispitivane sa aspekta sadržaja sekundarnih metabolita, izvršena HPLC analiza donosi prve podatke o njihovom fenolnom sastavu.

U hromatogramu fenolnih jedinjenja ekstrakta CE dominira hlorogenska kiselina (uz nepoznatu fenolnu kiselinu – verovatno je i ona derivat kafene kiseline), koja je prisutna u količini od 26,99 mg/g.

Od 3 fenolna jedinjenja koja dominiraju u ekstraktu BE (izokvercitrin, kvercitrin i nepoznati glikozid kvercetina), na osnovu površine pika je kvantifikovan kvercitrin: 70,91 mg/g. Ova značajna količina kvercitrina, uz utvrđen visok nivo ukupnih flavonoida (11,8%), može barem delom da objasni izuzetnu antioksidativnu aktivnost etanolnog ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (posebno u testovima inhibicije lipidne peroksidacije), ali i antiinflamatornu aktivnost različitih ekstrakata i frakcija ove biljne vrste.

Najvažniji flavonoidi u drogi *Uvae ursi folium* su glikozidi kvercetina, kemferola i mircetina (uključujući najzastupljeniji hiperozid, zatim kvercitrin, izokvercitrin, mircitrin,...), a fenolna kiselina galna kiselina (prisutne su i p-kumarinska, sinirginska, salicilna, p-hidroksibenzojeva, ferulna, kafena i litosperminska kiselina) (34,171).

5. Kvantitativna hemijska analiza

5.1. Određivanje arbutina

Određivanje arbutina je vršeno prema propisima Ph. Jug. V (spektrofotometrijska metoda kojom se kvantifikuje sadržaj ukupnih hidrohinskih derivata) i Ph. Eur. 5 (HPLC određivanje arbutina i hidrohina).

Spektrofotometrijsko određivanje hidrohinskih derivata po Ph. Jug. V

Spektrofotometrijskom metodom, propisanom u Ph. Jug. V za drogu *Uvae –ursi folium*, se određuju ukupni derivati hidrohina u biljnom materijalu, a rezultati se izražavaju na bezvodni arbutin. Značajnija količina ukupnih hidrohinskih derivata je spektrofotometrijskim određivanjem detektovana u vrsti *Arbutus unedo* sa oba staništa (1,66% i 1,56% u biljnom materijalu iz Crne Gore i iz Grčke odnosno 2,65% i 2,96% u odgovarajućim etanolnim ekstraktima; ovde je interesantno da *Arbutus unedo* iz Crne Gore u sprasenom biljnom materijalu ima nešto viši a u suvom etanolnom ekstraktu nešto niži sadržaj hidrohinskih derivata od iste vrste poreklom iz Grčke). U ostalim vrstama je sadržaj hidrohinskih derivata, izraženih na arbutin, oko 0,5% u biljnom materijalu, a ispod 1% u suvom ekstraktu (Tabela 4.6.).

Tabela 4.6. Rezultati spektrofotometrijskog (Ph. Jug. V) određivanja ukupnih hidrohinskih derivata izraženih kao arbutin

	% arbutina ± SD	
	biljni materijal	ekstrakt
<i>Arbutus unedo</i> CG	1,66 ± 0,12	2,65 ± 0,13
<i>Arbutus unedo</i> G	1,56 ± 0,01	2,96 ± 0,05
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	0,50 ± 0,00	0,65 ± 0,07
<i>Calluna vulgaris</i>	0,51 ± 0,02	0,80 ± 0,05
<i>Erica arborea</i>	0,47 ± 0,00	0,93 ± 0,03
<i>Erica carnea</i>	0,47 ± 0,00	0,76 ± 0,02
<i>Arctostaphylos uva ursi</i>	7,29 ± 0,11	n.o.
<i>Vaccinium myrtillus</i>	1,06 ± 0,01	n.o.
<i>Vaccinium vitis-idea</i>	8,47 ± 0,18	n.o.

n.o. = nije određivano

U literaturi se navodi podatak da vrsta *Calluna vulgaris* sadrži arbutin, odnosno 0,6 – 0,68% ukupnih hidrohinskih glikozida (34,69), što je nešto viša vrednost od one koja je u ovom istraživanju utvrđena.

Poređenja radi je istom metodom određivan i sadržaj ukupnih hidrohinskih derivata u sprasenom suvom biljnom materijalu vrsta *Arctostaphylos uva ursi* (komercijalni uzorak), *Vaccinium myrtillus* i *Vaccinium vitis-idea* (oba uzorka su sakupljena na Suvoj planini, 27. maja 2006.). Sadržaj fenolnih heterozida je u ovim vrstama bio viši nego u ispitivanim vrstama familije Ericaceae (Tabela 4.6.). Jedini izuzetak je vrsta *Arbutus unedo* sa oba staništa u kojoj je određen sadržaj bio veći nego u listu borovnice, ali znatno niži nego u listovima uve i brusnice.

HPLC određivanje arbutina

HPLC određivanjem, po metodi Ph. Eur. 5, utvrđen je sadržaj arbutina i hidrohina u sprasenom biljnom materijalu ispitivanih vrsta (Tabela 4.7.). Kvantifikacija je vršena na osnovu integrisane površine pikova sa hromatograma, uz korišćenje eksternog standarda.

Hidrohinon nije detektovan u ispitivanim uzorcima, a kod vrsta *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* i *Erica carnea* nije registrovano ni prisustvo arbutina. Oba uzorka vrste *Arbutus unedo* su sadržale arbutin, i to uzorak iz Crne Gore u nešto većem procentu od uzorka iz Grčke (Tabela 4.7.), što je u skladu sa rezultatima spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidrohinijskih derivata u biljnom materijalu za ove uzorke. HPLC hromatogrami ova dva uzorka su prikazani u Dodatku III.

Istom metodom je u poredbenim uzorcima – komercijalnom *Arctostaphylos uva ursi* i *Vaccinium vitis-idea* sa Suve planine određeno 5,24% odnosno 3,46% arbutina, dok u uzorku *Vaccinium myrtillus* sa Suve planine nije detektovano prisustvo arbutina.

Tabela 4.7. Rezultati HPLC određivanja arbutina

	% arbutina	% hidrohina
<i>Arbutus unedo</i> CG	1,2402	-
<i>Arbutus unedo</i> G	1,0021	-

Sadržaj arbutina u divljim vrstama *A. uva-ursi* može biti i do 17% (15), a prema zahtevu Ph.Eur. 6 droga *Uvae-ursi folium* ne sme sadržati manje od 7% arbutina (m/m suve droge) (27). Od ispitivanih vrsta porodice Ericaceae samo *Arbutus unedo* (ako se izuzme poredbena vrsta *Vaccinium vitis-idea*) bi, na osnovu sadržaja arbutina, mogao da posluži kao eventualna zamena za poznatu uroantiseptičnu drogu *Uvae-ursi folium*, uz uslov korigovanja (povećanja) doze.

Odsustvo hidrohina u ispitivanim vrstama je pozitivno, ako se ima u vidu specijalno upozorenje ESCOP-a, da nivo slobodnog hidrohina u biljnom materijalu i preparatima treba kontrolisati zbog potencijalne toksičnosti (171).

5.2. Određivanje flavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida je određivan u etanolnim ekstraktima i u biljnom materijalu. Korišćena je metoda za određivanje ukupnih flavonoida opisana u DAB 10 monografiji *Crataegi folium et flores*, sa tim da je prilikom ispitivanja ekstrakata odmeravana dva puta manja količina uzorka (po 0,3 g suvih etanolnih ekstrakata). Rezultati su prikazani u Tabeli 4.8.

Svi uzorci sadrže značajne količine ukupnih flavonoidnih jedinjenja. Po sadržaju ukupnih flavonoida se izdvaja vrsta *Bruckenthalia spiculifolia* (3,42% u biljnom materijalu i 11,8% u ekstraktu), dok su vrednosti za ostale ispitivane vrste prilično bliske kada je u pitanju biljni materijal (0,77 – 1,79%), a kreću se u nešto širem opsegu kada su u pitanju ekstrakti (1,39 – 6,95%). *Arbutus unedo* sa područja Grčke je nešto bogatiji flavonoidima

od iste vrste sakupljane u Crnoj Gori. Ovi rezultati su veoma bliski gornjoj granici opsega koji je publikovan za sadržaj ukupnih flavonida u listovima iste vrste sa područja Hrvatske: 0,52 – 2,00 % (58).

Tabela 4.8. Sadržaj ukupnih flavonoida u biljnom materijalu i u etanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta familije Ericaceae

% flavonoida ± standardna devijacija		
	biljni materijal	ekstrakt
<i>Arbutus unedo</i> CG	1,76 ± 0,07	3,05 ± 0,01
<i>Arbutus unedo</i> G	1,97 ± 0,02	4,60 ± 0,09
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	3,42 ± 0,05	11,80 ± 0,25
<i>Calluna vulgaris</i>	1,43 ± 0,03	3,70 ± 0,12
<i>Erica arborea</i>	1,79 ± 0,03	6,95 ± 0,08
<i>Erica carnea</i>	0,77 ± 0,04	1,39 ± 0,00

Sadržaj flavonoidnih glikozida u drogu *Uvae-ursi folium* se kreće od 0,8 do 1,5%, pri čemu je dominantna flavonoidna komponenta hiperozid (34). Sadržaj ukupnih flavonoidnih jedinjenja je u biljnim materijalima ispitivanih uzoraka viši nego u oficinalnoj drogi (jedini izuzetak je *Erica carnea* sa 0,77% ukupnih flavonoida).

5.3. Određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina

Prilikom određivanja sadržaja polifenola i tanina korišćene su sledeće kalibracione krive standardnog rastvora katehina:

$y = 0,0575x - 0,0517$ $R^2 = 0,9973$ (određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u etanolnim ekstraktima A1E, BE, VE, EE i CE)

$y = 0,0422x - 0,0431$ $R^2 = 0,9995$ (određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u spršenom biljnom materijalu vrsta: *Arbutus unedo* CG, *Bruckenthalia spiculifolia*, *Calluna vulgaris*, *Erica arborea* i *Erica carnea*)

$y = 0,0417x + 0,0081$ $R^2 = 0,9997$ (određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u etanolnom ekstraktu A2E)

$y = 0,0236x + 0,0076$ $R^2 = 0,9993$ (određivanje sadržaja ukupnih polifenola i tanina u spršenom biljnom materijalu vrste *Arbutus unedo* G)

Sve ispitivane biljne vrste sadrže značajnu količinu ukupnih polifenola i tanina (Tabela 4.9.). Najveći sadržaj je određen u listovima vrste *Arbutus unedo* (i to je sadržaj veći u biljnom materijalu sakupljanom u Grčkoj u odnosu na materijal iz Crne Gore), a zatim u biljnom materijalu vrsta *Bruckenthalia spiculifolia* i *Calluna vulgaris*.

Tabela 4.9. Sadržaj polifenola, netaninskih materija i tanina u biljnom materijalu

	% polifenola	% netanina	% tanina
<i>Arbutus unedo</i> CG	10,18±0,28	2,81±0,10	7,37±0,10
<i>Arbutus unedo</i> G	14,73±0,01	0,76±0,01	13,97±0,00
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i>	4,66±0,08	0,86±0,02	3,80±0,06
<i>Calluna vulgaris</i>	4,22±0,12	1,27±0,05	2,95±0,15
<i>Erica arborea</i>	1,46±0,07	0,52±0,05	0,94±0,09
<i>Erica carnea</i>	3,33±0,20	1,59±0,21	1,74±0,01

Sadržaj polifenola u ekstraktima je sledio isti raspored: najzastupljeniji su u A2E (čak 28,69% ukupnih polifenola i 24,80% tanina u suvom etanolnom ekstraktu) a najniže vrednosti su pronađene u ekstraktima EE i CE (Tabela 4.10.).

Tabela 4.10. Sadržaj polifenola, netaninskih materija i tanina u etanolnim ekstraktima

ekstrakt	% polifenola	% netanina	% tanina
<i>Arbutus unedo</i> CG – A1E	20,48 ± 0,36	8,16 ± 0,15	12,32 ± 0,15
<i>Arbutus unedo</i> G – A2E	28,69 ± 0,57	3,89 ± 0,13	24,80 ± 0,13
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i> – BE	19,00 ± 0,48	3,98 ± 0,07	15,02 ± 0,07
<i>Calluna vulgaris</i> – VE	18,28 ± 0,12	5,62 ± 0,28	12,66 ± 0,28
<i>Erica arborea</i> – EE	13,99 ± 0,12	4,60 ± 0,10	9,39 ± 0,02
<i>Erica carnea</i> – CE	12,91 ± 0,10	5,23 ± 0,33	7,69 ± 0,23

Ovako visok sadržaj polifenola, a pre svega tanina, je u skladu sa podacima iz literature. Još Tucakov navodi da je sadržaj ukupnih tanina u korenu i listovima vrste *Arbutus unedo* oko 18% (31). U *Calluna vulgaris* monografiji (PDR for herbal medicines) stoji da su u ovoj biljnoj vrsti obično prisutni katehinski tanini, i to u opsegu od 3 do 7%, a postoji i podatak da vrste *Calluna vulgaris* i *Erica arborea* mogu sadržati i preko 17,6% katehinskih tanina (34,49).

U monografijama droge *Uvae ursi folium* se navodi da ona sadrži 15-20% tanina i to najvećim delom galotanina, kao i da su prisutni i elagitanini i kondenzovani tanini (uglavnom proantocijanidini i njihovi monomeri) (18,34,171). Ispitivane biljne vrste sadrže niže vrednosti tanina u biljnom materijalu od ove oficinalne droge.

5.4. Određivanje sadržaja fenilpropanoidnih derivata

Rezultati određivanja sadržaja fenilpropanoidnih derivata u suvim etanolnim ekstraktima su prikazani u Tabeli 4.11. Najviši sadržaj fenilpropanoidnih derivata je izmeren u ekstraktima vrsta *Bruckenthalia spiculifolia* i *Calluna vulgaris*, pri čemu prvi ekstrakt ima nešto više vrednosti. Najniže vrednosti se nalaze kod vrste *Arbutus unedo*, pri čemu je uzorak iz Crne Gore bogatiji ovom grupom sekundarnih metabolita od uzorka iz Grčke.

Tabela 4.11. Sadržaj fenilpropanoidnih derivata u etanolnim ekstraktima ispitivanih vrsta familije Ericaceae

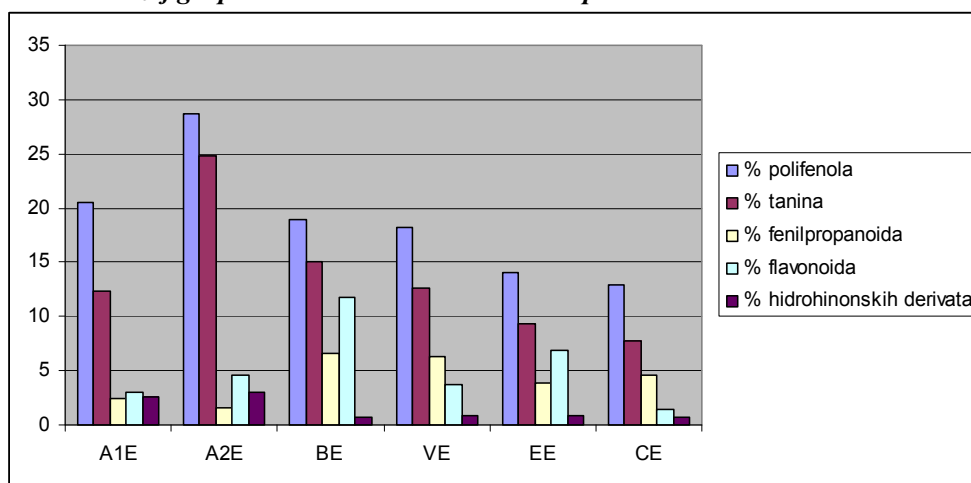
Ekstrakt	% hlorogenske kiseline ± standardna devijacija
<i>Arbutus unedo</i> CG – A1E	2,42 ± 0,31
<i>Arbutus unedo</i> G – A2E	1,57 ± 0,07
<i>Bruckenthalia spiculifolia</i> – BE	6,53 ± 0,30
<i>Calluna vulgaris</i> – VE	6,33 ± 0,11
<i>Erica arborea</i> – EE	3,86 ± 0,18
<i>Erica carnea</i> – CE	4,52 ± 0,06

I TLC i HPLC analiza fenolnih jedinjenja je ukazala na odsustvo hlorogenske kiseline u vrsti *Arbutus unedo*. U vrsti *Bruckenthalia spiculifolia* hlorogenska kiselina nije detektovana TLC analizom, dok je HPLC analizom registrovana u tragovima. Međutim,

kako ekstrakt ove vrste sadrži najveći procenat fenilpropanoidnih derivata, nameće se zaključak da su, iako je hlorogenska kiselina odsutna/prisutna u tragu, ostali derivati hidroksicimetne kiseline veoma zastupljeni.

Sadržaj određivanih grupa fenolnih jedinjenja u suvim etanolnim ekstraktima ispitivanih biljnih vrsta je, samo radi bolje preglednosti, dat i grafički na Slici 4.24. Naravno, sadržaj ukupnih polifenola dominira pošto oni obuhvataju i sve ostale određivane grupe sekundarnih biljnih metabolita, mada ne predstavlja njihov prost zbir.

Slika 4.24. Sadržaj grupa sekundarnih metabolita u ispitivanim suvim etanolnim ekstraktima



6. Farmakološka ispitivanja

6.1. Antioksidativna aktivnost

Antioksidativna aktivnost je osnov iz koga proizilaze mnoge biološke funkcije kao što su antimutagena, antikancerogena, usporavanje starenja i mnoge druge (136).

Određivanje ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP-metodom

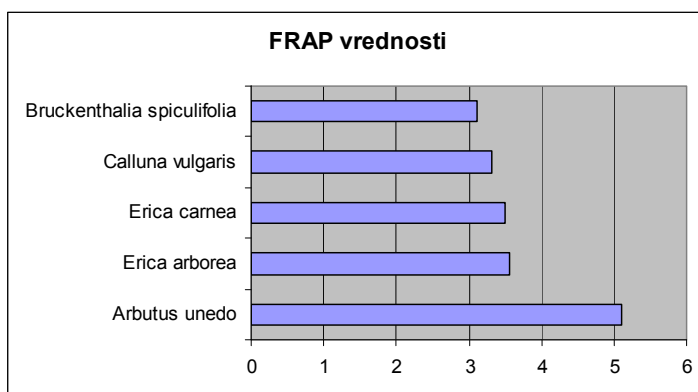
Antioksidativni potencijal je određivan na osnovu standardne krive dobijene korišćenjem rastvora fero-sulfata poznatih koncentracija (Fe^{2+} od 200 – 1000 μM , odnosno 200, 400, 600, 800 i 1000 μM):

$$y = 10,19 x - 0,0992 \quad R^2 = 0,9994$$

Tabela 4.12. Rezultati određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP metodom

Ekstrakt	A srednje	koncentracija Fe^{2+} u analizi ($\mu\text{molFe}^{2+}/\text{ml}$)	FRAP vrednost ($\text{mmolFe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakta)
A1E	1,203 \pm 0,024	0,13 \pm 0,01	5,11 \pm 0,09
BE	0,694 \pm 0,053	0,08 \pm 0,01	3,11 \pm 0,21
VE	0,747 \pm 0,020	0,08 \pm 0,01	3,32 \pm 0,08
EE	0,806 \pm 0,029	0,09 \pm 0,01	3,55 \pm 0,11
CE	0,790 \pm 0,011	0,09 \pm 0,01	3,49 \pm 0,04

Rezultati određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala suvih etanolnih ekstrakata su prikazani u Tabeli 4.12., a radi bolje preglednosti i na Slici 4.25. Najveću moć redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} pokazuje ekstrakt vrste *Arbutus unedo* (najviša FRAP vrednost: 5,11), što se može povezati sa najvišim sadržajem hidrohinskih derivata, dok ostale ispitivane vrste pokazuju relativno bliske redukcione moći (FRAP vrednosti se kreću od 3,11 do 3,55 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$ ekstrakta).



Slika 4.25. Odnos FRAP vrednosti ispitivanih vrsta familije Ericaceae

Određivanje intenziteta lipidne peroksidacije u lipozomima

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja inhibicije LP u lipozomima TBA testom su prikazani u Tabeli 4.13. i grafički (Slika 4.26.).

Tabela 4.13. Rezultati određivanja inhibicije intenziteta lipidne peroksidacije

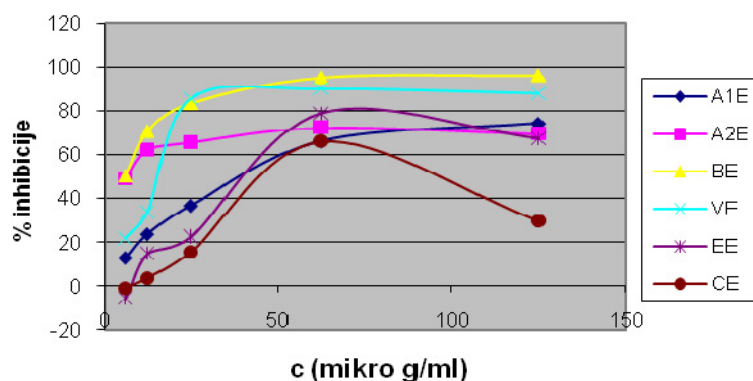
Ekstrakt	Inhibicija lipidne peroksidacije (%)				
	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25,0 µg/ml	62,5 µg/ml	125,0 µg/ml
A1E	12,85	23,71	36,73	66,16	74,31
A2E	49,31	62,33	65,75	72,47	69,63
BE	50,32	70,70	83,44	95,33	96,32
VE	22,04	34,06	85,97	90,26	88,25
EE	- 5,63	14,79	22,63	78,97	67,44
CE	- 0,95	3,61	15,50	65,97	29,54

Ekstrakti vrsta *Erica arborea* i *Erica carnea* u najnižoj ispitivanoj koncentraciji pokazuju prooksidativno dejstvo, dok sa porastom koncentracije raste antioksidativna aktivnost.

Supstance sa antioksidantnom aktivnošću mogu pod određenim uslovima delovati i kao prooksidanti. Većina fenolnih jedinjenja može pokazati prooksidativnu aktivnost u niskim koncentracijama, nasuprot sintetskim antioksidantima (BHA i BHT). Mircetin, kvercetin i kemferol pokazuju prooksidativnu aktivnost u testu određivanja kapaciteta apsorpcije kiseoničnih radikala sa Cu^{2+} kao prelaznim metalom oksidantom. Delfinidin, cijanidin, malvidin, malvin i pelagonidin pokazuju izvesnu prooksidantnu aktivnost u sistemima humanih LDL i lecitinskih lipozoma, kada se kao katalizator koristi Cu^{2+} . Prooksidantna aktivnost flavonoida i drugih antioksidanata (uključujući i askorbinsku kiselinu i α -tokoferol) nema značaja *in vivo*, gde joni prelaznih metala (od kojih je uticaj jona bakra najbolje proučen) nisu slobodni, osim u određenim oboljenjima koja uključuju i povećanu koncentraciju metala (172). Međutim, pošto prooksidantna aktivnost može ubrzati oštećenje molekula kao što su DNK, ugljenihidrati ili proteini, potencijalni antioksidanti se moraju testirati i na prooksidantnu aktivnost (120). Kao najmerodavniji pokazatelj aktivnosti nekog uzoraka je predložena zbirna vrednost antioksidantne i prooksidantne aktivnosti koju on pokazuje (173).

Najizraženiju dozno-zavisnu inhibiciju LP pokazuje BE (96,32% u koncentraciji od 125 µg/ml). Inhibiciju preko 90% daje i VE (90,26% inhibicije sa koncentracijom od 62,5 µg/ml), dok ostali ekstrakti pokazuju nešto slabiju, ali i dalje značajnu aktivnost u ovom testu.

Poređenjem aktivnosti inhibicije LP vrste *Arbutus unedo* sa dva staništa uočava se veoma slično ponašanje u višim koncentracijama. Antioksidanti koji su efikasni helatori jona prelaznih metala mogu različito doprinosti antioksidativnom odgovoru, pošto je $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ aktivan redoks par u Fentonovoj reakciji (125). Dakle, izuzetna sposobnost redukcije jona gvožđa koju ispoljava ekstrakt vrste *Arbutus unedo* (FRAP test), može objasniti nešto slabije rezultate uzoraka A1E i A2E u zaustavljanju LP.



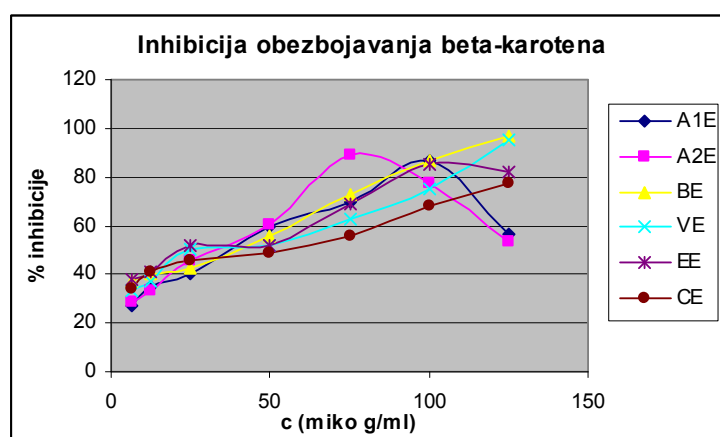
Slika 4.26. Odnos inhibicija lipidne peroksidacije

Određivanje sposobnosti inhibicije obezbojavanja β -karotena

Rezultati spektrofotometrijskog određivanja sposobnost inhibicije obezbojavanja β -karotena u sistemu β -karoten/linolna kiselina, izraženi u procentima inhibicije u zavisnosti od primenjene koncentracije rastvora suvog etanolnog ekstrakta, su prikazani u Tabeli 4.14. i grafički (Slika 4.27.).

Tabela 4.14. Rezultati određivanja inhibicije obezbojavanja β -karotena

Ekstrakt	Inhibicija obezbojavanja β -karotena (%)						
	6,25 μ g/ml	12,5 μ g/ml	25 μ g/ml	50 μ g/ml	75 μ g/ml	100 μ g/ml	125,0 μ g/ml
A1E	27,01	35,13	40,07	59,82	69,81	86,77	56,68
A2E	28,90	33,32	45,37	60,11	89,16	77,50	53,64
BE	36,79	40,05	42,81	55,87	72,78	86,43	96,54
VE	33,04	37,40	50,39	51,52	62,49	75,15	95,03
EE	37,97	40,87	52,08	51,93	69,18	84,94	82,32
CE	33,87	40,68	45,72	48,48	55,40	68,43	77,09



Slika 4.27. Odnos inhibicija obezbojavanja β -karotena

Svi testirani uzorci pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu, pri čemu je dozna zavisnost jače izražena nego u testu inhibicije LP u sistemu lipozoma.

Razmatranjem rezultata dve antioksidativne metode koja se baziraju na inhibiciji lipidne peroksidacije uočava se veoma slično ponašanje uzoraka vrste *Arbutus unedo* sa dva različita staništa, ali je veoma slična aktivnost i ekstrakata vrsta BE i CE (pokazuju najizraženiju inhibiciju obezbojavanja β -karotena, a bile su najefikasnije i u inhibiciji lipidne peroksidacije u sistemu lipozoma).

Tabela 4.15. Rezultati određivanja inhibicije obezbojavanja β -karotena za ekstrakte vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera

Ekstrakt	IC ₅₀ (μg/ml)
BK	9,10± 0,81
BL	6,56± 0,27
BC	19,62± 0,78
BH	5,17± 0,04
PB	/
B	7,86± 0,91
ETB	2,41± 0,08
EAB	6,03± 1,07
VB	6,95± 0,35

Rezultati antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (sa Vlasinskog jezera) u β -karotena/linolna kiselina testu su prikazani u Tabeli 4.15. i to kao IC₅₀ vrednosti (koncentracije ekstrakta koje dovode do 50% inhibicije). Aktivnost ovih ekstrakata je veoma izražena, pri čemu je najsnažniji ekstrakt dobijen perkolacijom herbe etanolom, odnosno kada su u pitanju frakcije etanolnog ekstrakta, etarska frakcija (IC₅₀=2,14 μg/ml). Petroletarska frakcija nije dostigla IC₅₀ vrednost u ovom ispitivanju, odnosno delovala je najslabije od svih testiranih uzoraka.

Čitava paleta sintetskih antioksidanata (koji pre svega inhibiraju ili odlažu lipidnu peroksidaciju) se koristi u cilju zaštite ne samo namirnica već i lekova, pomoćnih lekovitih sredstava, kozmetičkih preparata i sl. Butilhidroksianizol (BHA) i butilhidroksitoluol (BHT), široko primenjivani sintetski antioksidanti, pored visoke stabilnosti, niske cene i ostalih praktičnih pogodnosti, imaju nenadmašnu efikasnost u različitim proizvodima. Međutim, smatra se da sintetski antioksidanti imaju negativne posledice po zdravlje (potencijalni promotori kancerogeneze), pa postoje stroga ograničenja za njihovu primenu i trend zamene prirodnim antioksidantima, koji su, između ostalog, i veoma cenjeni od strane potrošača. Teži se pronalaženju bezbednog i efikasnog antioksidanta, a dobri kandidati za tako nešto su, kako su pokazala brojna ispitivanja, biljni fenoli (posebno kada se radi o jedinjenjima koja prekidaju lančanu reakciju), i to posebno tanini i flavonoidi (2,121,124,137,174).

Radi poređenja su ispitivane i sposobnosti komercijalnih sintetskih antioksidanata: BHT i BHA da inhibiraju obezbojavanje β -karotena. Pri istim uslovima u kojima su testirani ekstrakti određene su i IC₅₀ vrednosti za BHT (0,03±0,00 μg/ml) i BHA

(0,04±0,01 µg/ml). Kao što je i očekivano, sintetski antioksidanti pokazuju znatno veću aktivnost u zaustavljanju lančane reakcije lipidne peroksidacije.

Određivanje sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala DPPH testom

Svi ispitivani ekstrakti pokazuju izuzetnu sposobnost neutralizacije slobodnih radikala, što se može videti na osnovu IC₅₀ vrednosti koje su dobijene DPPH testom (Tabela 4.16.). Najaktivniji su ekstrakti vrste *Arbutus unedo* (i to je ekstrakt biljnog materijala iz Grčke ispoljio nižu IC₅₀ vrednost od onog iz Crne Gore). Kako mali molekuli (npr. hidrohinon) imaju bolji prilaz radikalu (103), verovatno su ponovo hidrohinonski derivati, uz polifenolna jedinjenja (donore H atoma), najodgovorniji za antiradikalnu aktivnost.

Tabela 4.16. Redosled aktivnosti etanolnih ekstrakata ispitivanih vrsta familije Ericaceae, dobijen poredjenjem IC₅₀ koncentracija

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)
A2E	5,38
A1E	7,14
BE	10,29
VE	12,05
EE	12,92
CE	14,34

Sposobnost neutralizacije slobodnog DPPH radikala koju ispoljavaju ekstrakti biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (sa Vlasinskog jezera) je prikazana u Tabeli 4.17. Ponovo najbolju antioksidativnu aktivnost ispoljava ekstrakt dobijen perkolacijom herbe etanolom, međutim, kada su u pitanju frakcije etanolnog ekstrakta, najaktivnija u uklanjanju slobodnog radikala je etilacetatna frakcija (IC₅₀=1,07 µg/ml). Ipak, aktivnost svih testiranih ekstrakata (izuzev petroletarske frakcije, što je i očekivano, pošto petroletar ekstrahuje nepolarna jedinjenja) je izuzetna – niža od 4,3 µg/ml.

Tabela 4.17. IC₅₀ vrednosti u DPPH testu za ekstrakte vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera

Ekstrakt	IC ₅₀ (µg/ml)
BK	2,59 ± 0,10
BL	3,06 ± 0,21
BC	3,04 ± 0,20
BH	2,29 ± 0,19
PB	109,65 ± 2,42
B	2,61 ± 0,40
ETB	4,27 ± 0,58
EAB	1,07 ± 0,26
VB	3,85 ± 0,38

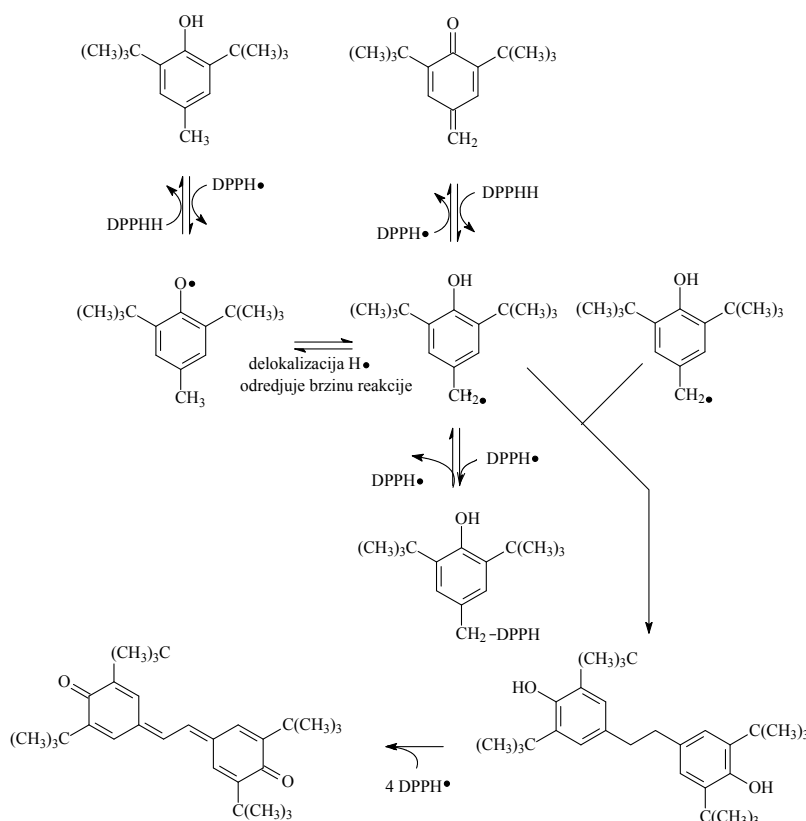
Redosled antioksidativne aktivnosti ekstrakata biljnog materijala vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (sa Vlasinskog jezera) je sledeći:

EAB > BH > BK > B > BC > BL > VB > ETB >>>PB (u β-karotena/linolna kiselina testu)

ETB > BH > EAB > BL > VB > B > BK > BC >>>>>PB (u DPPH testu)

Radi poređenja antiradikalske aktivnosti ispitivana je i sposobnost komercijalnih sintetskih antioksidanta, BHT i BHA, da uklanjaju slobodne radikale. Pri istim uslovima u kojima su testirani ekstrakti određene su IC_{50} vrednosti: $22,82 \pm 2,07 \mu\text{g/ml}$ (BHT) i $2,44 \pm 0,09 \mu\text{g/ml}$ (BHA).

Poređenjem dobijenih koncentracija se može zaključiti da ekstrakti svih ispitivanih vrsta familije Ericaceae pokazuju izuzetnu antioksidantnu sposobnost, čak i da bolje uklanjaju slobodne radikale od komercijalnog antioksidanta BHT-a. Međutim, treba oprezno izvoditi zaključke o "slabosti" sintetskih antioksidanta, odnosno potrebna su paralelna ispitivanja i u ostalim test-sistemima. Naime, DPPH je stabilan radikal sa usporanim razlaganjem i reaguje sa većinom supstanci. Kao posledica toga, samo dobri H-donori reaguju sa stabilnim radikalom na steheometrijski način (103): reakcija je veoma brza a smanjenje broja DPPH \cdot molekula odgovara broju raspoloživih hidroksilnih grupa. Ipak, kako reakcioni mehanizam između antioksidanta i DPPH \cdot zavisi od strukturne konformacije antioksidanta, veliki broj jedinjenja reaguje sporije i kompleksnijim mehanizmom. Ukoliko radikal nastao iz antioksidanta nije dovoljno stabilan, moguće su i mnoge druge reakcije.



Slika 4.28. Predloženi mehanizam reakcije DPPH \cdot i BHT (139)

Kompleksna reakcija BHT-a i DPPH \cdot obuhvata tri različita reakciona puta: nakon prve najbrže reakcije (kojom reaguju brzi hvatači ovog slobodnog radikala), BHT može dati još jedan H atom ili nakon regeneracije OH grupe dimerizacijom, ona može da reaguje

po drugi put sa DPPH·, dajući bihinoidnu strukturu. Treći reakcioni put uključuje kompleksiranje (Slika 4.28.).

Proučavanjem kinetike ponašanja tri različita antioksidanta (BHT, eugenol i izoeugenol) utvrđeno je da steheometrijske vrednosti ne objašnjavaju sve aspekte antioksidantne efikasnosti, čak i da postoji inverzna zavisnost steheometrije i brzine reakcije što ukazuje na to da što se sporije reakcija odvija, to je složeniji njen mehanizam. BHT se može smatrati najboljim antioksidantom pošto 1 mol redukuje otprilike 3 mola DPPH·, uprkos tome što je reakcija veoma spora (završava se nakon 5 h na 20 °C) (139).

Treba napomenuti da je često veoma važna brzina uklanjanja slobodnog radikala – potencijalne opasnosti u sistemu čim se on pojavi, a pre nego što nanese nepopravljivu štetu okolnim strukturama. Ipak, podaci dobijeni *in vitro* metodama imaju samo hemijski značaj i teško se mogu interpretirati na biološke sisteme, pošto ne mere bioraspodivnost, stabilnost *in vivo*, zadržavanje antioksidanata u tkivima i reaktivnost *in situ* (175).

Veza antioksidativne aktivnosti i sadržaja fenolnih jedinjenja

Mehanizmi korišćenih antioksidativnih testova su različiti i njihovi rezultati ne moraju da budu međusobno u korelaciji, međutim ne isključuju jedni druge. U slučaju polifenola rezultati su uglavnom bliski u različitim testovima, pošto su oni redukciona sredstva koja istovremeno imaju i sposobnost neutralisanja slobodnih radikala i vezivanja teških i prelaznih metala u vidu kompleksa (176).

Značajna povezanost antioksidantnog kapaciteta i ukupnog sadržaja fenolnih supstanci ukazuje na to da su fenolne supstance najzaslužnije za antioksidantni kapacitet. Utvrđena je značajna korelacija i potvrđeno je da fenolne komponente značajno doprinose ukupnom antioksidantnom kapacitetu lekovitog bilja (106,176). Polifenoli poseduju idealnu hemijsku strukturu za aktivnost uklanjanja slobodnih radikala, i pokazano je da su *in vitro* često bolji antioksidanti od tokoferola i askorbata. Antioksidativna aktivnost polifenola potiče od njihove velike reaktivnosti kao donora elektrona ili vodonika, od osobine radikala nastalih iz polifenola da stabilizuju i delokalizuju nespareni elektron (funkcija prekidanja lančane reakcije) i da heliraju jone prelaznih metala (terminacija Fentonove reakcije). Još jedan mehanizam koji doprinosi antioksidativnim karakteristikama fenola je sposobnost flavonoida da promene kinetiku peroksidacije modifikacijom načina pakovanja lipida i smanjenjem fluidnosti membrana. Ove promene mogu sterno ometati difuziju slobodnih radikala i ograničiti reakcije peroksidacije (114).

Vrsta sa najvećim sadržajem ukupnih polifenola (*Arbutus unedo* iz Grčke) ima najveću FRAP vrednost – najveći totalni antioksidativni kapacitet, a sa smanjenjem sadržaja polifenola i ova vrednost se smanjuje. Statistički značajna pozitivna korelacija ($p=0,019$, $R=0,937$) je utvrđena za sadržaj netaninskih polifenolnih supstanci i totalni redukcioni kapacitet – FRAP. Vrednosti dobijene u FRAP ispitivanju su još jače povezane sa vrednostima ukupnih hidrohinskih derivata – gde svakako upravo vrsta *Arbutus unedo* dominira po sadržaju arbutina i ukupnih hidrohinona: statistička značajnost ove korelacije je $p=0,001$ uz $R=0,991$.

Sadržaj ukupnih hidrohinskih derivata statistički značajno korelira i sa IC_{50} vrednostima iz DPPH testa: $p=0,014$ uz $R=0,903$. Regresionom analizom je utvrđena statistički značajna korelacija između sposobnosti neutralizacije DPPH radikala i sadržaja ukupnih polifenola ($p=0,007$, $R=0,932$), kao i sadržaja ukupnih tanina ($p=0,039$, $R=0,834$).

Što se tiče inhibicije lipidne peroksidacije, u testu obezbojavanja β -karotena je utvrđena veoma izražena korelacija samo sa sadržajem fenilpropanoidnih jedinjenja ($p=0,001$, $R=0,97$), a postoji i inverzna zavisnost sa sadržajem hidrohinskih derivata ($p=0,008$, $R=0,928$; pošto *Arbutus unedo* pokazuje najnižu aktivnost u β -karoten/linolna kiselina testu, a sadrži najveću količinu ovih jedinjenja).

Kada je u pitanju drugi test inhibicije lipidne peroksidacije (u sistemu lipozoma), nije utvrđena statistički značajna korelacija ni sa jednom određivanom grupom sekundarnih metabolita. Postoji izvesna zavisnost inhibicije lipidne peroksidacije i sadržaja ukupnih fenilpropanoidnih jedinjenja ($R=0,785$; $p=0,064$), odnosno flavonoida ($R=0,752$; $p=0,084$), mada je u oba slučaja $p>0,05$ (a $p<0,05$ je odabrano za kriterijum kada je u pitanju statistička značajnost).

Sve ispitivane vrste pokazuju dobru antioksidativnu aktivnost. Interesantno je da najbolju inhibiciju lipidne peroksidacije (i u testu indukovane peroksidacije u lipozomima i u β -karoten/linolna kiselina testu) ispoljava BE (etanolni ekstrakt vrste *Bruckenthalia spiculifolia*), koji sadrži najveći procenat flavonoida, fenilpropanoidnih jedinjenja i dosta visok (u okviru ispitivanih vrsta odmah posle vrste *Arbutus*) sadržaj ukupnih polifenola. Sa druge strane, najbolje rezultate u uklanjanju slobodnih radikala (DPPH test) i redukciji jona gvožđa (FRAP test) ispoljava vrsta *Arbutus unedo*, za šta su verovatno, barem delimično, odgovorni derivati hidrohinona (uključujući prisutni arbutin), mada ne treba zanemariti ni izuzetno visok sadržaj ukupnih polifenolnih jedinjenja.

6.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost etanolnih ekstrakata je ispitivana korišćenjem 10 sojeva mikroorganizama: 5 Gram-(+) i 5 Gram-(-). Kontrole su bile diskovi sa rastvaračem u kome je rastvaran ekstrakt (70% etanol), kristal-violet (1mg/ml) i antibiotik na koji je ispitivan mikroorganizam osetljiv (tetraciklin, streptomycin ili penicilin). Nanošene su dve serije razblaženja. Razblaženiji ekstrakti (opseg razblaženja od 1:100 do 1:20) nisu dali merljive zone inhibicije, pa su nanošeni koncentrovaniji ekstrakti i to: koncentracija 1 (40% rastvor etanolnog ekstrakta odnosno 2:5), koncentracija 2 (20% rastvor etanolnog ekstrakta odnosno 1:5), koncentracija 3 (10% rastvor etanolnog ekstrakta odnosno 1:10) i 4 (5% rastvor etanolnog ekstrakta odnosno 1:20).

Rezultati drugog određivanja (sa višim koncentracijama ekstrakata) su prikazani u Tabeli 4.18. kao prečnici očitanih zona inhibicije (pri čemu je prečnik diskova na koje su nanošeni uzorci 13 mm) i u Tabeli 4.19. kao % aktivnosti antibiotika i kristal-violeta.

Tabela 4.18. Rezultati antimikrobnog testa (prečnici zona inhibicije koje daju različita razblaženja ekstrakata, 70% etanol (rastvarač), kristal-violet i odgovarajući antibiotik u kulturama 10 testiranih sojeva mikroorganizama)

Mikroorganizam	A1E	BE	VE	EE	CE	70% etanol	Kristal violet	Antibiotik
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC10707	1=14.5 2,3=14	1,2,3=14	1,2=14 3=13.5	1=14	1- 4=14	/	20	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	/	/	/	/	/	/	/	22
<i>E. coli</i> ATCC25922	/	/	/	/	/	/	/	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCIB9111	/	/	/	/	/	13.5	16	17
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	1,2=14.5 3=14	/	/	/	/	/	21	27
<i>Micc. flavus</i> ATCC10240	1=17 2,3=16 4=15	1=14.5 2=14	/	1,2=13.5	/	/	22	37
<i>S. aureus</i> ATCC29213	/	1=14 2,3=13.5	1=14.5 2,=14 3=13.5	/	1=16 2=15 3=14	/	17	18
<i>Sarcina lutea</i> ATCC9391	1,2=14.5 3=14	1=15 2=14.5	/	1,2=13.5	1=13.5	/	20	47
<i>E. coli</i> SY252	/	/	/	/	/	/	14	18
<i>E. coli</i> LPCA	1=15 2=14 3=13.5	/	/	/	/	/	21	23

Tabela 4.19. Antimikrobna aktivnost različitih koncentracija etanolnih ekstrakta ispitivanih vrsta izražena kao % aktivnosti koju u istom test sistemu ispoljava odgovarajući antibiotik odnosno kristal-violet

	A1E		BE		EE		CE		VE	
	% ak. antib.	% ak. kristal violeta	% ak. antib.	% ak. kristal violeta	% ak. antib.	% ak. kristal violeta	% ak. antib.	% ak. kristal violeta	% ak. antib.	% ak. kristal violeta
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC10707	11,54 7,69 7,69	21,43 14,29 14,29	7,69 7,69 7,69	14,29 14,29 14,29	7,69	14,29	7,69 7,69 7,69	14,29 14,29 14,29	7,69 3,85	14,29 3,85
<i>S. epidermidis</i> ATCC12228	10,71 10,71 7,14	18,75 18,75 12,50	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Micc. flavus</i> ATCC10240	16,67 12,50 12,50 8,33	44,44 33,33 33,33 22,22	6,25 4,17	16,67 11,11	2,08 2,08	5,56 5,56	/	/	/	/
<i>S. aureus</i> ATCC29213	/	/	20,00 10,00 10,00	25,00 12,50 12,50	/	/	60,00 40,00 20,00	75,00 50,00 25,00	60,00 40,00 20,00	75,00 50,00 25,00
<i>Sarcina lutea</i> ATCC9391	4,41 4,41 2,94	21,43 21,43 14,29	5,88 4,41	28,57 21,43	1,47 1,47	7,14 7,14	1,47	7,14	/	/
<i>E. coli</i> LPCA	20,00 10,00 5,00	25,00 12,50 6,25	/	/	/	/	/	/	/	/

Antimikrobna aktivnost testiranih ekstrakata je prilično slaba. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027, *E. coli* ATCC25922 i *Klebsiella pneumoniae* NCIB9111 nisu osjetljive ni na jedan od ispitivanih ekstrakata. Ostali mikroorganizmi daju male zone inhibicije i to uglavnom kada su u pitanju najveće koncentracije ekstrakata. Međutim, ni detektovana antimikrobna aktivnost ekstrakata nije od većeg značaja, pošto jedva da ponegde prelazi 50% aktivnosti koju na testirani mikroorganizam ispoljava odgovarajući antibiotik ili rastvor kristal-violeta. Kao najbolji rezultati u ovom određivanju se mogu izdvojiti aktivnosti ekstrakta VE i CE na soj *Staphylococcus aureus*: u najvišoj aplikovanoj koncentraciji dosežu 60% aktivnosti antibiotika na koji je bakterija osjetljiva, odnosno u dve najviše koncentracije dosežu 75 i 50% aktivnosti kristal violeta. *Staphylococcus aureus* je koagulaza-pozitivan, što ga diferencira od drugih vrsta roda *Staphylococcus*. On je i najčešći izazivač oboljenja ljudi (gotovo svaka osoba tokom života dobije neku od infekcija koju izaziva *S. aureus*, od trovanja hranom ili minorne kožne infekcije do teške infekcije koja ugrožava život) (177). Gram-(+) bakterije su obično osjetljivije od Gram(-) na antimikrobna jedinjenja biljaka (145). Testirani uzorci ispoljavaju, iako veoma skromnu, antimikrobnu aktivnost upravo prema Gram-(+) korišćenim sojevima (jedini izuzetak je etanolni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* koji ne deluje na *S. aureus*, ali ispoljava određenu antimikrobnu aktivnost prema Gram(-) bakteriji: laboratorijskom soju divlje *E. coli*).

Što se tiče dosadašnjih ispitivanja antimikrobne aktivnosti ispitivanih biljnih vrsta, ona se svode na umerenu aktivnost ekstrakta korena vrste *Arbutus unedo* prema sojevima *E. coli* i *Staphylococcus aureus* (59) i bakteriostatsku aktivnost metanolnog ekstrakta semena vrste *Calluna vulgaris* prema sojevima *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus hominis* (sa MIC 0,1 µg/ml) (86).

Potvrđena je i aktivnost ekstrakta listova vrste *Arbutus unedo* protiv protozoa *Leishmania tropica* (80) i *Trichomonas vaginalis* (81).

WHO monografija droge *Uvae ursi folium* navodi da 30% etanolni ekstrakt ove droge *in vitro* inhibira rast sojeva: *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* i *Staphylococcus aureus*, dok 95% etanolni ekstrakt ne pokazuje antibakterijsku aktivnost. Postoji podatak i o antimikrobnoj aktivnosti koju etanolni ekstrakt *in vitro* ispoljava prema sojevima *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus faecalis* i *Enterobacter aerogenes*, pri čemu se antibakterijska aktivnost pripisuje prisustvu arbutina (18).

Uzorak u čijem biljnom materijalu je HPLC analizom utvrđeno prisustvo arbutina (A1E) nije ispoljio značajnu antimikrobnu aktivnost ni prema jednom od testiranih sojeva.

6.3. Spazmolitička aktivnost

Ekstrakti listova i korena vrste *Arbutus unedo* ispoljavaju snažan endotel-zavisni vazorelaksantni efekat, koji uključuje aktivaciju endotelijalne NO sintaze i cGMP sintaze (61,64). Pored poznate uloge u vazorelaksaciji, NO je važan medijator relaksacije i glatkih mišića GIT-a (151). Kako se spazmolitička aktivnost koju ispoljavaju brojni biljni ekstrakti objašnjava prisustvom fenolnih jedinjenja, a njihov sadržaj u ovoj biljnoj vrsti je značajan, izvršeno je ispitivanje uticaja ekstrakata vrste *Arbutus unedo* sa dva lokaliteta na kontraktilnost izolovanog ileuma pacova.

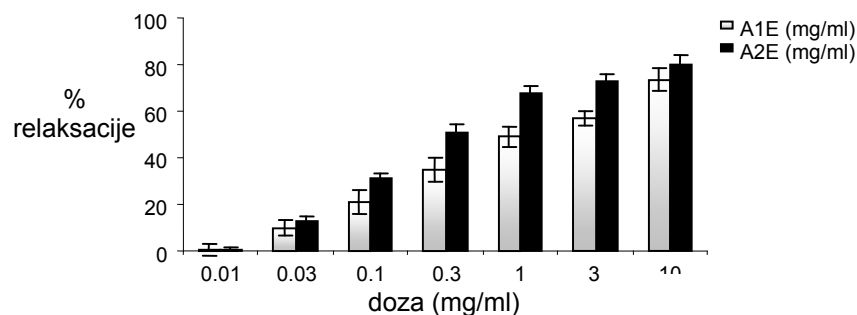
Arbutus unedo

U cilju utvrđivanja spazmolitičke aktivnosti, prvo je ispitivan uticaj etanolnih ekstrakata (A1E – etanolni ekstrakt listova vrste *Arbutus unedo* iz Crne Gore i A2E – etanolni ekstrakt listova vrste *Arbutus unedo* iz Grčke) na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Oba ekstrakta u ispitivanim koncentracijama (0,03 – 10 mg/ml) dovode do snižavanja tonusa spontanih kontrakcija ileuma, i to na dozno-zavisan način (Slika 4.29.), što ukazuje na spazmolitičku aktivnost.

A2E pokazuje statistički značajno višu aktivnost od A1E ($p < 0.05$), što se može zaključiti i iz izračunatih IC_{50} vrednosti:

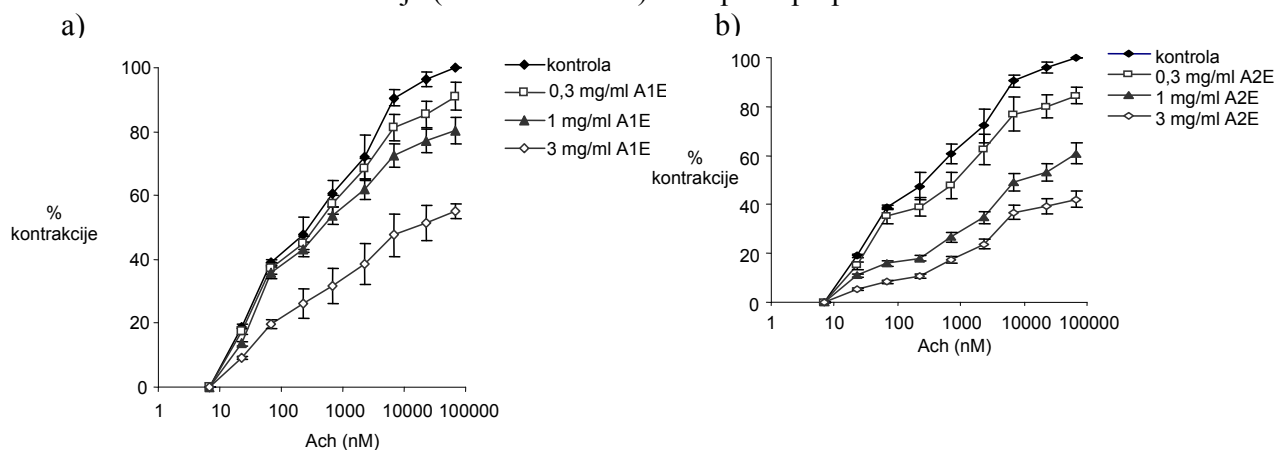
$$IC_{50} (A1E) = 5,26 \pm 0,98 \text{ mg/ml}$$

$$IC_{50} (A2E) = 1,66 \pm 0,39 \text{ mg/ml}$$



Slika 4.29. Miorelaksantni uticaj ekstrakata A1E i A2E na spontane kontrakcije (zavisnost primenjene doze i postignutog % relaksacije)

Uticaj na pokretljivost creva je procenjivana na osnovu sposobnosti ekstrakata da blokiraju kontrakcije izazvane agonistima, odnosno meren je efekat A1E i A2E na acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Acetilholin (Ach) u koncentracijama od 6,9 do 69000 nM izaziva fazne kontrakcije tkiva sa IC_{50} vrednošću $1529,69 \pm 194,57$ nM. A1E i A2E dovode do značajne koncentraciono-zavisne inhibicije Ach indukovanih kontrakcija (Slike 4.30. a i b). Atropin u potpunosti blokira efekte Ach.



Slika 4.30. Uticaj ekstrakata A1E (a) i A2E (b) na acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova

A2E je efikasniji od A1E ($p < 0,05$) i kada je u pitanju relaksacija Ach indukovanih kontrakcija, odnosno:

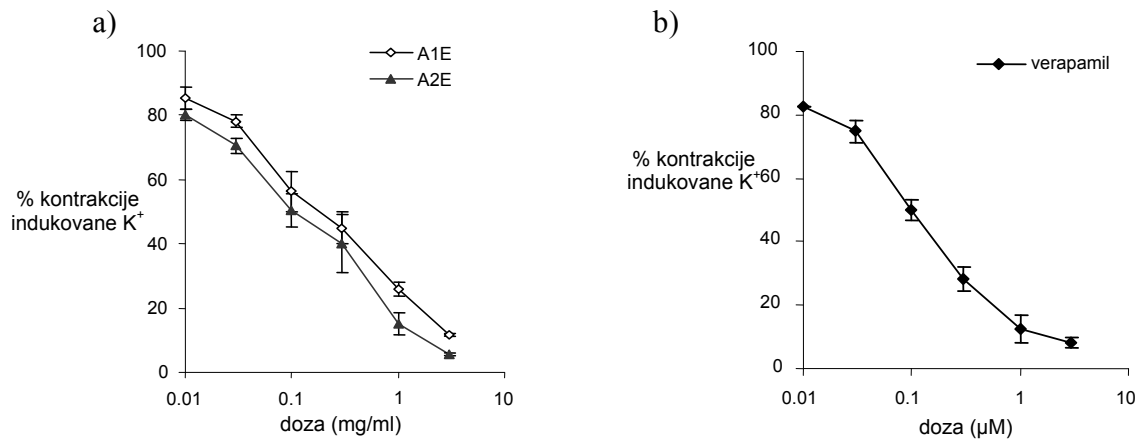
$$IC_{50} (A1E) = 79526,71 \pm 6816,28 \text{ nM}$$

$$IC_{50} (A2E) = 50793,24 \pm 4912,35 \text{ nM}$$

Da bi se ispitaio mehanizam dejstva ekstrakata na pokretljivost creva, korišćene su visoke koncentracije K^+ (80 mM). Kao što se vidi na Slici 6.31. a, A1E i A2E (u koncentracionom opsegu od 0,01 do 3 mg/ml) izazivaju koncentraciono-zavisnu relaksaciju K^+ -indukovanih kontrakcija izolovanog ileuma sa IC_{50} vrednostima:

$$A1E: 0,76 \pm 0,05 \text{ mg/ml}$$

$$A2E: 0,62 \pm 0,03 \text{ mg/ml}$$



Slika 4.31. Uticaj ekstrakata A1E i A2E (a) i verapamila (b) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane jonima kalijuma

Relaksacija koja se javlja uz primenu ispitivanih ekstrakata na kalijumom prekontrahovano tkivo je slična relaksaciji koju izaziva poznati blokator kalcijumovih kanala – verapamil (Slika 4.31. b).

Slika 4.32. (a i b) pokazuje krive kalcijum hloridom indukovanih kontrakcija ileuma pacova u medijumu bez Ca^{2+} koji je bogat K^+ , u odsustvu i u prisustvu A1E i A2E. A1E i A2E pomeraju krive zavisnosti odgovora tkiva od koncentracije kalcijuma na desno, slično kao i verapamil (Slika 4.32. c).

IC_{50} vrednosti dobijene sa krivih zavisnosti kontrakcija od koncentracije Ca^{2+} u prisustvu testiranih uzoraka (u najvećim testiranim koncentracijama 3 mg/ml za ekstrakte i 0,3 µM verapamila) su sledeće:

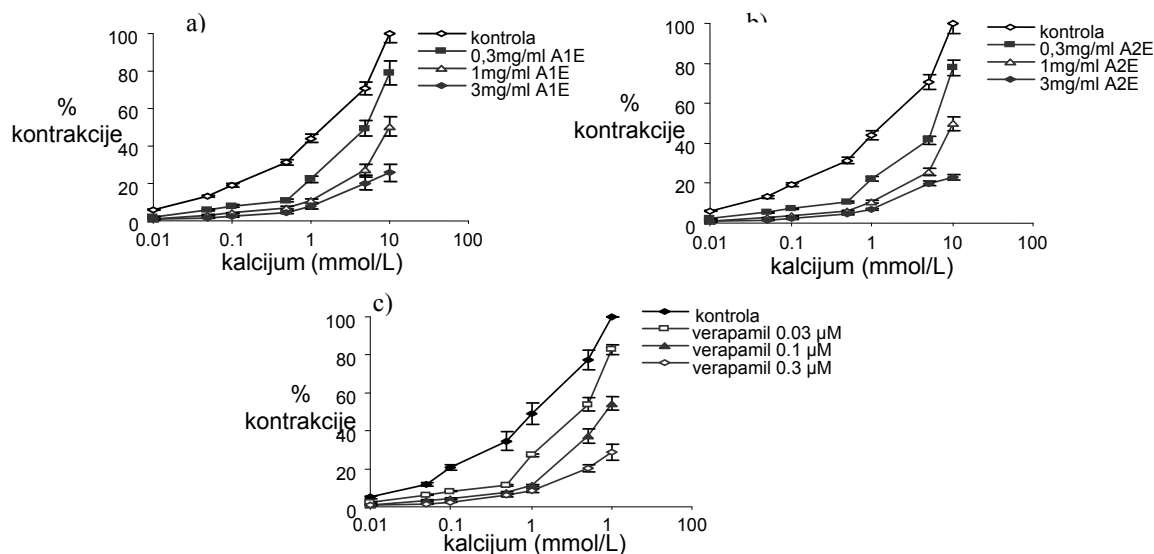
$$IC_{50} (A1E) = 31,02 \text{ mmol/l,}$$

$$IC_{50} (A2E) = 45,11 \text{ mmol/l,}$$

$$IC_{50} (\text{verapamil}) = 29,43 \text{ mmol/l,}$$

a vrednosti odgovarajućih kontrolnih kriva su: 2,60, 5,26 i 3,18 mmol/l.

Regulacija kontraktilnosti glatkih gastrointestinalnih mišića zavisi od intracelularne koncentracije Ca^{2+} . Acetilholin, neurotransmiter postganglijskih završetaka parasimpatičkog nervnog sistema, stimuliše pokrete glatkih mišića ileuma. On deluje preko muskarinskih receptora i povećava intracelularnu koncentraciju Ca^{2+} . U visokim koncentracijama (80 mM) K^+ aktivira voltažno zavisne Ca^{2+} kanale da pokrenu ulazak Ca^{2+} , odnosno dovodi do kontrakcije glatkih mišića putem otvaranja voltažno-zavisnih Ca^{2+} kanala. Supstance koje blokiraju kontrakcije indukovane visokim koncentracijama K^+ se smatraju kalcijumskim blokatorima (154,178).



Slika 4.32. Uticaj ekstrakata A1E (a), A2E (b) i verapamila (c) na kontrakcije izolovanog ileuma pacova indukovane jonima kalcijuma

Naši rezultati pokazuju da etanolni ekstrakti listova vrste *Arbutus unedo* poseduju značajnu spazmolitičku aktivnost. Oba testirana uzorka ispoljavaju inhibitorni efekat, ne samo na spontane kontrakcije izolovanog ileuma pacova, već i na kontrakcije indukovane acetilholinom, jonima kalijuma i kalcijuma, a njihov efekat na ovaj izolovani preparat je veoma sličan sa efektom koji ispoljava verapamil (komercijalni sintetski blokator kalcijumovih kanala). Nameće se zaključak da se utvrđeni spazmolitički efekat odvija preko inhibicije kalcijumovih kanala. Ovakav mehanizam dejstva je donekle i očekivan, pošto je poznato da komponente sa spazmolitičkim efektom prisutne u različitim lekovitim biljkama obično ispoljavaju svoje dejstvo putem blokade kalcijumovih kanala. Upravo blokada kalcijumovih kanala je odgovorna za pozitivan uticaj mnogih biljaka na gastrointestinalni, respiratorni i kardiovaskularni sistem (178,179).

Antagonisti kalcijuma pozitivno utiču na GIT poremećaje kao što su abdominalni grčevi i dijareja. Droge koje sadrže flavonoide i tanine su efikasni antidijaroiici a sprečavaju i inflamaciju pošto oblažu sluzokožu tankog creva (57,180). Uz značajne količine polifenolnih jedinjenja (uključujući tanine i flavonoide) i izraženu spazmolitičku aktivnost, listovi vrste *Arbutus unedo* bi mogli biti od velike koristi u tretmanu stomaćnih poremećaja. Kako nagomilavanje ROS tokom akutne infekcije GIT može pogoršati stanje pacijenta, snažna antioksidativna aktivnost ove biljne vrste doprinosi ukupnoj terapijskoj efikasnosti u pomenutoj indikaciji.

Flavonoidi su najvažnija grupa sekundarnih metabolita biljaka (uz saponine i kumarine) kada je u pitanju spazmolitička aktivnost (179,181). Flavonoidi deluju kao spazmolitici tako što relaksiraju glatke mišiće različitih delova ljudskog tela. Dokazano je da relaksiraju tonične i fazične kontrakcije izolovanog ileuma pacova, redukuju tonus izolovane traheje zamorca, uterusa i krvnih sudova pacova (155). Verovatno su upravo flavonoidi, barem delom, odgovorni za spazmolitičku aktivnost uzoraka A1E i A2E. Najbližnje

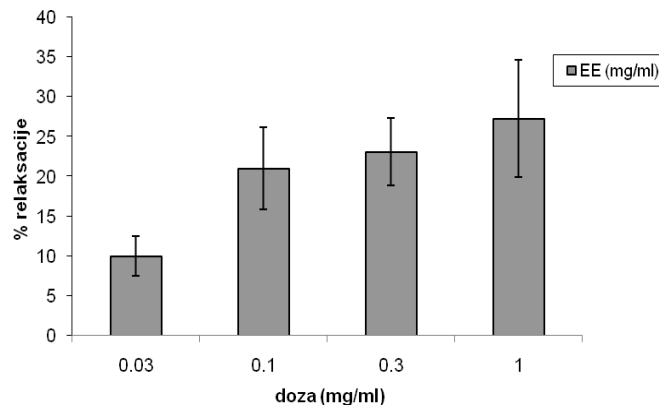
ispitivanje koje je rađeno je procena vazorelaksantnog dejstva vodenog ekstrakata listova vrste *Arbutus unedo* na izolovanoj aorti pacova. Mehanizam vazorelaksantnog dejstva je endotel-zavisan i uključuje aktivaciju endotelijalne NO-sintetaze bez aktivacije muskarinskih receptora. Oligomerni kondenzovani tanini i katehin galat su odgovorni za dejstvo, a arbutin ne ispoljava vazorelaksantnu aktivnost (64).

Stanište biljne vrste očigledno utiče na njen sastav (pre svega kada je u pitanju količina zastupljenih sekundarnih metabolita) i aktivnost. Tako A2E (etanolni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* poreklom iz Grčke) ispoljava jaču antioksidativnu i spazmolitičku aktivnost od uzorka A1E (etanolni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* poreklom iz Crne Gore). Sa druge strane, u biljnom materijalu iz Crne Gore je utvrđen viši sadržaj arbutina – komponente odgovorne za uroantiseptične efekte.

Erica arborea

Uticao etanolnog ekstrakta vrste *Erica arborea* (EE) na spontane i acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova je ispitivan u cilju poređenja sa utvrđenom spazmolitičkom aktivnošću vrste *Arbutus unedo*.

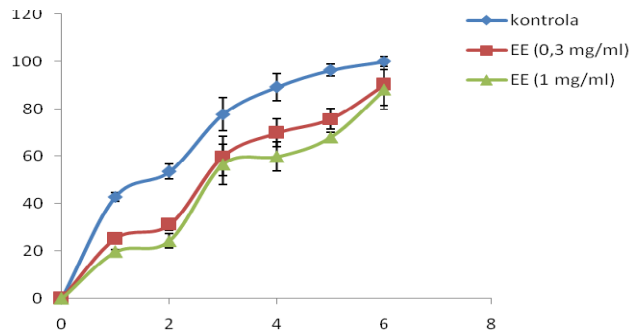
U prvoj eksperimentalnoj seriji registrovan je kumulativni uticaj EE na spontane kontrakcije ileuma pacova. Ekstrakt u ispitivanim koncentracijama (0,01 – 1 mg/ml) dovodi do snižavanja tonusa spontanih kontrakcija ileuma i to na dozno-zavisan način (Slika 4.33.), što ukazuje na spazmolitičku aktivnost. Iako najveća koncentracija (1 mg/ml) uzrokuje statistički značajno smanjenje kontraktilnosti ileuma, za $27,42 \pm 3,15\%$ ($p < 0,01$), u ovom opsegu koncentracija IC_{50} vrednost nije dostignuta. Aktivnost EE na spontane kontrakcije je niža u odnosu na efekte koje ispoljavaju A1E i A2E (Slika 4.29.).



Slika 4.33. Miorelaksantni uticaj ekstrakta EE na spontane kontrakcije (zavisnost primenjena doze i postignutog % relaksacije)

Uticao EE na pokretljivost creva je procenjivana na osnovu sposobnosti ekstrakta da blokira kontrakcije izazvane agonistima, odnosno meren je efekat na acetilholinom indukovane kontrakcije izolovanog ileuma pacova. Korišćen je Ach u koncentracijama od 5 do 1500 nM i EE u koncentracijama od 0,3 do 1 mg/ml. EE dovodi do koncentraciono-zavisne inhibicije Ach indukovanih kontrakcija (Slika 4.34), odnosno, u prisustvu etanolnog

ekstrakta *Erica arborea* stimulatívni efekti acetilholina su bili umanjéni. Koncentracija EE od 0,3 mg/ml inhibira kontrakcije ileuma pacova indukované acetilholinom za $10,84 \pm 2,75\%$ a maksimalna testirana koncentracija (1 mg/ml) dovodi do smanjenja od $33,58 \pm 4,75\%$ ($p < 0,01$). Atropin u potpunosti blokira efekte Ach.



Slika 4.34. Uticaj ekstrakta EE na acetilholinom indukované kontrakcije izolovanog ileuma pacova

Dobijeni rezultati pokazuju da i etanolni ekstrakt vrste *Erica arborea* statistički značajno umanjuje tonus kontrakcija izolovanog ileuma pacova, odnosno izaziva spazmolitičke efekte. Međutim, aktivnost ekstrakta EE je niža u odnosu na ekstrakte A1E i A2E.

Inhibitorni efekti svih testiranih ekstrakta su reverzibilni (nestaju nakon ispiranja preparata fiziološkim rastvorom), što ukazuje na to da utvrđeni spazmolitički efekti nisu posledica ireverzibilnih oštećenja ileuma.

6.4. Antiinflamatorna aktivnost

Primenom karageninskog testa akutne inflamacije šapice pacova utvrđeno je da svi testirani uzorci (ekstrakti i frakcije biljne vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera) u primenjenim dozama (50, 100 i 200 mg/kg telesne mase pacova davano *per os*) ispoljavaju značajnu antiinflamatornu aktivnost (Tabela 4.20.). Iako se kod svakog ekstrakta uočava dozno-zavisani efekat (sa porastom doze povećava se i antiinflamatorna aktivnost), razlike u efektu između pojedinih doza samo u nekim slučajevima dostižu nivo statističke značajnosti (krajnja desna kolona Tabele 4.20.).

Indometacin, korišćen kao pozitivna kontrola, je u dozi od 4 mg/kg dovodio do smanjenja edema za oko 50%. Efekti testiranih uzoraka su uporedivi sa antiinflamatornim efektom ovog snažnog sintetskog NSAID. U najvećoj testiranoj dozi gotovo svi uzorci (izuzev etarske i petroletarske frakcije) ispoljavaju jači efekat od indometacina. Etilacetatna i vodena frakcija, kao i etanolni ekstrakt herbe dobijen perkolacijom, i u najnižoj (50 mg/kg) aplikovanoj dozi obezbeđuju inhibiciju od preko 50%. Etilacetatna i vodena frakcija

ispoljavaju najsnažniji i međusobno veoma sličan efekat, dok etarska i petroletarska frakcija pokazuju najslabiji efekat od svih testiranih uzoraka. Kada su u pitanju ekstrakti različitih biljnih delova, njihova aktivnost je veoma bliska, ali se ipak kao nešto efikasniji mogu izdvojiti ekstrakti herbe i listova u odnosu na cvet i, posebno, koren.

Tabela 4.20. Rezultati ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti ekstrakata vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera

Ekstrakt	% ± SD			
	Doza (mg/kg <i>p.o.</i>)			
	50	100	200	
BK	38,50 ± 9,95 ^c	40,77 ± 8,67 ^c	52,37 ± 7,03 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^a , 50:200 ^a
BL	48,22 ± 11,89 ^c	53,24 ± 8,93 ^c	58,03 ± 15,04 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^{ns}
BC	41,15 ± 7,38 ^c	42,53 ± 11,54 ^c	57,28 ± 11,60 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^{ns}
BH	51,12 ± 6,26 ^c	56,65 ± 6,57 ^c	61,24 ± 15,89 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^a
PB	27,53 ± 8,84 ^c	36,36 ± 9,12 ^c	43,11 ± 10,82 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^a
B	36,86 ± 10,32 ^c	46,45 ± 10,62 ^c	58,06 ± 9,23 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^b
ETB	17,79 ± 13,51 ^a	30,97 ± 15,42 ^b	39,92 ± 7,72 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^b
EAB	55,81 ± 9,12 ^c	58,07 ± 11,05 ^c	62,86 ± 9,18 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^{ns}
VB	53,87 ± 6,23 ^c	57,28 ± 11,67 ^c	63,04 ± 8,42 ^c	50:100 ^{ns} ; 100:200 ^{ns} , 50:200 ^a
DMSO (1 ml/kg <i>p.o.</i>)		0,00 ± 10,23		<i>p</i> *
Indometacin (4 mg/kg <i>p.o.</i>)		50,28 ± 6,4		

^a *p* < 0,05; ^b *p* < 0,01; ^c *p* < 0,001 prema kontrolnoj grupi

* *p* – značajnost razlike između pojedinih doza unutar iste grupe: ^{ns} nije značajno; ^a *p* < 0,05; ^b *p* < 0,01; ^c *p* < 0,001

Kako injekcija karagenina dovodi do lokalne akutne inflamatorne reakcije, a proizvodnja metabolita arahidonske kiseline je glavni faktor uključen u obe faze karageninom izazvane inflamacije, antiinflamatorna aktivnost ekstrakata biljne vrste *Bruckenthalia spiculifolia* se može povezati sa inhibicijom oslobađanja ili sinteze proizvoda ciklooksigenaze i/ili lipooksigenaze. Sa druge strane, druga faza karageninom indukovane inflamacije je povezana i sa infiltracijom neutrofila i posledičnom hiperprodukcijom ROS, pa antiinflamatorna aktivnost može biti, barem delom, posledica inhibicije infiltracije neutrofila, kao i uklanjanja slobodnih radikala.

Najveća grupa biljnih sekundarnih metabolita sa sposobnošću modifikacije inflamatornih puteva su polifenoli: flavonoidi, lignani, floroglucinoli, hinoni, stilbeni, fenilpropanoidi i diarilheptanoidi. Brojna istraživanja su pokazala da mnoge aktivne komponente biljaka, pre svega flavonoidi i fenolkarbonske kiseline, sprečavaju infiltraciju neutrofila u inflamirano područje i uklanjaju slobodne radikale pa deluju antiinflamatorno. Flavonoidi mogu da inhibiraju 5-lipooksigenazu i ciklooksigenazu, a deluju i kao inhibitori PLA2, pa utiču na biosintetske puteve prostanoida (63,156,159).

Flavoni generalno pokazuju nešto snažnije antiinflamatorno dejstvo od izoflavona, flavonola i flavanona. Flavonoli modifikuju inflamatorni odgovor, barem delom, modulacijom sinteze prostanoida i produkcije citokina. Flavonol kvercetin, koji ispoljava širok spektar bioloških i farmakoloških aktivnosti, je jedan od flavonoida (pored luteolina, vagonina, apigenina, fisetina i baikaleina) čija je antiinflamatorna aktivnost potvrđena u različitim *in vitro* i *in vivo* modelima. Ciljna mesta njegovog delovanja uključuju: TNF- α , IL-6, MMP-2 i MMP-9, RANTES, MIP-2, NO (smanjuje ekspresiju iNOS), NF- κ B, IL-4, IL-8, MCP-1, β -heksozaminidaza, 15-LOX-1, LOX L1, PGE2,... Antiinflamatorni efekat kvercetina je potvrđen i histološkim ispitivanjima. Kada je u pitanju karageninom izazvana inflamacija, kvercetin prevenira i ranu i kasnu fazu inflamatornog odgovora (pošto je efikasan kada se primeni 1h pre ili zajedno sa karageninom) kao rezultat supresije transkripcije COX-2 mRNA, insertovanja (na koncentraciono- i pH-zavisani način) u lipidni dvosloj membrane, inhibicije oslobađanja TNF- α (i posledičnog smanjenja nivoa PGE2) i antioksidativnog kapaciteta. Izovercitrin i rutin ispoljavaju slične efekte kao kvercetin, što ukazuje na to da šećerna komponenta prisutna kod flavonolnih glikozida ne utiče, ili barem ne negativno, na antiinflamatornu aktivnost (156,182,183).

Nameće se zaključak da su kvercetin i njegovi glikozidi (kvercitrin kao najzastupljeniji, sa čak 70,91 mg/g ekstrakta, ali i izokvercitrin, nepoznati glikozid kvercetina i rutin), koji su detektovani HPLC analizom u etanolnom ekstraktu herbe *Bruckenthalia spiculifolia*, odgovorni, barem delom, za utvrđene efekte ekstrakata i frakcija ove vrste u testiranom modelu akutne inflamacije. Visok sadržaj ukupnih polifenola (flavonoida ali i tanina i fenilpropanoida) i snažna antioksidativna aktivnost verovatno doprinose antiinflamatornom dejstvu. Sa druge strane, kako je proizvodnja metabolita arahidonske kiseline glavni faktor uključen u obe faze karageninom indukovane inflamacije, može se pretpostaviti da je mehanizam antiinflamatornog dejstva povezan sa inhibicijom sinteze i oslobađanja ovih medijatora inflamacije.

Kao što je i očekivano, rezultati antiinflamatorne i antioksidativne aktivnosti su u korelaciji (posebna sličnost u redosledu aktivnosti se uočava sa testom inhibicije obezbojavanja β -karotena koji simulira lipidnu peroksidaciju).

Ovo su prvi podaci o farmakološkim efektima biljne vrste *Bruckenthalia spiculifolia*, a ukazuju na značajnu antiinflamatornu aktivnost, pa i potencijalnu efikasnost ove vrste u terapiji akutne inflamacije.

Što se tiče ostalih predstavnika ove familije, u literaturi postoje podaci da:

- vodeni ekstrakt vrste *Arbutus unedo* ublažava akutnu inflamaciju pluća miša (39).

- *Calluna vulgaris* inhibira ciklooksigenazu (53), lipooksigenazu i humanu leukocitnu elastazu (54) (zahvaljujući pre svega prisustvu ursolne kiseline – snažnom prirodnom antiinflamatornom sredstvu). U modelu karageninom izazvanog edema šapice miša najaktivnija je etilacetatna frakcija etanolnog ekstrakta herbe *Calluna vulgaris* sa najzastupljenijim flavonolnim glikozidom: kemferol-3-O-β-D-galaktozidom (48). To je isti eksperimentalni *in vivo* model koji je korišćen za ispitivanje ekstrakata vrste *Bruckenthalia spiculifolia*, pri čemu je najaktivnija bila takođe etilacetatna frakcija (verovatno i ona zahvaljujući flavonolnim glikozidima).
- vrste *Erica arborea*, *Erica bocquetii*, *Erica manipuliflora* i *Erica sicula* subsp. *libanotica* pokazuju značajnu antiinflamatornu aktivnost u 3 *in vivo* modela. U modelu karageninom izazvanog edema šapice miša ponovo etilacetatna frakcija metanolnog ekstrakta listova vrste *Erica arborea* ispoljava najsnažniji efekat – uporediv sa efektom indometacina (63).
- 50% metanolni ekstrakt listova vrste *Arctostaphylos uva-ursi* ispoljava antiinflamatorni efekat u *in vivo* modelu lokalne inflamacije uha miša (davan intragastrično, 100 mg/kg) i potencira efikasnost prednizolona i deksametazona, pri čemu arbutin nije komponenta odgovorna za ovaj efekat (18).

6.5. *In vivo* određivanje antiiritantne aktivnosti

Različiti biljni ekstrakti su veoma cenjeni u lečenju rana, tretmanu oštećene, iritirane i ostarele kože i kao topikalni tretman različitih kožnih oboljenja. Pošto je inflamacija zajednički činilac većine dermatozâ, posebna pažnja se obraća na ekstrakte sa antiinflamatornom aktivnošću pa se oni i najčešće inkorporiraju u topikalne preparate (184,185).

Ispitivanja odabranih vrsta familije Ericaceae na humanoj koži do sada nisu rađena, uprkos tome što se one tradicionalno koriste (a *Calluna vulgaris* i u savremenoj komercijalnoj kozmetici) u tretmanu različitih stanja i poremećaja kože.

Uticaj hidrogelova, pripremljenih sa suvim etanolnim ekstraktima, na veštački iritiranu kožu je ispitivan neinvazivnim metodama bioinženjeringa na koži zdravih dobrovoljaca nakon iritacije izazvane Na-lauril-sulfatom (SLS). U cilju utvrđivanja potencijala ispitivanih ekstrakata da modifikuju reakciju iritacije, praćena je njihova sposobnost da redukuju eritem, hidriraju kožu i vraćaju pH kože na početne vrednosti.

Od 29 regrutovanih dobrovoljaca, koji su potpisali informisani pristanak za učešće u studiji, 18 je završilo studiju (17 žena, 1 muškarac; starosti od 20 do 59 godina, prosek godina 37,28±11,30).

Interesantno je naglasiti da veliki deo najmlađih dobrovoljaca (5 žena, 4 muškarca; starosti od 20 do 24 godine, prosek godina 21,78±1,23) nije razvio iritaciju nakon aplikacije 12% rastvora SLS. Ovo se može objasniti veoma dobrom barijernom funkcijom i boljim puferskim kapacitetom kože (obzirom da je SLS baza) mlađih osoba u odnosu na starije. Dobrovoljci kod kojih se nije razvila iritacija i dva dobrovoljca (2 žene; starosti 40 i 32 godine) koja nisu ispoštovala protokol studije su isključeni iz istraživanja.

Dobrovoljci su podeljeni u dve grupe: prva (9 ispitanika: 8 žena, 1 muškarac; prosek godina $39,78 \pm 10,11$) je koristila uzorke A1, A2 i P, a druga grupa (9 žena, prosek godina $34,78 \pm 11,87$) uzorke B, C, V i E.

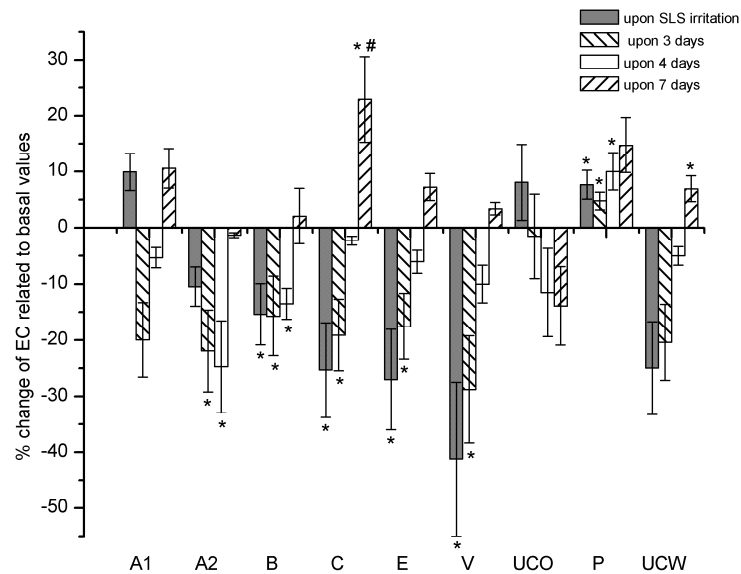
Određivanje električne kapacitativnosti kože (EC)

Poremećaj SC barijere koji izazivaju surfaktanti, posebno SLS, uključuje dezorganizaciju lipidnog dvosloja, pojačano preuzimanje vode od strane SC i prolazno bubrenje korneocita, koje neposredno nakon iritacije vodi porastu EC iritirane kože. Iako trajanje ovog stanja hiperhidratacije nije utvrđeno, ono je praćeno subbazalnim vrednostima hidratacije, što se objašnjava nepotpunim oporavkom lipidne i proteinske strukture SC i posledičnom redukcijom kapaciteta za vezivanje vode (160).

Okkluzija sa 12% rastvorom SLS u provokativnom testu iritacije značajno snižava nivo hidratacije kože 24h nakon iritacije u odnosu na bazalne vrednosti na svim test mestima, osim onim tretiranim placebom i uzorcima A1 i A2 i iritiranom mestu koje služi kao kontrola (UCO) (Slika 4.36.). Ovo može biti objašnjeno produženim preuzimanjem vode od strane SC nakon iritacije kože na ovim test mestima usled interindividualnih razlika kože ispitanika (gelovi A1, A2 i P su testirani na jednoj istoj grupi ispitanika!). Ipak, očekivani pad nivoa hidratacije se uočava kasnije u toku studije i kod netretiranih i kod test mesta tretiranih uzorcima A1 i A2, dok se na koži tretiranoj placebom vidi dalji rast vrednosti EC. Verovatno prisustvo ksantan gume, koja je korišćena za geliranje, sprečava očekivano isušivanje kože. Ksantan guma je poznati humektans a potvrđeno je i da njena topikalna primena štiti lipide humane kože (186). Nameće se zaključak da formulisani hidrogel *per se* može da blokira redukciju kapaciteta za vezivanje vode kod kože hiperhidrirane neposredno i nakon iritacije SLS.

Tretman kože gelovima A1 i A2 je doveo do poboljšanja nivoa hidratacije kože nakon 7 dana u odnosu na bazalne vrednosti, mada to poboljšanje nije statistički značajno.

Okkluzija sa 12% SLS je dovela do značajnog smanjenja nivoa hidratacije na svim ostalim test mestima u odnosu na bazalne vrednosti (Slika 4.35.).

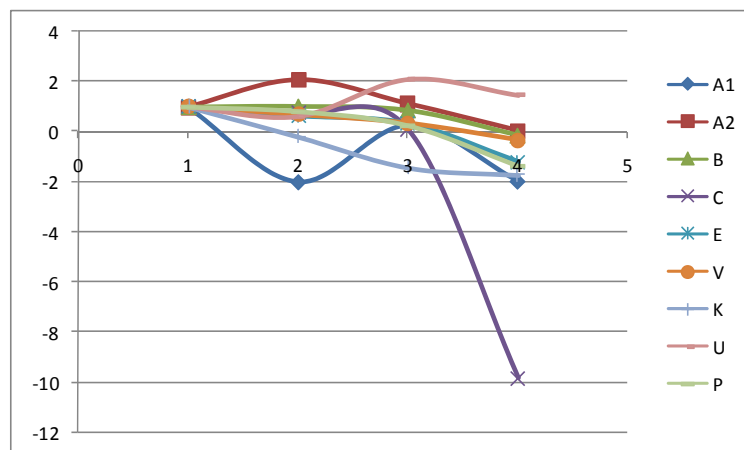


Slika 4.35. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na EC. Vrednosti EC su izražene kao apsolutne promene u odnosu na bazalne vrednosti u različitim vremenskim tačkama. Razlike u odnosu na bazalne vrednosti su proveravane korišćenjem uparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana *; razlike efekata gelova u odnosu na UCO i placebo (P) su proveravane korišćenjem neuparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana #, odnosno &.

Gel C je značajno povećavao hidrataciju kože nakon 7 dana, mada bez značajne razlike u odnosu na ostale uzorke. Očigledno je da, izuzev u slučaju uzorka C, dodavanje ekstrakata nema aditivne efekte na postojeću sposobnost ksantan gume da efikasno hidrira kožu i čak spreči redukciju kapaciteta za vezivanje vode kože hiperhidrirane nakon SLS iritacije. Može se čak pretpostaviti da postoji neka vrsta kompeticije za vezivanje vode između kože i nekih komponenata (verovatno sluzi) inkorporiranih ekstrakata, tako da aktivni gelovi (za razliku od placebo) zadržavaju vodu na površini kože onemogućavajući time njen dalji transport. Neophodna su detaljnija fizičko-hemijska ispitivanja da bi se potvrdilo ovo vezivanje i zadržavanje vode i rasvetlio mehanizam ovog efekta testiranih ekstrakata kada su inkorporirani u gel sa ksantan gumom. Prilično visoke vrednosti brojeva bubrenja biljnog materijala ispitivanih ekstrakata bi mogle, barem delom, da objasne ispoljenu higroskopsnost.

Iako je primena svih gelova dovela do porasta vlažnosti kože (porast EC), u poređenju sa UCO (ova razlika je statistički značajna samo za gel C), ne može se izvesti zaključak o boljem potencijalu testiranih gelova u odnosu na placebo uzorak.

Ako stanje kože nakon iritacije SLS postavimo za vrednost 1, odnosno dovođenjem svih krivih promene parametra EC na isti početak (Slika 4.36.), može se jednostavnije pratiti nivo hidriranosti kože nakon primene aktivnih gelova i placebo, odnosno hidriranost neiritirane (U) i kože iritirane SLS-om a koja je ostavljena bez ikakvog tretmana (K). I ovde se jasno vidi da gel C pokazuje najbolji uticaj na hidrataciju.



Slika 4.36. Uticaj ispitivanih gelova na EC (početna iritacija na svim mestima izjednačena)

Određivanje eritema indeksa kože (EI)

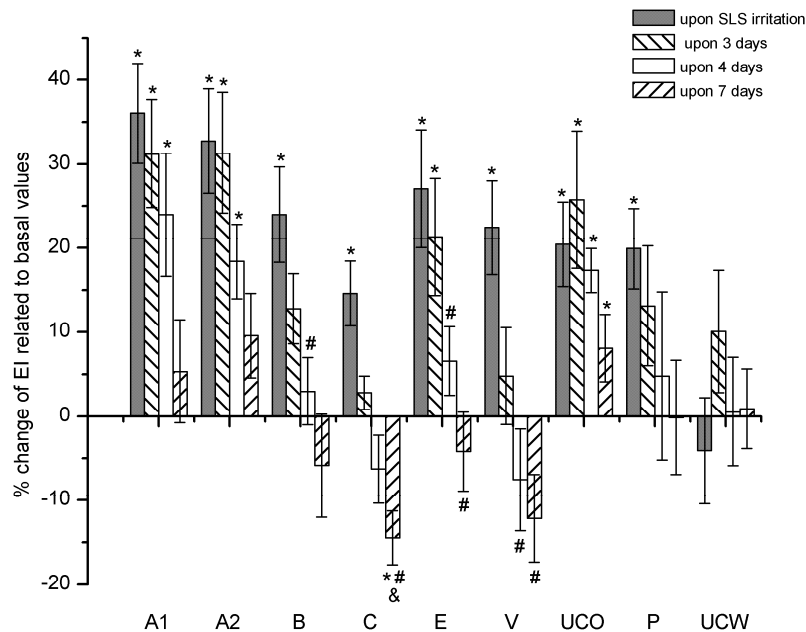
Kao što je i očekivano, vrednost parametra EI, koji je mera eritema kože, je značajno porasla nakon iritacije provocirane SLS-om na svim test mestima u odnosu na bazalne vrednosti (Slika 4.37.), uključujući i kontrolno mesto (UCO).

Svi testirani uzorci su značajno smanjivali eritem u toku sedmodnevne studije. Pošto je značajna promena vrednosti EI izmerena i nakon tretmana placebom, može se pretpostaviti da efikasna hidratacija uz protektivnu ulogu na lipide humane kože, koju ispoljava ksantan guma, dovodi do poboljšanja sopstvenog kapaciteta kože da smiri iritaciju nakon 7 dana (187). Poznato je da efikasna hidratacija čini kožu manje osetljivom na iritaciju i ubrzava oporavak poremećene kožne barijere (188). Ipak, gelovi sa ekstraktima CE, BE, EE i VE, koji nisu pokazali značajan vlažeći kapacitet (Slika 4.35.), su svi statistički značajno snižavali povišene vrednosti EI iritirane kože u poređenje sa UCO, što se može objasniti upravo prisustvom ekstrakata.

Aktivnost testiranih gelova na EI je u skladu sa rezultatima određivanja sadržaja hlorogenske kiseline. Sadržaj ukupnih fenilpropanoidnih derivata, koji se izražava u % hlorogenske kiseline, je za ekstrakte sledio redosled:

$$BE > VE > CE > EE > A1E > A2E$$

a HPLC analiza je potvrdila prisustvo hlorogenske kiseline u ekstraktima CE, VE, EE i u tragu u ekstraktu BE (u kome je utvrđen najviši nivo ukupnih fenilpropanoidnih derivata). A1E i A2E u svojim hromatogramima nisu imali pik koji bi mogao pripadati hlorogenskoj kiselini. Hlorogenska kiselina ispoljava antiinflamatornu aktivnost koja je posredovana inhibicijom produkcije PGE₂, antiedematoznu i antinociceptivnu aktivnost, verovatno usled inhibicije periferne sinteze/oslobađanja inflamatornih medijatora uključenih u ove odgovore, a izuzetno snažno inhibira i mikrozomalnu lipidnu peroksidaciju (189-191).



Slika 4.37. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na EI. Vrednosti EI su izražene kao apsolutne promene u odnosu na bazalne vrednosti u različitim vremenskim tačkama. Razlike u odnosu na bazalne vrednosti su proveravane korišćenjem uparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana *; razlike efekata gelova u odnosu na UCO i placebo (P) su proveravane korišćenjem neuparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana #, odnosno &.

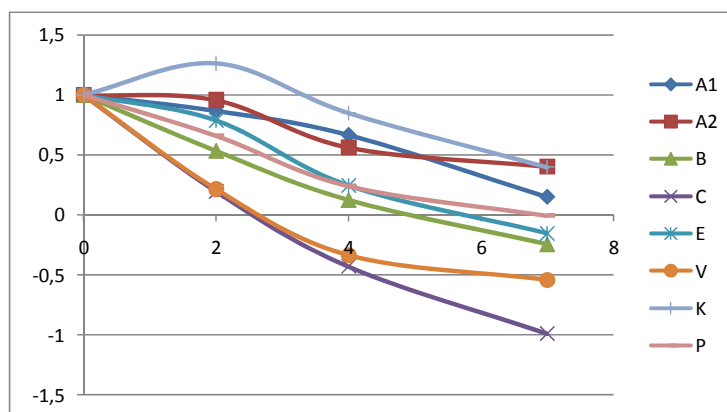
Izražena aktivnost testiranih gelova na snižavanje EI iritirane kože se može povezati i sa antioksidativnom aktivnošću inkorporiranih ekstrakata. Svaka povreda kože indukuje kompleksnu reakciju koja uključuje i ranu inflamaciju uz oslobađanje ROS koji u visokim koncentracijama mogu ozbiljno oštetiti tkivo (192). Obzirom da je oksidativni stres uključen u hemijski-indukovane reakcije kože (kao što je akutni iritantni kontaktni dermatitis), topikalna primena antioksidanata može zaštititi povređeno tkivo od toksičnih efekata ROS, odnosno ublažiti inflamaciju i poboljšati stanje kože (193).

Pošto su PUFA veoma podložne peroksidaciji, njihova peroksidacija je jedna od najistraženijih posledica dejstva ROS na strukturu i funkciju membrane (114). Proizvodi lipidne peroksidacije ispoljavaju brojne toksične efekte u ćelijama sisara, a kada je stanje kože u pitanju, mogu dovesti do pojave hiperkeratinoze, diskeratinoze, intraepidermalnog edema i spongioze (194). Upravo zbog toga je inhibicija LP metoda izbora kada se ispituje antioksidativna aktivnost topikalnih preparata ili njihovih komponenata.

Gel C je pokazao najbolji potencijal da snižava EI eksperimentalno iritirane kože. Iako ekstrakt CE ima visok sadržaj fenilpropanoide (mada niži nego BE i EE), flavonoida i tanina, kao i dobar potencijal da zaustavlja LP (u oba testirana sistema), najverovatnije je prisustvo hlorogenske kiseline (dominantan pik u HPLC hromatogramu ekstrakta) najzaslužnije za uticaj gela C na EI kože.

Dakle, snažna antioksidativna aktivnost je verovatno najzaslužnija za pozitivne efekte koje su gelovi ispoljili na iritiranoj koži. Fenilpropanoidi su, pored prisutnih flavonoida i tanina, barem delom odgovorni za ovakvo dejstvo.

Ako stanje kože nakon iritacije SLS postavimo za vrednost 1, odnosno dovođenjem svih krivih promene parametra EI na isti početak (Slika 4.38.), može se jednostavnije pratiti nivo eritema kože nakon primene aktivnih gelova i placeba, odnosno eritema kože iritirane SLS a koja je ostavljena bez ikakvog tretmana (K). I ovde se jasno vidi da gel C pokazuje najbolji uticaj na stanje iritirane kože.



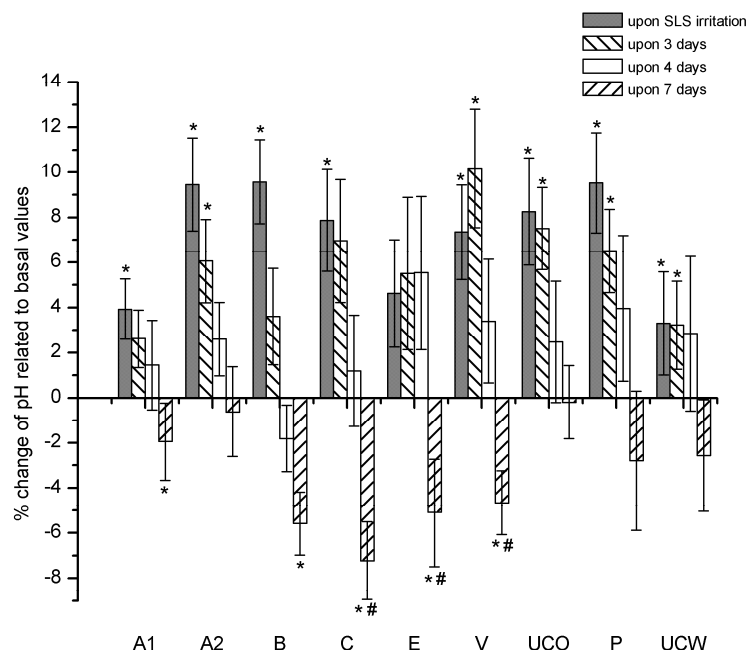
Slika 4.38. Uticaj ispitivanih gelova na EI (početna iritacija na svim mestima izjednačena)

Određivanje pH vrednosti kože

Prosečna pH vrednost na podlakticama žena je $5,6 \pm 0,4$ (prema drugoj grupi autora 5,54) a kod muškaraca je ta vrednost nešto niža $4,6 \pm 0,4$ (prema drugoj grupi autora 5,80). U svakom slučaju, koža je veoma dobar pufer, i kada se površinski aplikuju kisele ili bazne supstance, pH se već u okviru par sati vraća na fiziološku vrednost (195).

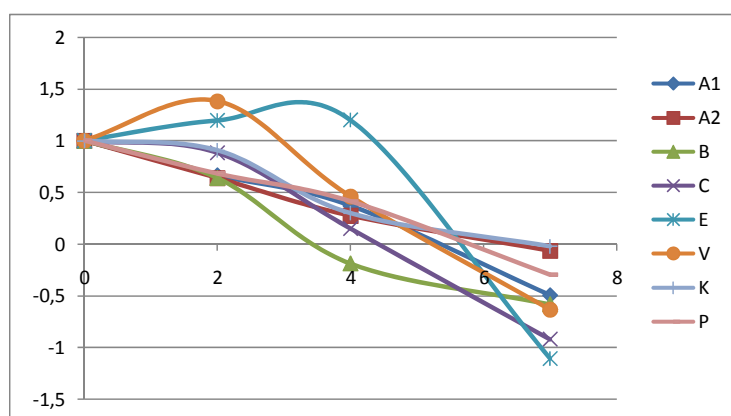
Izmerene vrednosti pH kože su bile očekivane: pod okluzijom, SLS dovodi do značajnog porasta pH kože u odnosu na vrednosti pre iritacije. Inicijalni trend rasta pH nakon iritacije je praćen povratkom na bazalne vrednosti ubrzo po početku tretmana svim uzorcima, uključujući i placebo (Slika 4.39.). Sa druge strane, gelovi B, C, E i V značajno snižavaju pH kože nakon 7 dana studije u poređenju sa bazalnim vrednostima, odnosno izmeren pH je niži čak i od vrednosti pre iritacije.

Imajući na umu da je porast pH vrednosti kože obično povezan sa pojačanom iritacijom (196), može se pretpostaviti da uzorci B, C, E i V mogu da snize pH kože bez prateće iritacije, što bi moglo biti od velike koristi u tretmanu nekih patoloških stanja kože, mada su upravo ovi uzorci veoma efikasni i u smirivanju hemijski indukovane iritacije (Slika 4.37.). Sama neutralizacija SC dovodi do poremećaja njegove funkcije, koji uključuju promenu permeabilnosti i smanjenje integriteta/kohezije SC, pa sredstva koja snižavaju pH kože imaju i protektivnu aktivnost (197).



Slika 4.39. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na pH vrednost kože. Vrednosti pH su izražene kao apsolutne promene u odnosu na bazalne vrednosti u različitim vremenskim tačkama. Razlike u odnosu na bazalne vrednosti su proveravane korišćenjem uparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana *; razlike efekata gelova u odnosu na UCO i placebo (P) su proveravane korišćenjem neuparenog t-testa pri čemu je statistička značajnost obeležavana # , odnosno &.

Ako stanje kože nakon iritacije SLS uzmemo za vrednost 1, odnosno dovođenjem svih krivih promene parametra pH na isti početak (Slika 4.40.), može se jednostavnije pratiti nivo pH kože nakon primene aktivnih gelova i placeba, odnosno pH kože iritirane SLS a koja je ostavljena bez ikakvog tretmana.



Slika 4.40. Uticaj ispitivanih gelova na pH (početna iritacija na svim mestima izjednačena)

Rezultati dobijeni u *in vivo* studiji na iritiranoj koži zdravih dobrovoljaca, prilikom aplikacije gelova sa po 2% suvog etanolnog ekstrakta odabranih vrsta, ukazuju na njihov značajan antiiritacioni efekat u modelu SLS-om iritirane kože, uprkos tome što nije dobijena

očekivana statistička značajnost u odnosu na efekat koji ispoljava placebo (gel sa ksantan gumom). EC, pH kože i EI, parametri kojima je praćeno stanje kože, su vraćene na bazalne vrednosti nakon 7 dana studije, bilo da su test mesta tretirana aktivnim gelovima bilo placebo.

Gelovi sa ekstraktima koji sadrže viši nivo ukupnih fenilpropanoide i ispoljavaju bolju aktivnost inhibicije LP, su pokazali nešto izraženije efekte. Antioksidativna aktivnost i fenolni sastav ovih ekstrakata, posebno prisustvo hlorogenske kiseline, verovatno doprinose njihovoj efikasnosti u smirivanju iritirane kože. Uprkos tome što tanini kada se primene eksterno pokazuju antiinflamatorno dejstvo i ubrzavaju regeneraciju kože i sluzokože (usled sprečavanja infekcije, "zatvaranja" manjih povreda kapilara kože i zaustavljanja krvarenja i smanjenja gubitka vlage) (17), redosled aktivnosti u sprovedenom *in vivo* ispitivanju ne prati opadajući niz sadržaja ukupnih tanina u ispitivanim ekstraktima. Čak CE (komponenta gela C koji je ispoljio najbolji efekat) sadrži najnižu (mada i dalje značajnu) količinu tanina, ukupnih polifenola i flavonoida od svih testiranih ekstrakata. Međutim, svakako i prisutni tanini doprinose utvrđenom antiinflamatornom efektu u modelu veštački izazvane iritacije kože.

Tradicionalno se listovi vrste *Arbutus unedo* koriste kao vulnerar i za pripremanje kupki kod hemoroida (198,199). U eksperimentalnim modelima na životinjama je utvrđeno antiinflamatorno dejstvo ove biljne vrste (78).

Calluna vulgaris se još od srednjeg veka koristi za pranje tela, obloge i lečenje ekcema, a smatra se antiseptičnim, antimikrobnim, antireumatskim kao i sredstvom koje olakšava zarastanje rana i deluje protiv akni (34,200). Različiti ekstrakti herbe ove biljne vrste su ispoljili značajnu inhibiciju ciklooksigenaze i lipooksigenaze (pripisuje se prisustvu ursolne kiseline), što može objasniti njenu tradicionalnu i modernu (vodeni ekstrakt je komercijalno dostupna kozmetička sirovina) upotrebu (36,85,90).

Vrste roda *Erica* se vekovima koriste u tretmanu različitih inflamatornih stanja kao što su edemi, rane i ujedi zmija. Akkol i saradnici su na eksperimentalnim životinjama potvrdili značajnu antiinflamatornu i antinociceptivnu aktivnost vrste *Erica arborea* (37). Nema studija koje ispituju efikasnost vrste *Erica carnea* pri topikalnoj primeni, a u našem eksperimentu je upravo ona ispoljila najsnažniji efekat (smirivanja indukovanog eritema i normalizacije poremećene pH vrednosti kože).

Što se tiče droge *Uvae ursi folium*, ona se primenjuje topikalno, ali kao agens za izbeljivanje, zahvaljujući prisustvu hidrohina i njegovih derivata (18,34). Utvrđeno je da posvetljava kožu usled antitirozinazne aktivnosti, inhibicije produkcije melanina, efekta sličnog aktivnosti superoksid dismutaze i sposobnosti da apsorbuje UV zračenje (34). Prisustvo slobodnog hidrohina u listovima uve može biti problem i pri topikalnoj primeni. Koncentracija hidrohina u kremama je u nekim državama ograničena na 2%, pošto je uočeno da izaziva egzogene ohronoze (fleke boje rđe) kod žena crne populacije. Prijavljeno je i nekoliko slučajeva leukoderme pri primeni krema sa 2%, kao i pojave eritema i alergijskog kontaktnog dermatitisa u slučaju krema sa 1-5% hidrohina (18,171).

Hidrogelovi sa po 2% etanolnog ekstrakta testiranih vrsta familije Ericaceae u studiji na već iritiranoj koži (pretretmanom SLS) nisu ispoljili nikakva neželjena dejstva. Njihov antiiritantan efekat utvrđen u modelu SLS-om iritirane kože zdravih dobrovoljaca može delom objasniti neke od topikalnih primena ovih biljnih vrsta.

VII Zaključak

Na osnovu rezultata dobijenih u toku morfološke, hemijske i farmakološke analize odabranih biljnih vrsta *Arbutus unedo* L., *Bruckenthalia spiculifolia* Rechb., *Calluna vulgaris* (L.) Hull., *Erica arborea* L. i *Erica carnea* L. (Ericaceae) mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Morfoanatomskom analizom ispitivanih biljnih materijala uočene su jasne razlike na nivou građe:

- lista, koji je kod svih ispitivanih vrsta, osim kod vrste *Arbutus unedo*, erikoidne građe (ali različitog stepena otvorenosti i oblika kripe; debljine kutikule na površini lista; veličine epidermalnih ćelija i prisustva sluzi u unutrašnjim slojevima ćelijskog zida; broja slojeva palisadnog tkiva; prisustva i veličine ćelija sa kristalnim druzama).
- mladog stabla, koje je različitog oblika, različitog stepena prisutnosti dlaka od golog stabla (*Erica carnea*) do gustog indumentuma od nežlezdanih i žlezdanih dlaka različitih tipova (*Erica arborea*).
- višegodišnjeg stabla, pre svega na osnovu oblika srži (koji je zadržan iz primarne građe).
- površinskih struktura zastupljenih na listu i stablu.

2. Opštim hemijskim ispitivanjima je utvrđeno da sadržaj vlage i pepela odgovara propisima za biljne droge. Broj bubrenja se kretao od 3,33 do 4,50 izuzev u biljnom materijalu vrste *Calluna vulgaris* (gotovo 8), koja se može smatrati i sluznom drogom.

3. Kvalitativnom analizom biljnog materijala je utvrđeno prisustvo flavonoidnih heterozida i tanina (i to mešoviti u vrsti *Arbutus unedo*, a pretežno kondenzovanih u ostalim ispitivanim vrstama). TLC analizom je utvrđeno da ispitivane vrste imaju zajedničke flavonoidne i šećerne komponente, kao i da samo vrsta *Arbutus unedo* sadrži arbutin a ni jedna od ispitivanih vrsta ne sadrži hidrohion.

4. Spektrofotometrijskom metodom određen sadržaj ukupnih hidrohiononskih derivata se kretao u opsegu 0,47 – 1,66% u biljnom materijalu, odnosno 0,65 – 2,96% u suvim etanolnim ekstraktima, dok je HPLC metodom arbutin detektovan samo u vrsti *Arbutus unedo*. Hidrohionon nije detektovan u ispitivanim vrstama. Na osnovu izvedenog ispitivanja se može izvesti zaključak da samo listovi vrste *Arbutus unedo* sadrže merljivu količinu arbutina (1,24% u biljnom materijalu poreklom iz Crne Gore i 1,00% u materijalu iz Grčke), pa samo oni i mogu poslužiti kao eventualna zamena za drogu *Uvae ursi folium*, i to pod uslovom višestrukog doziranja.

5. Svi uzorci sadrže značajne količine ukupnih flavonoidnih jedinjenja (pri čemu se izdvaja *Bruckenthalia spiculifolia* sa 3,42% u biljnom materijalu i 11,8% u suvom ekstraktu), ukupnih polifenola i tanina (najzastupljeniji u vrsti *Arbutus unedo* poreklom iz Grčke) i ukupnih fenilpropanoidnih derivata (najniži u etanolnom ekstraktu vrste *Arbutus unedo* poreklom iz Grčke a najviši u etanolnom ekstraktu vrste *Bruckenthalia spiculifolia*).

6. Semikvantitativna HPLC analiza etanolnih ekstrakata je ukazala na različit sastav ispitivanih fenolnih jedinjenja, čak i u okviru istog roda (*Erica arborea* i *Erica carnea*) pa i iste vrste sa različitih staništa (*Arbutus unedo*):

- kvercitrin, kvercetin-3-O-glukozid i galna kiselina su prisutni u svim uzorcima
- kvercitrin je dominantna komponenta u ekstraktima vrsta *Bruckenthalia spiculifolia*, *Erica arborea* i *Arbutus unedo*, a hlorogenska kiselina u *Erica carnea* i *Calluna vulgaris*.

7. Antioksidativna aktivnost etanolnih ekstrakata je veoma izražena:

- najbolju sposobnost redukcije jona gvožđa u FRAP testu i sposobnost neutralizacije slobodnih radikala ispoljavaju ekstrakti vrste *Arbutus unedo*.
- najbolju dozno-zavisnu aktivnost u oba testa inhibicije LP pokazuje ekstrakt vrste *Bruckenthalia spiculifolia*, odnosno etarska frakcija kada su u pitanju frakcije ovog ekstrakta.
- rezultati ispitivanja antioksidativne aktivnosti su u skladu sa visokim sadržajem polifenola (uključujući tanine, flavonoide, fenilpropanoidne i hidrohinske derivate) koji su određeni u ispitivanim uzorcima.

8. Antimikrobna aktivnost ispitivanih ekstrakata je veoma slaba (tek ponegde uz najveće aplikovane koncentracije ekstrakata prelazi 50% aktivnosti komercijalnog antibiotika i kristal-violeta).

9. Ispitivanjem spazmolitičke aktivnosti na izolovanom ileumu pacova je utvrđeno:

- etanolni ekstrakti vrste *Arbutus unedo* pokazuju značajnu spazmolitičku aktivnost (i to bolji efekat ispoljava ekstrakt listova sakupljenih u Grčkoj nego u Crnoj Gori) pri čemu je mehanizam dejstva inhibicija kalcijumovih kanala.
- etanolni ekstrakt vrste *Erica arborea* pokazuje dozno-zavisnu spazmolitičku aktivnost, ali znatno slabiju od aktivnosti koju ispoljavaju ekstrakti vrste *Arbutus unedo*.
- inhibitorni efekti svih testiranih ekstrakta su reverzibilni nakon ispiranja preparata fiziološkim rastvorom, što ukazuje da utvrđena spazmolitička aktivnost nije posledica ireverzibilnih oštećenja ileuma.

10. Ekstrakti i frakcije vrste *Bruckenthalia spiculifolia* sa Vlasinskog jezera pokazuju značajnu antiinflamatornu aktivnost u modelu akutne inflamacije – karageninom indukovano edema šapice pacova. Efekti su uporedivi, a kada je u pitanju etilacetatna i vodena frakcija, odnosno ekstrakti herbe i listova, i snažniji od efekta indometacina.

11. Hidrogelovi sa po 2% suvog etanolnog ekstrakta ispitivanih vrsta modifikuju reakciju iritacije izazvane SLS-om na koži zdravih dobrovoljaca, odnosno redukuju eritem, hidriraju

kožu i vraćaju pH kože na početne vrednosti. Rezultati *in vivo* ispitivanja na veštački iritiranoj koži se mogu pripisati izraženoj antioksidativnoj aktivnosti i sadržaju polifenolnih jedinjenja, pri čemu najbolji efekat ispoljava gel sa ekstraktom vrste *Erica carnea* u kome dominira hlorogenska kiselina.

12. Na osnovu dobijenih rezultata hemijske analize i izvršenih farmakoloških ispitivanja može se zaključiti da ispitivane biljne vrste familije Ericaceae poseduju izvestan farmakološki potencijal. Dalje analize su neophodne da bi se sagledala mogućnost primene nadzemnih delova ovih biljaka kao potencijalno novih prirodnih lekovitih sirovina.

LITERATURA

1. <http://ntp.niehs.nih.gov/files/Arbutin.pdf> (Chemical Information Review Document for Arbutin [497-76-7] and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* 01/2006.) [cited 2007 Feb 24]
2. Milić B, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, Sakač M. Biljni polifenoli, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
3. <http://www.scri.ac.uk/bpp/chartxt.htm> (Lyon G. D. (1997): Metabolic pathways of the diseased potato) [cited 2010 Dec 10]
4. Milojević B, Mihajlov M, Tucakov J. Uperedno određivanje arbutozida u vrstama rodova *Arctostaphylos* Adans (fam. Ericaceae) i *Vaccinium* Lindl. (fam. Vacciniaceae) s područja Prokletija i Komova u Crnoj Gori. Tokovi 1974;9:161-174.
5. Lukić P. Farmakognozija. Savez socijalističke omladine Farmaceutskog fakulteta u Beogradu, Beograd, 1988.
6. Hinch DK, Oliver AE, Crowe JH. Lipid Composition Determines the Effects of Arbutin on the Stability of Membranes. *Biophys J* 1999;77: 2024–2034.
7. Stevanović B, Janković M. Ekologija biljaka sa osnovima fiziološke ekologije biljaka. NNK International, Beograd, 2001.
8. Pop C, Vlase L, Tamas M. Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 2009;37(1):129-132.
9. Sherwin HW, Farrant JM. Differences in Rehydration of Three Desiccation-tolerant Angiosperm Species. *Ann Bot* 1996;78:703-710.
10. Petkou D, Diamantidis G, Vasilakakis M. Arbutin oxidation by pear (*Pyrus communis* L.) peroxidases. *Plant Sci* 2002;162:115–119.
11. Oliver AE, Hinch DK, Crowe LM, Crowe JH. Interactions of arbutin with dry and hydrated bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1998;1370:87–97.
12. Grayer RJ, Kokubun T. Plant and fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem* 2001;56:253-263.
13. Buonaurio R. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction. *Mol Plant Microbe Interact* 2008;169-197.
14. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* 2003;643–19.
15. Lukas B, Schmidler C, Mitteregger U, Novak J. Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chem* 2010;121:185–190.
16. Lin CH, Wu HL, Huang YL. Microdialysis sampling coupled to on-line high-performance liquid chromatography for determination of arbutin in whitening cosmetics. *J Chrom B* 2005;829:149–152.
17. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Srpska školska knjiga, Beograd, 2002.
18. WHO monographs on selected medicinal plants, Vol 2. World Health Organization, Geneva, 2002.
19. Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, Niciecki A, Wittig J, Krähmer N, Glöckl I, Veit M. Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *J Clin Pharmacol* (2002);42:920-927.
20. Siegers C, Bodinet C, Ali SS, Siegers CP. Bacterial deconjugation of Arbutin by *Escherichia coli*. *Phytomed* 2003;10(IV):58–60.
21. Semenza G, Bircher J, Mülhaupt E, Koide T, Pfenninger E, Marthaler T, Gmünder U, Haemmerli UP. Arbutin absorption in human small intestine: A simple procedure for the

- determination of active sugar uptake in peroral biopsy specimens. Clin Chim Acta 1969;25(2)213-219.
22. Takii H, Matsumoto K, Kometani T, Okada S, Fushiki T. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice. Biosci Biotechnol Biochem 1997;61(9):1531-5.
 23. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/123319.pdf> [cited 2007 Feb 25]
 24. <http://www.inchem.org/documents/iarc/vol71/024-hydroquinone.html> [cited 2007 Feb 25]
 25. McDonald TA, Holland NT, Skibola C, Duramad P, Smith MT. Hypothesis: Phenol and hydroquinone derived mainly from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. Leukemia 2001;15:10–20
 26. Blumenthal M. The Complete German Commission E Monographs – Therapeutic Guide to Herbal Medicines. American Botanical Council, Austin, Texas, 1998.
 27. European Pharmacopeia 6.0, 6th Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2007.
 28. Jugoslovenska Farmakopeja 2000-prilagođeni prevod Evropske farmakopeje iz 1997 (Ph. Eur. III) – 5. izd. (i. e. 1. izd.) Ph. Jug. V. Savremena Administracija, Beograd, 2000.
 29. Özcan Özcan MM, Haciseferoğullari H. The Strawberry (*Arbutus unedo* L.) fruits: Chemical composition, physical properties and mineral contents. J Food Eng 2007; 78(3):1022-1028.
 30. Šilić Č. Atlas drveća i grmlja. IV izdanje, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990.
 31. Tucakov J. Lečenje biljem. VII izdanje, Rad, Beograd, 1997.
 32. Ziyvat A, Legssyer A, Mekhfi H, Dassouli A, Serhrouchni M, Benjelloun W. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. J Ethnopharmac 1997;58:45-54.
 33. Ballero M, Poli F, Sacchetti G, Loi MC. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore (south-western Sardinia). Fitoterapia 2001;72:788-801.
 34. PDR for Herbal Remedies. 2nd Edition, Medical Economics Company, Montvale, New Jersey, 2000.
 35. Kušan F. Ljekovito i drugo korisno bilje. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb, 1956.
 36. Orhan I, Küpeli E, Terzioğlu S, Yesil E. Bioassay-guided isolation of kaempferol-3-O- β -D-galactoside with anti-inflammatory and antinociceptive activity from the aerial part of *Calluna vulgaris* L. J Ethnopharmacol 2007;114:32–37.
 37. Akkol EK, Yeşilada E, Güvenc A. Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey. J Ethnopharmacol 2008;116:251–257.
 38. Harnafi H, Bouanani NH, Aziz M, Caid HS, Ghalim N, Amrani S. The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. J Ethnopharmacol 2007;109:156–160.
 39. Tasić S, Šavikin Fodulović K, Menković N. Vodič kroz svet lekovitog bilja. Valjevac, Valjevo, 2004.
 40. Mathekgga ADM. Antimicrobial activity of *Helichrysum* species and the isolation of a new phloroglucinol from *Helichrysum caespitium*. PhD Thesis, (Plant Physiology), University of Pretoria, 2001.
 41. Jovanović B. *Ericaceae* DC. U: Josifović, M. (Urednik): Flora SR Srbije. SANU, Beograd, 1972.
 42. Weebb DA. *Ericaceae* L. U: Tutin T.G. et al. (eds.) Flora Europea. Volume 3, Cambridge University Press, London, 1972.
 43. <http://www.bgbm.org/IOPI/GPC/default.asp> (© 1996-2007 The International Organization for Plant Information (klasifikacija familije Ericaceae po: BfN - FloraWeb DB, 2003.; rasprostranjenje ispitivanih vrsta je citirano iz: Greuter, W., Burdet, H. M. & Long, G. (ed.) 1984/1986: Med Checklist (Vol. 1 and 3)) [cited 2010 Dec 12]
 44. Jamšak K. Medonosno bilje. Nolit, Beograd, 1980.

45. Lakušić R. Planinske biljke. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990.
46. Flora Reipublicae Popularis Bulgaricae. In aedibus Academiae Scientiarum Bulgaricae, Serdaciae, 1982.
47. Stevanović V, Niketić M, Lakušić D, Jovanović S, Bulić Z, Butorac D, Boža P, Knežević A, Randelović V, Randelović N, Stevanović B, Vukoijičić S, Savić D, Tomović G. Preliminarna crvena lista vaskularne flore Srbije – interna baza podataka. Biloški fakultet, Beograd (manuscript), 2003.
48. Rohlena J. Conspectus Florae Montenegrinae. Preslia, 1941-1942.
49. Frutos P, Hervás G, Ramos G, Giráldez FJ, Mantecón AR. Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Anim Feed Sci Technol* 2002;95:215–226.
50. Scanu R, Spano N, Panzanelli A, Pilo MI, Piu PC, Sanna G, Tapparo A. Direct chromatographic methods for the rapid determination of homogentisic acid in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) honey. *J Chromatogr A* 2005;1090:76–80.
51. Harborne JB, Williams CA. The identification of orcinol in higher plants in the family Ericaceae. *Phytochem* 1969;8(11):2223-2226.
52. Guyot C, Scheirman V, Collin S. Floral origin markers of heather honeys: *Calluna vulgaris* and *Erica arborea*. *Food Chem* 1999;64:3-11.
53. Karikas GA, Giannitsaros A. Glucosides phénoliques des feuilles d' *Arbutus unedo*. *Plantes médicinales et phytothérapie* 1990; XXIV(1):27-30.
54. Ziyat A, Boussairi E-H. Cardiovascular Effects of *Arbutus unedo* L. in Spontaneously Hypertensive Rats. *Phytother res*1998;12:110–113
55. Deliorman-Orhan D, Şenol S, Kartal M, Orhan I. Assessment of antiradical potential of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and its major flavonoid. *J Sci Food Agric* 2009;89:809-814.
56. Ay M, Bahadori F, Öztürk M, Kolak U, Topçu G. Antioxidant activity of *Erica arborea*. *Fitoterapia* 2007;78:571–573.
57. Evans WC. Trease and Evans Pharmacognosy. Saunders, Edinburgh, 2000.
58. Maleš Ž, Plazibat M, Bilušić-Vundać V, Žuntar I. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids of the strawberry tree – *Arbutus unedo* L. (*Ericaceae*). *Acta Pharm* 2006;56:245–250.
59. Dib MEA, Allali H, Bendiabdellah A, Meliani N, Tabti B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *J Saudi Chem Soc* 2011; doi:10.1016/j.jscs.2011.05.001
60. Dauguet JC, Foucher JP. Les flavonoïdes de *Arbutus unedo* L. (*Ericacées*). *Plantes médicinales et phytothérapie* 1982; XVI(3):185-191.
61. Afkir S, Nguelefack TB, Aziz M, Zoheir J, Cuisinaud G, Bnouham M, Mekhfi H, Legssyer A, Lahlou S, Ziyat A. *Arbutus unedo* prevents cardiovascular and morphological alterations in L-NAME-induced hypertensive rats Part I: Cardiovascular and renal hemodynamic effects of *Arbutus unedo* in L-NAME-induced hypertensive rats. *J Ethnopharmacol* 2008;116:288–295.
62. Davini E, Esposito P, Iavarone C, Trogolo C. Structure and configuration of unedide, an iridoid glucoside from *Arbutus unedo*. *Phytochem* 1981;20(7):1583-1585.
63. Pabuçcuoğlu A, Kivçak B, Ba M, Mert T. Antioxidant activity of *Arbutus unedo* leaves. *Fitoterapia* 2003;74(6):597-599.
64. Legssyer A, Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Herrenknecht C, Roumy V, Fourneau C, Laurens A, Hoerter J, Fischmeister R. Tannins and Catechin Gallate Mediate the Vasorelaxant Effect of *Arbutus unedo* on the Rat Isolated Aorta. *Phytother Res* 2004;18:889–894.
65. Kivçak B, Mert T. Quantitative determination of α -tocopherol in *Arbutus unedo* by TLC-densitometry and colorimetry. *Fitoterapia* 2001;72(6):656-661.

66. Allias DP, Chulia AJ, Kaouadji M, Simon A, Delage C. 3-desoxycallunin and 2"-acetylcallunin, two minor 2,3-dihydroflavonoid glucosides from *Calluna vulgaris*. *Phytochem* 1995;39(2):427-430.
67. Simon A, Chulia AJ, Kaouadji M, Delage C. Quercetin 3-[triacetylraibinosyl(1→6)galactoside] and chromones from *Calluna vulgaris*. *Phytochem* 1994; 36(4):1043-1045.
68. Brachet J, Paris R R. Proanthocyanes de *Calluna vulgaris* L. séparation et caractérisation de ces substances dans les rameaux verts. *Phytochem* 1970;9(2):435-439.
69. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second Edition, Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
70. Nazemiyeh H, Bahadori F, Delazar A, Ay M, Topçu G, Nahar L, Majinda RR, Sarker SD. Antioxidant phenolic compounds from the leaves of *Erica arborea* (Ericaceae). *Nat Prod Res*. 2008;22(16):1385-92.
71. Nazemiyeh H, Bahadori F, Delazar A, Ay M, Topçu G, Kolak U, Nahar L, Auzie AA, Sarker SD. Tricetin 4'-O- α -L-rhamnopyranoside: A new flavonoid from the aerial parts of *Erica arborea*. *Chem Nat Compd+* 2008;44(2):174-177.
72. Mendes L, De Freitas V, Baptista P, Carvalho M. Comparative antihemolytic and radical scavenging activities of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaf and fruit. *Food Chem Toxicol* 2011;49(9):2285-2291.
73. Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1507–1511.
74. Ziyat A, Mekhfi H, Bnouham M, Tahri A, Legssyer A, Hoerter J, Fischmeister R. *Arbutus unedo* Induces Endothelium-dependent Relaxation of the Isolated Rat Aorta. *Phytother Res* 2002;16:572–575.
75. Mekhfi H, El Haouari M, Legssyer A, Bnouham M, Aziz M, Atmani F, Remmal A, Ziyat A. Platelet anti-aggregant property of some Moroccan medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2004;94(2-3):317-322.
76. Mekhfi H, ElHaouari M, Bnouham M, Aziz M, Ziyat A, Legssyer A. Effects of Extracts and Tannins from *Arbutus unedo* Leaves on Rat Platelet Agregation. *Phytother Res* 2006;20:135-139.
77. Haouari ME, López JJ, Mekhfi H, Rosado JA, Salido GM. Antiaggregant effects of *Arbutus unedo* extracts in human platelets. *J Ethnopharmacol* 2007;113(2):325-331.
78. Mariotto S, Esposito M, Di Paola R, Ciampa A, Mazzon E, De Prati AC, Darra E, Vincenzi S, Cucinotta G, Caminiti R, Suzuki H, Cuzzocrea S. Protective effect of *Arbutus unedo* aqueous extract in carrageenaninduced lung inflammation in mice. *Pharmacol Res* 2008;57:110–124.
79. Bnouham M, Merhfour FZ, Legssyer A, Mekhfi H, Maâllem S, Ziyat A. Antihyperglycemic activity of *Arbutus unedo*, *Ammoides pusilla* and *Thymelaea hirsuta*. *Pharmazie* 2007;62(8):630-2.
80. Kivçak B, Mert T, Ertabaklar H, Balcioglu C, Özensoy Töz S. In vitro Activity of *Arbutus unedo* Against *Leishmania tropica* Promastigotes. *Türkiye Parazitolo Derg* 2009;33(2):114-15.
81. Ertabaklar H, Kivçak B, Mert T, Özensoy Töz S. In vitro Activity of *Arbutus unedo* Leaf Extracts against *Trichomonas vaginalis* Trophozoites. *Türkiye Parazitolo Derg* 2009;33(4):263-265.
82. Chaturvedi PK, Bhui K, Shukla Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. *Cancer Lett* 2008;263:1–13.
83. Filip A, Clichici S, Daicovicu D, Catoi C, Bolfa P, Postescu ID, Gal A, Baldea I, Gherman C, Muresan A. Chemopreventive effects of *Calluna vulgaris* and *Vitis vinifera*

- Extracts on UVB-induced skin damage in SKH-1 hairless mice. *J Physiol Pharmacol* 2011;62(3):385-392.
84. Tuno H, Olavsdotter C, Bohlin L. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J Ethnopharmacol* 1995;48(2):61-76.
 85. Najid A, Simon A, Cook J, Chable-Rabinovitch EL, Delageb C, Chulia AJ, Rigaud M. Characterization of ursolic acid as a lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitor using macrophages, platelets and differentiated HL60 leukemic cells. *Febs Lett* 1992;299(3):213-217.
 86. Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, Sarker SD. Screening seeds of Scottish plants for antibacterial activity. *J Ethnopharmacol* 2002;83:73-77.
 87. Saaby L, Rasmussen HB, Jäger AK. MAO-A inhibitory activity of quercetin from *Calluna vulgaris* (L.) Hull. *J Ethnopharmacol* 2009;121:178–181.
 88. Filip A, Daicovicu D, Clichici S, Mocan T, Muresan A, Postescu ID. Photoprotective Effects of Two Natural Products on Ultraviolet B–Induced Oxidative Stress and Apoptosis in SKH-1 Mouse Skin. *J Med Food* 2011;14(7-8):761-766.
 89. Dweck AC. Natural Extracts and Herbal Oils: Concentrated Benefits for the Skin. *Cosmet Toiletries* 1992;107:89-98.
 90. <http://www.specialchem4cosmetics.com> [cited 2011 Dec 27]
 91. *Pharmacopoea Jugoslavica editio quarta* – Ph. Jug. IV. Izdanje Saveznog zavoda za zdravstvenu zaštitu, Beograd, 1984.
 92. European Pharmacopoeia, 5th Edition. Council of Europe, Strasbourg, 2005.
 93. World Health Organization: Quality control methods for medical plant materials. Geneva, 1998.
 94. Tanaka Y, Nakamura T. The thermal decomposition of arbutin. *Thermochim Acta* 1981;44(3):303-312.
 95. Petrović S, Maksimović Z, Kundaković T. Analiza sastojaka biljnih droga. Farmaceutski fakultet, Beograd, 2009.
 96. Petrović DS. Fitohemijsko proučavanje vrsta roda *Hieracium* L. Biblioteka Dissertatio, Zadužbina Andrejević, Beograd, 2001.
 97. Kovačević N. Usporedno proučavanje krušine, *Frangula alnus* Mill., i pasdrena, *Rhamnus catharticus* L. Magistarski rad, Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, 1989.
 98. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin, 1970.
 99. *Pharmacopoea Jugoslavica editio secunda* – Ph. Jug. II. Medicinska knjiga, Beograd, 1951.
 100. Ministry of Health of the USSR: State Pharmacopoeia of the Union of Soviet Socialist Republics. Ninth edition-translated from Russian, Moscow, 1961.
 101. British Pharmacopoeia CD 1998 Version 2.0. March 1998 Data @ Crown Copyright 1998 The Stationery Office Ltd. Norwich
 102. German Pharmacopoeia DAB 10. Deutsches Arzneibuch. 10th Edition. 3rd suppl. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 1996.
 103. Prior RL, 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.
 104. Padda MS. Phenolic composition and antioxidant activity of sweetpotatoes [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]. Academic Dissertation, Department of Horticulture, Punjab Agricultural University, Louisiana State University, 2006.
 105. Makkar HPS, Hagerman A, Mueller-Harvey I. Quantification on Tannins in Tree Foliage-A Laboratory Manual. FAO/IAEA, Vienna, 2000.

106. Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 2007;102(3):938-953.
107. Didry N, Seidel V, Dubreuil L, Tillequin F, Bailleul F. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. *J Ethnopharmacol* 1999;67:197-202.
108. McCord JM. The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *Am J Med*. 2000;108:652-659
109. Benzie IFF. Evolution of dietary antioxidants. *Comp Biochem Phys A* 2003;136(1):113-126.
110. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54:176-186.
111. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol* 2006;141:312-322.
112. Pietta P-G. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod* 2000;63:1035-1042.
113. Gutteridge JMC, Halliwell B. Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000: A Historical Look to the Future. *Ann NY Acad Sci* 2000;899:136-147.
114. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Ann Bot* 2003;91:179-194.
115. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003;552(2):335-344.
116. Yen G-C, Chen H-Y. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. *J Agric Food Chem* 1995;43:27-32.
117. Gracy RW, Talent JM, Kong Y, Conrad CC. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult? *Mutat Res* 1999;428:17-22.
118. Duthie GG, Duthie SJ, Kyle JAM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* 2000;13:79-106.
119. Surveswaran S, Cai Y-Z, Corke H, Sun M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chem* 2007;102(3):938-953.
120. Samee W, Sae-Lee N, Ungwitayatorn J. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of the Synthesized Chromone Derivatives. *SWU J Pharm Sci* 2004;9(1):36-42.
121. Fukumoto LR, Mazza G. Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem* 2000;48:3597-3604.
122. Wang H, Cao G, Prior R L. Oxygen Radical Absorbing Capacity of Anthocyanins. *J Agric Food Chem* 1997;45:304-309.
123. Pinelo M, Rubilar M, Sineiro J, Nuñez M J. A thermal treatment to increase the antioxidant capacity of natural phenols: catechin, resveratrol and grape extract cases. *Eur Food Res Technol* 2005;221(3):284-290.
124. Yokozawa T, Chen CP, Dong D, Tanaka T, Nonaka G-I, Nishioka I. Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochem Pharmacol* 1998;56:213-222.
125. Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, McPhail D, Skibsted LH, Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol* 2001;212:319-328.
126. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *J Agric Food Chem* 2000;48(8):3396-3402.
127. Szöllösi R, Szöllösi Varga I. Total antioxidant power in some species of Labiatae (Adaptation of FRAP method). *Acta Biol Szeged* 2002;46(3-4):125-127.
128. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem* 1996;239:70-76.

129. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MCW, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold A, Haffner K, Baugerød H, Andersen LF, Moskaug Ø, Jacobs DR, Blomhoff R. A Systematic Screening of Total Antioxidants in Dietary Plants. *J Nutr* 2002;132:461-471.
130. 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.
131. Ranjbar A, Ghasmeinezhad S, Zamani H, Malekirad AA, Baiaty A, Mohammadirad A, Abdollahi M. Antioxidative stress potential of *Cinnamomum zeylanicum* in humans: a comparative cross-sectional clinical study. *Therapy* 2006;3(1):113-117.
132. Caillet S, Yu H, Lessard S, Lamoureux G, Ajdukovic D, Lacroix M. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. *Food Chem* 2007;100:542-552.
133. Benedet JA, Shibamoto T. Role of transition metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II), in lipid peroxidation. *Food Chem* 2008;107:165-168.
134. Štajner D. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Jugoslavija, 1990.
135. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chem* 2005;92:235-254.
136. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem* 1998;46:4113-4117.
137. Koleva II, Van Beek TA, Linszen JPH, De Groot A, Evstatieva LN. Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods. *Phytochem Analysis* 2002;13:8-17.
138. Barros L, Ferreira M-J, Queirós B, Ferreira ICFR, Baptista P. Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chem* 2007;103:413-419.
139. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH• Free Radical Method, *LWT* 1997;30:609-615.
140. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta* 1997;80:1144-1152.
141. Kumar VP, Chauhan NS, Padh H, Rajani M. Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 2006;107:182-188.
142. Cos P, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D, Maes L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 2006;106:290-302.
143. Sarić MR. Fiziologija biljaka. Naučna knjiga, Beograd, 1979.
144. Kitić D. Divlji bosiljak hemijsko i mikrobiološko ispitivanja., Zadužbina Andrejević, Beograd, 2006.
145. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005;100:80-84.
146. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson EM. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2004.
147. Mahon CR, M G. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3rd edition, Elsevier Health Sciences, UK, 2000.
148. Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL, Jameson JL. *Harrison's principles of Internal Medicine*. 16th Edition, McGraw-Hill, New York, 2005.
149. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*. Prvo srpsko izdanje, urednik Todorović Z, Data Status, Beograd, 2005.
150. Gilani AH, Khan A, Ghayur MN. Ca²⁺ antagonist and cholinergic activities explain the medicinal use of olive in gut disorders. *Nutr Res* 2006;26:277-283.
151. Estrada-Soto S, Rodríguez-Avilez A, Castañeda-Avila C, Castillo-España P, Navarrete-Vázquez G, Hernández L, Aguirre-Crespo F. Spasmolytic action of *Lepechinia caulescens* is through calcium channel blockade and NO release. *J Ethnopharmacol* 2007;114:364-370.

152. Attia H, Mouneir SM. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol* 2004;92:303–309.
153. Radenković M, Ivetić V, Popović M, Mimica-Dukić N, Veljković S. Neurophysiological effects of mistletoe (*Viscum album* L.) on isolated rat intestines. *Phytother Res* 2006;20:374–377.
154. Goyal RK. Identification, localisation and classification of muscarinic receptor subtypes in the gut. *Life Sci* 1988;43:2209–2220.
155. Karamenderes C, Apaydin S. Antispasmodic effect of *Achillea nobilis* L. subsp. *sipylea* (O. Schwarz) Bässler on the rat isolated duodenum. *J Ethnopharmacol* 2003;84:175–179.
156. Gautam R, Jachak SM. Recent Developments in Anti-Inflammatory Natural Products. *Med Res Rev* 2009; 29(5):767–820.
157. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM., Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Bio Med* 2010;49:1603–1616.
158. Oyanagi Y, Sato S. Inhibition by nilvadipine of ischemic and carrageenan paw edema as well as of superoxide radical production from neutrophils and xanthine oxidase. *Arzneimittelforsch* 1991;41;1(5):469-474.
159. Tadić VM, Dobrić S, Marković GM, Đorđević SM, Arsić IA, Menković NR, Stević T. Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract. *J Agric Food Chem* 2008;56:7700–7709
160. Welss T, Basketterb DA, Schröder KR. In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models. *Toxicol in Vitro* 2004;18:231–243.
161. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C (Eds.). *Rook's Textbook of Dermatology*. Seventh Edition, Blackwell Publishing, Inc., Malden, Massachusetts, USA, 2008.
162. Elias M. Epidermal barrier function: intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J Control Rel* 1991;15:199-208.
163. Roberts MS, Cross SE, Pellet MA. Skin transport. In: Walters KA, Hadgraft J (Eds.). *Dermatological and transdermal formulations*. New York, Marcel Dekker, 2002.
164. Kartono F, Maibach HI. Irritants in combination with a synergistic or additive effect on the skin response: an overview of tandem irritation studies. *Contact Dermatitis* 2006;54:303–312.
165. Tupker RA, Willis C, Berardksca E, Lee CH, Fartasch M, Atinrat T, Serup J. Guidelines on sodium lauryl sulfate (SLS) exposure tests. *Contact Dermatitis* 1997;37:53–69.
166. Savić S, Savić M, Vesić S, Vuleta G, Müller-Goymann CC. Vehicles based on a sugar surfactant: Colloidal structure and its impact on *in vitro/in vivo* hydrocortisone permeation. *Int J Pharmaceut* 2006;320(1-2): 86-95.
167. Berardesca E. EEMCO, EEMCO guidance for the assessment of stratum corneum hydration: electrical methods. *Skin res Technol* 1997;3(2):126-132.
168. Clarys P, Alewaeters K, Lambrecht R, Barel AO. Skin color measurements: comparison between three instruments: the Chromameter®, the DermaSpectrometer® and the Mexameter®. *Skin Res Technol* 2000;6:230-238.
169. Andersen F, Hedegaard K, Petersen TK, Bindslev-Jansen C, Fullerton A, Andersen KE. Anti-irritants II: efficacy against cumulative irritation. *Contact Dermatitis* 2006;55:155-159.
170. Pinagoda J, Tupker RA, Agner T, Serup J. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. A report from the standardization group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis* 1990;22:164–178.
171. ESCOP *Uvae ursi folium*. Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs. European Scientific Cooperative on Phytotherapy, Exeter, U.K., 1997.
172. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. *Free Radical Biol Med* 1997;22(5):749–760.

173. Llesuy S, Evelson P, Campos AM. Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. A critical review. *Biol Res* 2001;34(2):51-73.
174. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem* 2004;85:231–237.
175. Huang D, Ou B, Prior R. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J Agric Food Chem* 2005;53:1841-1856.
176. Maksimović AZ. Kukuruzna svila *Maydis stigma*. Zadužbina Andrejević, Beograd, 2005.
177. Brooks GF, Butel JS, Ornston LN. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. Prevod 20. izdanja (Valentina Arsić et al; stručni redaktor Miloš Jovanović), Savremena administracija, Beograd, 1998.
178. Levey AI. Immunological localization of M1-M5 muscarinic acetylcholine receptors in peripheral tissue and brain. *Life Sci* 1993;52:441-118.
179. Gilani AH, Bashir S, Khan A. Pharmacological basis for the use of *Borago officinalis* in gastrointestinal, respiratory and cardiovascular disorders. *J Ethnopharmacol* 2007;114:393–399.
180. Palombo EA. Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: modes of action and effects on intestinal function. *Phytother Res* 2006;20:717–724.
181. Sadraei H, Asghari G, Hekmatti AA. Antispasmodic effect of three fractions of hydroalcoholic extract of *Pycnocycla spinosa*. *J Ethnopharmacol* 2003;86:187–190.
182. Morikawa K, Nonaka M, Narahara M, Torii I, Kawaguchi K, Yoshikawa T, Kumazawa Y, Morikawa S. Inhibitory effect of quercetin on carrageenan-induced inflammation in rats. *Life Sci* 2003;74:709–721.
183. Boesch-Saadatmandi C, Wagner AE, Wolfram S, Rimbach G. Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver *in vivo* – role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacol Res* 2012;65:523– 530.
184. Aburjai T, Natsheh FM. Plants Used in Cosmetics. *Phytother Res* 2003;17:987-1000.
185. Draelos ZD. Botanicals as Topical Agents. *Clin Dermatol* 2001;19:474-477.
186. Trommer H, Neubert RHH. The examination of polysaccharides as potential antioxidative compounds for topical administration using a lipid model system. *Int J Pharmaceut* 2005;298:153–163.
187. Tasić-Kostov M, Reichl S, Lukić M, Jakšić I, Savić S. Does lactobionic acid affect the colloidal structure and skin moisturizing potential of the alkyl polyglucoside – based emulsion systems? *Pharmazie* 2011;66:862–870.
188. Johnson WA. Cosmeceuticals: Function and the Skin Barrier. In: Draelos Z.D. (Ed.), *Cosmeceuticals*, Elsevier Saunders, New York, 2005.
189. 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.
190. Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biol Pharm Bull* 2006;29(11):2236–2240.
191. Korkina LG. Phenylpropanoids as naturally occurring antioxidants: from plant defense to human health. *Cell Mol Biol* 2007;53(1):15–25.
192. Korkina LG, Mikhal'chik EV, Suprun MV, Pastore S, Dal Toso R. Molecular mechanisms underlying wound healing and anti-inflammatory properties of naturally occurring biotechnologically produced phenylpropanoid glycosides. *Cell Mol Biol* 2007;53(5):78–83.
193. Willis CM, Reiche L, Wilkinson JD. Immunocytochemical demonstration of reduced Cu,Zn-superoxide dismutase levels following topical application of dithranol and sodium lauryl sulphate: an indication of the role of oxidative stress in acute irritant contact dermatitis. *Eur J Dermatol* 1998;8(1):8–12.

194. Katsarou A, Davoy E, Xenos K, Armenaka M, Theoharides TC. Effect of an antioxidant (quercetin) on sodium-lauryl-sulfate-induced skin irritation. *Contact Dermatitis* 2000; 42:85-89.
195. Giacomoni PU, Mammonea T, Teri M. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci* 2009;55:144–149.
196. Smith WP. Hydroxy-acids and skin aging. *Cosmet Toil* 1994;109:41–47.
197. Hachem JP, Crumrine D, Fluhr J, Brown BE, Feingold KR, Elias PM. pH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J Invest Dermatol* 2003;121(2):345-353.
198. Balleroa M, Polib F, Sacchetti G, Loi MC.. Ethnobotanical research in the territory of Fluminimaggiore south-western Sardinia. *Fitoterapia* 2001;72:788-801.
199. Cornara L, La Rocca A, Marsili S, Mariotti MG. Traditional uses of plants in the Eastern Riviera (Liguria, Italy). *J Ethnopharmacol* 2009;125:16-30.
200. Neves JM, Matos C, Moutinho C, Queiroz G, Gomes LR. Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Tras-os-Montes (northern of Portugal). *J Ethnopharmacol* 2009;124:270–283.

DODATAK I

PUBLIKOVANI RADOVI IZ DOKTORATA

D. R. Pavlović, B. Lakušić, Z. Došlov-Kokoruš, N. Kovačević, Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species, *Pharmazie* 64 (2009) 656–659.

D. R. Pavlović, S. Branković, N. Kovačević, D. Kitić, S. Veljković: Comparative Study of Spasmolytic Properties, Antioxidant Activity and Phenolic Content of *Arbutus unedo* from Montenegro and Greece, *Phytother Res* (2011) 749–754.

DODATAK II

NAJZNAČAJNIJI BIOLOŠKI IZVORI ARBUTINA

(ARBUTIN KOD PREDSTAVNIKA RAZLIČITIH FAMILIJA)

Ericaceae

Red Ericales obuhvata 5 familija: *Clethraceae*, *Cyrillaceae*, *Ericaceae*, *Epacridaceae* i *Empetraceae*; predstavnici su uglavnom žbunovi, a ređe nisko drveće ili višegodišnje biljke (1).

Arbutin se javlja kod gotovo trećine predstavnika ovog reda (2), ali ga najviše ima kod predstavnika familije *Ericaceae*, gde se najčešće javlja sa metilarbutinom (3).

Sadržaj arbutina u divljim vrstama *A. uva-ursi* može biti i do 17% (4).

Osim u vrstama *Arctostaphylos uva ursi* Spr., *Vaccinium myrtillus* L. i *Vaccinium vitis-idaea* L., koje se smatraju lekovitim upravo zahvaljujući sadržaju arbutina, arbutin je prisutan i u drugim vrstama roda *Vaccinium*:

V. oxycoccus L. (syn. *Oxycoccus palustris* Pers.)

V. microcarpum (Turcz. ex Rupr.) Schmalh. (syn. *Oxycoccus microcarpus* Turcz. ex Rupr.) (5).

I kod drugih predstavnika familije *Ericaceae* je prisutan arbutin:

Arbutus unedo gde je arbutin prisutan u značajnoj količini i delimično objašnjava izuzetno antioksidativno dejstvo listova ove vrste (6-8).

Calluna vulgaris (L.) Hull (9-11)

Rod *Chimaphila* Pursh. (12)

Rhododendron ferrugineum L. (13).

Asteraceae

Kod vrsta roda *Serratula*:

S. radiata Bunge (syn. *S. Bracteifolia* (Iljin ex Grossh.) Stank., *S. radiata* ssp. *bracteifolia* Iljin ex Grossh., *Klasea radiata* (Waldst. & Kit.) A. Löve & D. Löve)

S. erucifolia (L.) Boriss (syn. *S. xeranthemum* M. Bieb., *Xeranthemum erucifolium* L., *Klasea erucifolia* (L.) Gaertner et Wagenitz)

S. gmelinii Tausch (syn. *S. Isophylla* Claus, *Klasea gmelinii* (Tausch) Holub)

S. quinquefolia M. Bieb. Ex Wild (syn. *Klasea quinquefoia* (Wild.) Greuter et Wagenitz)

S. sogdiana Bunge (syn. *Klasea sogdiana* (Bunge)) (14,15)

Kod hajdučke trave - *Achillea millefolium* L. (16)

Fabaceae (Leguminosae)

Onobrychis viciifolia Scop. (3)

Eriosema tuberosum A.Rich. (15)

Lathyrus niger (L.) Bernh. (1)

Podocarpaceae

Halocarpus biformis Hook. (3)

Turnearceae

Turnera diffusa Willd. ex J. A. Schultes (17)

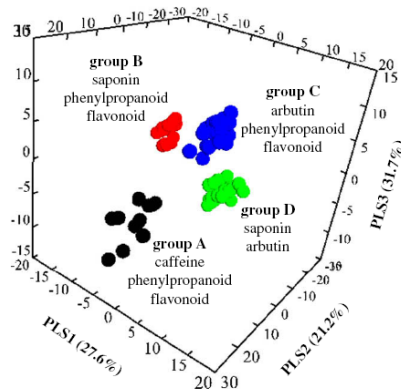
Aquifoliaceae

Arbutin je iskorišćen kao hemijski marker za hemotaksonomsku klasifikaciju vrsta u okviru roda *Ilex* L. Ovaj rod broji oko 500 vrsta a svakako je *Ilex paraguariensis* (mate) najpoznatija. Vrste ovog roda su podeljene u 4 grupe, od kojih su 2 bogate arbutinom i to grupa C:

I. integerrima, *I. pseudobuxus* i *I. theezans*

i grupa D:

I. argentina, *I. brevicuspis*, *I. microdonta* i *I. taubertiana* (18).



Slika II 1. Podela roda *Ilex* na 4 grupe na osnovu prisustva najzastupljenijih sekundarnih metabolita (18).

Plantaginaceae

Wulfeniopsis amherstiana (Benth.) DY Hong,

Scrofella spp.,

vrste *Veronicastrum axillare* (Sieb. et Zucc) T. Yamaz, *Veronicastrum sibiricum* (L.) Pennell i *Veronicastrum virginicum* (L.) Farw.

vrste *Veronica* sect. *Hebe*. (komercijalni hibrid) i *Veronica turrilliana* (arbutin inače nije karakterističan za rod *Veronica*, a povezuje se sa rodom *Veronicastrum*) (19-21)

Rutaceae

Naringi crenulata (Roxb.) Nicolson (syn. *Hesperethusa crenulata* (Roxb.) Roem); kora izdanaka ove vrste se u Aziji tradicionalno koristi za negu i izbeljivanje kože i to upravo zahvaljujući sadržaju arbutina (22).

Lamiaceae

U rodu *Origanum*, koji obuhvata 43 vrste, sinteza arbutina je polimorfna karakteristika, sa veoma značajnim količinama ovog sekundarnog metabolita kod *O. majorana* L. ili uz njegovo potpuno odsustvo kod *O. vulgare* spp. *vulgare* (4).

Drugi literaturni izvor navodi prisustvo arbutina u vrstama *Majorana hortensis* Moench (syn. *Origanum majorana* L.) i *Origanum vulgare* L. (15).

Thymus vulgaris L. (arbutin izolovan iz butanolne frakcije metanolnog ekstrakta) (23)

Salvia mexicana L. (3)

Satureja spp. (24).

Tabela II 1: Prisustvo arbutina u vrstama roda *Origanum* (4)

Značajna količina	Mala količina	Odsustvo
<i>O. majorana</i> (gajen i samonikli)	<i>O. microphyllum</i>	<i>O. vulgare</i>
<i>O. dubium</i>	<i>O. onites</i> (gajen i samonikli)	<i>O. husnucan-Baseri</i>
	<i>O. saccatum</i>	<i>O. syriacum</i>
	<i>O. solymicum</i>	

Crassulaceae

Rhodiola sacra SH Fu (3,25)

Vrste roda *Sedum*: *S. acre* L., *S. aizoon* L., *S. hybridum* L., *S. purpureum* (L.) Schult., *S. telephium* L (26) i Korejska endemična vrsta *S. takesimense* Nakai. (27).

Caprifoliaceae

Viburnum opulus L. (15)

Saxifragaceae

Bergenia crassifolia (L.) Fritsch. (27-29)

Betulaceae

Betula alba L. (30)

Rosaceae

Pyrus communis L.

Pyrus spp. (31-35).

Myrothamnaceae

Myrothamnus abellifolia (36)

Myrothamnus flabellifolia Welw. (37)

Liliaceae

Borya spp. (24,38)

Navodi se i prisustvo arbutina, bez navoda u kojim vrstama, u familijama:

Buxaceae (25)

Juglandaceae (25)

Fagaceae (25)

Hydrangeaceae (2)

Rubiaceae (2, 38)

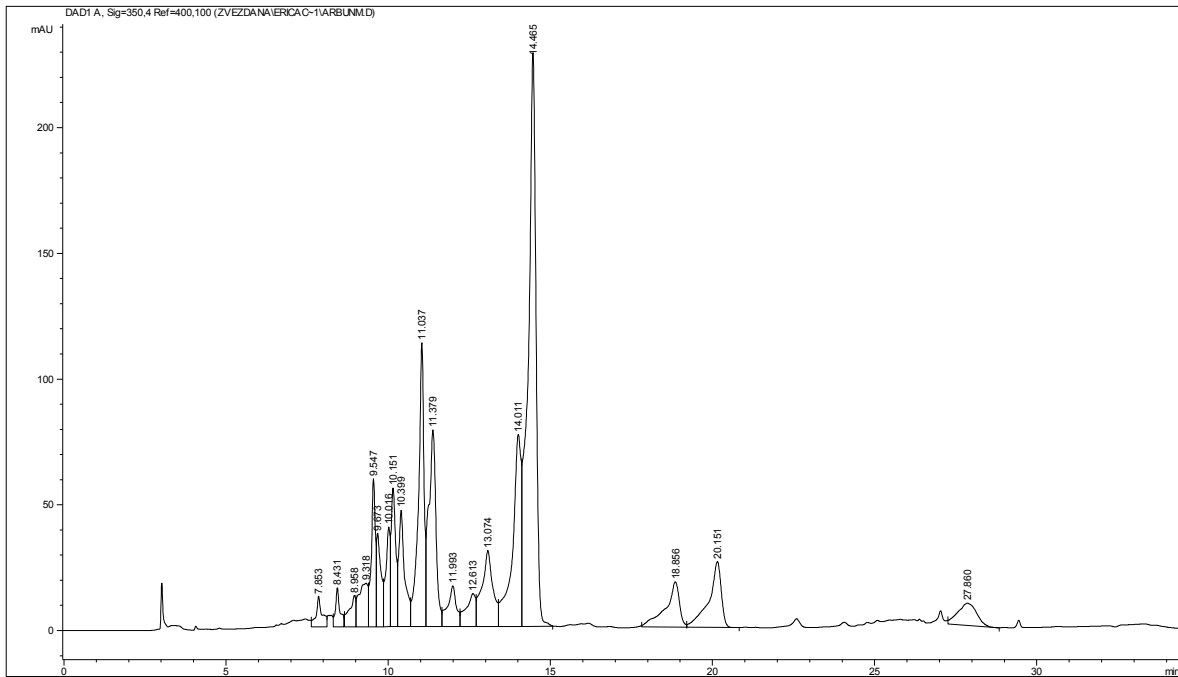
Literatura II:

1. Takhtajan A. Diversity and classification of flowering plants. Columbia University Press, New York, 1997.
2. Anderberg AA. The Circumscription of the Ericales, and Their Cladistic Relationships to Other Families of "Higher" Dicotyledons. *Systematic Botany* 1992;17(4):660-675.
3. <http://ntp.niehs.nih.gov/files/Arbutin.pdf> (Chemical Information Review Document for Arbutin [497-76-7] and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* 01/2006.)
4. Lukas B, Schmiderer C, Mitteregger U, Novak J. Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chem* 2010;121:185–190.
5. Jacquemart AL. *Vaccinium oxycoccus* L. (*Oxycoccus palustris* Pers.) and *Vaccinium microcarpum* (Turcz. ex Rupr.) Schmalh. (*Oxycoccus microcarpus* Turcz. ex Rupr.). *J Ecol* 1997;85:381-396.
6. Karikas GA, Giannitsaros A. Glucosides phénoliques des feuilles d' *Arbutus unedo*. *Plantes médicinales et phytothérapie* 1990;XXIV(1):27-30.
7. Pavlović RD, Lakušić B, Došlov-Kokoruš Z, Kovašvić N. Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species. *Pharmazie* 2009;64:656–659.
8. Oliveira I, Coelho V, Baltasar R, Pereira JA, Baptista P. Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food Chem Toxicol* 2009;47:1507–1511.
9. PDR for Herbal Remedies. Second edition, Medical Economics Company, Montvale, New Jersey. 2000.
10. Wagner H, Bladt S. *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Second Edition, Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
11. Viegi L, Pieroni A, Guarrera PM, Vangelisti R. A review of plants used in folk veterinary medicine in Italy as basis for a databank. *J Ethnopharmacol* 2003;89:221–244.
12. <http://nsl.fs.fed.us/wpsm/Chimaphila.pdf>. (Don Minore: *Chimaphila* Pursh)
13. Harmannstein D. *Phytochemical and Toxicological Research of Rhododendron ferrugineum L.* Diplomarbeit, Universität Wien, Wien, 2008.
14. Yatsyuk YK, Lyashenko SS, Batyuk VS. The content of arbutin in some species of the genus *Serratula*, *Chem nat compd+* 1968;4(1):46-47.
15. Nowak G, Nawrot J, Latowski K. Arbutin in *Serratula quinquefolia* M.B. (Asteraceae). *Acta Soc Bot Pol* 2009;78(2):137-140.
16. Petkou D, Diamantidis G, Vasilakakis M. Arbutin oxidation by pear (*Pyrus communis* L.) peroxidases. *Plant Sci* 2002;162,115–119.
17. Zhao J, Dasmahapatra AK, Khan SI, Khan IA. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). *J Ethnopharmacol* 2008;120:387–393.
18. Kim HK, Saifullah Khan S, Wilson EG, Kricun SDP, Meissner A, Goral S, Deelder AM, Choi YH, Verpoorte R. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. *Phytochem* 2010;71:773–784.
19. Jensen SR, Gottfredsen CH, Zidorn C. Iridoids and phenylethanoids in *Lagotis integrifolia* and *Wulfeniopsis amherstiana* (Plantaginaceae). *Biochem Syst Ecol* 2009;37:421–425.
20. Taskova RM, Gottfredsen CH, Jensen SR. Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochem* 2006;67:286–301.
21. Johansen M, Larsen TS, Matthebjerg MA, Gottfredsen CH, Jensen SR. Chemical markers in *Veronica* sect. *Hebe*. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:614-620.
22. Kanlayavattanukul M, Phrutivorapongkul A, Lourith N, Ruangrunsi N. Pharmacognostic specification of *Naringi crenulata* stem wood. *J Health Res* 2009;23(2):65-69.
23. Takeuchi H, Lu ZG, Fujita T. New Monoterpene Glucoside from the Aerial Parts of Thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68(5):1131–1134.

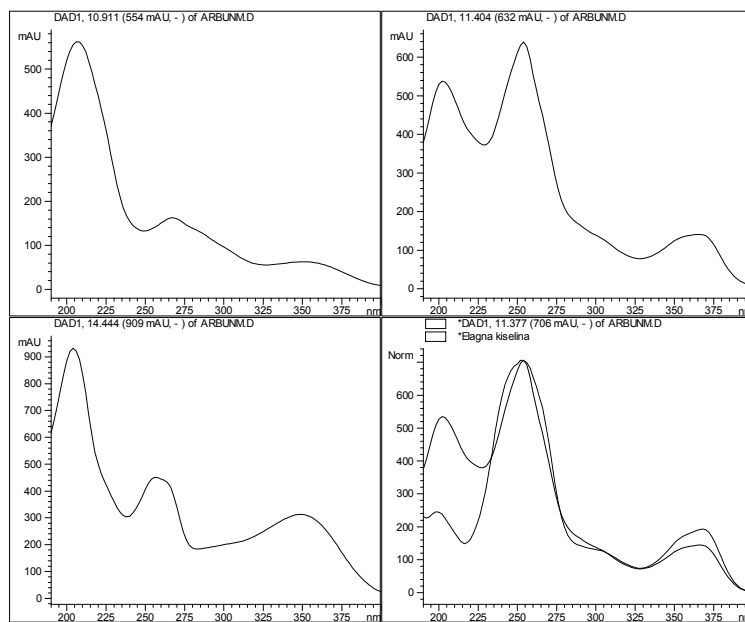
24. Stevanović B, Janković M. Ekologija biljaka sa osnovima fiziološke ekologije biljaka. NNK International, Beograd, 2001.
25. Castilho RO, Kaplan MAC. Chemosystematics of the Rosiflorae. *Braz J Biol* 2008;68(3):633-640.
26. Korul'kin D. Y. Chemical composition of certain *Sedum* species of Kazakhstan. *Chem Nat Compd+* 2001;37(3)219-223.
27. Thuong PT, Kang HJ, Na M, Jin W, Youn UJ, Seong YH, Song K-S, Min B-S, Bae K. Antioxidant constituents from *Sedum takesimense*. *Phytochem* 2007;68:2432–2438.
28. Pop C, Vlase L, Tamas M. Natural Resources Containing Arbutin. Determination of Arbutin in the Leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 2009;37(1),129-132.
29. Grayer RJ, Kokubun T. Plant and fungal interactions: the search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plants. *Phytochem* 2001;56,253-263.
30. Buonauro R. Infection and plant defense responses during plant-bacterial interaction, *Plant Microbe Inter* 2008;169-197.
31. Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits, The Analyst critical review. *Analyst* 2000;125,989-1009.
32. Milić B, Đilas S, Čanadanović-Brunet J, Sakač M. Biljni polifenoli. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
33. Schindler G, Patzak U, Brinkhaus B, Nieciecki A, Wittig J, Krähmer N, Glöckl I, Veit M. Urinary Excretion and Metabolism of Arbutin after Oral Administration of *Arctostaphylos uva-ursi* Extract as Film-Coated Tablets and Aqueous Solution in Healthy Humans. *J Clin Pharmacol* 2002;42:920-927.
34. Siegers C, Bodinet C, Ali SS, Siegers CP. Bacterial deconjugation of Arbutin by *Escherichia coli*. *Phytomed* 2003;10(IV)58–60.
35. Wink M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochem* 2003;64:3–19.
36. Sherwin HW, Farrant JM. Differences in Rehydration of Three Desiccation-tolerant Angiosperm Species, *Ann Bot* 1996;78:703-710.
37. Hinch DK, Oliver AE, Crowe JH. Lipid Composition Determines the Effects of Arbutin on the Stability of Membranes. *Biophys J* 1999;77:2024–2034.
38. <http://media.iupac.org/publications/pac/1967/pdf> (Hegnauer R. Chemical characters in plant taxonomy: some possibilities and limitations)

DODATAK III: HPLC HROMATOGRAMI I SPEKTRI

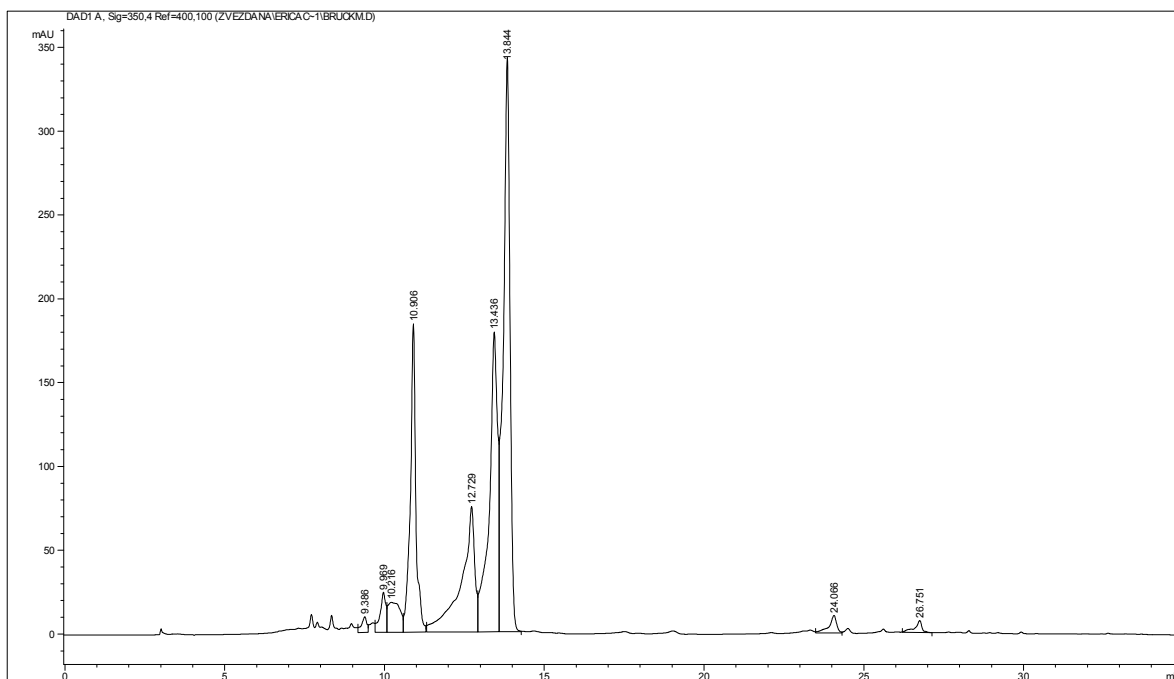
Hromatogrami dobijeni HPLC analizom fenolnih jedinjenja etanolnih ekstrakata ispitivanih biljnih vrsta i spektri najznačajnijih identifikovanih jedinjenja su prikazani na slikama III 1. – III 14.



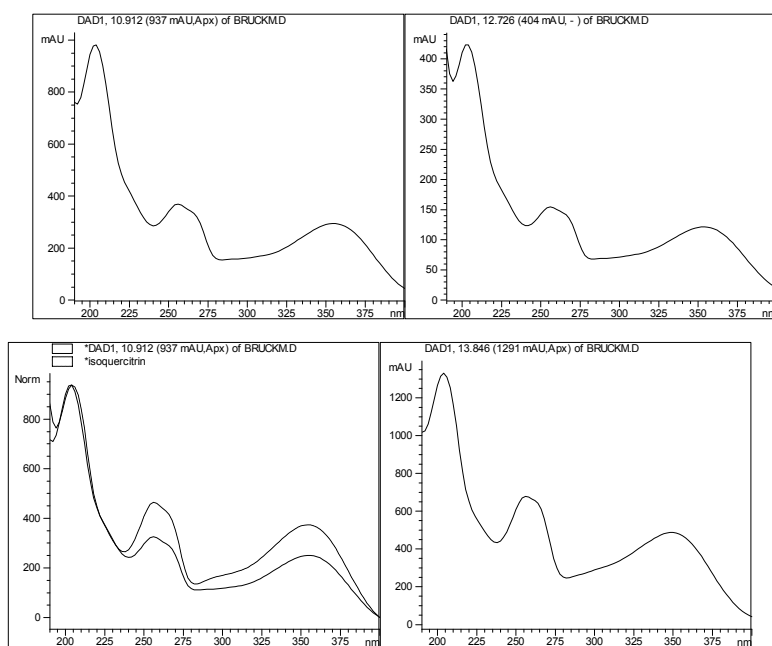
Slika III 1. HPLC hromatogram ekstrakta vrste *Arbutus unedo* iz Crne Gore (AIE, 0,5 mg/ml)



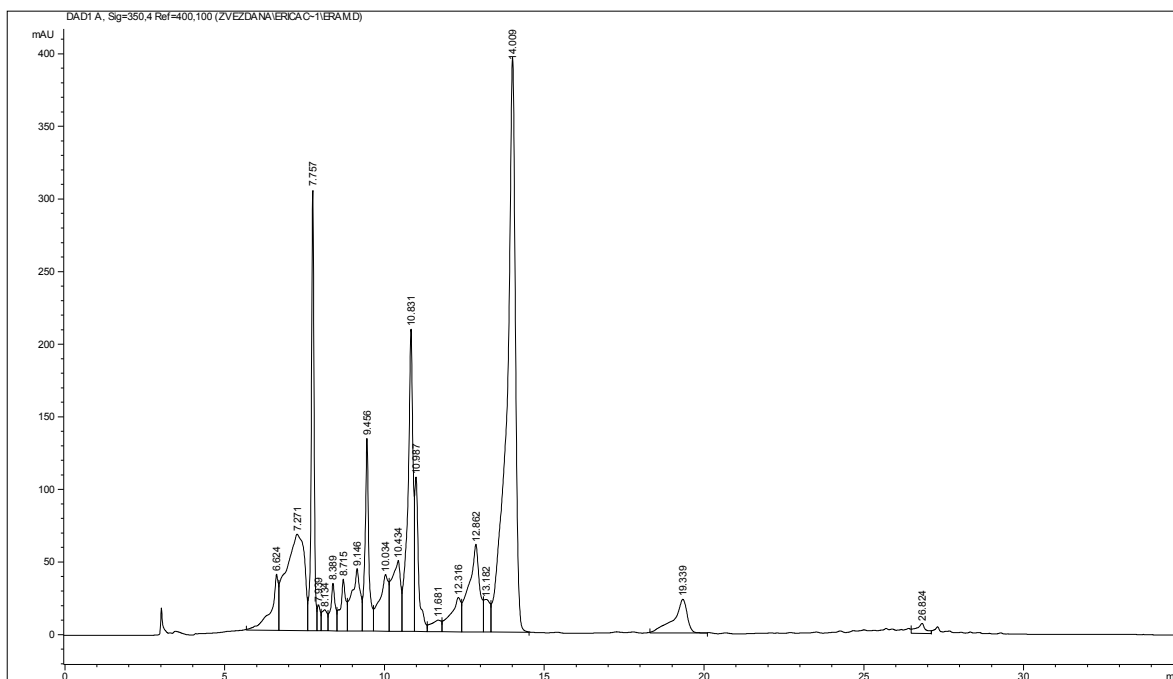
Slika III 2. Izgled spektara izokvercitina, elagne kiseline i kvercitrina ekstrakta AIE



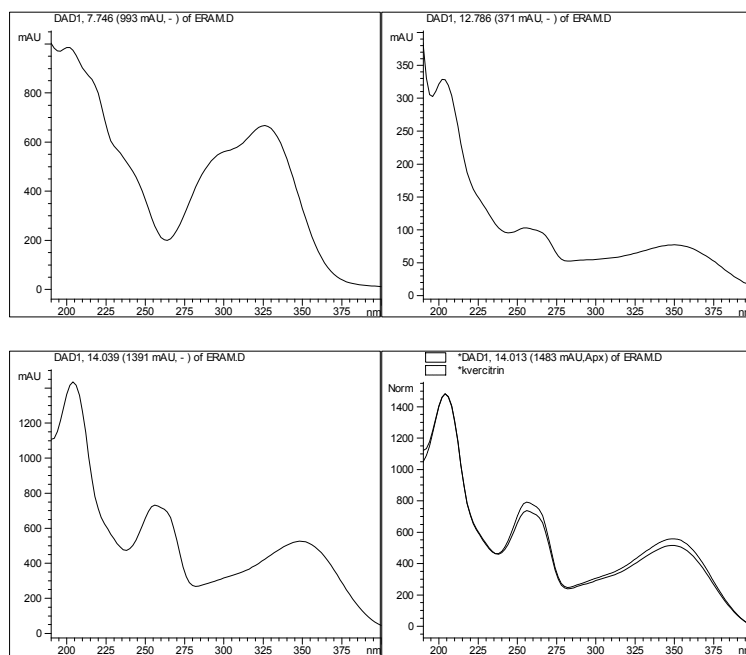
Slika III 3. HPLC hromatogram ekstrakta vrste *Bruckenthalia spiculifolia* (BE, 0,25 mg/ml)



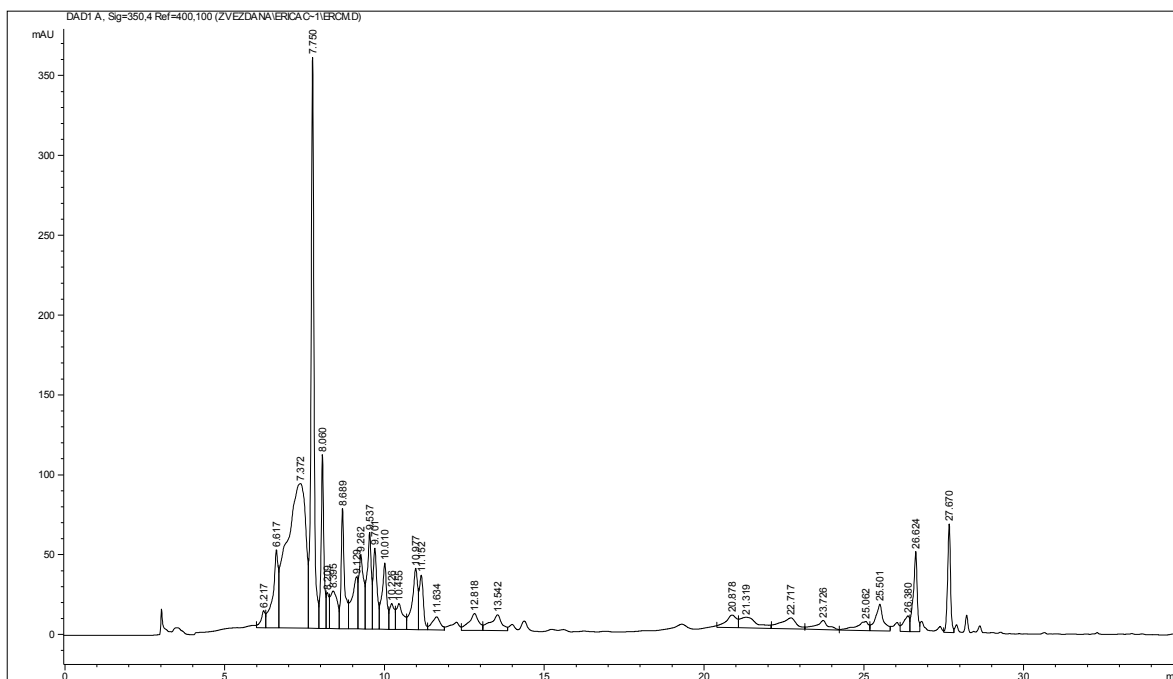
Slika III 4. Izgled spektara izokvercitrina, glikozida kvercetrina i kvercitrina ekstrakta BE



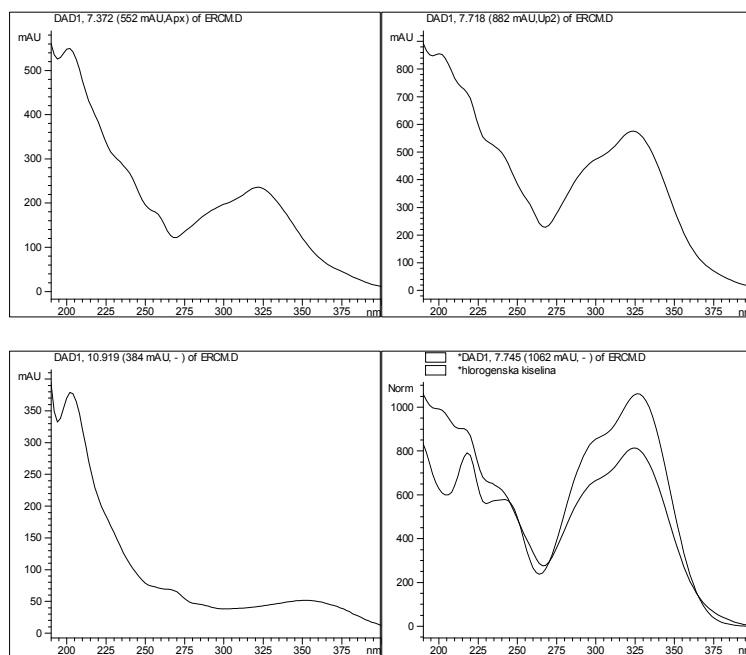
Slika III 5. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Erica arborea (EE, 0,5 mg/ml)



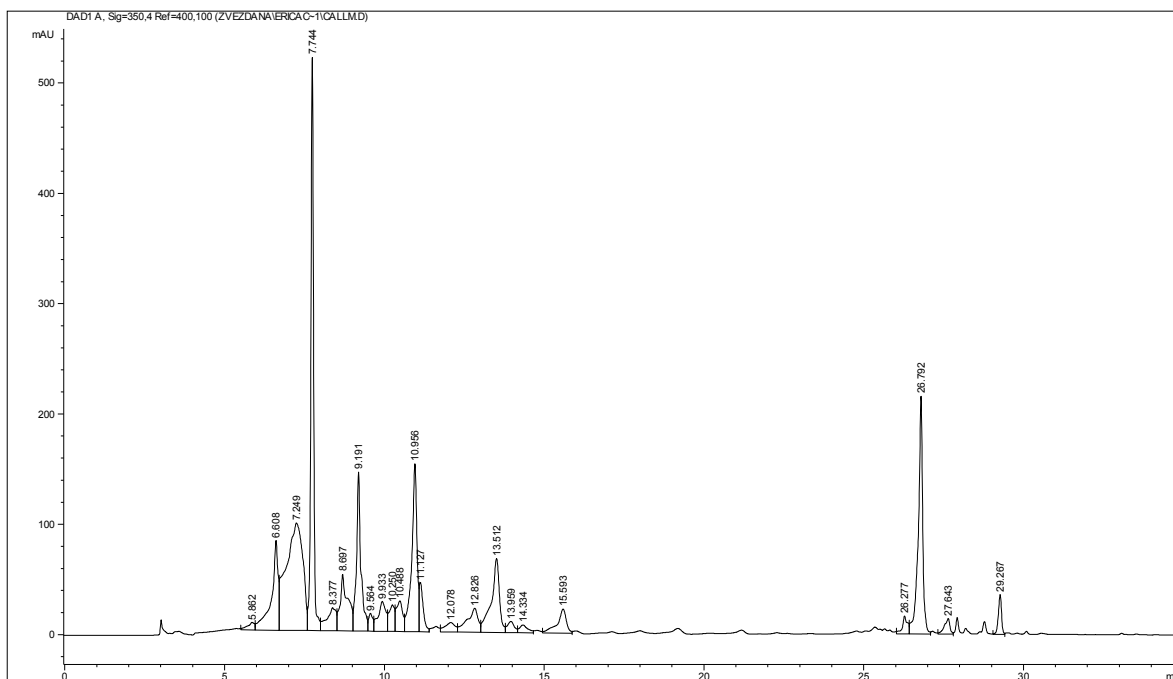
Slika III 6. Izgled spektara hlorogenske kiseline, glikozida kvercetina i kvercitrina ekstrakta EE



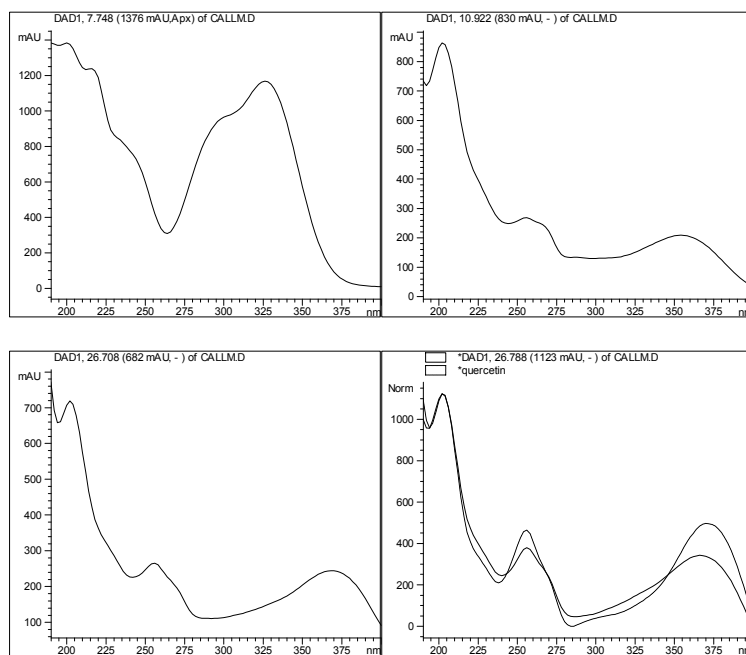
Slika III 7. HPLC hromatogram ekstrakta vrste *Erica carnea* (CE, 0,5 mg/ml)



Slika III 8. Izgled spektara fenolne kiseline, hlorogenske kiseline i izokvercitina ekstrakta CE

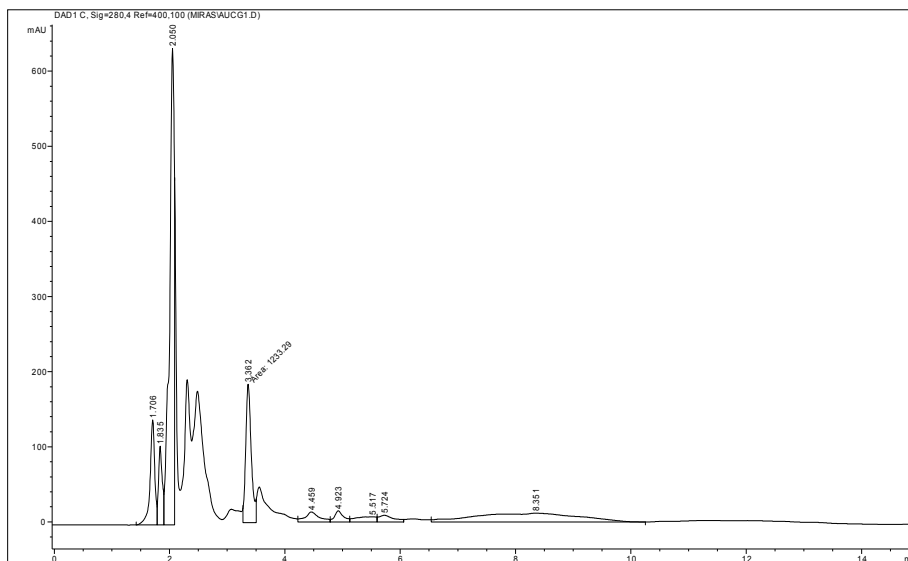


Slika III 9. HPLC hromatogram ekstrakta vrste *Calluna vulgaris* (VE, 0,5 mg/ml)

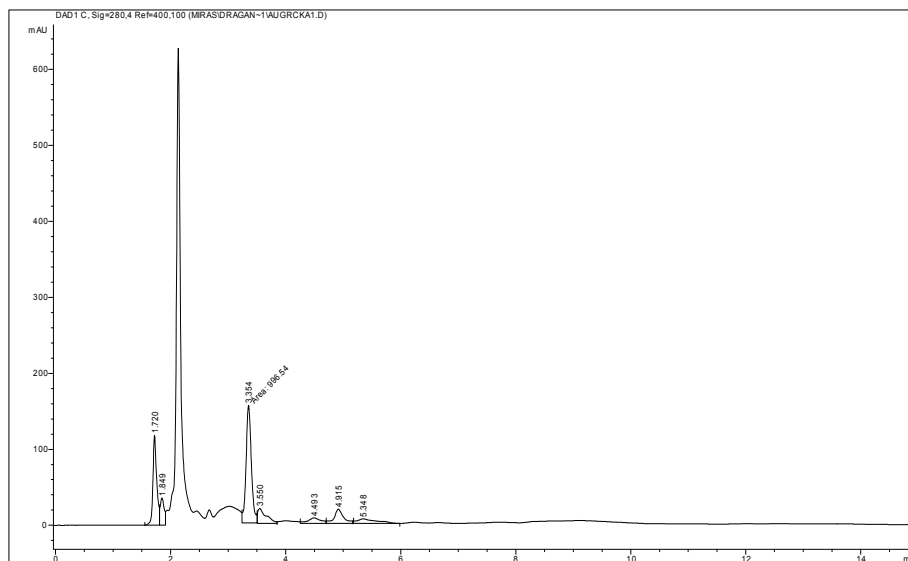


Slika III 10. Izgled spektara hlorogenske kiseline, izokvercicina i kvercicina ekstrakta VE

a)



b)



Slika III 11. HPLC hromatogram sa karakterističnim pikom arbutina (na RT 3,36) a) *Arbutus unedo* CG (16 mg/ml), b) *Arbutus unedo* G (16 mg/ml)

Lista ilustracija

Slika 1.1. Nastanak arbutina iz tirozina	1
Slika 1.2. Šematski prikaz preseka spoljašnjeg sloja lipozomske membrane	2
Slika 1.3. Metabolizam benzena i primarni putevi karcinogeneze	6
Slika 1.4. Areal karta porodice Ericaceae	7
Slika 1.5. Lupeol i arbutin	16
Slika 1.6. Ursolna kiselina, hlorogenska kiselina i kemferol-3O-β-D-galaktozid	17
Slika 3.1. Hidroliza arbutina i metilarbutina	26
Slika 3.2. Glavni izvori slobodnih radikala u telu i posledice njihovog delovanja	36
Slika 3.3. ROS izazivaju oštećenje	37
Slika 3.4. Antioksidativna odbrana od napada slobodnih radikala	37
Slika 3.5. Funkcionalne grupe katehina odgovorne za antioksidativnu aktivnost	38
Slika 3.6. Oksidativna polimerizacija katehina	39
Slika 3.7. Šema reakcije: Fe^{3+} -TPTZ + redukujući antioksidant $\rightarrow Fe^{2+}$ -TPTZ	40
Slika 3.8. Šema reakcije nastajanja ružičasto obojenog hromogena u reakciji MDA i TBA	42
Slika 3.9. Šema redukcije DPPH \cdot u DPPH-H	45
Slika 3.10. Različita ciljna mesta supstanci koje utiču na inflamatornu kaskadu	54
Slika 4.1. <i>A. unedo</i> – poprečni presek lista i detalj lista	61
Slika 4.2. Naličje lista <i>A. unedo</i> – SEM	62
Slika 4.3. <i>A. unedo</i> – poprečni presek stabla	62
Slika 4.4. <i>B. spiculifolia</i> – poprečni presek lista	63
Slika 4.5. Naličje lista <i>B. spiculifolia</i> – SEM	63
Slika 4.6. Stablo sa ožiljcima od lisnih drški	63
Slika 4.7. <i>B. spiculifolia</i> – poprečni presek stabla sekundarne građe	63
Slika 4.8. Površine naličja lista i kripte <i>C. vulgaris</i> – SEM	63
Slika 4.9. <i>C. vulgaris</i> – poprečni presek lista	64
Slika 4.10. <i>C. vulgaris</i> – poprečni presek stabla sekundarne građe	64
Slika 4.11. Površina stabla <i>C. vulgaris</i> – SEM	64
Slika 4.12. Površine naličja i vrha lista <i>E. arborea</i> – SEM	65
Slika 4.13. <i>E. arborea</i> – poprečni presek i detalji preseka lista	65
Slika 4.14. <i>E. arborea</i> – nežlezdane i žlezdane višćelijske biserijalne dlake	65
Slika 4.15. Površina stabla <i>E. arborea</i>	66
Slika 4.16. <i>E. arborea</i> – primarna građa stabla SEM	66
Slika 4.17. <i>E. arborea</i> – poprečni presek stabla	66
Slika 4.18. <i>E. carnea</i> – poprečni presek lista	66
Slika 4.19. <i>E. carnea</i> – detalj lista	66
Slika 4.20. Površina lista <i>E. carnea</i> – SEM	67
Slika 4.21. <i>E. carnea</i> – presek primarne građe	67
Slika 4.22. Površina stabla <i>E. carnea</i> – SEM	67
Slika 4.23. <i>E. carnea</i> – poprečni presek stabla sekundarne građe	67
Slika 4.24. Sadržaj grupa sekundarnih metabolita u ispitivanim suvim etanolnim ekstraktima	79
Slika 4.25. Odnos FRAP vrednosti ispitivanih vrsta porodice Ericaceae	80
Slika 4.26. Odnos inhibicija lipidne peroksidacije	82
Slika 4.27. Odnos inhibicija obezbojavanja β-karotena	82
Slika 4.28. Predloženi mehanizam reakcije DPPH \cdot i BHT	85
Slika 4.29. Miorelaksantni uticaj ekstrakata A1E i A2E na spontane kontrakcije	91
Slika 4.30. Uticaj A1E (a) i A2E (b) na acetilholinom indukovane kontrakcije	91
Slika 4.31. Uticaj A1E i A2E (a) i verapamila (b) na kontrakcije indukovane jonima kalijuma	92
Slika 4.32. Uticaj A1E (a), A2E (b) i verapamila (c) na kontrakcije indukovane jonima kalcijuma	93

<i>Slika 4.33. Miorelaksantni uticaj ekstrakta EE na spontane kontrakcije.....</i>	94
<i>Slika 4.34. Uticaj EE na acetilholinom indukovane kontrakcije.....</i>	95
<i>Slika 4.35. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na EC.....</i>	100
<i>Slika 4.36. Uticaj ispitivanih gelova na EC.....</i>	101
<i>Slika 4.37. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na EI.....</i>	102
<i>Slika 4.38. Uticaj ispitivanih gelova na EI.....</i>	103
<i>Slika 4.39. Uticaj iritacije i ispitivanih gelova nakon iritacije na pH vrednost kože.....</i>	104
<i>Slika 4.40. Uticaj ispitivanih gelova na pH.....</i>	104
<i>Slika II 1. Podela roda Ilex na 4 grupe na osnovu prisustva sekundarnih metabolita.....</i>	122
<i>Slika III 1. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Arbutus unedo iz Crne Gore.....</i>	126
<i>Slika III 2. Izgled spektara izokvercicina, elagne kiseline i kvercitrina ekstrakta AIE.....</i>	126
<i>Slika III 3. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Bruckenthalia spiculifolia.....</i>	127
<i>Slika III 4. Izgled spektara izokvercicina, glikozida kvercetina i kvercitrina ekstrakta BE.....</i>	127
<i>Slika III 5. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Erica arborea.....</i>	128
<i>Slika III 6. Izgled spektara hlorogenske kiseline, glikozida kvercetina i kvercitrina ekstrakta EE.....</i>	128
<i>Slika III 7. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Erica carnea.....</i>	129
<i>Slika III 8. Izgled spektara fenolne kiseline, hlorogenske kiseline i izokvercicina ekstrakta.....</i>	129
<i>Slika III 9. HPLC hromatogram ekstrakta vrste Calluna vulgaris.....</i>	130
<i>Slika III 10. Izgled spektara hlorogenske kiseline, izokvercicina i kvercetina ekstrakta VE.....</i>	130
<i>Slika III 11. HPLC hromatogram sa pikom arbutina a) Arbutus unedo CG b) Arbutus unedo G.....</i>	131

Lista tabela

Tabela 1.1. Vrste roda <i>Arbutus</i>	8
Tabela 1.2. Vrste roda <i>Bruckenthalia</i>	8
Tabela 1.3. Vrste roda <i>Calluna</i>	8
Tabela 1.4. Vrste roda <i>Erica</i>	8
Tabela 3.1. Reagensi i proizvodi njihove reakcije sa taninima	29
Tabela 3.2. Gradijent elucije pri HPLC analizi fenolnih jedinjenja	30
Tabela 3.3. Priprema uzoraka za izradu kalibracione krive	34
Tabela 3.4. Najvažniji reaktivni oblici kiseonika (ROS)	36
Tabela 3.5. Mehanizmi antioksidativnog dejstva	38
Tabela 4.1. Rezultati opštih hemijskih ispitivanja	68
Tabela 4.2. Prinos etanolnih ekstrakata i skraćenice za dobijene ekstrakte	69
Tabela 4.3. Prinos ekstrakata dobijenih perkolacijom i višestrukom ekstrakcijom biljnog materijala vrste <i>Bruckenthalia spiculifolia</i> sa Vlasinskog jezera i skraćenice za dobijene ekstrakte	70
Tabela 4.4. Rezultati uporedne TLC analize flavonoidnih jedinjenja ispitivanih vrsta	72
Tabela 4.5. Rezultati HPLC analize ekstrakata	73
Tabela 4.6. Rezultati spektrofotometrijskog određivanja ukupnih hidrohinskih derivata	75
Tabela 4.7. Rezultati HPLC određivanja arbutina	76
Tabela 4.8. Sadržaj ukupnih flavonoida u biljnom materijalu i u etanolnim ekstraktima	77
Tabela 4.9. Sadržaj polifenola, netaninskih materija i tanina u biljnom materijalu	77
Tabela 4.10. Sadržaj polifenola, netaninskih materija i tanina u etanolnim ekstraktima	78
Tabela 4.11. Sadržaj fenilpropanoidnih derivata u etanolnim ekstraktima	78
Tabela 4.12. Rezultati određivanja ukupnog antioksidativnog potencijala FRAP metodom	80
Tabela 4.13. Rezultati određivanja inhibicije intenziteta lipidne peroksidacije	81
Tabela 4.14. Rezultati određivanja inhibicije obezbojavanja β -karotena	82
Tabela 4.15. Rezultati određivanja inhibicije obezbojavanja β -karotena za ekstrakte vrste <i>B. spiculifolia</i> sa Vlasinskog jezera	83
Tabela 4.16. Redosled aktivnosti etanolnih ekstrakata dobijen poređenjem IC50 koncentracija	84
Tabela 4.17. IC50 vrednosti u DPPH testu za ekstrakte vrste <i>B. spiculifolia</i> sa Vlasinskog jezera	84
Tabela 4.18. Rezultati antimikrobnog testa	88
Tabela 4.19. Antimikrobna aktivnost različitih koncentracija etanolnih ekstrakata	89
Tabela 4.20. Rezultati ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti	96
Tabela II 1: Prisustvo arbutina u vrstama roda <i>Origanum</i>	123

Biografija autora

Dragana Pavlović (devojačko prezime Jovičić) rođena je 19. marta 1978. godine u Nišu. Osnovnu školu i gimnaziju završila je u Nišu. Farmaceutski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 1997/98. godine a diplomirala je juna 2003. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,39.

Poslediplomske studije upisala je školske 2003/04. godine, a školske 2007/08. godine i doktorske akademske studije iz farmakognozije na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od decembra 2004. godine zaposlena je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu, u okviru Integrisanih akademskih studija Farmacije, uža naučna oblast Farmakognozija, na mestu asistenta-pripravnika, a od 2008. godine na mestu asistenta.

Od 2003. godine učestvuje na projektima Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

Autor je više naučnih i stručnih radova.

Jula 2004. godine je položila sručni državni ispit za farmaceute. Član je Farmaceutskog društva Nišavsko-pirotskog okruga, a od maja 2010. godine i član Odbora za kontinuirane edukacije farmaceuta u okviru ovog društva.

Govori engleski, a služi se francuskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Dragana Pavlović

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta
rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae)**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11.09.2012.

Dragana Pavlović

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Dragana Pavlović

Број уписа _____

Студијски програм FARMACIJA - FARMAKOLOGIZIJA

Наслов рада **Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih
biljnih vrsta rodova *Arbutus L.*, *Bruckenthalia Rchb.*, *Calluna Salisb.* i *Erica L.*
(Ericaceae)**

Ментор dr Nada Kovačević, redovni profesor

Потписани DIPLOM. RH. DRAGANA PAVLOVIĆ

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11. 09. 2012.

Dragana Pavlović

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih biljnih vrsta rodova *Arbutus* L., *Bruckenthalia* Rchb., *Calluna* Salisb. i *Erica* L. (Ericaceae)

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.09.2012.

Јелена Табољин