

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Branislav J. Nastasijević

**BIOLOŠKI EFEKTI EKSTRAKATA
KORENA LINCURE (*Gentiana lutea*)-
INHIBICIJA ENZIMA, ANTIOKSIDATIVNA
I ANTIMIKROBNA AKTIVNOST**

doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Branislav J. Nastasijević

**BIOLOGICAL EFFECTS OF GENTIAN
ROOT EXTRACTS (*Gentiana lutea*)-
ENZYME INHIBITION, ANTIOXIDATIVE
AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

Mentori:

dr Suzana Dimitrijević Branković, vanredni profesor Tehnološko metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Suzana Dimitrijević Branković, vanredni profesor Tehnološko metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Vasić, naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Univerzitet u Beogradu

dr Dušan Antonović, redovni profesor Tehnološko metalurškog fakulteta, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane doktorske teze:

Zahvalnica

Najveći deo eksperimenata koji čine ovaj doktorat urađen je u Laboratoriji za fizičku hemiju 050, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, a mentori su bili: Suzana Dimitrijević Branković, vanredni profesor Tehnološko metalurškog fakulteta i Vesna Vasić, naučni savetnik Instituta Vinča.

Ovom prilikom želim da se zahvalim svima koji su doprineli da se ova doktorska disertacija realizuje.

Suzani Dimitrijević-Branković se zahvaljujem na ukazanom poverenju i prihvatanju mentorstva, na korisnim savetima i sugestijama i pomoći prilikom eksperimentalne izrade ove teze.

Vesni Vasić dugujem posebnu zahvalnost jer mi je omogućila da se bavim zanimljivom tematikom, na podršci, korisnim savetima i sugestijama i stručnoj korekciji naučnih radova iz kojih je doktorat proistekao.

Dušanu Antoniću, redovnom profesoru Tehnološko metalurškog fakulteta se zahvaljujem jer je prihvatio da bude član komisije za ocenu i odbranu ove disertacije.

Vojislavu Staniću, kolegi iz Laboratorije za zaštitu od zračenja, izražavam posebnu zahvalnost zbog preporuke, na osnovu koje sam dobio mogućnost da se zaposlim u Institutu Vinča.

Naučnim saradnicima iz Laboratorije za fizičku hemiju 050, Instituta za nuklearne nauke Vinča, dr Andreji Leskovac i dr Sandri Petrović zahvaljujem se na eksperimentalnoj pomoći i interpretaciji rezultata prilikom ispitivanja radiobioloških efekata ekstrakata korena lincure.

U različitim eksperimentalnim fazama izrade ove teze, svoj doprinos su dali: Maja Milošević, Tamara Lazarević-Pašti, Gordana Joksić, Tina Kamčeva, Bojana Damjanović i Milica Budimir iz Laboratorija 090, 050 i 030, Instituta za nuklearne nauke Vinča, na čemu im se najiskrenije zahvaljujem.

Zahvaljujem se i Goranu Janjiću iz Instituta za hemiju tehnologiju i metalurgiju, zatim Igoru Paštiju, sa Fakulteta za fizičku hemiju kao i Marijani Stojanović iz Instituta

Torlak jer su takođe učestvovali u realizaciji ove teze. Jeleni Lević, naučnom savetniku iz Instituta za kukuruz zahvaljujem se na ustupljenim izolatima fitopatogena, kao i Dragani Franelić, iz fabrike alkohola A.D. Vrenje na izuzetnoj saradnji.

Ostalim kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju 050, Instituta Vinča zahvaljujem se na saradnji a posebno Jasmini Savić, Mariji Nišavić i Milovanu Stoilkoviću.

Prijateljima se zahvaljujem na podršci i razumevanju!

Najveću zahvalnost dugujem roditeljima na strpljenju i bezrezervnoj podršci!

Lista skraćenica

AChE- acetilholinesteraza

AFM- mikroskopija atomskih sila

CBPI- citokinezis blok proliferativni indeks

CV- ciklična voltometrija

DPPH- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB -5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoeva kiselina)

E-NTPDaza- ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaza

HPLC– visoko efikasna tečna hromatografija (tečna hromatografija pod visokim pritiskom- high performance/pressure liquid chromatography, *eng.*)

HPLC/MS-ESI- visoko efikasna tečna hromatografija spregnuta sa masenim spektrometrom sa elektrosprej jonizacijom

IP- indeks proliferacije

MALDI-TOF– laserom indukovana desorpcija i jonizacija molekula potpomognuta matriksom sa vremenom preleta molekula

MIC- minimalna inhibitorna koncentracija

MN-mikronukleusi

MPO- mijeloperoksidaza

MRM mod- multiple reaction monitoring mode- mod u masenoj spektrometriji kojim se prati formiranje fragmentisanih (ćerki) jona nastalih od jednog ili više prekursor (roditeljskih) jona.

PDA- (photo diode array) niz fotodioda

SPM- sinapatičke plazma membrane

TRC- taste receptors cells – ćelije receptora ukusa

TQD- tripl kvadrupolni detektor (tandem maseni spektrometar)- MS i MS/MS mod

UPLC- (ultra performance liquid chromatography)- ultra efikasna tečna hromatografija

WHO- World Health Organization- svetska zdravstvena organizacija

ZKE-zasićena kalomelova elektroda

Biološki efekti ekstrakata korena lincure (*Gentiana lutea*)-inhibicija enzima, antioksidativna i antimikrobna aktivnost

IZVOD

Predmet istraživanja doktorske disertacije je bio usmeren na ispitivanje bioloških efekata ekstrakata korena lincure i određivanje njihovog kvalitativnog i kvantitativnog sastava. Ispitivan je uticaj ekstrakata i konstituenata lincure (*G. lutea*) na aktivnost enzima mijeloperoksidaze (MPO), acetilholinesteraze (AChE) i ekto-ATPaze (E-NTPDaze) sa membrane sinaptozoma. Takođe, određivana je antioksidativna, antimikrobna, radioprotektivna i antiproliferativna aktivnost ekstrakata lincure i njenih konstituenata. Najzad, ispitan je i uticaj pojedinih konstituenata lincure na proces apoptoze humanih leukocita.

Za proučavanje navedenih bioloških efekata pripremljeni su vodeni, kiseli (4% sirćetna kiselina, v/v) i etanolno vodeni (25, 50, 75 i 96% etanola u vodi, v/v) ekstrakti. Genciopikrozid, loganska kiselina, sverozid, svertiamarin, izoviteksin, amarogentin i izogentizin su izabrani kao konstituenti lincure čija je biološka aktivnost ispitivana. Kvalitativni sastav ekstrakata određivan je primenom tečno-masene hromatografije: HPLC-MS/ESI-TOF, MALDI-TOF i UPLC-PDA. Kvantitativna analiza ekstrakata kojom su određivane koncentracije navedenih konstituenata izvršena je pomoću UPLC-TQD-MS/MS. Kvantitativnom analizom je utvrđeno da su genciopikrozid i loganska kiselina najzastupljenija jedinjenja u svim ekstraktima (0,9 do 2,5% genciopikrozid i 0,3 do 0,9% loganska kiselina), izogentizin je prisutan samo u etanolno vodenim ekstraktima (50- 96% EtOH, v/v) a amarogentin i izoviteksin su prisutni u tragovima. Kao najpotentniji inhibitori enzima MPO, AChE i E-NTPDaze su se pokazali etanolno vodeni ekstrakti. Pri koncentraciji od 100 µg/mL, 50% i 75% EtOH ekstrakti inhibiraju 100% aktivnosti MPO, a u grupi ispitivanih konstituenata najjači inhibitor je genciopikrozid sa $IC_{50}=0,8\pm 0,1$ µg/mL (2,25 µM). Najviši stepen inhibicije AChE (54%) postignut je sa 75% EtOH ekstraktom, pri koncentraciji od 50 µg/mL a od konstituenata sa loganskom kiselinom (39%) pri $C= 6,77$ µM. Sposobnost inhibicije E-NTPDaze su pokazali svi ispitivani ekstrakti u opsegu od 45 do 53% (vodeni i 50% EtOH) pri koncentraciji od 200 µg/mL. U *in vitro* ispitivanju genciopikrozid, amarogentin i izoviteksin su smanjili aktivnost enzima za oko 30%, pri koncentraciji od

20 µg/mL. Matematičkom analizom eksperimentalno dobijenih vrednosti, pod pretpostavkom da u slučaju inhibicije E-NTPDaze prisutnih na membrani sinaptozoma važi zakon o dejstvu masa, pri čemu dva enzima kompetiraju za isti supstrat, izračunate su IC₅₀ vrednosti. Najniža IC₅₀ vrednost je izračunata za amarogentin (9,89 x10⁻⁶ M). Pored eksperimentalno dobijenih podataka izračunate su i energije vezivanja kojima se inhibitor (konstituenti lincure) vezuje za enzim E-NTPDazu pomoću *docking* studije. Rezultati *docking* studije su pokazali da dimer izogentizina ima najveći afinitet prema E-NTPDazi2 jer je njegova energija vezivanja -10 kcal/mol, nasuprot energiji vezivanja ATPa (-9,3 kcal/mol). *Doking* studijom je takođe potvrđeno da su i amarogentin i izoviteksin potencijalni inhibitori E-NTPDaze sa energijama vezivanja sličnim ATPu (oba po -9,4 kcal/mol).

Antioksidativna aktivnost ekstrakata je ispitivana pomoću inhibicije DPPH radikala i cikličnom voltametrijom (CV). Takođe u svim ekstraktima određen je ukupni sadržaj polifenola. Rezultati analize antioksidativne aktivnosti su pokazali da ekstrakti lincure poseduju umerenu antioksidativnu aktivnost, a među ekstraktima 50% EtOH u najvećoj meri inhibira DPPH radikal sa IC₅₀=20,6±0,4 µg/ml. Određivanjem antioksidativne aktivnosti ekstrakata pomoću ciklične voltetrije potvrđeno je da 50% EtOH ekstrakt ima najvišu antioksidativnu aktivnost na osnovu pojave anodnog pika sa najvećom površinom (količinom naelektrisanja). Najveća količina polifenolnih jedinjenja utvrđena je kod 50% EtOH i vodenog ekstrakta (96,1 i 99,6 mg/g ekstrakta).

Radioprotektivna aktivnost ekstrakata lincure je ispitivana u kulturi humanih limfocita pre i nakon izlaganja jonizujućem zračenju. Ispitivanjem radioprotektivne aktivnosti ekstrakata otkriveno je da kiseli ekstrakt pokazuje najbolja radioprotektivna svojstva, jer u najvećoj meri smanjuje učestalost mikronukleusa (za 44,57%) u kulturi humanih limfocita izloženih jonizujućem zračenju. U neozračenim limfocitima 50% EtOH ekstrakt u najvećoj meri (preko 100%) povećava učestalost MN, što ukazuje na njegove genotoksične efekte. U grupi ispitivanih konstituenata lincure amarogentin možemo izdvojiti kao najpodesniji radioprotektor, jer značajno smanjuje učestalost MN kod ozračenih uzoraka, za 74,38% ali i kod neozračenih uzoraka, za oko 50%.

Najjaču antiproliferativnu aktivnost u grupi ispitivanih konstituenata lincure ispoljava genciopikrozid (43,2% smanjenja indeksa proliferacije u odnosu na kontrolu,

pri C=1 µg/mL) što ukazuje na njegovo citotoksično delovanje. U grupi ispitivanih ekstrakata 50 % EtOH, pokazuje najjaču antiproliferativnu aktivnost u ozračenim uzorcima (13,3 % smanjenja u odnosu na kontrolu pri C= 0,4 mg/mL).

Etanolno-vodeni ekstrakti pokazuju najbolju antifungalnu aktivnost. U koncentraciji od 0,5 mg/mL, 50% i 96% EtOH ekstrakti inhibiraju rast *F. proliferatum* za 48 odnosno 56%. Pri navedenim uslovima 50% EtOH ekstrakt inhibira rast *F. verticillioides* za 54%. Najjače antifungalno delovanje postignuto je 50% EtOH ekstraktom, prema *A. niger* čiji je rast inhibiran za 71%.

Dobijeni rezultati pokazuju da je tradicionalni način primene lincure u tretmanu digestivnih poremećaja samo jedan u nizu bioloških efekata koje ekstrakti ove biljke ispoljavaju. U ovoj studiji je pokazano da ekstrakti korena lincure ispoljavaju i druge biološke efekte od kojih su najvažniji antiinflamatorni, antiproliferativni i antifungalni efekti.

ključne reči: *AChE, amarogentin, Aspergillus, E-NTPDaza, Fusarium, G. lutea, genciopikrozid, MPO, izogentizin, 50% EtOH.*

Naučna oblast: Tehničko-tehnološke nauke

Uža naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija

UDK broj: 582.936:577.15

Biological effects of Gentian root extracts (*Gentiana lutea*)- enzyme inhibition, antioxidative and antimicrobial activity

ABSTRACT

The objective of the study of this doctoral thesis was focused toward investigation of the biological effects of *G. lutea* extracts and determination of their qualitative and quantitative composition. The activity of enzymes, myeloperoxidase (MPO), acetylcholinesterase (AChE) and synaptosomal membrane ecto-ATPase (E-NTPDase) were investigated. Also, antioxidative, antimicrobial, radioprotective and antiproliferative activity of Gentian extracts and their constituents were determined. Finally, the influence of the individual *G. lutea* constituents on apoptosis of human leukocytes was examined.

For the study of the mentioned biological effects water, acidic (4 % acetic acid, v/v) and ethanol-water extracts (25, 50, 75 and 96% ethanol in water, v/v) were prepared. Gentiopicroside, loganic acid, sweroside, swertiamarin, isovitexin, amarogentin and isogentisine were selected as *G. lutea* constituents whose biological activity was investigated. The qualitative composition of the extracts was determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry: HPLC-MS/ESI-TOF, MALDI-TOF and UPLC-PDA. Quantitative analysis of the extracts, which was used for the determination of the constituent's concentration, was performed using UPLC-TQD-MS/MS. Quantitative analysis showed that the gentiopicroside and loganic acid are the most abundant compounds in all examined extracts (0.9 to 2.5% and 0.3-0.9% of gentiopicroside and loganic acid, respectively), while isogentisin is only present in the ethanol water extracts (50-96%, v/v) and amarogentin and isovitexin are present only in traces. The ethanol water extracts proved to be the most potent inhibitors of MPO, AChE and E-NTPDase enzymes.

At a concentration of 100 µg/ml, 50% and 75% EtOH extracts inhibited 100% of MPO activity, and in the group of examined constituents the strongest inhibition was achieved with gentiopicroside with an $IC_{50} = 0.8 \pm 0.1$ µg/mL (2.25 µM). The highest degree of inhibition of AChE (54%) was obtained with 75% EtOH extract at a concentration of 50 µg/mL while in the group of constituents the highest degree of

inhibition was with loganic acid (39%) at $C = 6.77 \mu\text{M}$. All examined extracts displayed the ability of E-NTPDase inhibition in the range from 45 to 53% (water and 50% EtOH extracts) at a concentration of $200 \mu\text{g/mL}$. Gentiopicroside, amarogentin and isovitexin decreased enzyme activity for approximately 30%, at the concentration of $20 \mu\text{g/mL}$ in *in vitro* testing. A mathematical analysis of experimentally obtained values, assuming that in all of the cases of synaptosomal E-NTPDase inhibition the law of mass action could be applied, where at least two enzymes compete for the same substrate, the IC_{50} values were calculated. The lowest IC_{50} value was calculated for amarogentin ($9.89 \times 10^{-6} \text{ M}$). In addition of experimentally obtained data, the binding energies of inhibitors (*G. lutea* constituents) by which they bind to the E-NTPDase are calculated using molecular docking study. Results of the docking studies have shown that isogentisin dimer has the highest affinity for the E-NTPDase2, with binding energy -10 kcal/mol , in contrast to the binding energy of ATP ($-9,3 \text{ kcal/mol}$). Docking study also revealed that both amarogentin and isovitexin are potential inhibitors of E-NTPDase with a similar binding energies as ATP (both has $-9,4 \text{ kcal/mol}$).

The antioxidative activity of the extracts was investigated using DPPH radical inhibition assay and with Cyclic Voltammetry (CV). Also, in all of the examined extracts, the total content of polyphenols was determined. Results obtained revealed that *G. lutea* extracts possess moderate antioxidative activity and among extracts, the 50% EtOH extract inhibited DPPH radical at the highest level, with an $\text{IC}_{50} = 20.6 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$. Determining of the antioxidative activity of the extracts using CV confirmed that 50% EtOH extract has the highest antioxidative activity due to the appearance of the anodic peak with the largest area (amount of charge). The greatest amount of the polyphenols was found in 50% EtOH and water extracts (96.1 and 99.6 mg/g of extracts).

The radioprotective activity of *G. lutea* extracts was studied in cultured human lymphocytes before and after exposure to ionizing radiation. Investigation of the radioprotective activity of extracts revealed that acidic extract exerts the best radioprotection, since it reduced the incidence of micronuclei (MN) in irradiated human lymphocytes in the highest extent among the extracts (for 44,57%). In the non-irradiated lymphocytes the 50% EtOH extracts predominantly (over 100%) increased the incidence of MN, which points to their genotoxic effects. In the group of examined

constituents, amarogentin could be singled out as the most suitable radioprotector, since it significantly decreased the MN frequency in the irradiated samples (74.38 %) as well as in the non-irradiated samples for approximately 50%. In the group of the tested *G. lutea* constituents the gentiopicroside exerted the strongest anti-proliferative activity by decreasing the index of proliferation by 43.2% (in comparison from control, at C=1 µg/mL) which suggests its cytotoxic activity. In the group of investigated extracts, the 50% EtOH showed the strongest antiproliferative activity in irradiated samples (13.3% decrease in comparison to control, at C=0.4 mg/mL).

The ethanol water extracts showed the best antifungal activity. At a concentration of 0.5 mg/mL, the 50% and 96% EtOH extract inhibited the growth of *F. proliferatum* for the 48 and 56%. At mentioned conditions, the 50% EtOH extract inhibited the growth of *F. verticillioides* for 54%. Most powerful antifungal properties were achieved by 50% EtOH extract against *A. niger* whose growth was inhibited by 71%.

The results obtained suggest that traditional way of Gentian usage for the treatment of the digestive disorders is the one of the many biological effects that extracts of this herb show. In this study it was shown that extracts of Gentian root also display some other biological effects such as anti-inflammatory, anti-proliferative and antifungal effects.

Key words: AChE, amarogentin, Aspergillus, E-NTPDase, Fusarium, G. lutea, gentiopicroside, MPO, isogentisine, 50% EtOH.

Scientific area: Technical and Technological Sciences

Specified scientific area: Chemistry and Chemical Technology

UDC number: 582.936:577.15

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	PREGLED LITERATURE	4
	2.1. Familija <i>Gentianaceae</i>	4
	2.2. Farmakološka svojstva korena lincure	6
	2.3. Kvalitativni sastav korena lincure	8
	2.4. Biološki efekti konstituenata korena lincure	13
	2.4.1. Iridoidi i sekoiridoidi.....	13
	2.4.2. Ksantoni.....	16
	2.4.3. C-glukozilflavoni.....	17
	2.4.4. Biosvojivost i metabolizam konstituenata lincure.....	18
	2.5. Enzimi i prirodna jedinjenja kao njihovi inhibitori i predviđanje molekulskih interakcija	21
	2.5.1. Predviđanje mesta vezivanja liganada za ciljne molekule- <i>docking</i> studija.....	22
	2.5.2. Ekstrakti i konstituenti <i>G. lutea</i> kao inhibitori enzima.....	23
	2.5.3. Mijeloperoksidaza (MPO).....	24
	2.5.4. Acetilholinesteraza (AChE).....	27
	2.5.5. Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze).....	31
	2.6. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata	34
	2.7. Radioprotektivna i antiproliferativna aktivnost	38
	2.8. Antimikrobna aktivnost korena lincure	42
3.	MATERIJAL I METODE	46
	3.1. Oprema	46
	3.2. Hemikalije	46
	3.2.1. Enzimi.....	47
	3.2.2. Mikronukleusni (MN) test, indeks proliferacije i apoptoza.....	47
	3.2.3. Mikroorganizmi za određivanje antifungalnog dejstva.....	48
	3.3. Priprema ekstrakata	48
	3.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata korena lincure	49

3.4.1. UPLC-TQD analiza ekstrakata.....	49
3.4.2. LC/MS-TOF i MALDI-TOF analiza ekstrakata.....	50
3.5. Inhibicija enzima.....	51
3.5.1. Inhibicija mijeloperoksidaze (MPO).....	51
3.5.2. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE).....	52
3.5.3. Inhibicija Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze) izolovanih iz sinaptičkih plazma membrana (SPM).....	53
3.5.3.1. Određivanje koncentracije proteina.....	54
3.5.4. Predviđanje mesta vezivanja konstituenata lincure za E-NTPDazu- <i>docking</i> studija.....	55
3.6. Antioksidativna i antimikrobna aktivnost i određivanje ukupnih polifenola.....	55
3.6.1. DPPH inhibicija i određivanje ukupnih polifenola.....	55
3.6.2. Ciklična voltametrij.....	56
3.6.3. Antimikrobna aktivnost.....	57
3.7. Mikronukleusni test, analiza proliferativnog potencijala ćelija, apoptoza i protočna citometrija.....	57
3.7.1. Analiza mikronukleusa.....	58
3.7.2. Analiza proliferativnog potencijala ćelija (Citokinezis-blok proliferativnog indeksa).....	58
3.7.3. Priprema ćelija za apoptozu.....	59
3.7.4. Priprema ćelija za protočnu citometriju i mikroskopiju atomskih sila (AFM).....	59
3.7.5. Statistička analiza.....	60
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	61
4.1. Kvalitativna analiza ekstrakata korena <i>G. lutea</i> i prinos ekstrakcije.....	61
4.1.1. Analiza ekstrakata korena lincure MALDI-TOF masenom spektrometrijom.....	61
4.1.2. Kvalitativna analiza ekstrakata korena lincure HPLC hromatografijom sa PDA i MS/ESI-TOF detekcijom.....	66

4.1.3. Analiza ekstrakta lincure UPLC hromatografijom sa PDA i TQD detekcijom	69
4.2. Kvantitativna analiza sekoiridoida, ksantona i glukozilflavona u ekstraktu korena <i>G. lutea</i>.....	73
4.3. Inhibicija enzima ekstraktima <i>G. lutea</i> i njenim konstituentima.....	81
4.3.1. Inhibicija mijeloperoksidaze (MPO).....	82
4.3.2. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE).....	86
4.3.3. Inhibicija Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze).....	92
4.3.3.1. Predviđanje mesta vezivanja konstituenata lincure za E- NTPDazu- <i>docking</i> studija.....	99
4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakta lincure.....	106
4.3.1. Inhibicija DPPH radikala i sadržaj ukupnih polifenola.....	106
4.3.2. Ciklična voltometrija (CV) ekstrakata lincure i antioksidativni kapacitet.....	108
4.5. Radioprotektivni efekti ekstrakata i konstituenata lincure.....	112
4.5.1. Uticaj ekstrakata i konstituenata lincure na učestalost mikronukleusa i indeks proliferacije ćelija.....	112
4.5.2. Uticaj konstituenata lincure na apoptozu leukocita.....	122
4.5.3. Analiza ozračenih i neozračenih leukocita mikroskopijom atomske sile (AFM).....	124
4.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i konstituenata lincure.....	130
5. ZAKLJUČCI.....	136
6. LITERATURA.....	139
7. PRILOZI.....	159
Biografija.....	171
Izjava o autorstvu.....	173
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije rada.....	174
Izjava o korišćenju.....	175

1. UVOD

Upotreba lekovitih biljaka je verovatno najstarija metoda koju je čovečanstvo koristilo u pokušaju da se izbori sa bolestima. Širom sveta lekovite biljke su postale deo različitih tradicionalnih medicinskih sistema, počevši od Ajurvede preko tradicionalne kineske, tibetanske, amazonske i afričke narodne medicine. Tradicionalna medicina prisutna u Evropi potiče iz Grčke i starog Rima. Fitopreparati su standardizovani biljni preparati, koji predstavljaju kompleksne smeše jedne ili više biljaka, sadrže različite delove biljke ili biljnog materijala u sirovom ili prerađenom stanju (WHO, 2007; Bandaranayake, 2006; Calixto, 2000).

Upotrebljavaju se u obliku tečnosti (tinktura), u čvrstom stanju (sprašena biljka, obično jedan njen deo) i kao viskozni preparati (sirupi na bazi biljnih ekstrakta) (WHO, 2007; Calixto, 2000). Biljna medicina, rasprostranjena u Evropi, koristi se u šest osnovnih terapijskih kategorija, za tretman kardiovaskularnih, respiratornih i problema sa varenjem, zatim za izradu tonika, za hipnozu, sedaciju i za topikalnu upotrebu.

Iako se biljni preparati smatraju veoma sigurnim i praktično bez sporednih efekata, s obzirom da sadrže na stotine konstituenata od kojih su neki i toksični, poput pirolizidinskih alkaloida, zatim digitalisa i efedrina, konstantno ispitivanje njihove biološke aktivnosti je od izuzetne važnosti. Odsek za tradicionalnu medicinu svetske zdravstvene organizacije (WHO, 2007) preporučuje da se kao dokaz efikasnosti biljnih preparata uzima u obzir stotinama godina sticano iskustvo u korišćenju biljaka. Međutim, zvanična medicina dozvoljava upotrebu biljnih preparata tek nakon ispitivanja njihove efikasnosti i toksičnosti uobičajenim testovima kojima se testiraju novi lekovi (Calixto, 2000; Rates, 2011; Gilbert i sar., 1997).

Sa druge strane, ispitivanja potencijalno korisnih ali i toksičnih efekata biljnih ekstrakata su značajna jer se smatra da 25% prepisanih lekova (na svetskom nivou) potiče od biljaka, odnosno 121 aktivna komponenta je u upotrebi. Na osnovu podataka svetske zdravstvene organizacije (WHO) oko 252 leka smatra se osnovnim, od tog broja 11% su biljnog porekla. Takođe, značajan broj lekova je dobijen modifikacijom prirodnih prekursora, izolovanih iz biljaka (Rates, 2011; Gilbert i sar., 1997). Kada je reč o antitumorskim ili antimikrobnim lekovima smatra se da je i do 60% prirodnog

porekla, onih koji su već u upotrebi i ostalih koji se nalaze u fazi kliničkih ispitivanja (Rates, 2011; Shu i sar., 1997). Digoksin iz biljke *Digitalis spp.*, kinin i kinidin iz biljke *Cinchona spp.*, atropin iz biljke *Atropa belladonna*, zatim morfin i kodein iz *Papaver somniferum*, predstavljaju mnogima poznate lekove, izolovane iz biljaka. Smatra se da put od biljke do ciljnog terapijskog materijala, zahteva najmanje deset godina rada, sa otprilike jednim farmakološki aktivnim jedinjenjem na oko 10000 testiranih (Rates, 2011).

Međutim poslednjih nekoliko godina, sve češće se koristi i virtuelni odabir farmakološki aktivnih jedinjenja, baziran na dizajniranju lekova na osnovu strukture liganda i strukture vezivnog mesta liganda (uglavnom proteina). Smatra se da bi na ovaj način mogla da se postigne veća efikasnost pri odabiru lekova, koji bi se dalje koristili u kliničkim ispitivanjima, što bi ubrzalo pronalaženje novih lekova (Van de Waterbeemd i Gifford, 2003).

Gentiana lutea (*G. lutea*) ili žuta lincura, deo je naše i evropske tradicionalne medicine i njena upotreba je opisana u većini svetskih farmakopeja. Takođe, gorak ukus nekih alkoholnih pića potiče od ekstrakata lincure, zahvaljujući gorkim jedinjenjima genciopikrozidu, amarogentinu i svertiamarinu, karakterističnim za ovu biljku. U narodnoj medicini se koristi za poboljšanje apetita i stimulaciju varenja. Ekstrakti ove biljke se upotrebljavaju pored prehrambene i u farmaceutskoj industriji.

Cilj ovog rada bio je usmeren na ispitivanje bioloških efekata lincure koji do sada nisu ispitivani, a mogli bi da doprinesu jasnijem sagledavanju fizioloških efekata koje indukuju preparati na bazi lincure kao i pojedini njeni konstituenti.

Kao potencijalni inhibitori fiziološki važnih enzima mijeloperoksidaze, acetilholinesteraze i ekto-ATPaze, ispitivani su sledeći konstituenti *G. lutea*: loganska kiselina, svertiamarin, genciopikrozid, sverozid, izoviteksin, amarogentin i izogentizin. Takođe, praćena je i antioksidativna aktivnost ekstrakata, pomoću inhibicije DPPH radikala i cikličnom voltametrijom. Ispitane su i radioprotektivna i antifungalna aktivnost ekstrakata i konstituenata lincure, kao i sposobnost inhibicije ćelijske proliferacije i indukcija apoptoze. Ekstrakti su pripremani na način kako se koriste i u narodnoj medicini, upotrebom vode i alkoholno vodenih smeša (25, 50, 75 i 96% etanol

u vodi, v/v) za ekstrakciju a njihov kvalitativan i kvantitativan sastav je ispitivan tečnom hromatografijom sa PDA, MS (TQD i Q-TOF) detektorima kao i MALDI-TOF masenom spektrometrijom.

2. PREGLED LITERATURE – OPŠTI DEO

2.1. Familija *Gentianaceae*

G. lutea kod nas poznata kao žuta lincura je vrsta koja pripada familiji *Gentianaceae*. Struwe i Albert sa grupom autora su 2002. godine izvršili sveobuhvatnu reviziju u klasifikaciji familije *Gentianaceae*, koja je tada brojala 87 rodova i preko 1600 vrsta (Struwe i sar., 2002). Pre i nakon ovog perioda dolazilo je do povremnih izmena, pri čemu su vrste uključivane i isključivane iz postojećih rodova da bi nakon skorašnje ponovne klasifikacije familija *Gentianaceae* obuhvatila 99 rodova i oko 1736 različitih vrsta (Struwe, 2014). Rod *Gentiana* je najbrojniji u familiji *Gentianaceae*, sa preko 400 vrsta. Dva roda koja su ranije pripadala rodu *Gentiana*, sada su odvojena u rodove *Gentianella* i *Gentianopsis* (Jensen i Schripsena, 2002; EFSA, 2005).

Različite vrste iz roda *Gentiana* su široko rasprostranjene u Evropi, Aziji i Severnoj Americi. Neke se mogu naći i u severozapadnoj Africi, istočnoj Australiji i na Novom Zelandu. *G. lutea* je karakteristična za region centralne i južne Evrope i raste u planinskim predelima na visinama u rasponu od 800 do 2500 m. (EFSA, 2005; WHO, 2001). Najčešće se nalazi na travnatim pašnjacima alpskih i subalpskih planina, a prostire se od Španije, Francuske i Italije preko balkanskog poluostrva do istočne Turske.

Zbog nekontrolisane eksploatacije u proteklom periodu, lincura je postala ugrožena vrsta i u većini evropskih zemalja njena upotreba je zakonski regulisana, kako bi se očuvala na svojim prirodnim staništima. S obzirom da je potražnja za korenom lincure u porastu, sve je popularnija i njena veštačka kultivacija (Radanović i sar., 2014). U flori Srbije prisutno je jedanaest vrsta i podvrsta iz roda *Gentiana* među kojima je i *G. lutea* L., višegodišnja biljka, koja je rasprostranjena u centralnoj Evropi i maloj Aziji (Menković i sar, 1997). U našim krajevima prisutna je samo podvrsta *G. lutea* (subspecia) *symphyandra* Murb. (Stevanović i sar, 2014). Podvrsta *lutea* nije nađena u Srbiji, a na Balkanskom poluostrvu može se naći samo u nekim delovima Makedonije i Grčke. Inače pomenuta podvrsta *lutea* je najzastupljenija na Alpima, Pirinejima, Apeninskom poluostrvu i Tatrama (Stevanović i sar, 2014).

U našim krajevima *G. lutea* je prisutna na sledećim planinama: Maljen, Divčibare, Suvobor, Zlatibor, Suva planina, Golija, Prokletije i Tara (Menković i sar., 1997). Pored navedenih u istočnim krajevima Srbije, na Staroj Planini može se naći i *G. punctata* L. (Stevanović i sar, 2014).

G. lutea raste do visine od 1 do 2 m, sa širokim listovima, elipsoidnog oblika, dužine od 10 do 30 cm, širine od 4 do 12 cm (slika 2.1). Najveći broj listova se nalazi na bazalnoj rozeti i raspoređeni su jedan naspram drugog, što *G. lutea* razlikuje od veoma toksične *Veratrum album* (EFSA, 2005). Cvetovi su žuti, sa oko 5 do 7 uskih latica, a glavni koren može biti duži od jednog metra a težine i do sedam kilograma u svežem stanju (slika 2.2) (EMA, 2009).



Slika 2.1. Plantažno gajena *G. lutea* na planini Tara, levo (autor T. Marković, Institutut za lekovito bilje „dr Josif Pančić”, Beograd); u prirodnom staništu (desno).



Slika 2.2. Cvet i osušen koren *G. lutea* (<http://www.fleurs-des-montagnes.net>; <http://chamomilla.rs/product/lincura-gentianae-radix/>)

2.2. Farmakološka svojstva korena lincure

Smatra se da je lekovita svojstva lincure prvi otkrio ilirski kralj Gentius (180-167 pre nove ere) koji je ovom biljkom lečio vojnike i po kome je ona i dobila ime. U srednjem veku *G. lutea* je korišćena kao antidot za određene otrove. Sve vrste koje pripadaju rodu *Gentiana* imaju izrazito gorak ukus a jedinjenja izolovana iz korena *G. lutea* koriste se kao standard pri merenju indeksa gorčine (EFSA, 2005; EMA, 2009). Za upotrebu u medicinske svrhe, najbolji kvalitet se postiže ako se koren lincure bere u jesen ili u rano proleće pre klijanja. Takođe je bitno da se koren odmah nakon branja suši, da bi se izbegli fermentativni procesi, koji mogu da smanje sadržaj fiziološki aktivnih konstituenata. Koren se pre upotrebe ostavlja još šest do osam meseci dok ne dobije žuto braon boju (WHO, 2001; EMA, 2009). Ekstrakti lincure koji se komercijalno koriste dobijaju se uglavnom perkolacijom sa 60-70% etanolom u vodi (v/v) pri čemu se dobija ekstrakt karakterističnog gorkog ukusa i arome. Nadzemni delovi se koriste vrlo retko i to uglavnom u svežem obliku.

Evropska farmakopeja koren lincure ili *Gentiana radix* smatra lekovitim kod određenih gastrointestinalnih problema, poput dispepsije i za stimulisanje apetita. Farmakološke *in vivo* i *in vitro* studije, ukazuju na mogućnost stimulacije gustativnog nerva u ustima i na moguću stimulaciju lučenja zeludačne kiseline i žuči, zbog čega je

njena upotreba kontraindikovana kod ljudi sa čirom i povišenim krvnim pritiskom (EMA, 2009). U različitim eksperimentima je pokazano, da navedeni efekti povećavaju apetit i poboljšavaju varenje. Gorka jedinjenja prisutna u korenu lincure uzrokuju takođe i povećanu sekreciju pljuvačke. U eksperimentima izvedenim na psima, kojima je davana tinktura lincure, došlo je do 30% povećanja u sekreciji želudačnog soka u odnosu na kontrolnu grupu pasa (EFSA, 2005; Meier i sar., 1993). U drugom eksperimentu, vodeni rastvor korena lincure, u dnevnoj dozi od pet grama pre obroka, stimulisao je izlučivanje enzima u želucu ovce (ESCOP, 2003).

Ispitivanja ekstrakata korena lincure u humanim studijama nisu toliko zastupljena, posebno studije koje ispituju genotoksično delovanje. U jednoj od studija izvedenih na ljudima, pacijenti sa zapaljenskim bolestima digestivnog trakta, poput ulceroznog kolitisa, Kronove bolesti i nespecifičnih inflamatornih stanja uzimali su dva puta dnevno po 20 kapi etanolnog ekstrakta lincure, u toku osam dana. Kod ove grupe, nivoi sekretornih imunoglobulina (IgA) u pljuvački bili su povećani (20 do 200 mg/dL). Kontrolna grupa su bile zdrave osobe, sa nivoima IgA od 3 do 25 mg/dL i tretirani su na isti način. Skoro kod svih ispitivanih iz obe kontrolne grupe, osim kod dva pacijenta, nivoi IgA nakon primene tinkture lincure su opali (EMA, 2009; EFSA, 2005). Takođe u grupi od deset zdravih ispitanika, došlo je do povećanja u lučenju zeludačnih sokova nakon pojedinačne oralne doze alkoholnog ekstrakta korena lincure, koji odgovara količini od 0,2 g suvog korena. Tokom ovog eksperimenta primećena je i povećana sekrecija žuči (EFSA, 2005).

U obimnoj studiji koja je obuhvatala 205 pacijenata (prosek godina 53,3 i 65% ženskog pola) sa različitim stomačnim tegobama (gorušica, povraćanje, mučnina, gubitak apetita i konstipacija) korišćene su kapsule sa 120 mg suvog ekstrakta (ekvivalentno sa 2,9 g lincure) korena lincure (ekstrahovane 53% etanolom u vodi, v/v), dva do tri puta dnevno u periodu od 15 dana. U većini slučajeva poboljšanje simptoma je primećeno već posle pet dana primene (EMA, 2009; Wegner 1997). Ukoliko nije drugačije naznačeno, prosečna dnevna doza korena i rizoma lincure je od 0,1 do 2 g u 150 mL vode ako se koristi kao macerat dobijen na hladno ili čaj, koji se može uzimati 3 puta dnevno. U obliku tinkture, u količini od 2 do 4 g, koja se dobija ekstrakcijom

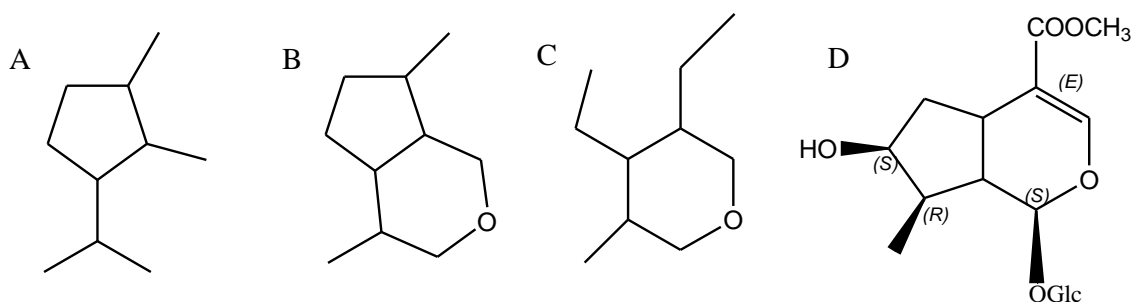
korena sa 45 do 70% etanolno vodenim rastvorom (V/V) u odnosu 1:5 (koren:rastvor, m/V) (WHO, 2007).

2.3. Kvalitativni sastav korena lincure

Sekoiridoidi, farmakološki aktivni sastojci korena *G. lutea*, po hemijskoj strukturi monoterpeni predstavljaju najvažniju grupu jedinjenja koja se akumuliraju u rizomu i korenu ove biljke. Najkarakterističniji predstavnici iz ove grupe su genciopikrozid (od 2-8%, pa čak i do 10%) i acilglukozid amarogentin (0,025-0,4%) sa indeksima gorčine 12000 i 58 miliona, što amarogentin svrstava u najgorče jedinjenje koje je do sada poznato (EFSA, 2005; EMA, 2009; WHO, 2007; Waltenberger i sar., 2015). Zatim slede svertiamarin i sverozid, sa zastupljenošću od 0,15-0,2% odnosno od 0,05 do 0,08%, koji se pojavljuju sporadično u biljci. Nedavno je otkriven još jedan gorki sastojak, loganska kiselina (iridoid) zastupljen u količini od oko 1% (WHO, 2007; EMA, 2009; Aberham i sar., 2007, Mustafa i sar., 2015).

Količine pomenutih jedinjenja variraju u zavisnosti od podvrste, zatim sezone, visine lokaliteta a najviše od starosti korena. Tako je sadržaj većine sekoiridoida najveći kod mladih korenova, starosti od jedne do tri godine, dok stariji korenovi, sadrže najviše genciopikrozida (EMA, 2009; EFSA, 2005; Radanović, 2014, Buffa i sar., 1991). Pored sekoiridoida, u korenu se mogu naći jedinjenja koja pripadaju klasi ksantona, kojih ukupno ima do 1%, a u tu grupu spadaju gentizin, izogentizin, metilgentizin, gentizein, 1-hidroksi-3,7-dimetoksiksanton, 1,3,7-trimetoksiksanton, dihidroksi-1,3-dimetoksi-2,7-ksanton, gentizin-1-primverozid i gentiozid-7-O-primverozid (WHO, 2007; EMA, 2009). Žuta boja korena i cveta lincure potiče od ksantonskih jedinjenja. Količinski najzastupljenija jedinjenja u korenu su rastvorni ugljenihidrati, koji čine od 30 do 50% suve mase korena i to gentianoza (trisaharid), gentiobioza i saharoza (disaharidi) i u manjem procentu glukoza i fruktoza (monosaharidi). Od nerastvornih šećera, najzastupljeniji je polisaharid pektin. U sastav korena ulaze i lipidi sa oko 6 do 7% suve mase (EFSA, 2005). U korenu su takođe nađeni i alkaloidi, gentianin i gentialutin, od kojih gentianin predstavlja azotov analog sekoiridoida genciopikrozida, u kome je kiseonik iz piranskog prstena zamenjen azotom (Kumar i sar., 2013; Dewick, 2002;

Toriumi i sar, 2003). U tragovima, u korenu se mogu naći i flavonoidi, koji su prisutniji u nadzemnim delovima biljke (cvetu) to su izoviteksin-4-O-glukozid i izoorientin-4-O-glukozid, dok je magniferin (C-glukoksanton) nađen samo u listovima i cvetovima (Dewick, 2002; EFSA, 2005; Menković i sar., 2000). Pored navedenih klasa jedinjenja koja su karakteristična za familiju *Gentianaceae*, u korenu se u malim količinama mogu naći i slobodne aminokiseline ali i etarsko ulje, u količini od 0,1 do 0,2% (EFSA, 2009). Etarsko ulje korena *G. lutea* čine terpenoidi, alkoholi, aldehidi, ketoni i hidroksilovani derivati benzena. Najzastupljenija jedinjenja u frakciji etarskog ulja su limonen, linalool, karvakrol, *cis*-linalil oksid i α -terpineol. (Arberas i sar., 1995; Arino i sar., 1997; Chialva i sar., 1986). Iako su navedena jedinjenja najzastupljenija u etarskom ulju, karakterističan ukus destilata dobijenog iz korena lincure potiče od brojnih aldehida: heksanala, *t*-2-noneala, *t*-2-4-nondienala, dekanala i drugih a od alkohola to su 1-okten-3-ol i linalool (Mustafa i sar., 2015). Klasa jedinjenja monoterpenoidi, karakteristični za koren lincure (iridoidi (C10) i sekoiridoidi) sastoje se iz iridanskog skeleta koji sadrži ciklopentanski prsten, najčešće kondenzovan sa šestočlanim heterocikličnim prstenom sa kiseonikom (slika 2.3).

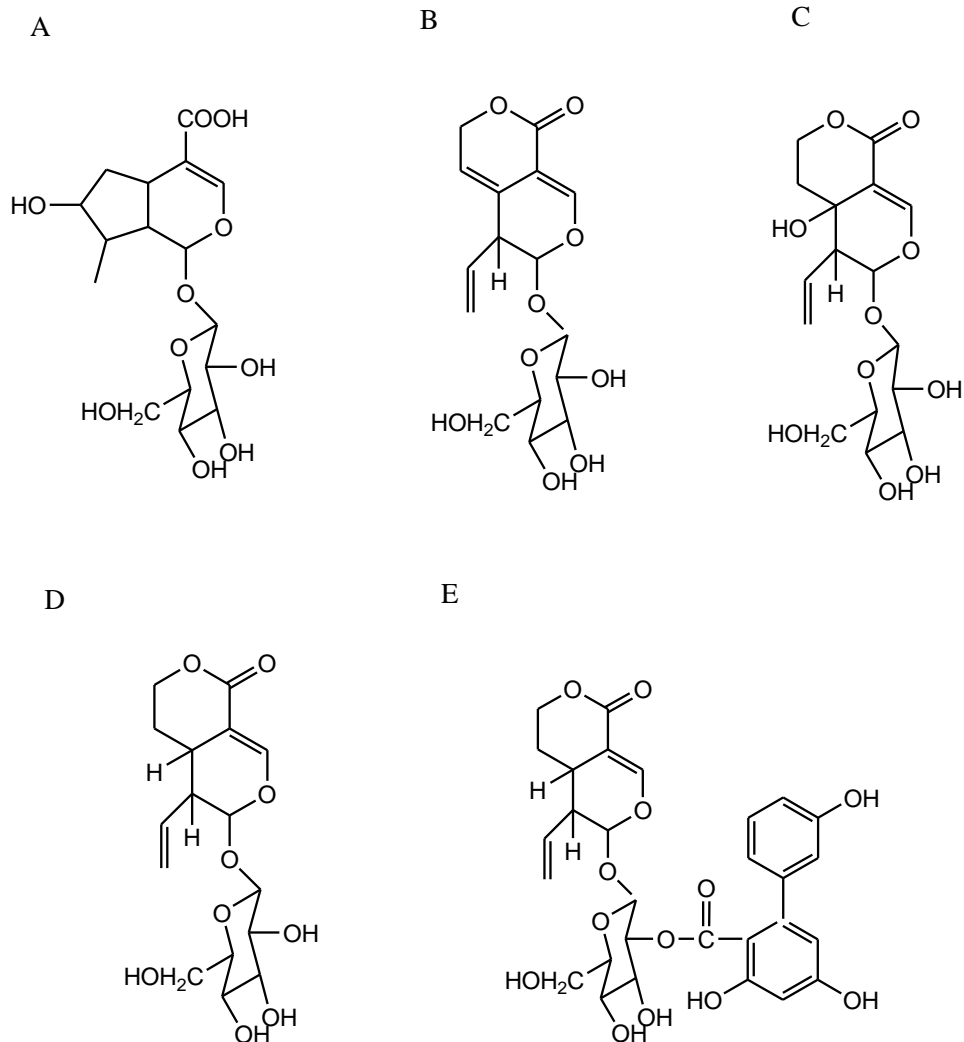


Slika 2.3. Struktura prekursora iridoida i sekoiridoida: A) iridan, B) iridoid, C) sekoiridoid, D) loganin

Brojni iridoidi su nađeni u formi glikozida, kao na primer loganin (slika 2.3D) intermedijer u biosintezi terpenodnih indolskih alkaloida i loganska kiselina (slika 2.4A) (Dewick, 2002). Daljim cepanjem ciklopentanskog prstena loganina nastaje sekologanin (prekursor ostalih sekoiridoida) aldehyd, koji tautomerizacijom prelazi u svoj enolni

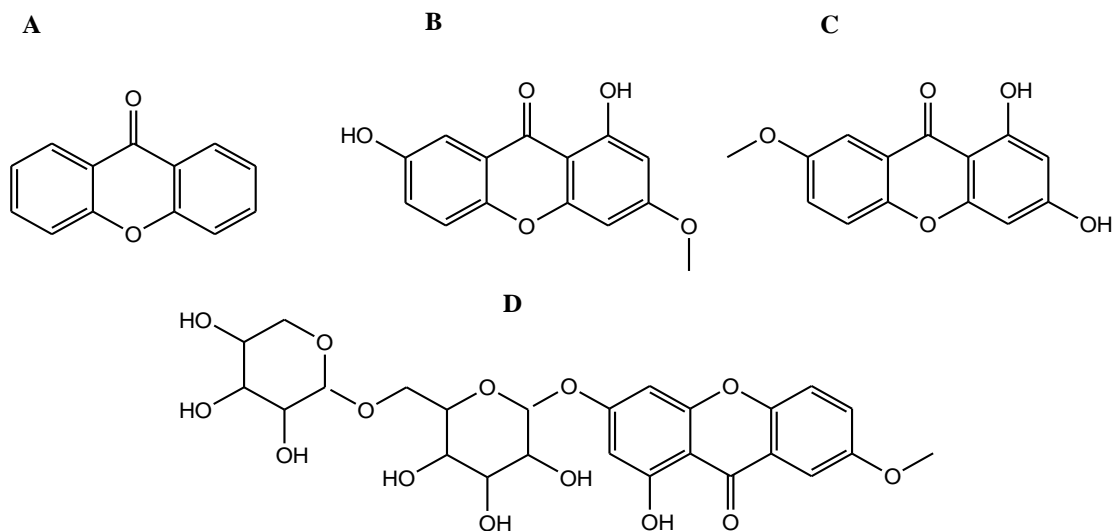
oblik, koji se dalje izomerizuje gradeći lakton, genciopikrozid (Slika 2.4 B) zatim njegov hidroksilovani analog svertiamarin (slika 2.4 C), sverozid (slika 2.4 D) i amarogentin (slika 2.4 E), koji pored glikozilovanog sekoiridoidnog skeleta sadrži i trihidroksi bifenil karboksilnu kiselinu, vezanu estarskom vezom preko C2 hidroksilne grupe glukoze.

Druga klasa fiziološki aktivnih jedinjenja prisutnih u korenu lincure su ksantoni. Za razliku od iridoida, oni nisu prisutni u svim vrstama u okviru porodice *Gentianaceae*. U studijama koje je izveo Hostettmann-Kaldas i grupa saradnika (Hostettmann-Kaldas, 1981; Dewick, 2002) utvrđeno je da su ksantonska jedinjenja prisutna samo u tri od šest vrsta *Gentiana*, od kojih je jedna i *G. lutea*. Osnovnu strukturu ksantonskih jedinjenja čini ksantonsko jezgro, po hemijskoj strukturi 9H-ksanten-9-on (dibenzo- γ -piron), slika 2.5. U biljkama, ksantoni su tetraoksigenisani, najčešće u pozicijama 1,3,5,6- i 1,3,6,7-, a najzastupljeniji u korenu lincure su gentizin, izogentizin (1,3-dihidroksi-7-metoksiksanton) i njihov glikozilovani derivat gentiozid, slika 2.5 (B-D). U biljkama se nalaze u obliku aglikona i glikozilovani, a kao O-glikozilovani, nalaze se samo u dve porodice (*Gentianaceae* i *Polygalaceae*). Za razliku od O-glikozida, C-glikozidi su rasprostranjeni u većem broju biljnih vrsta među angiospermama, papratima i gljivama (Arnason, 1995). Kao što je ranije navedeno, ovo nisu jedini predstavnici ksantonskih jedinjenja u *G. lutea*, jer su mnoga od jedinjenja derivatizovana na drugim pozicijama a takođe su prisutna i u drugim delovima biljke, u listovima i cvetovima.



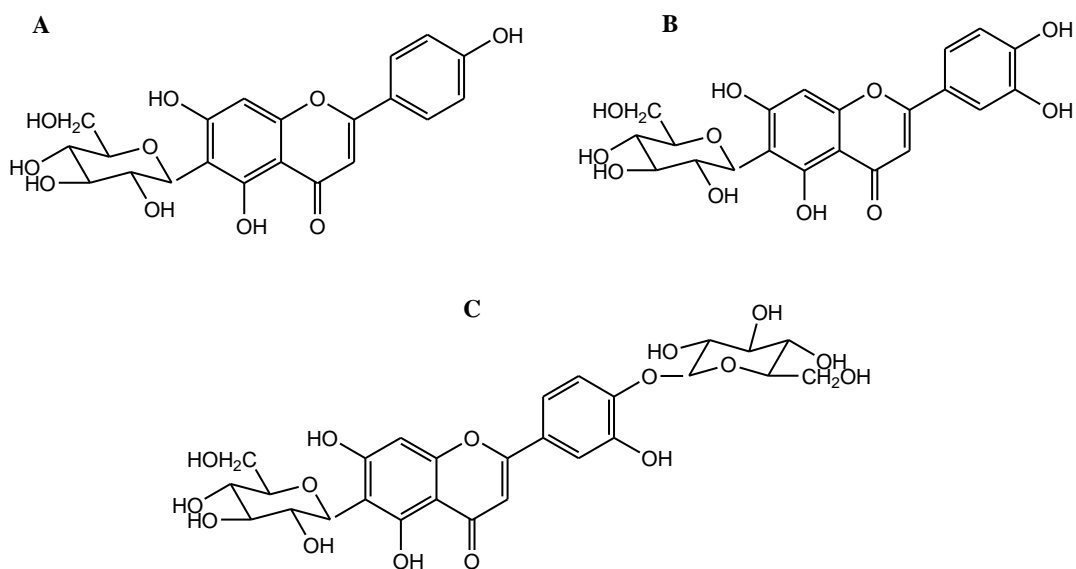
Slika 2.4. Struktura jedinjenja sa iridanskim i sekoiridanskim skeletom, karakterističnih za koren lincure (*G. lutea*): glikozilovani iridoid- Loganska kiselina (A) i glikozilovani sekoiridoidi: Genciopikrozid (B), Svertiamarin (C), Sverozid (D) i Amarogentin (E).

Treća klasa jedinjenja karakterističnih za familiju *Gentianaceae*, takođe farmakološki aktivnih i važnih za taksonomiju pomenute familije su C-glukozilflavoni (Jensen i Schripsema, 2002), koji se nalaze u tragovima u korenu lincure, slika 2.6 (A-C).



Slika 2.5. Struktura ksantona (A) i odabranih derivata prisutnih u korenu lincure: gentizin (B), izogentizin (C) i gentiozid (D).

Osnovnu strukturu ovih jedinjenja čine dva kondenzovana šestočlana prstena, od kojih je jedan benzen a drugi heterociklični piranski prsten (α -piron) koji u C2 položaju vezuje još jedan benzenov prsten.



Slika 2.6. C-glukoflavoni prisutni u korenu *G. lutea*: (A) izoviteksin (apigenin-6-C-glukozid), homoorientin (B) i (C) izoorientin 4'-O-glukozid (luteolin-6-C- β -D-glukozid).

Izoviteksin, izoorientin i homoorientin, prikazani na slici 2.6, pripadaju klasi flavona (Kumar i sar., 2013).

2.4. Biološki efekti konstituenata korena lincure

Iridoidi (sekoiridoidi), ksantoni i C-glukozilflavoni nađeni u korenu lincure ali i u drugim rodovima iz roda *Gentiana* najčešće ispoljavaju antioksidativnu, hipoglikemijsku, antimikrobnu, antiinflamatornu i antitumorsku aktivnost (antiproliferativnu). Takođe u literaturi se navodi i njihova neuroprotektivna, hepatoprotektivna i imunomodulatorana aktivnost. Aktivnost koju pokazuju je često rezultat inhibicije različitih enzima čija je aktivnost povećana u različitim patološkim stanjima. Takođe, fiziološki efekti koje ova jedinjenja pokazuju ostvaruju se putem smanjenja ili povećanja genske ekspresije pojedinih enzima, receptora i signalnih molekula.

2.4.1. Iridoidi i sekoiridoidi

Kao što je ranije pomenuto, glikozilovani sekoiridoidi su najzastupljenija klasa jedinjenja roda *Gentiana*, sa najvećom zastupljenošću genciopikrozida i loganske kiseline i u manjim količinama svertiamarina i sverozida koji su prvi put nađeni u rodu *Swertia*, koji takođe pripada familiji *Gentianaceae*. Zajedno sa iridoidima čine najveću klasu prirodno prisutnih monoterpena u biljkama, zbog kojih ove biljke imaju karakterističan gorak ukus. U ovu klasu jedinjenja spada i amarogentin, prirodno jedinjenje sa najvećim indeksom gorčine (EMA, 2009).

Dosadašnje farmakološke studije vezane za genciopikrozid su obuhvatale testove kojima su ispitivani njegovi hepatoprotektivni efekti, na model sistemima gde su oštećenja na jetri izazivana hemijskim i imunološkim agensima (Kondo i sar., 1994). Povećanje nivoa enzima jetre u serumu miševa je indukovano ugljentetrahloridom kojim su miševi oralno tretirani. Kod grupe miševa koji su pet dana za redom tretirani sa genciopikrozidom, u količini od 30 do 60 mg/kg/dan, sprečeno je povećanje enzima jetre. U drugoj studiji, miševi su tretirani intravenozno bakterijskim lipopolisaharidom (LPS), koji izaziva takođe porast enzima jetre u serumu (autoimuni hepatitis). Naime

nakon ubrizgavanja LPS, prvo dolazi do povećanja tumor nekroze faktora (TNF), glavnog inflamatornog medijatora, a takođe i do povećanja nivoa enzima iz jetre u serumu. Nakon tretmana genciopikrozidom i u ovom slučaju došlo je do pada nivoa enzima jetre u serumu, kao i do značajnog pada koncentracije TNF-a.

Ovaj podatak je od koristi ne samo kod tretmana bolesti jetre već i kod drugih inflamatornih bolesti kod kojih dolazi do povećanog lučenja TNF α , kao što su reumatoidni artritis i lupus. U skorašnjoj studiji iz 2012. godine otriveno je analgetsko dejstvo genciopikrozida kao i inhibitorno delovanje na ekspresiju N-metil-D-aspartatskog (NMDA) receptora koji sadrži GluN2B subjedinicu. NMDA receptor je ustvari jonotropni glutamatni receptor, koji je uključen u mehanizam morfinske zavisnosti a učestvuje i u toleranciji na analgetike (Liu i sar., 2012; Trujillo i sar., 2000). U ovoj studiji je pokazano da genciopikrozid inhibira morfinsku zavisnost tako što utiče na smanjenje morfinom povećane ekspresije NMDA receptora koji sadrži GluN2B subjedinicu u čeonom režnju limbičkog sistema miša. U drugoj studiji, pomenuti autori su pokazali da genciopikrozid ispoljava analgetsko delovanje, kod miševa kojima je depresija izazvana rezerpinom, lekom koji se ranije koristio za sniženje pritiska a koji pokazuje brojne sporedne efekte (Liu i sar., 2014). Mehanizam delovanja je takođe smanjena ekspresija NMDA receptora koji sadrži GluN2B subjedinicu.

Pored navedenih efekata, u eksperimentima na miševima je pokazano antikonvulzivno delovanje genciopikrozida. U ovoj studiji miševi su izlagani pentilentetrazolu, zatim diazepamu i ekstraktu biljke iz roda *Swertia*, gde su dve najzastupljenije komponente genciopikrozid i svertianin (ksanton). U paralelnoj studiji konvulzije su izazivane izoniazidom (lekom za tuberkulozu) koji aplikovan u većoj količini (250 mg/kg) pokazuje brojne sporedne efekte. U oba eksperimentalna modela primenom ekstrakta *Swertia* smanjena je učestalost nevoljnih mišićnih pokreta koje izazivaju ova dva jedinjenja pa se genciopikrozid i svertianin mogu posmatrati kao potencijalni kandidati u ispitivanju antiepileptika (Mahendrani i sar., 2014). U nekoliko odvojenih studija pokazano je da amarogentin svojim delovanjem može preventivno da deluje kada su u pitanju vaskularne bolesti. Naime, utvrđeno je da amarogentin u koncentraciji od 15 do 60 μ M inhibira agregaciju trombocita izazvanu kolagenom, na model sistema humanih trombocita (Yen i sar., 2014).

Takođe, ustanovljeno je njegovo hemoprotektivno i antikancerogeno delovanje kod miševa, kod kojih je kancerogeneza na jetri izazvana ugljentetrahloridom. Ovaj efekat je postignut indukcijom apoptoze ćelija jetre, koju izaziva amarogentin (Pal i sar., 2012). S obzirom da se radi o najgorčem prirodnom jedinjenju, nekoliko studija je bilo usmereno na delovanje amarogentina na receptore za gorko, odnosno na ćelije receptora ukusa (taste receptor cells-TRC receptori). TRC receptori su organizovani u višćelijske strukture, koje na jeziku formiraju čulne kvržice, odnosno receptore za gorak ukus. Svaka ćelija koja čini ove čulne receptore eksprimira u različitom stepenu neki od 25 gena za TRC receptor. Ovi receptori se sastoje iz kratkog ekstraćelijskog amino terminusa i unutarćelijskog C-terminusa, između kojih je transmembranski domen, koji sedam puta prolazi kroz membranu, što je tipično za receptore kuplovane sa G proteinima (Behrens i sar., 2009).

Percepcija gorkog ukusa posredstvom hTAS2Rs je neobično važna i predstavlja osnov zdrave ishrane jer su mnogi farmakološki aktivni ili čak toksični metaboliti biljaka gorkog ukusa. Tako na primer, amarogentin aktivira humani, hTAS2R50 receptor za gorko, pri koncentraciji od 100 μM a takođe i hTAS2R46 receptor, za koji se vezuje strihnin (Behrens i sar., 2009). Skorašnje studije su pokazale da se humani receptori za gorko (TAS2Rs) ne ekspimiraju samo na mukoznim epitelijalnim ćelijama jezika, već i na epitelijalnim ćelijama kolona, želuca, i gornjih respiratornih puteva. Takođe, utvrđeno je njihovo prisustvo i u koži, odnosno u epidermisu gde utiču na diferencijaciju keratinocita (Wölfle i sar., 2015). Keratinociti ekspimiraju TAS2R1 i TAS2R38 receptore za gorak ukus a njihovo prisustvo takođe je potvrđeno i na površini mastocita, ćelija koje se nalaze u gornjem sloju dermisa i koje kada su aktivirane luče histamin i $\text{TNF-}\alpha$, čime učestvuju u alergijskoj reakciji.

Ekperimentalno je pokazano da amarogentin kao agonist ovih receptora inhibira lučenje proinflamatornih molekula iz mastocita, odnosno pokazuje imunomodulatornu aktivnost (Wölfle i sar., 2015). Pored navedenih tkiva, koja dolaze u kontakt sa različitim molekulima iz spoljašnje i unutrašnje sredine, receptori gorkog ukusa nalaze se i u tiroidnom tkivu, endokrinoj žlezdi, koja nije u direktnom kontaktu sa spoljašnjom sredinom. Ekspresija TAS2Rs receptora na ćelijama tiroidnog tkiva utiče na proizvodnju tiroidnih hormona, preko promene nivoa unutarćelijskog Ca^{2+} zavisnog od tireostimulirajućeg hormona i efluksa I^- iz tireocita (Clark i sar., 2014). Od ostalih

sekoiridoida prisutnih u korenu treba pomenuti sverozid i svertiamarin, po strukturi najbližijih genciopikrozidu. U nedavnim studijama pokazano je da sverozid deluje inhibitory na proces osteoporoze, što je pokazano na model sistema humanih MG-63 ćelija kao i osteoblasta dobijenih iz pacova. Ovaj efekat sverozid ostvaruje povećanjem proliferacije pomenutih ćelija kao i inhibitorynim delovanjem na proces apoptoze (Sun i sar., 2013). Za svertiamarin je pokazano da pomaže regeneraciju β ćelija pankreasa a njegov metabolički produkt gentianin pokazuje antidiabetesna svojstva. Takođe deluje i kao antihyperlipidemik a ispoljava i antiadipogene efekte (Dhanavathy, 2015; Vaidya i sar., 2013; Vaidya i sar., 2014). Ne postoji puno podataka o biološkoj aktivnosti loganske kiseline, osim da ispoljava antiinflamatornu aktivnost, sprečavajući sintezu superoksidnog radikala u aktiviranim neutrofilima (Wei i sar., 2013).

2.4.2. Ksantoni

Za razliku od iridoida, ksantoni nisu prisutni u svim biljnim vrstama koje pripadaju familiji *Gentianaceae* a takođe njihovo prisustvo kod viših biljaka je ograničeno. U manjem broju slučajeva predstavljaju polihidroksilovana jedinjenja a u većini slučajeva dolazi do supstitucije na atomu kiseonika iz hidroksilne grupe (Jensen i Schripsema, 2002). Prvi podaci o farmakološkoj aktivnosti ksantona odnose se na mangiferin, glikozilovani ksanton, koji je u studiji izvedenoj 1968. godine pokazao diuretičku i kardiotoničnu aktivnost. Sledeća ispitivanja su se odnosila na stimulišuće efekte mangiferina na CNS, jer je u *in vitro* eksperimentima otkrivena njegova inhibitoryna aktivnost prema enzimu monoaminoksidazi (MAO) (Pinto i sar., 2005; Haraguchi i sar., 2004). Ksanton 5,6- dimetilksantenon-4- sirćetna kiselina (DMXAA) ispitivan je u kliničkim studijama kao antitumorsko jedinjenje, a takođe je dokazano njegovo stimulišuće delovanje na gen za interferona β , što ukazuje i na njegovu antivirusnu aktivnost (Pinto i sar., 2005; Prantner i sar., 2012). Takođe, komercijalno su dostupani i preparati na bazi vodenih ekstrakata *Mangifera indica* (Vimang) i *Garcinia mangostana* (Xango), koji se preporučuju kao prirodni antioksidanti a poseduju i antiinflamatorno i analgetsko dejstvo. Glavni sastojci ovih preparata su mangiferin (Vimang) i prenilovani derivati ksantona (Xango). Takođe u brojnim studijama

pokazana je hepatoprotektivna i antiinflamatorna uloga ksantonskih jedinjenja (Pinto i sar., 2005). Kada je reč o ksantonima koji su prisutni u lincuri, pored pomenutih, izogentizina, gentizina i gentiozida koji se nalaze u korenu, u cvetovima i posebno listovima *G. lutea* nalazi se i magniferin (Savikin i sar., 2009). U nekoliko odvojenih studija pokazano je da ksantoni štite vaskularne endotelijske ćelije od ćelijske smrti koju izazivaju slobodni radikali. Tako na primer, izogentizin iz *G. lutea* i ekstrakti ove biljke koji sadrže ovo jedinjenje, štite humane endotelijske ćelije krvnih sudova od oštećenja izazvanih jedinjenjima iz duvanskog dima (Schmieder i sar., 2007). Neprenilovani (polioksigenisani) ksantoni iz *G. lutea*, *F. carolinensis* i *C. erythraea* su netoksični inhibitori proliferacije glatkih mišićnih ćelija krvnih sudova, a gentizin iz lincure se pokazao kao najpotentniji inhibitor u grupi ispitivanih jedinjenja (Waltenberger i sar., 2015). Demetilbelidifolin, koji se nalazi u tragovima u lincuri (u glikozilovanom obliku) ali je prisutan i u drugim vrstama iz familije *Gentianaceae*, u kulturi endotelijskih ćelija značajno inhibira proizvodnju malondialdehida i asimetričnog dimetilarginina (inhibitor azot oksid sintaze) čije su koncentracije inače povećane kod pacijenata sa hiperholesterolemijom (Jiang i sar., 2004).

2.4.3. C-glukozilflavoni

U nekoliko nezavisnih istraživanja utvrđeno je da se u nadzemnim delovima lincure nalaze izoorientin-4-O-glukozid i izoviteksin-4-O-glukozid, dok se u korenu izoviteksin nalazi samo u tragovima. Sadržaj C-glukozil flavona u nadzemnim delovima lincure varira sezonski i dostiže maksimum tokom perioda cvetanja (EFSA, 2005). U literaturi se navode različiti biološki efekti ovih jedinjenja, poput inhibicije ekspresije enzima iNOS (inducibilna azot oksid sintetaza) kojeg luče makrofagi pod delovanjem lipopolisaharida. Ova inhibicija se zasniva na inhibiciji NF-*kappa* B transkripcionog faktora (Lin i sar., 2005). Takođe je pokazano da izoviteksin ispoljava antihiperglikemijske efekte, stimulišući *in vivo* sekreciju insulina, a vodeni ekstrakt *G. lutea* i posebno izoviteksin, sprečavaju i proliferaciju glatkih mišićnih ćelija aorte pacova, što ukazuje na njihove antiaterosklerotične efekte (Folador i sar., 2010; Kesavan i sar., 2013). Biljke sa visokim sadržajem izoviteksina, orientina i izoorientina (poput *Passiflora incarnata* L.) pokazuju anksiolitičke i sedativne efekte, posredstvom

odgovarajućih derivata fenilsirćetne kiseline, koji nastaju delovanjem intestinalnih bakterija (Miroddi i sar., 2013). Izoorientin izolovan iz *G. olivieri* Griseb. testiran na miševima pokazao je antinociceptivne (smanjenje osetljivosti na bol) i antiinflamatorne efekte. Ekstrakt pomenute biljke koja pripada familiji *Gentianaceae*, takođe ispoljava i hepatoprotektivne efekte, kod ostećenja jetre izazvanih ugljentetrahloridom (Kupeli i sar., 2004).

2.4.4. Biousvojivost i metabolizam konstituenata lincure

Konvencionalni lekovi su tako dizajnirani, da nakon oralne upotrebe zadržavaju dobru biousvojivost, za razliku od prirodnih proizvoda prisutnih u fitopreparatima ili hrani koji mogu imati značajno slabiju usvojivost. Primena biljnih preparata je ograničena na topikalnu i oralnu upotrebu, stoga biološki efekti koje ispoljavaju pojedine komponente prisutne u biljnim ekstraktima zavise od: stepena apsorpcije komponente koja dospeva do krvotoka (biousvojivost), distribucije, metabolizma i eliminacije iz tela (Bruneton, 2012). Pošto prirodni preparati nisu dizajnirani, poput lekova, da imaju predefinisano farmakokinetičko ponašanje, najčešće se dešava da se konstituenti prisutni u njima metabolišu u digestivnom traktu, pri čemu se menja ne samo njihova biousvojivost, već i njihovi biološki efekti. Ovde možemo navesti primer kvercetina, flavonoida prisutnog ne samo u lekovitim biljkama i nego i u voću i povrću. Tako na primer, kvercetin i apigenin u *in vitro* uslovima inhibiraju koagulaciju krvnih pločica, dok u eksperimentima na ljudima ne pokazuju iste efekte (Janssen i sar., 1998).

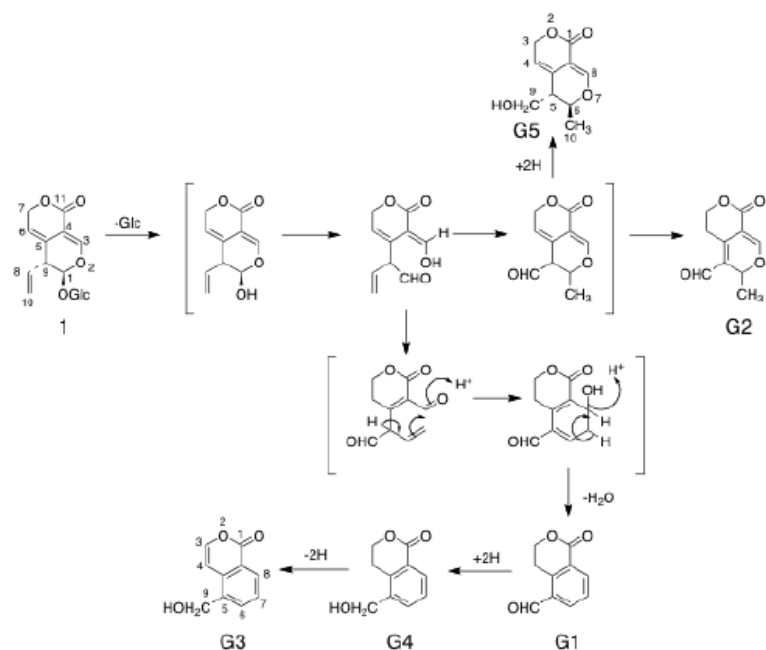
Takođe u mnogim *in vitro* studijama pokazano je mutageno delovanje kvercetina, za razliku od glikozilovanih analoga. Međutim, kada glikozilovani flavonoid dođe do digestivnog trakta, dolazi do hidrolize šećerne komponente, delovanjem β -glukozidaze (u slučaju rutina, α -ramnozidaze) koju produkuju bakterije crevnog mikrobioma. Aglikon kvercetin se dalje transformiše u odgovarajući metoksi derivat, delovanjem katehol-O-metiltransferaze, čime se značajno smanjuje njegova mutagena aktivnost (Bruneton, 2012).

Sledeći faktori utiču na biousvojivost biljnih konstituentata:

- način pripreme, odnosno u kom obliku se primenjuju,

- veličina molekula (veliki molekuli su takođe usvojivi, do 1%, zbog procesa pinocitoze).
- rastvorljivost molekula u mastima, povećava biusvojivost.
- rastvorljivost molekula u vodi i mastima, ako je molekul amfifilan, odnosno ima i hidrofilne i hidrofobne grupe, biće dobro rastvorljiv u želudačnom soku i u tankom crevu, a takođe njegov transport kroz lipidnu membranu biće olakšan.
- molekuli koji su jonizovani i samo rastvorni u vodi, pokazuju slabu usvojivost.
- pojedini molekuli se transportuju aktivnim transportom kroz membranu.
- interakcija među molekulima takođe utiče na apsorpciju.
- metabolizam, odnosno transformacija u crevima i metablizam u jetri, menjaju biusvojivost molekula.
- individualni faktori, povezani sa genetikom organizma i raznim patofiziološkim stanjima takođe utiču na usvojivost.

Kao što utiče na usvojivost lekova, isti uticaj hrana ima i na usvajanje komponenti iz biljnih preparata. Najpoznatiji primer je sok od grejpfruta koji povećava ili inhibira usvojivost, nekih lekova. Njegovo delovanje se uglavnom odnosi na inhibiciju enzima citohrom P450, koji se nalaze u ćelijama lumena creva i u ćelijama jetre. Kada je reč o obliku u kome se biljni preparati doziraju, treba istaći da vodeni ekstrakti, dobijeni procesom dekokcije i infuzije, pokazuju slabu biusvojivost. Međutim, usvojivost takvih smeša (iz vodenog ekstrakta) može se povećati dodatkom biljaka koje sadrže na primer saponine, što se koristi u tradicionalnoj kineskoj medicini. Mali broj radova je posvećen metabolizmu i usvojivosti sekoiridoida i ksantona iz korena lincure. Međutim, u istraživanju izvedenom sa Gram negativnom bakterijom *Veillonella parvula*, striktnim anaerobom, koja je deo humanog mikrobioma, dobijeno je pet metabolita genciopikrozida (slika 2.7) (el-Sedawy i sar., 1989).



Slika 2.7. Genciopikrozid (1) i metaboliti (G1-G5) dobijeni pomoću bakterije *Veillonella parvula* (el-Sedawy i sar., 1989).

Farmakološke studije iridoida pokazuju da oni poseduju slabu oralnu bioisvojjivost i da biološku aktivnost ispoljavaju tek nakon metabolisanja. Međutim, njihov *in vivo* metabolizam je još uvek nedovoljno poznat. Pored pomenutih metabolita genciopikrozida koji se dobijaju delovanjem intestinalnih bakterija, do sada je detektovano 15 metabolita genciopikrozida u urinu, u humanom kohortu sa 12 učesnika koji su oralno uzimali 50 mg genciopikrozida (Wang i sar., 2015; Han i sar. 2014). Dva najzastupljenija metabolita genciopikrozida koja nastaju delovanjem intestinalnih bakterija, a koja su detektovana u plazmi pacova su: eritrocentaurin (G1, slika 2.7), čija se maksimalna koncentracija u plazmi dostiže 2h nakon oralne primene i gentiopikral (G2, slika 2.7), čija se maksimalna koncentracija dostiže nakon 4h, u plazmi (Wang i sar., 2015). Kada je reč o usvojjivosti i metabolizmu ksantonskih jedinjenja iz lincure, takođe je dostupno malo literaturnih podataka. Međutim, postoje podaci o metabolizmu ksantonskih jedinjenja iz drugih biljaka, kao na primer iz mangostina.

Rezultati humanog kohorta, u kome su učesnici uzimali po 60 mL soka od mangostina, pokazuju da se jedan deo ksantona (sa izoprenskim grupama) nalazi u slobodnom obliku u serumu, a drugi, u konjugovanom (glukuronizovan i sulfonovan).

Oba navedena oblika ksantona su detektovana u urinu, pri čemu je količina usvojenih ksantona oko 2% (Chitchumroonchokchai, 2012). Za razliku od mangostina, koji sadrži prenilovane ksantone, koren lincure sadrži uglavnom tetraoksigenisane ksantone, izogentizin, gentizin i gentiozid (O- glikozilovan), a u nadzemnom delu mangiferin, C-glukozidni ksanton).

2.5. Enzimi i prirodna jedinjenja kao njihovi inhibitori i predviđanje molekularnih interakcija

Enzimski inhibitori su jedinjenja koja smanjuju enzimsku aktivnost, sprečavajući konverziju supstrata u odgovarajući proizvod. Prirodna jedinjenja kao enzimski inhibitori ne utiču samo na aktivnost enzima, već mogu uticati i na gensku ekspresiju enzima. Inhibitori enzima predstavljaju skoro polovinu lekova koji se trenutno koriste. Selektivni inhibitori enzima virusa, bakterija i višćelijskih parazita su glavni lekovi u tretmanu infektivnih bolesti. Međutim i enzimi koji su esencijalni za život čoveka, ukoliko dođe do promene njihove aktivnosti dovode do bolesti. U nekim slučajevima, mutacije gena koji kodiraju ove enzime dovode do abnormalno visokih koncentracija enzima (overekspresija). Sa druge strane tačkaste mutacije mogu dovesti do promene specifične aktivnosti enzima jer dolazi do njihove strukturne promene. U oba slučaja dolazi do poremećaja u koncentraciji krajnjeg produkta enzimske reakcije koja uzrokuje patološka stanja (Copeland, 2005).

Enzimska aktivnost zavisi od koncentracije enzima, količine specifičnog supstrata, pH vrednosti reakcije, prisustva aktivatora (specifični ili nespecifični) kao i inhibitora, koji mogu biti ne samo prirodna jedinjenja već i produkti metabolizma (Bjelaković i sar., 2002). Inhibitori, koji se koriste u terapeutske svrhe svoje delovanje ostvaruju mehanizmom kompetitivne inhibicije enzima. Kompetitivni inhibitori najčešće imaju strukturnih sličnosti sa supstratom i kompetiraju za vezivno mesto u aktivnom centru enzima. Kada se vežu za enzim, formiraju enzim-inhibitor kompleks, sprečavaju vezivanje supstrata i formiranje normalnog metaboličkog proizvoda. Jedan od takvih primera je malonska kiselina, koja inhibira enzim sukcinat dehidrogenazu, a predstavlja strukturni analog sukcinata, supstrata ovog enzima (Bjelaković i sar., 2002). Sledeći

primer je inhibitor alkohol dehidrogenaze, etanol, koji predstavlja antidot za trovanje metanolom. Terapeutici, koji predstavljaju specifične inhibitore enzima i sprečavaju formiranje neželjenih metabolita, nazivani su antimetabolitima. U svakodnevnoj primeni su strukturni analozi amino kiselina, kao antibakterijski lekovi, zatim antagonisti folne kiseline koji utiču na sintezu DNK i RNK, kao i strukturni analozi purina i pirimidina.

Mnoga prirodna jedinjenja koja biljke koriste za zaštitu od herbivora, danas imaju primenu kao laksativi, emetici, kardiotonici ili relaksanti humanih mišićnih ćelija. Komparativnom genomskom analizom je utvrđeno da 70% gena povezanih sa humanim kancerima pokazuje ortologiju sa biljkom *Arabidopsis thaliana* (Ji i sar., 2009). Međutim, postoje i primeri gde prirodni proizvodi, poput kurkumina, resveratrola ili kvercetina inhibiraju enzime poput, acetilholinesteraze i monoamine oksidaze (A i B) a ne pokazuju homologiju sa biljnim enzimima. Takođe, mnogi prirodni proizvodi mogu istovremeno da se vezuju za različite proteine (enzime, receptore) različitim afinitetom, što takođe treba imati u vidu kada se ispituje njihovo delovanje *in vivo*.

2.5.1. Predviđanje mesta vezivanja liganada za ciljne molekule- *docking* studija

Smatra se da više od 40% kodirajućih proteinskih sekvenci u genomu eukariota obuhvata proteine čija funkcija do sada nije poznata čime se otvaraju brojne mogućnosti za identifikacijom novih terapeutika (Galperin i Koonin, 2010). Bioinformatičkim metodama moguće je predvideti ligand vezujuća mesta na ovim proteinima uz pomoć geometrijskih, informatičkih i energetskih algoritama. Funkcionalni epitopi ili ligand vezujuća mesta na površini proteina su evolutivno konzervirani regioni koji omogućavaju proteinima da održe svoju biološku funkciju. Stoga su proteini koji dele slične ligand vezujuće strukturne domene često homologni i po funkciji i vezuju sličan set liganada.

Molekulskim modelovanjem može se predvideti konformacija i orijentacija liganda (najčešće malog molekula) u interakciji sa aktivnim mestom ciljnog molekula (najčešće proteina, receptora ili enzima). Ciljni molekuli, pored proteina mogu biti i nukleinske kiseline, ugljeni hidrati i lipidi, odnosno svi fiziološki relevantni molekuli a interakcije nisu samo ograničene na male ligande, poput sekundarnih metabolita biljaka ili lekova,

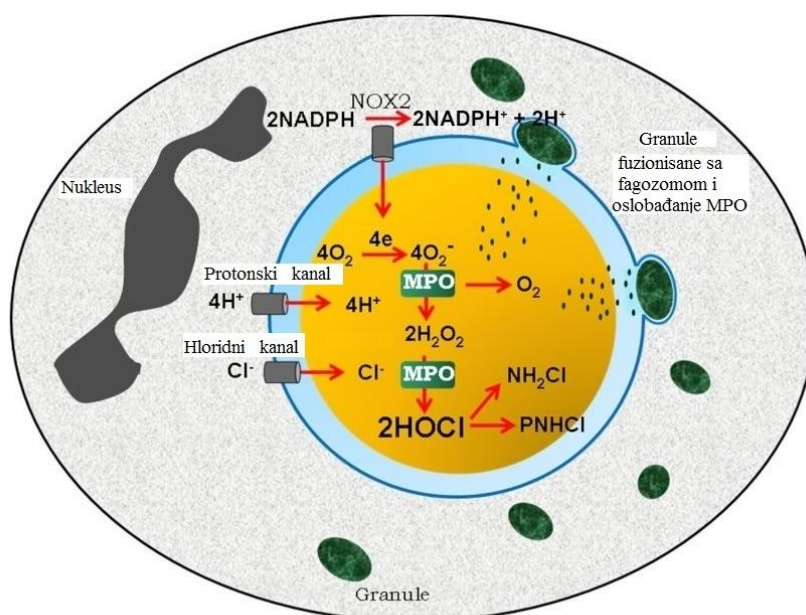
već se mogu analizirati i protein-protein interakcije (Eweas i sar., 2014). Smatra se da farmaceutska industrija trenutno izdvaja oko 10% sredstava na ovakva istraživanja sa trendom povećanja na 20% u 2016. godini. Na ovaj način će se postići veća efikasnost pri selekciji potencijalnih lekova, koji bi se dalje koristili u kliničkim testiranjima, što bi svakako ubrzalo pronalaženje novih lekova (Van de Waterbeemd i Gifford, 2003). U ovom radu biće predstavljeno molekulsko modelovanje interakcija između odabranih konstituenta lincure i E-NTPDaze koji se nalazi na površini membrane sinaptozoma.

2.5.2. Ekstrakti i konstituenti *G. lutea* kao inhibitori enzima

Brojna istraživanja pokazuju da ekstrakti lincure i njeni konstituenti, pre svega sekoiridoidi i ksantoni, prisutni i u drugim biljkama iz familije *Gentianaceae*, inhibiraju različite enzime. Tako na primer, ksanton, belidifolin, kao i njegov 8-O-glikozilovani analog inhibiraju acetilholinesterazu (Urbain i sar., 2004). U drugom istraživanju je pokazano da ekstrakti pet različitih vrsta koje pripadaju rodu *Gentiana* inhibiraju acetilholin- i butirilholinesterazu (Senol i sar. 2012). Izogentizin i još tri izolovana jedinjenja iz *G. lutea* pokazuju inhibitorno delovanje prema enzimu monoamin oksidazi (MAO) A i B, enzimu spoljne mitohondrijske membrane, izolovane iz mozga pacova (Suzuki i sar.,1980; Haraguchi i sar. 2004). Najefikasniji inhibitor od navedena tri jedinjenja je dihidrokumarin (MAO-B) i hidroksiflavon (MAO-B). Sekoiridoid amarogentin, predstavlja potentni inhibitor enzima topoizomeraze I iz *Leishmania donovani*, a inhibiciju ovog enzima pokazuje i metanolni ekstrakt biljke *Swerita chirata* (*Gentianaceae*) koji pored amarogentina sadrži i amarosverin i sverozid (Ray i sar.,1996). Takođe, rezultati molekuskog modelovanja ukazuju da bi amarogentin mogao da inhibira enzime ciklooksigenazu 2 (COX-2) i aldol-reduktazu, dok je za izoviteksin utvrđeno da inhibira enzim ksantin oksidazu (Shukla i sar., 2014; Akileshwari i sar., 2012, Lin i sar., 2002).

2.5.3. Mijeloperoksidaza

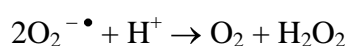
Mijeloperoksidaza (MPO) pripada grupi hem peroksidaza koje se u najvećoj meri eksprimiraju u neutrofilima i nešto manjoj u monocitima, ali i u aktiviranim makrofagima (Malle i sar., 2007). Po strukturi to je dimerni molekul, koji se sastoji od teškog i lakog lanca i dva atoma gvožđa. MPO učestvuje u inicijalnom imunom odgovoru formiranjem mikrobicidnih reaktivnih oksidanata i radikala. U krvi postoje dve vrste fagocitnih ćelija (bela krvna zrnca): neutrofil i monocit. Neutrofil su takođe poznati kao granulociti ili polimorfonuklerani leukociti i čine 50 do 70% krvnih ćelija. Kada neutrofil dođu u dodir sa opsonizovanim mikroorganizmima, dolazi do njihove ingestije putem fagocitoze (od grčke reči phagein-pojesti). Fagozom se unutar neutrofila spaja sa azurofilnim granulama koje su ispunjene enzimima i drugim antimikrobnim supstancama (peptidima) (slika 2.8).



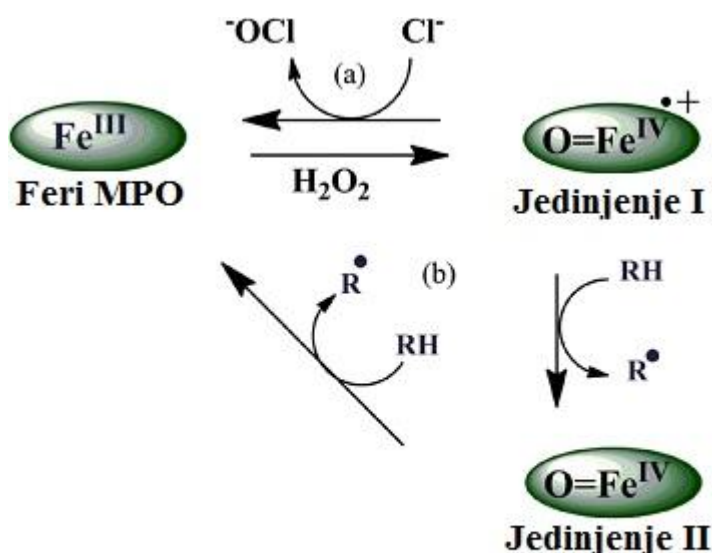
Slika 2.8. Nastanak HOCl u fagozomu netrofila, nakon fagocitoze, delovanjem MPO (Klebanoff i sar., 2013).

Glavni enzim granula neutrofila je mijeloperoksidaza, koja čini 5% od ukupnih proteina u neutrofilima. Nakon fagocitoze dolazi do velike potrošnje kiseonika

(„respiratorna eksplozija”) delovanjem enzima NADPH oksidaze, koji se nalazi prvenstveno u membranama fagozoma i koji stvara superoksidni anjon ($O_2^{\bullet -}$). Transfer elektrona u membrani izaziva depolarizaciju membrane pri čemu dolazi do aktivacije protonskih pumpi i influksa protona (Klebanoff i sar., 2013). Na ovaj način dolazi do dismutacije superoksidnog anjona kojom se stvara H_2O_2 i kojom se pH unutar fagozoma održava blizu neutralnog, u reakciji:

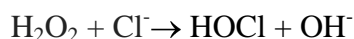


MPO oksiduje hlorid i druge halogene anjone (bromid, jodid) kao i tiocijanat $[SCN]^-$ stvarajući pritom odgovarajuće hipohlorne kiseline. Katalitička aktivnost MPO obuhvata halogenujuću i peroksidaznu aktivnost, a katalitički ciklus MPO prikazan je na slici 2.9.

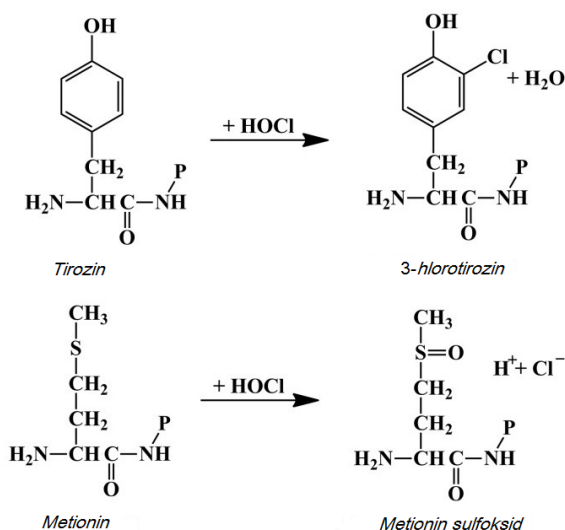


Slika 2.9. Katalitički ciklus MPO: (a) U nativnom stanju enzim se nalazi u obliku feri MPO i reaguje sa H_2O_2 formirajući redoks intermedijer- jedinjenje I. Jedinjenje I ili oksiduje hlorid, pri čemu dolazi do regeneracije feri MPO-halogeni ciklus ili (b) oksiduje organske susptrate (RH) do slobodnih radikala (R^{\bullet}) formirajući pri tom intermedijer- jedinjenje II. Redukcijom jedinjenja II, MPO se vraća u nativno stanje a ovaj ciklus se naziva peroksidaznim (Forbes i sar., 2013).

Kinetička ispitivanja su pokazala da je reakcija sa hloridnim i tioijanatnim anjonima favorizovana i sumarno se može prikazati, na primeru Cl^- kao:



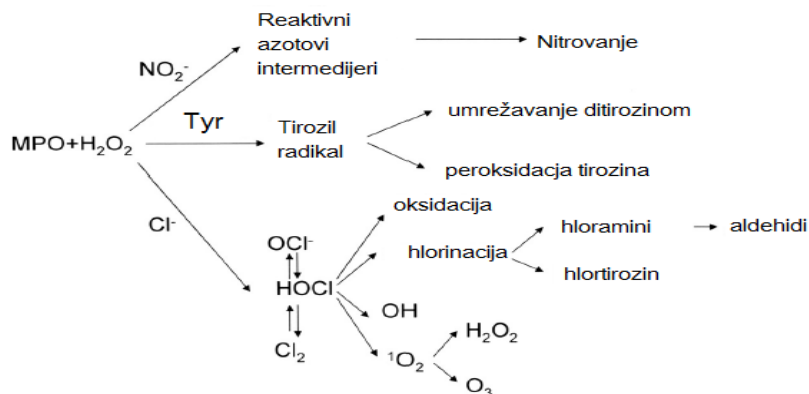
Hipohlorna kiselina je jak mikrobicid i na neutralnom pH se nalazi u obliku smeše HOCl i OCl^- zbog svoje pK_a vrednosti od 7,5 na $T=30^\circ\text{C}$. Peroksidaze, uključujući i MPO mogu katalizovati halogenaciju i drugih molekula, poput aminokiselina tirozina i metionina pri čemu su halogenovani (hlorovani) proteini indikacija prisutva MPO u određenom tkivu (slika 2.10). Tako je u ateromatoznim naslagama utvrđeno prisustvo halogenivanih proteina, što ukazuje na moguću ulogu MPO enzima u njihovom formiranju. Pored Tyr, supstrat za MPO/ H_2O_2 sistem mogu biti i nitriti, koji se delovanjem enzima oksiduju u nitrate.



Slika 2.10. Reakcije koje katalizuje MPO: HOCl i Tyr i/ili Met aminokiselinski ostaci na površini proteina (Klebanoff i sar., 2013).

Mehanizam delovanja MPO prikazan je na slici 2.11. Ovakav sistem je širokog spektra delovanja i toksičan je za većinu mikroorganizama (bakterije, gljive, virusi, protozoa, amebe, crvi) bakterijskih toksina i intaktnih sisarskih ćelija (Kelbanof i sar., 2005). Međutim pored navedenog antimikrobnog delovanja, produkti oksidacije koje izaziva MPO mogu imati štetno delovanje u nekim patološkim stanjima, izazivajući

ostećenja okolnog tkiva. Smatra se da ostećenja tkiva kod akutnih i hroničnih vaskularnih inflamatornih bolesti nastaju delovanjem MPO (Malle i sar., 2007).

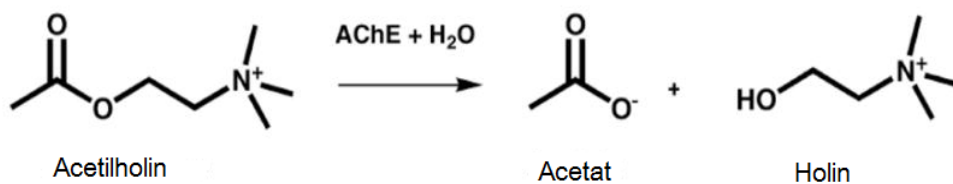


Slika 2.11. Shema mikrobicidnog delovanja MPO (preuzeto i modifikovano iz Klebanoff i sar., 2005).

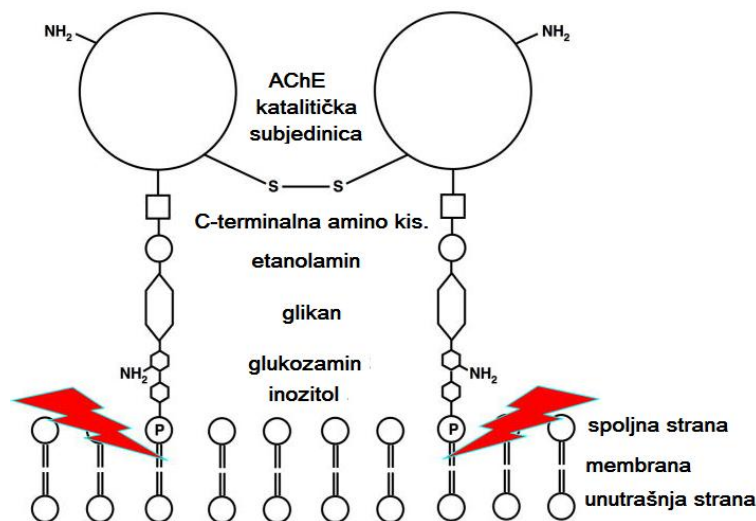
Štaviše, nivo cirkulišućeg MPO kao i halogenih derivate nastalih u reakciji HOCl sa Tyr, mogu poslužiti kao marker srčanih oboljenja. Iz navedenih razloga MPO predstavlja jedan od ciljnih molekula za razvoj novih inhibitora.

2.5.4. Acetilholinesteraza (AChE)

Biološka uloga acetilholinesteraze (AChE) je zaustavljanje prenošenja impulsa u holinergičkim sinapsama, brzom hidrolizom neurotransmitera acetilholina (ACh). U skladu sa tom ulogom, AChE poseduje značajno visoku specifičnu aktivnost, sa brzinom koja se približava difuzionim reakcijama (Dvir i sar., 2010). Enzimska hidroliza acetilholina sa AchE je prikazana reakcijom:

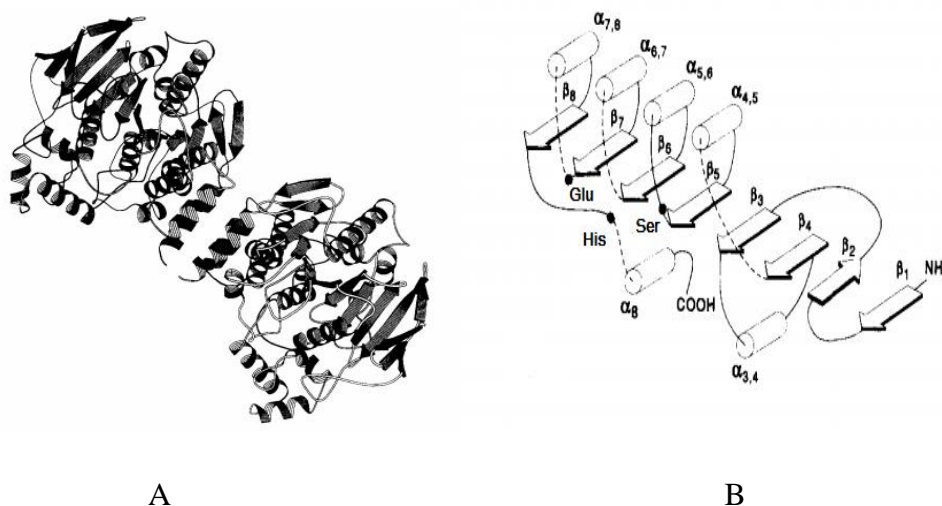


Kod električne raže (*Torpedo*) glavna forma u kojoj se AChE nalazi je homodimer, koji je vezan za plazma membranu pomoću glikofosfatidil inozitola (GPI). GPI je kovalentno vezan za C-terminus svakog od monomera, a sam predstavlja hidrofobno sidro koje ukotvljava AChE (slika 2.12).



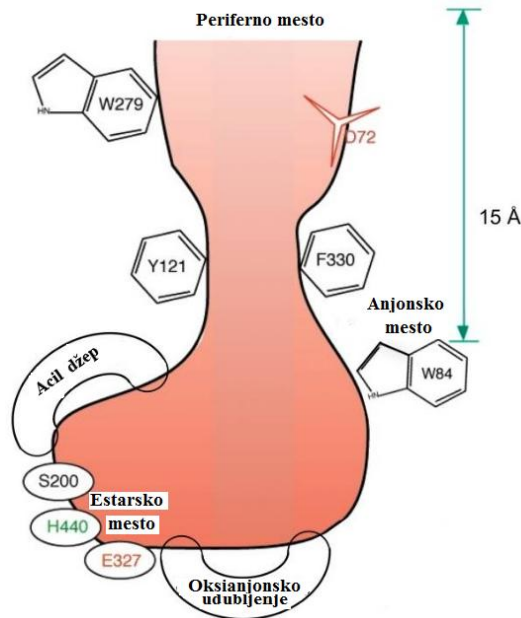
Slika 2.12. Način vezivanja AChE za plazminu membranu, kod raže (*Torpedo*) (preuzeto i modificovano iz Dvir i sar., 2010).

Na osnovu kristalne strukture AChE dobijene eksprimiranjem gena u S2 ćelijama *Drosophila* ustanovljeno je da se katalitička subjedinica sastoji iz 556 aminokiselinskih ostataka, sa molekulskom masom od 70 kDa. Domen bogat prolinom omogućava da subjedinice AChE formiraju tetramerni molekul, koji je stabilan i bez disulfidnih veza, što je pokazano u eksperimentu sa sintetički dodatim poliprolinom. Sam enzim je elipsoidnog oblika, dimenzija 45 x 60 x 65 Å, i pripada klasi α/β proteina, slika 2.13 (A-B). Na slici 2.13 (A) vidi se način organizacije homodimera sa N-terminalnim grupama koje se nalaze na krajevima dimernog molekula i C-terminusima u centru, sa 4 heliksa, koji dve monomerne jedinice drže zajedno. Monomerne jedinice se sastoje iz β -ploča okruženih α -heliksima, kao i tri kraće β -ploče na N-terminalnim krajevima. Najuočljivija strukturna karakteristika AChE je udubljenje, dugačko oko 20 Å u kome se nalazi aktivni centar enzima.



Slika 2.13. (A) Shematski prikaz trodimenzionalne dimerne strukture AChE izolovane iz električne raze (*Torpedo californica*); (B) shematski prikaz α/β uvijanja-crnim tačkama su obeleženi aminokiselinski ostaci katalitičke trijade (Sussman i Silman, 1992).

U njemu se nalazi katalitička trijada enzima (slika 2.14). Pored Ser200, koji se nalazi na oko 4Å od površine udubljenja, u aktivnom centru se nalazi i 14 aminokiselinskih ostataka aromatičnih aminokiselina, koji zauzimaju oko 40% aktivne površine centra, a koje čine sledeći aminokiselinski ostaci: Tyr70, Trp84, Trp114, Tyr121, Tyr130, Trp233, Trp279, Phe288, Phe290, Phe330, Phe331, Tyr334, Trp432 and Tyr442 (Sussman i Silman, 1992). Ovako formiran domen je visoko konzerviran i kod međusobno udaljenih vrsta i nalazi se između β -pločica. Ovo udubljenje sadrži samo nekoliko kiselih aminokiselinskih ostataka, koji uključuju Asp285 i Glu273, na samom vrhu, kao i Asp72 (vezan vodoničnom vezom za Tyr334) negde na sredini i Glu199 blizu dna udubljenja. Bočni ostaci aromatičnih aminokiselina značajno doprinose vezivanju kvaternarnog ACh liganda, koji svojim alkil ostacima (na kvaternarnom N atomu) interaguje sa triptofanskim prstenom (Trp84) u aktivnom centru enzima, slika 2.14. Estarsko vezivno mesto, je po svojim kinetičkim karakteristikama slično ostalim serinskim hidrolazama. Anjonsko vezujuće mesto aktivnog centra vezuje kvaternarnu grupu ACh i kvaternarne ligande, koji deluju kao kompetitivni inhibitori enzima. Pored ova dva mesta vezivanja u aktivnom centru enzima, AChE poseduje i jedno ili više dodatnih mesta za vezivanje ACh i kvaternarnih liganada.



Slika 2.14. Raspored aminokiselina aktivnog centra AChE dobijen na osnovu kristalne strukture TcAChE. U katalitičkom udubljenju su prisutni: anjonsko mesto (AS) sa kojim AChE interaguje, zatim estarsko vezivno mesto (ES), oksianjonsko udubljenje i acil džep, koji utice na supstratnu specifičnost i periferno vezivno mesto za anjone (PAS) (preuzeto i modifikovano iz Dvir i sar., 2010).

Ovo mesto je označeno kao periferno vezujuće mesto za anjone (PAS) i jasno je udaljeno od vezujućeg džepa aktivnog centra. Smatra se da PAS ima ulogu u inhibiciji enzima supstratom, koja je jedna od karakteristika AChE. Ključnu ulogu u vezivanju holinergičkih liganada ostvaruju π -elektroni aromatičnih prstenova iz AS vezivnog mesta. Podaci o strukturi vezivnog mesta su važni za dizajniranje lekova kao i za razvoj terapijskih pristupa u slučajevima trovanja organofosfatima. Takođe, informacije o vezujućem mestu za ACh mogu da pomognu u razumevanju interakcija između ACh i drugih ACh vezujućih proteina, poput nikotinskih i muskarinskih receptora (Sussman i Silman, 1992).

Inhibitori AChE se koriste u tretmanu brojnih neuromuskularnih bolesti, i predstavljaju prvu generaciju lekova koji se koriste u tretmanu Alchajmerove bolesti. Takođe, razvoj AChE inhibitora je važan zbog razvoja novih terapijskih pristupa u eliminisanju intoksikacije organofosfatnih insekticida, koji se ireverzibilno (kovalentno) vezuju za enzim, preko Ser ostataka u aktivnom centru enzima.

2.5.5. Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaze

Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaze (E-NTPDaze, EC 3.6.1.5) su membranski enzimi sveprisutni u eukariotskim ćelijama koji hidrolizuju ekstraćelijske nukleotid tri- i di-fosfate u prisustvu milimolarnih koncentracija Ca^{2+} i Mg^{2+} , pri pH vrednostima između 7 i 8. Do sada je identifikovano osam različitih gena za E-NTPDaze, koji kodiraju članove ove familije NTPDaza. Četiri od osam (NTPDaze 1,2,3 i 8) su membranski enzimi pozicionirani ka ekstraćelijskom prostoru i eksprimiraju se u različitom odnosu u različitim tipovima ćelija (Zimmermann i sar., 2012; Maliszewski i sar., 1994).

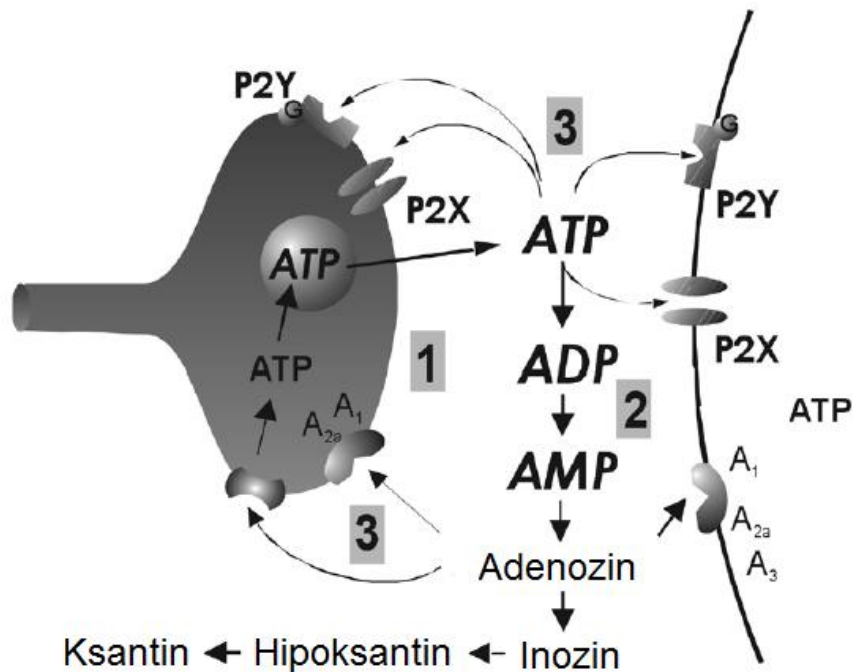
Ekstraćelijski ATP i drugi nukleotidi i nukleozidi su važni signalni molekuli koji ostvaruju različite efekte u skoro svim tkivima i organima, uključujući: neadrenergičke i neholinergičke kontrakcije glatkih mišićnih ćelija, nociceptivne i antinociceptivne (protiv bola) efekte, neurotransmisiju u CNS, regulaciju imunog odgovora, razvoj embriona, održavanje homeostaze okularnih procesa, kontrola konorarne vazodilatacije i angiogeneze (Yegutkin, 2014). Takođe aktiviraju krvne pločice i proces tromboze (Burnstock i Ralević, 2014). Purinergička signalizacija zavisi od funkcionalne interakcije između različitih procesa koji obuhvataju: oslobađanje endogenog ATPa, aktivaciju signala koji se prenose preko ligand zavisnih jonskih P2X receptora i G-kuplovanih P2Y receptora. Takođe na purinergičku signalizaciju utiče inaktivacija nukleotida koju vrše ektoenzimi, vezivanje nukleozida za svoje specifične receptore i najzad metabolizam nukleozida u ćeliji (Yegutkin, 2014). Purinergička signalizacija je uključena u procese učenja i memorije, lokomotornu aktivnost i navike u ishrani. Receptori za koje se nukleotidi vezuju u mozgu učestvuju u brzom prenošenju signala (neurotransmisija i neuromodulacija) a u drugim tkivima u prenosu signala sa dugotrajnijim efektima (ćelijska proliferacija, diferencijacija i ćelijska smrt) (Burnstock, 2010).

U zavisnosti od ćelijske lokalizacije i supstratne specifičnosti razlikujemo osam izoformi NTPDaza: NTPDaza1 (CD39), NTPDaza2 (CD39L1), NTPDaza3 (CD39L3), NTPDaza4, NTPDaza5 (CD39L4), NTPDaza6 (CD39L2), NTPDaza7 i NTPDaza8. CD (cluster of differentiation) u nazivu NTPDaza potiče od starije nomenklature i sa pouzdanošću se može primeniti samo za NTPDazu1 koja zaista pripada klasteru

diferencirajućih antigena, smeštenih na površini limfocita (Zimmermann, 2001). Navedene izoforme NTPDaza hidrolizuju terminalnu fosfatnu grupu nukleozid tri ili difosfata do monofosfata različitim brzinama, odnosno poseduju različit afinitet prema ATPu i ADPu. NTPDaze 1, 2 i 8 su membranski enzimi sa aktivnim centrom u ekstraćelijskom prostoru i predstavljaju dominantne ekto nukleotidaze koje prekidaju purinegričku signalizaciju koja se odvija preko nukleotidnih agonista P2 receptora. Kristalna struktura katalitički aktivnog ekstraćelijskog domena je opisana 2008, na primeru NTPDaze2 izolovane iz mozga pacova *Rattus norvegicus* (Zimmermann, 2000). Kod membranskih NTPDaza dva glavna domena (I i II) su transmembranski, dok je interdomenski region, koji se nalazi u ekstraćelijskom prostoru rotabilan i shodno tome odgovoran za vezivanje supstrata i otpuštanje katalitičkog produkta (Zebisch i Strater, 2008).

U pogledu supstratne specifičnosti i fiziološke uloge NTPDaza1 ima tromboregulatornu ulogu i hidrolizuje adenzin tri- i difosfate do monofosfata, skoro kompletno do AMP, uz minimalnu akumulaciju prelaznog ADPa. To nije slučaj sa UTPom, pri čijoj hidrolizi dolazi do nakupljanja UDPa. Za razliku od izoforme 1, NTPDaza2 ima mnogo veći afinitet prema ATPu pri čemu dolazi do akumuliranja veće količine ADPa. Druge dve membranske izoforme NTPDaza, 3 i 8, imaju afinitet prema ATPu veći nego prema ADPu, međutim po brzini akumuliranja međuprodukta ADPa, nalaze se između NTPDaze 1 i 2. NTPDaze od 4 do 7 uglavnom su povezane sa unutarćelijskim organelama a hidrolizuju najčešće neadenozinske tri- i dinukleozidfosfate (Fields i Burnstock, 2006). Nemembranske, sekretorne forme NTPDaza su izoforme 5 i 6 i smatra se da je njihova uloga u regulaciji purinergičkih P2Y receptora (Keeffe i sar., 2010). Pod normalnim metaboličkim uslovima veći deo ATP-a se sintetiše u mitohondrijama oksidativnom fosforilacijom i skladišti se u citoplazmi nervnih završetaka i glija u milimolarnim koncentracijama. Deo citoplazmatskog ATP-a ulazi u sinaptičke vezikule preko vezikularnog nukleotidnog transportera i tu se skladišti zajedno sa drugim neurotransmiterima. ATP se oslobađa u ekstraćelijski prostor fiziološkom aktivnošću neurona ali i pod uticajem patoloških signala, kao što su hipoksija, hipoglikemija, ishemija, inflamacija, metabolički i osmotski stres i ćelijska oštećenja (Sperlagh i sar., 2012). Delovanje ATP-a u ekstraćelijskom prostoru se brzo prekida delovanjem kaskade egzokleotidaza, koje

ATP hidrolizuju do adenzina. Navedena kaskada enzima nalazi se na membrani sinaptozoma i čine je: E-NTPDaze, E-NPPaze, AP i E-5' nukleotidaze, koji vrše defosforilaciju purinskih nukleotida, slika 2.15.



Slika 2.15. ATP oslobođen u sinaptičkoj pukotini (ekstraćelijski) se defosforiluje delovanjem E-NTPDaza do adenzina. Adenzin se dalje deaminuje do inozina ili se transportuje ponovo u nervne završetke gde se inkorporira u nove molekule ATPa (preuzeto i modifikovno iz Sperlagh i sar., 2012).

ATP oslobođen u ekstraćelijskom prostoru se degradira do adenzina, ali u zavisnosti od aktivnosti ekto-ATPaza deo nehidrolizovanog ATP može da se veže za jonotropne ili metabotropne, P2X ili P2Y receptore i tako ostvari svoje fiziološko delovanje. Sa druge strane krajnji produkt njegove hidrolize, adenzin, takođe može da se veže za svoje receptore na membrani nervnih završetaka i ostvari svoje delovanje. Pored vezivanja za receptore, može doći i do njegove dalje razgradnje do inozina. Promena u aktivnosti E-NTPDaza je primećena kod mnogih neurodegenerativnih

bolesti, kao što su Parkinsonova, Alchajmerova i Hantingtonova bolest, zatim kod neuroinflamatornih bolesti poput multipleks skleroze i kod neuropsihijatrijskih bolesti.

Povišeni nivoi ATP-a izazivaju citotoksična oštećenja i inflamaciju u mozgu. Smanjena aktivnost E-NTPDaza uzrokuje povećanje nivoa ATP-a i smanjenje koncentracije adenzina, što se dešava kod epilepsije. Stoga svako jedinjenje koje utiče na aktivnost E-NTPDaza može biti od potencijalnog značaja za tok navednih bolesti (Burnstock, 2010; Roszek i Czarnecka, 2015). Sa druge strane, osim nukleozidnih analoga i nekih polioksometalata, nedostatak dovoljno specifičnih inhibitora E-NTPDaza je glavna prepreka u razvoju terapeutika koji bi mogli da utiču na purinergičku signalizaciju (Muller i sar., 2006; Al Rashida i Iqbal, 2014).

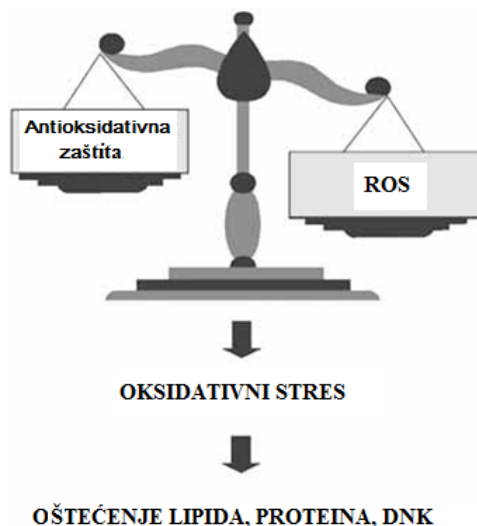
2.6. Antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakta

Ljudi i životinje su kontinuirano izloženi različitim reaktivnim kiseoničnim vrstama (Reactive oxygen species-ROS) kao i prooksidativnim vrstama. ROS čine kiseonični radikali ali i neradikalska jedinjenja koja se mogu lako konvertovati u radikale pomoću oksidujućih agenasa, tabela 2.1 (Hermans i sar., 2007). Optimalna antioksidativna zaštita protiv ovih potencijalno štetnih ROS je esencijalna za održavanje uravnoteženog balansa između oksidanata i antioksidanata.

Tabela 2.1. Reaktivne kiseonične vrste (slobodni radikali i neradikalska jedinjenja) (preuzeto i modifikovano iz Hermans i sar., 2007).

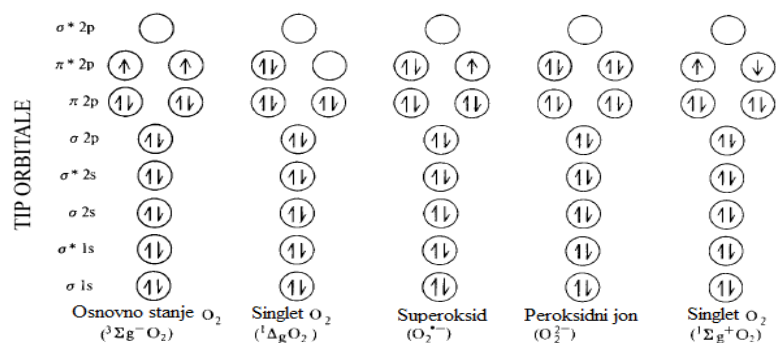
Slobodni radikali	Neradikalske vrste
Superoksidni anjon ($O_2^{\bullet-}$)	Vodonik peroksid (H_2O_2)
Hidroksil (HO^{\bullet})	Singlet kiseonik ($^1\Delta_g O_2$)
Hidroperoksil (HO_2^{\bullet})	Hipohlorna kiselina ($HOCl$)
Peroksil (RO_2^{\bullet})	Ozon (O_3)
Alkoksil (RO^{\bullet})	Azotasta kiselina (HNO_2)
Azot monoksid (NO^{\bullet})	Peroksinitrit ($ONOO^{\bullet}$)
Azot dioksid (NO_2^{\bullet})	Peroksinitritna kiselina ($ONOOH$)
	Alkil peroksinitrit ($ROONO$)

Oksidativni stres se dešava kada se poremeti balans između koncentracije ROS i antioksidanata, slika 2.16.



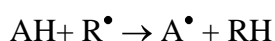
Slika 2.16. Oksidativna ravnoteža između prooksidanata (ROS) i antioksidanata. (preuzeto i modificirano iz Hermans i sar., 2007).

Slobodni radikali su različite vrste molekula, atoma ili jona koji sadrže jedan ili više nesparenih elektrona i u tom obliku mogu da egzistiraju samostalno (Halliwell, 2006). U nastojanju da postignu stabilnu elektronsku konfiguraciju sparivanjem nesparenih elektrona, pokazuju veliku reaktivnost prema drugim molekulima. Međutim, postoji značajna razlika u njihovoj reaktivnosti i stabilnosti. Superoksidni anjon radikal ($O_2^{\bullet-}$) reaguje veoma brzo, dok je hidoksil radikal (HO^{\bullet}) nestabilan i reaguje na mestu gde se formira. Peroksil (ROO^{\bullet}) i alkoksil radikali (RO^{\bullet}) su po reaktivnosti negde između ova dva. Pored navedenih slobodnih radikala treba istaći da i sam kiseonik, O_2 ubrajamo u slobodne radikale (Halliwell, 2006) jer sadrži dva (slobodan elektronski par) nesparena elektrona (paralelnog spina) u poslednjoj elektronskoj orbitali koju popunjava. U ovom obliku molekul kiseonika je najstabilniji i takav se nalazi u atmosferi ali takođe predstavlja i potentni oksidujući agens. Najreaktivniji oblik kiseonika je singlet kiseonik 1O_2 koji ima sposobnost direktne oksidacije proteina, DNK i lipida a ustvari ne predstavlja slobodni radikal jer nema nesparenih elektrona (slika 2.17).



Slika 2.17. Pojednostavljeni prikaz popunjavanja orbitala kod različitih molekula kiseonika (Halliwell, 2006).

Slabiji radikal od navedena dva oblika kiseonika je superoksidni radikal $O_2^{\bullet-}$, koji sadrži jedan nesparen elektron. Mitohondrije preuzimaju kiseonik i više od 95% O_2 se prevodi u vodu, pomoću membranskog enzima citohrom oksidaze. Istovremeno u mitohondrijskom elektron transportnom lancu (u biljkama u hloroplastima) formira se najveća količina superoksidnog radikala. Osnovni koncept kojim antioksidant (AH) ispoljava svoju antiradikalnu aktivnost je redoks reakcija koja uključuje otpuštanje jednog elektrona i njegov prelazak na radikalnu vrstu, što je sumarno prikazano sledećom reakcijom:



Da bi delovao kao antioksidant u reakciji sa radikalom, AH mora da da proizvod koji je mnogo stabilniji i manje štetan od jedinjenja sa kojim je reagovao. Ovo je slučaj sa vitaminom C koji deluje kao antioksidant. Sa druge strane vitamin E pokazuje i prooksidativno i antioksidativno delovanje. Antioksidativno u sprečavanju lipidne peroksidacije a prooksidativno delovanjem na LDL čestice. Iako su oksidacione reakcije ključne za život, mogu biti i štetne, zbog čega biljke i životinje održavaju kompleksan antioksidativni sistem, koji se sastoji od više tipova antioksidanata, poput glutaciona, vitamina C i E, antioksidativnih enzima katalaze, superoksid dismutase i različitih peroksidaza.

Nizak nivo antioksidanata ili nizak nivo antioksidativnih enzima, prouzrokuje oksidativni stres koji može oštetiti ćelije (Partap i Pandey, 2012). Oksidativni stres se

dovodi u vezu sa starenjem, kao i mnogim patološkim stanjima, poput ateroskleroze, dijabetesa i kancera (Hermans i sar., 2007). Antioksidanti deluju tako što uklanjaju slobodne radikale i neradikalske oksidante, imaju sposobnost da inhibiraju stvaranje oksidanata ili indukuju njihovu proizvodnju. Vitamin C deluje kao antioksidant koji eliminiše slobodne radikale, dok katalaza i tioli uklanjaju neradikalske oksidante, H_2O_2 i HOCl. Metalni helatori inhibiraju stvaranje oksidanata, a izotiocijanati indukuju njihovu proizvodnju.

Brojna istraživanja su usmerena na proučavanje antioksidativnih efekata namirnica ili suplemenata koji se koriste u svakodnevnoj ishrani, da bi se pronašla jedinjenja koja mogu sprečiti ili usporiti efekte antioksidativnog stresa. U tu grupu spadaju i biljni ekstrakti, pošto sadrže veliku količinu različitih klasa jedinjenja od kojih mnoga poseduju antioksidativnu aktivnost. Biljke kao odgovor na abiotički i biotički stres produkuju efikasni sistem odbrane od ROS-a koji se sastoji iz enzimskih i neenzimskih antioksidanata. Enzimski sistem odbrane uključuje SOD, CAT, GP i GR enzime, dok se neenzimski sastoji iz niskomolekulskih antioksidanata (vitamin C, glutation, fenolne kiseline, flavonoidi) i visokomolekulskih vrsta, kao što su tanini (Kasote i sar., 2015). Poslednje dve navedene grupe jedinjenja su ustvari sekundarni metaboliti biljaka, koji predstavljaju odličan izvor antioksidativnih jedinjenja. Ukoliko sadrže azotov atom, radi se o alkaloidima, a ukoliko ga nemaju u svojoj strukturi pripadaju ili terpenima ili polifenolima. Oko 20% biljnih vrsta akumulira alkaloidne, međutim u *in vitro* studijama, takva jedinjenja nisu pokazala visok stepen antioksidativne aktivnosti.

Terpenoidi koji takođe obuhvataju veliki broj različitih jedinjenja (monoterpeni, seskviterpeni i diterpeni) ispoljavaju značajan stepen antioksidativne aktivnosti. Tetraterpeni i karoteonidi su posebno aktivni antioksidanti, ali beta karoten može pokazivati i prooksidativne efekte pri visokoj koncentraciji i pri visokom parcijalnom pritisku O_2 . Najzad, fenolni antioksidanti predstavljaju najvažniju grupu antioksidativnih jedinjenja ne samo u *in vitro* već i u *in vivo* ispitivanjima. Biljne polifenole možemo svrstati u pet glavnih grupa: fenolne kiseline, flavonoidi, lignani, stilbeni i tanini (Duthie i sar., 2000; Blokhina i sar., 2003). Smatra se da antioksidativni kapacitet polifenola raste sa brojem slobodnih hidroksilnih grupa i stepena konjugacije bočnih lanaca za aromatični prsten. Nekoliko različitih *in vitro* eseja se koristi za

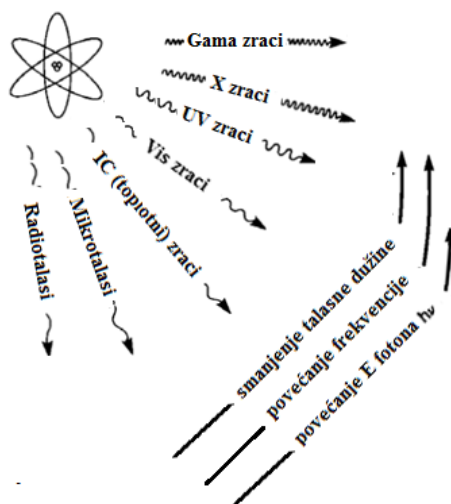
ispitivanje antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata. Ovim eksperimentim se određuju: redukujuća sposobnost ekstrakata ili pojedinačnih konstituenata, zatim sposobnost otpuštanja vodonika, reakcije sa singlet kiseonikom i/ili metalnim helatorima. Na osnovu navedenog, antioksidanti mogu biti primarni (donori vodonikovog atoma) i sekundarni koji vezujući metalne jone sprečavajući oksidativne procese koje metalni joni katalizuju. Sekundarni antioksidanti deluju posredno, na primer, apsorbujući UV zrake, inhibirajući enzime i razgrađujući H_2O_2 (Kasote, 2013). Testovi za njihovo određivanje mogu detektovati prelasku vodonika ili elektrona ili oba. Tako na primer, FRAP esej (feri redukujući antioksidativni kapacitet) detektuje prelazak elektrona, dok ABTS i DPPH detektuju i transfere vodonika i elektrona. Najzad, kada razmatramo delovanje biljnih antioksidanata u ljudskom telu, moramo uzeti u obzir i njihovu apsorpciju, metabolizam, skladištenje i ekskreciju.

2.7. Radioprotektivna i antiproliferativna aktivnost

Živi organizmi su kontinuirano izloženi jonizujućem zračenju iz brojnih prirodnih izvora. Pored prirodnih izvora, jonizujuće zračenje je rezultat i ljudske aktivnosti i medicinske prakse. Ipak više od 90% izloženosti radijaciji potiče od prirodnih izvora, kao što su kosmički talasi, zemljište, stene koje u sebi sadrže radionuklide, zatim hrana, voda kao i ljudsko telo, koje predstavlja takođe izvor jonizujućeg zračenja. Otprilike polovina ovog prirodnog zračenja potiče od radona, radioaktivnog gasa, prisutnog svuda na Zemlji, koji konstantno izlazi iz tla i uvek je prisutan u vazduhu. Radijacija kao rezultat ljudske aktivnosti uglavnom potiče od upotrebe radijacije i radioizotopa u medicinske svrhe ali i u nekim industrijskim uslovima, gde su u upotrebi izvori zračenja. Korišćenje jonizujućeg zračenja u dijagnostici i terapiji je sve više zastupljeno u medicinskoj praksi (IAEA, 2010).

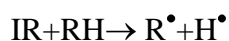
Biološki efekti jonizujućeg zračenja mogu biti direktni i indirektni. Kod direktnih efekata jonizujućeg zračenja (alfa i beta zračenje) čestice imaju dovoljno veliku kinetičku energiju da naruše atomsku strukturu medijuma koji ga apsorbuje. Pri tome dolazi do hemijskog i biološkog oštećenja molekula, odnosno ćelija koje su apsorbovale ovakvu vrstu zračenja. Druga vrsta zračenja, rendgensko ili X-zračenje, kao i γ - zračenje su indirektno jonizujuća zračenja jer indukuju stvaranje sekundarnih elektrona, nakon

što ih materijal apsorbuje. U grupu nejonizujućih (elektromagnetnih) zračenja, pored rendgenskog i γ - zračenja ubrajamo: ultraljubičasto (UV), vidljivu svetlost (Vis) infracrveno (IC), radio talase i mikrotalase (IAEA, 2010). Bez obzira na izvor i vrstu zračenja sva elektromagnetna zračenja predstavljaju elektromagnetni spektar različitih frekvencija, talasne dužine i energije fotona, slika 2.18.

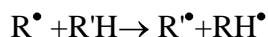


Slika 2.18. Vrste elektromagnetnog zračenja (preuzeto i modifikovano iz Hall i Giaccia, 2006).

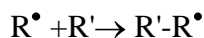
Prolaskom kroz materiju, jonizujuće zračenje postepeno gubi energiju interagujući sa njom. Brzina gubitka energije zavisi od tipa energije i radijacije kao i od gustine materijala. Gustina kojom se energija raspodeljuje u tkivu naziva se linearni energetska transfer (LET) radijacije. Na osnovu ovog parametra X- i γ - zračenje spadaju u zračenja sa niskim LET indeksom. Fizičke interakcije jonizujućeg zračenja sa tkivom izazivaju proizvodnju produkata jonizacije i ekscitaciju molekula koji se mogu konvertovati u slobodne radikale, u kratkom vremenskom periodu od nekoliko piko do femto sekundi. Stvoreni radikali dalje reaguju sa DNK molekulima ili lipidima, kod kojih pokreću lančanu reakciju, lipidne peroksidacije (IAEA, 2010). Ako deluju direktno na molekule od biološke važnosti, radi se o direktnim efektima zračenja, pri čemu se mogu dobiti, ukoliko se radi o ugljenovodonicima (masne kiseline) dva različita radiakala, prema reakciji:



Oba stvorena radikala mogu reagovati sa drugim molekulima, DNK, proteinima, lipidima, prema reakciji:

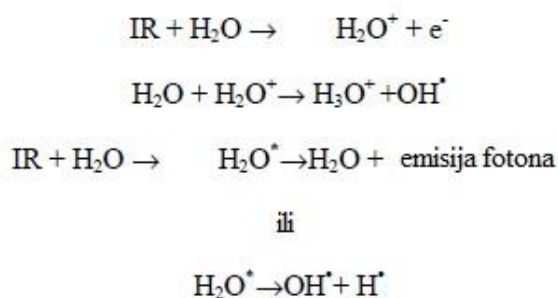


A takođe mogu pokrenuti i lančanu reakciju:



Procenjuje se da je oko trećina bioloških oštećenja koja potiču od γ - zračenja izazvano direktnim efektima.

Indirektni efekti jonizujućeg zračenja nastaju radiolizom vode. Naime na svom putu kroz tkiva i ćelije, jonizujuće zračenje najviše interaguje sa vodom jer nje u živim sistemima ima najviše, oko 80% ukupne mase. Radioliza vode obuhvata seriju kompleksnih hemijskih reakcija. U interakciji sa vodom, dolazi do formiranja niza međuprodukata, kratkoživećih radikal katjona poput H_2O^+ , brzih elektrona i ekscitovanih molekula vode. Pri ovim reakcijama se stvara već pomenuti hidroksil radikal OH^{\bullet} koji je vrlo reaktivan. Stvaranje hidroksil radikala radiolizom vode prikazano je sledećim nizom hemijskih reakcija (IAEA, 2010):



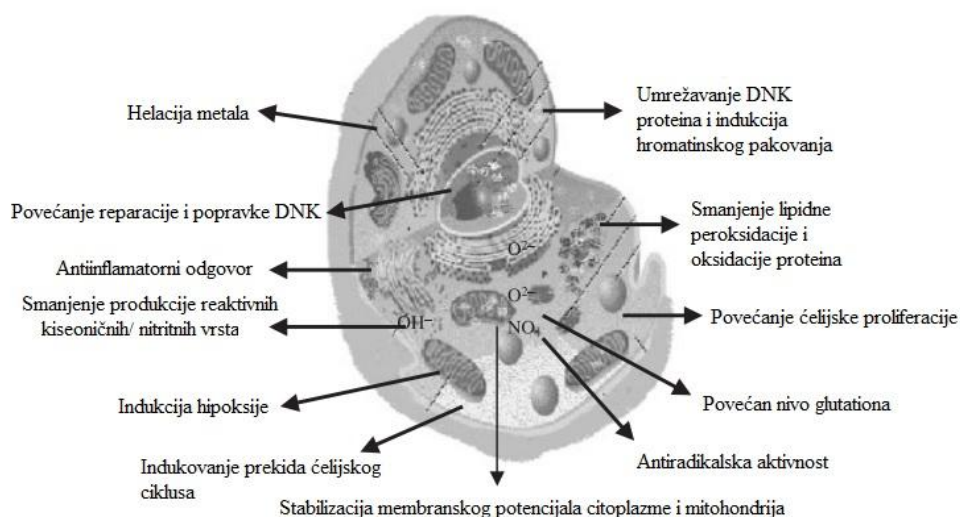
Radiolizom vode nastaju i termalizovani elektroni, koji se solvativuju molekulima vode formirajući e^-_{aq} . U ovom obliku solvativovani elektroni predstavljaju najjače redukujuće vrste na pH 7. U oksigenisanim rastvorima oni se konvertuju do superoksid radikala i na kraju do hidroksiperoksid slobodnih radikala (HO_2^{\bullet}).

Efekti jonizujućeg zračenja obuhvataju oštećenja na DNK, poput jednolančanih prekida fosfodiesterских veza, zatim dvolančanih, umrežavanja između proteina i DNK kao i između samih proteina. Doza od 1 do 2 Gy u najvećoj meri dovodi do oštećenja nukleotidnih baza (više od 1000), zatim do jednolančanih prekida (oko 1000) i dvolančanih (oko 40). Utvrđeno je da je broj dvolančanih prekida DNK u direktnoj srazmeri sa radiosenzitivnošću ćelije i preživljavanju pri malim dozama zračenja

(IAEA, 2010). Radijacija dovodi do smrti ćelije ukoliko dođe do narušavanja njenog reproduktivnog integriteta, mehanizmima kao što su: apoptoza, nekroza, mitotička katastrofa i indukovano ćelijsko starenje. Niske doze zračenja mogu da pokrenu apoptozu u limfocitima, ćelijama pljuvačne žlezde, zatim u nekim ćelijama koje čine zonu matičnih ćelija u testisima i intestinalnih kripti. Ćelije kod kojih dolazi do grešaka prilikom deobe, nakon zračenja takođe prolaze kroz process apoptoze. Apoptoza se može detektovati (mikroskopski i pomoću protočnog citometra) na osnovu karakterističnog skraćivanja ćelijske morfologije, kondenzacije hromatina, bubrenja ćelijske membrane, aktivacije kaspaza i otpuštanja citohroma C. Ekstraćelijska izloženost fosfatidil serina na ćelijskoj membrane ćelija u apoptozi omogućava vezivanje aneksina V i ispitivanje apoptoze protočnom citometrijom.

Nakon izlaganja ćelija visokim dozama zračenja dolazi do aktivacije nekroze. Kod ćelija koje imaju visok stepen ćelijske proliferacije, može doći i do mitotičke katastrofe. Još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno da li apoptoza prouzrokuje smrt tumorskih ćelija nakon njihovog izlaganja jonizujućem zračenju prilikom medicinske terapije.

Razvoj novih i efektivnih radioprotektora je od velikog značaja kada se uzme u obzir sve veća upotreba zračenja u medicini (radioterapija) kao i u neplaniranim akcidentnim situacijama. U ovom slučaju, biljke i njihovi konstituenti imaju važnu ulogu jer se očekuje da biljke sa antioksidativnim i antimikrobnim potencijalom, koje se koriste za lečenje bolesti poput reumatoidnog artritisa, ateroskleroze i drugih inflamatornih bolesti mogu biti i uspešni radioprotektori. Utvrđeno je da veliki broj ispitivanih biljaka poseduje radioprotektivnu aktivnost (Arora i sar., 2005). Mehanizam kojim biljni proizvodi ispoljavaju svoju radioprotektivnu aktivnost prikazana je na slici 2.19.



Slika 2.19. Mogući mehanizmi radioprotektivnog delovanja biljnih konstituenata u ćeliji nakon izlaganja jonizujućem zračenju (preuzeto i modifikovano iz Arora i sar., 2005).

2.8. Antimikrobna aktivnost ekstrakata lincure

Dosadašnja saznanja o antimikrobnoj aktivnosti ekstrakata korena lincure zasnivaju se na antibakterijskom delovanju prema sledećim bakterijskim vrstama: *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus* (96% EtOH ekstrakt) zatim *Helicobacter pylori* (MeOH ekstrakt) u opsegu MIC koncentracija od 3,1 od 100 µg/mL i *Streptococcus pneumoniae* u *in vivo* eksperimentima izvedenim na miševima. (Menković i sar., 1999; WHO, 2001; Mahady i sar., 2005; Stierna i sar., 2005). U poslednje navedenom slučaju ispitivan je 50% EtOH ekstrakt korena lincure a dobijena antimikrobna aktivnost može se uporediti sa delovanjem ampicilina. Dobijeni rezultati su važni zbog mogućeg tretmana bakterijskih infekcija gornjih respiratornih puteva izazvanih Gram pozitivnim bakterijama iz grupe streptokoka a posebno meticilin rezistentih sojeva poput *Staphylococcus aureus* NCTC 11940 (Stierna i sar., 2005). Preparat Sinupret, koji se sa uspehom koristi za tretman navedenih infekcija kao jedan od sastojaka sadrži sprášeni koren lincure. Ekstrakti (MeOH) nadzemnih delova lincure

(lišća i cvetova) takođe poseduju antimikrobno delovanje, prema sledećim bakterijskim vrstama i sojevima prikazanim u tabeli 2.2 (Šavikin i sar., 2009).

Tabela 2.2. Antimikrobna aktivnost izražena u MIC vrednostima u mg/mL ekstrakata lincure i odabranih konsituenata (Šavikin i sar., 2009).

Mikroorganizam	Ekstrakt 1	Ekstrakt 2	MG	IG	GP	Streptomicin (nistatin*)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6051	0,12	0,19	0,27	0,19	0,19	0,0052
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	0,31	0,31	0,31	0,22	0,27	0,016
<i>Micrococcus flavus</i> ATCC 10786	0,31	0,22	0,22	0,22	0,27	0,0052
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	0,15	0,19	0,20	0,15	0,31	0,016
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 14273	0,12	0,19	0,20	0,19	0,19	0,0052
<i>Sarcina lutea</i> ATCC 10054	0,27	0,19	0,31	0,31	0,22	0,038
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25932	0,15	0,22	0,31	0,22	0,15	0,0052
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0,12	0,19	0,27	0,22	0,22	0,0052
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 12952	0,27	0,22	0,22	0,19	0,19	0,027
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	0,15	0,19	0,20	0,15	0,12	0,0052
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13883	0,22	0,27	0,27	0,31	0,19	0,038
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,12	0,27	0,27	0,15	0,22	0,016
<i>Pseudomonas tolaasii</i> NCTC 387	0,27	0,27	0,27	0,31	0,22	0,027
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	0,15	0,19	0,22	0,19	0,15	0,038
<i>Salmonella enteridis</i> ATCC 13076	0,19	0,15	0,22	0,19	0,19	0,016
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,12	0,22	0,31	0,27	0,27	0,0052*

*Ekstrakt 1, predstavlja metanolni ekstrakt lišća a ekstrakt 2, MeOH ekstrakt cvetova, dok je MG- mangiferin, IG-izogentizin i GP- genciopikrozid.

Ekstrakti lincure pokazuju takođe i antifungalnu aktivnost prema: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinera*, *Fusarium oxysporum* i *Penicillium digitatum* u *in vitro* uslovima. Navedenu antifungalnu aktivnost ispoljava vodeni

ekstrakt korena lincure u koncentraciji od 500 mg/mL (WHO, 2001). Kada je reč o pojedinačnim konstituentima, pored ksantona: mangiferina i izogentizina i sekoiridoida genciopikrozida u literaturi se navodi i antimikrobna aktivnost druga dva sekoiridoida: svertiamarina i sverozida, tabela 2.3. Ekstrakti *Gentiana* koji potiču od drugih vrsta iz ove familije, poput *G. asclepiadea* i *G. kurroo* royle takođe pokazuju širok spektar antimikrobnog delovanja. Etarsko ulje *G. asclepiadea* ispoljava antimikrobnu aktivnost uporedivu sa antibiotikom amracinom, prema *E. coli*, *S. aureus* (FSB 30), *M. lysodeikticus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *B.suptylis* i nešto slabije antifungalno delovanje u poređenju sa nistatinom prema *C. albicans*. Vrednosti za MIC u navedenom slučaju su u opsegu od 0,6 do 5 µg/mL (Mihailović i sar., 2011). Metanolni ekstrakti korena i listova *G. kurroo* pokazuju antimikrobnu aktivnost prema *S. faecalis* i *P. mirabilis* sa MIC vrednostima od 270 do 290 µg/mL (streptomycin oko 50 i 25 µg/mL) kao i prema *Salmonella enteritidis*, MIC= 900 µg/mL (streptomycin 20 µg/mL) (Baba i sar., 2014).

Tabela 2.3. Antibakterijska aktivnost: (1) svertiamarina i (2) sverozida (Kumarasamy i sar., 2003).

Bakterijska vrsta	MIC (mg/mL)		
	Ciprofloksacin	1	2
<i>Bacillus cereus</i> 9689 ^a	2,5x10 ⁻⁸	2x10 ⁻²	2x10 ⁻²
<i>Bacillus subtilis</i> 7801 ^a	2,5x10 ⁻⁶	2x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹
<i>Citrobacter freundii</i> 9750 ^a	2,5x10 ⁻⁷	2x10 ⁻³	2x10 ⁻²
<i>Escherichia coli</i> 8110 ^a	2,5x10 ⁻⁷	2x10 ⁻¹	2x10 ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> 11954 ^a	2,5x10 ⁻⁶	-	-
<i>Klebsiella aeruginosa</i> 9689 ^a	2,5x10 ⁻⁶	-	-
<i>Proteus mirabilis</i> 60 ^a	2,5x10 ⁻¹⁰	2x10 ⁻¹	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 9689 ^a	2,5x10 ⁻⁸	-	-
<i>Salmonella goldcoast</i> 13175 ^a	2,5x10 ⁻⁶	-	-
<i>Serratia marcescens</i> 1377 ^a	2,5x10 ⁻⁶	2x10 ⁻²	-
<i>S. aureus</i> 10788 ^b	2,5x10 ⁻⁸	-	-
<i>S. aureus</i> (MRSA) 11940 ^b	2,5x10 ⁻⁵	-	-
<i>Staphylococcus epidermedis</i> 8558 ^a	2,5x10 ⁻⁸	-	2x10 ⁻¹
<i>Staphylococcus hominis</i> 11320 ^a	2,5x10 ⁻⁷	-	-

(-) bez inhibicije rasta pri testiranim koncentracijama, a-NCTC, b-ATCC

Antimikrobna ispitivanja u ovom radu su bila usmerena pre svega na fitopatogene plesni iz roda *Fusarium* i *Aspergillus*. Iz roda *Fusarium* odabrane su vrste: *graminearum*, *verticilloides* i *proliferatum* a vrste iz roda *Aspergillus*: *flavus* i *niger*.

Pronalaženje novih antimikotika prema navedenim vrstama je neobično važno je su oni najčešći uzročnici bolesti kod velikog broja industrijski važnih biljaka, koje se koriste u ishrani životinja i čoveka. *F. proliferatum* proizvodi velike količine fumonizina, mikotoksina poliketidnog tipa. Ovo jedinjenje ispoljava toksično delovanje i kod životinja i kod ljudi zbog inhibitornog delovanja na metabolizam sfingolipida (Stepien i sar., 2011). Pored aspergiloze, druga najčešća gljivična infekcija kod pacijenata sa hematološkim malignitetima je fuzarioza, oportunistička infekcija kod osoba sa oslabljenim imunitetom. Izazvana je najčešće sa *F. proliferatum* a problem predstavlja njena rezistentnost prema većini antifungalnih lekova (Ricna i sar, 2016). Važnost pronalaženja fungicida u slučaju *F. graminearum* je zbog bolesti koje izaziva na pšenici, poput paleži klasa pšenice (fuzarioza klasa), truleži korena, stabljike i semena. Takođe, *F. graminearum* Schwabe kao i *F. verticillioides* predstavljaju dve najvažnije patogene vrste koje izazivaju trulež korena, stabla i klipa kukuruza (Tančić i sar., 2009).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Oprema

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu ekstrakata korišćeni su tečni hromatograf ultra performansi-Waters ACQUITY Ultra Performance Liquide Chromatography (UPLC) sa Photo Diode Array (PDA) detektorom, zatim masenim detektorom-ACQUITY Tandem Mass Quadrupole Detector (TQD) sa elektrosprej jonizacijom (ESI), hemijskom jonizacijom na atmosferskom pritisku (APCI) i probom za čvrste uzorke-Atmospheric Solids Analysis Probe (ASAP) za jonizaciju čvrstih i tečnih uzoraka na atmosferskom pritisku. MALDI-TOF maseni spektrometar -Voyager Biospectrometry DE Pro Workstation (PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, SAD) je opremljen sa 20 Hz pulsnim azotovim laserom, talasne dužine 337nm. Ciklična voltometrija je izvedena na Gamry PCI-4/750 sistemu (Gamry, SAD), spektrofotometrijska merenja na UV/Vis spektrofotometru Lambda 35 (Perkin Elmer, SAD) i Wallac Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer Life Science, Waltham, MA, SAD). Merenja pH su vršena na uređaju Hanna HI 2209. Mikroskopija atomskih sila AFM (Atomic force microscope) Quesant-Scope Universal Scanning (Ambios Technology, USA) je korišćena za praćenje morfoloških promena ozračenih i neozračenih leukocita pre i nakon tretmana konstituentima lincure. Purite Select Fusion system je korišćen za proizvodnju dejonizovane vode.

3.2. Hemikalije

Za pripremu standardnih rastvora konstituenata lincure, rastvora za enzimске eseje, ekstrakcije i za pripremu mobilnih faza za tečnu hromatografiju korišćena je dejonizovana voda (18 MΩ kvaliteta) i rastvarači HPLC i *p.a.* kvaliteta. Korišćeni rastvarači HPLC kvaliteta su: metanol, acetonitril, mravlja i fosforna kiselina- J.T. Baker (Deventer, Holandija), trifluorsirćetna kiselina (TFA)- Fluka Chemie AG Buchs (St. Louis, SAD); zatim *p.a.* kvaliteta: etil alkohol- Zorka Pharma (Šabac, Srbija), metanol i dietil etar- Chemicals VWR BDH Prolabo (Leuven, Belgium). Ostale korišćene hemikalije su: NaH₂PO₄- Merck-Alcaloid (Skopje, Makedonija), Na₂HPO₄ - Chemicals VWR (Leuven, Belgium), Folin-Ciocalteu reagens-AppliChem-Biochemica

(Darmstadt, Nemačka), tris hidroklorid-Serva (Heidelberg, Germany) i 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) -Fluka Chemie AG Buchs (St. Louis, SAD). Galna kiselina, magnezijum hlorid, *o*-dianizidin dihidroklorid, acetilholinjodid (AChI) i 5,5'-ditio-bis-(2-nitro-benzoeva kiselina) DTNB-Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD) i reagens malahit zeleno (POMG-25H) - BioAssay System (Hayward, CA, SAD). Konstituenti lincure korišćeni u eksperimentima su: genciopicrozid (5-Ethenyl-6-(β -D-glucopyranosyloxy)-5,6-dihydro-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-*c*] pyran-1-one), amarogentin (2-4a*S*-(4a α ,5 β ,6 α))-3,3',5-Trihydroxy-(1,1'-biphenyl)-2-carboxylate), izoviteksin (6- β -D-Glucopyranosyl-5,7-dyxidroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4*H*-1-benzopyran-4-one) proizvođača ChromaDex (Irvine, SAD). Loganska kiselina (1 α -(β -D-Glucopyranosyloxy)-6 α -hydroxy-7 α -methyl-1,4a,5,6,7,7a-hexahydrocyclopenta [c] pyran-4-carboxylic acid) proizvođača Extrasynthese (Genay, Francuska). Izogentisin (1,3-Dihydroxy-7-methoxy-9*H*-xanthen-9-one), sverosid ((4a*S*,5*R*,6*S*)-1-Oxo-5-vinyl-4,4a,5,6-tetrahydro-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-*c*]pyran-6-yl β -D-glucopyranoside) i svertiamarin ((4a*R*,5*R*,6*S*)-4a-Hydroxy-1-oxo-5-vinyl-4,4a,5,6-tetrahydro-1*H*,3*H*-pyrano[3,4-*c*]pyran-6-yl β -D-glucopyranoside) proizvođača Phytolab. α -cijano-4-hidrocimetna kiselina (CHCA) i 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina (DHB), proizvođača Fluka, Sigma Aldrich, korišćene su kao matrice za MALDI-TOF.

3.2.1. Enzimi

Korišćeni su sledeći enzimi: mijeloperoksidaza (MPO) izolovana iz humanih limfocita-Planta Natural Product (Beč, Austrija), acetilholinesteraza (AChE) iz električne jegulje proizvođača Sigma-Aldrich (St. Louis, SAD). Plazmine membrane sinaptozoma (SPM) izolovane iz mozga pacova, korišćene su kao izvor E-NTPDaza (Mg^{2+} ATPaza).

3.2.2. Mikronukleusni (MN) test, indeks proliferacije (IP) i apoptoza

Uzorci krvi dobijeni su od zdravih donora, starosti od 35 do 40 godina. Za kultivaciju ćelijske kulture korišćen je Pmax (Invitrogen-Gibco, Paisley, Velika Britanija). Za izolovanje limfocita korišćen je limfoprep (Capricorn). Citohalazin B

(Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) zatim McCarnoy fiksativ i Gimza (Merck) su korišćeni za analizu i pripremu MN.

3.2.3. Mikroorganizmi za određivanje antifungalnog dejstva

Za određivanje antimikrobne aktivnosti odabrane su fitopatogene plesni, koje predstavljaju prirodne izolate nekoliko sojeva *Fusarium* i *Aspergillus flavus* 4008/2-1. Plesni koje su korišćene za određivanje antifungalne aktivnosti su dobijene iz kolekcije mikroorganizama Instituta za kukuruz, zahvaljujući dr Jeleni Lević, naučnom savetniku Instituta za kukuruz u Zemun polju. Pored navednih korišćen je i *Aspergillus niger* iz kolekcije TMF fakulteta. Vrste i sojevi *Fusarium* korišćeni u ovom radu su: *graminearum* 4009/6-1, *verticilloides* 4011/4-1 i *proliferatum* 4016/8-1. Podloge korišćene za kultivaciju plesni kao i za određivanje antifungalne aktivnosti ekstrakata su sladni agar (Torlak, Beograd) i Saborou Dextrose agar (Oxoid, UK) a kao pozitivna kontrola korišćen je antimikotik aktidion (Fluka).

3.3. Priprema ekstrakata

Koren lincure korišćen za pravljenje ekstrakata *G. lutea* je komercijalni proizvod Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ u Beogradu. Koren se najpre samelje u mlinu a zatim ekstrahuje vodenim, zakišljenim vodenim, metanolnim, etanolnim, etarskim i etanolno-vodenim rastvaračima (sa različitim zapreminskim udelom etil alkohola u vodi) u odnosu 1:20 (w/v). Vodeni ekstrakt je pripremljen kuvanjem 10 g samlevenog korena lincure u 200 mL vode, u ključalom vodenom kupatilu uz mešanje. Ekstrakt je dobijen ceđenjem dobijene suspenzije kroz filter papir (Whatman 589/1, Sigma Aldrich) preko bihnerovog levka, na vodenom vakuumu. Alternativno je korišćeno centrifugiranje na 3000 rpm, nakon čega je supernatant odvojen od taloga dekantovanjem. Ekstrakcija ostalim rastvaračima je izvedena na sobnoj temperaturi, uz prethodnu sonifikaciju u trajanju od 10 minuta, u balonima sa šlifovanim zatvaračima, uz povremeno mućkanje, u trajanju od 48h. Ekstrakt je odvajan od taloga na isti način kao što je opisano za vodeni ekstrakt. Ekstrakti su zatim upareni do suvog ostatka na vakuum uparivaču (Buchi R-210) na različitim temperaturama i

sniženom pritisku, od sobne temperature za etarski ekstrakt, do 60°C za vodeni ekstrakt. Ostali ekstrakti su uparavani na temperaturi od 40°C. Takođe, vodeni ekstrakt je u nekim slučajevima uparen liofilizacijom. Nakon uparavanja, uzorci su preneti u odgovarajuće vijale (staklene sa teflonskim-PTFE zatvaračima) i određen im je procenat suve supstance sušenjem u ustaljenim vegeglasima na 105 °C, do konstantne mase. Rastvarači korišćeni za ekstrakcije su: dejonizovana voda, 4% sirćetna kiselina u dejonizovanoj vodi (v/v), zatim 100% metanol, 100% dietil etar i 25, 50, 75 i 96% vodeni rastvori etil alkohola u vodi (v/v).

3.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza ekstrakata korena lincure

3.4.1. UPLC-TQD analiza ekstrakata

Za razdvajanje i identifikaciju pojedinačnih komponenti ekstrakata lincure korišćen je UPLC sa PDA i TQD detektorom i kolonama: Acquity UPLCTM BEH C18 (1.7 µm, 100 mm x 2.1 mm), Synergi Polar RP (2.5 µm, 100 mm x 2.1 mm) – Phenomenex i DB PAH pinnacale (1.9 µm 100 mm x 2.1 mm)- Restek. Razdvajanje je vršeno u gradijentu, sa nekoliko različitih kombinacija mobilnih faza gde je kao rastvarač A korišćen: TFA (0,1% u dejonizovanoj vodi, v/v) zatim mravlja kiselina u istoj koncentraciji kao i smeša mravlje i glacijalna sirćetna kiselina u vodi (0,9:0,1; v/v). Kao druga mobilna faza (rastvarač) korišćen je acetonitril (100%) ili smeša acetonitrila i metanola (85:15, v/v) kao i smeša acetonitrila i 2-propanola (50:50, v/v). Takođe za potebe LC/MS hromatografije kao B faza korišćena je 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu. Sve mobilne faze su pre upotrebe profiltrirane membranskom filtracijom (0,22 µm najlonski filter, Phenomenex) a zatim degazirane u ultrazvučnom kupatilu. Gradijent koji je korišćen za eluiranje počinje sa 5% (ili 20%) mobilne faze B a završava se sa 95% B po vremenskom režimu detaljnije opisanom u odeljku 4.1, tokom 7 do 15 minuta (za standardne rastvorenata lincure, odnosno za ekstrakte korena lincure). Protok eluenta korišćen za razdvajanje je bio 0,3 mL/min, injekciona zapremina 10 µL (za PDA detekciju) odnosno 5 µL (za TQD) a temperature kolone 30°C. Hromatografsko razdvajanje je praćeno na 254, 270 i 334 nm dok su spektri na osnovu kojih je vršena identifikacija konstituenata lincure snimani u opsegu talasnih

dužina od 190 do 500 nm. Za integraljenje i spektralnu analizu korišćen je softver Empower 2.0 i MassLynx NT 4.1.

Ekstrakti su rastvarani u vodi (vodeni i kiseli) ili metanolu (metanolni i alkoholno-vodeni) u opsegu koncentracija od 0,1 mg/mL do 10 mg/mL. Prethodno im je određen procenat suve supstance a nakon kompletnog rastvaranja profiltrovani su kroz membranski filter 0,22 μm (najlon, Phenomenex). Rastvori konstituenata lincure, odnosno loganske kiseline, svertiamarina, genciopikrozida, sverozida, izoviteksina, amarogentina i izogentizina su pripremani rastvaranjem u metanolu u koncentracionom opsegu od 0,002 mg/mL do 0,1 mg/mL. Pre analize na masenom detektoru-TQD, izvršena je optimizacija uslova pod kojima se pojedinačni konstituenti najbolje jonizuju, primenom ESI u pozitivnom i negativnom modu. Prilikom optimizacije korišćen je injektor sa protokom od 10-25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Temperatura jonskog izvora je varirana od 120 do 150°C, dok je temperature desolvacionog gasa (azota) varirana u opsegu od 200 do 350°C, pri protoku od 550 do 750 L/h. Napon na kapilari je variran od 3,0 do 4,5 kV, a napon na konusu je variran u opsegu od 24 do 60V. Prilikom upotrebe ASAP probe za čvrste uzorke, umesto napona na kapilari pored navedenih parametara, variran je napon na koroni u opsegu od 3,5 do 4,6 kV. Čvrsti uzorci su nanošeni na vrh staklene kapilare sa zatopljenim vrhom, prethodno izarene na 500°C u jonizacionoj komori. ASAP tehnikom su takođe analizirani tečni uzorci, umakanjem vrha kapilare u uzorak standardnih jedinjenja ili ekstrakata, bez prethodnog razdvajanja na koloni, tečnom hromatografijom. Za analizu podataka dobijenih masenom spektrometrijom korišćen je softver Masslynx NT 4.1. Opseg masa koje su praćene masenom spektroskopijom su od 50 do 1000 Da, a opseg samog instrumenta je od 10 do 2048 Da.

3.4.2. LC/MS-TOF i MALDI-TOF analiza ekstrakata

Odabrani ekstrakti su analizirani i tečno masenom hromatografijom-LC/MS opremljene sa TOF-om (tečni hromatograf Agilent Technologies 1200 Series, opremljen degaserom, autosamplerom, termostatiranim kolonskim kompartmentom i DAD detektorom, povezan sa Agilent Technologies 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom). Ekstrakti i konstituenti lincure koji su analizirani MALDI-TOF tehnikom su nanošeni

na odgovarajuću zlatnu ili čeličnu pločicu, sa i bez matriksa u količinama od 0,5 do 1,5 μL , u različitim koncentracijama (kao i kod UPLC analize). Nanošenje uzorka je vršeno na nekoliko načina, odmah nakon nanetog matriksa, zatim sendvič tehnikom, gde se prvo nanosi matriks pa analit, pa ponovo matriks kao i pravljenjem premiksa, gde se pre nanošenja na pločicu analit i matriks pomešaju u ependorfu. Uzorci na MALDI-TOF masenoj spektrometriji su snimani u linearnom i reflektornom modu (pozitivnog i negativnog polariteta) sa ekstrakcionim naponom od 18 do 20kV, odloženom ekstrakcijom od 100 do 500 nsec, sa promenljivim intenzitetom lasera od 1100 do 2500. CHCA i DHB matrice korišćene u ovim eksperimentima su rastvarane u smeši voda:acetonitril:0,1% TFA= 50:50:0,1 (v/v) u koncentraciji od 10 mg/mL. Nakon nanošenja uzoraka, pločicu sa uzorcima treba osušiti ili na sobnoj temepraturi ili u struji toplog vazduha, pomoću fena. Softver korišćen za analizu podataka je DataExplorer.

3.5. Inhibicija enzima

3.5.1. Inhibicija mijeloperoksidaze (MPO)

Peroksidazna enzimaska aktivnost je praćena pomoću *o*-dianizidin eseja na $25 \pm 1^\circ\text{C}$. MPO je prečišćena do Rz (A_{430}/A_{280})= 0,84 a njena koncentracija je izračunata pomoću ekstinkcionog koeficijenta, $\epsilon_{430}=91,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ po hemu (Odajima i Yamazaki, 1970). Radni rastvor vodonik peroksida je pravljen svakodnevnim razblaživanjem 30% (w/v) koncentrovanog rastvora i koncentracija je određivana spektrofotometrijski pomoću $\epsilon_{240}=43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Inhibicija MPO je izvedena mešanjem 19 μL enzima sa 587,4 μL 50 mM fosfatnog pufera, nakon čega se dodaje 70 μL inhibitora u različitoj koncentraciji (10 mg/mL i manje) i smeša se inkubira 10 i 15 minuta. Pre isteka 10-tog minuta dodaje se 11,6 μL *o*-dianizidina a nakon isteka 10-tog odnosno 15 minuta dodaje se 12 μL vodonik peroksida, tako da finalna koncentracija bude 0,15 mM (u 700 μL reakcione smeše) i meri apsorbancija na $\lambda=460 \text{ nm}$ u toku jednog minuta. Finalna koncentracija MPO u eseju je bila 5 nM a susprata 0,53 mM. U kontrolni uzorak se dodaju sve komponente osim inhibitora, a početna količina fosfatnog pufera je 657,4 μL . Inhibicija se određuje iz nagiba prave, uz korišćenje

ekstinkcionog koeficijenta $\varepsilon_{460} = 11.3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ i/ili iz razlike apsorbancije, ΔA nakon i pre 1 minuta, podeljeno sa vremenskim intervalom u kojem se meri promena A (Bradley i sar., 1982).

3.5.2. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE)

Inhibicija AChE je određivana na osnovu modifikovane Elmanove procedure (Ellman i sar., 1961; Krstić i sar., 2007). AChE iz električne jegulje aktivnosti od 2 do 2,5 IU/mL, inkubirana je sa konstituentima lincure i ekstraktima u različitim koncentracijama, razblaženim dejonizovanim vodom, da bi se izbegao inhibitorski uticaj organskog rastvarača (uglavnom metanola) na enzim. Inkubacija je izvođena na 37°C u 50 mM tris puferu, pH=8 a ukupna zapremina reakcione smeše bila je 650 μL . Kao blank korišćen je fosfatni pufer, V=620 μL , kome se dodaje 20 μL DTNB i 10 μL supstrata, odnosno acetilholin jodida. Ukoliko uzorak značajno apsorbuje na 412 nm onda se u slepu probu dodaje i uzorak (555 μL fosfatnog pufera i 65 μL uzorka). Kontrolu čine fosfatni pufer (610 μL) enzim (10 μL) i supstrat (20 μL). Uzorci (65 μL) se dodaju u 545 μL fosfatnog pufera (pH 8, 50 mM) promešaju i nakon dodatka enzima (10 μL) čija je finalna koncentracija u eseju 0,03 do 0,038 IU/mL, inkubiraju se najmanje 20 minuta na 37° C. DTNB se dodaje pre isteka 20-tog minuta, u količini od 20 μL . Nakon preinkubacije enzima sa inhibitorom, dodaje se supstrat ACh jodid i nastavlja se inkubacija na istoj temperaturi još 8 minuta. Reakcija se zaustavlja dodatkom SDS-a u količini od 50 μL . SDS je rastvoren u vodi u koncentraciji od 10^{-2}M , supstrat AChE je rastvoren u dejonizovanoj vodi, u količini od 21,7 mg/mL, dok je 39,6 mg DTNBa pomešano sa 15 mg NaHCO_3 i zajedno su rastvoreni u 10 mL fosfatnog pufera pH=7, C=50 mM. Nakon zaustavljanja reakcije sa SDS-om, meri se apsorbancija na 412 nm a inhibicija se izračunava po sledećoj formuli:

$$I (\%) = 100 - [A_{uz} - A_{blank} / A_{kontrola} - A_{blank}] \times 100 \quad [3.1]$$

gde su I- procenat inhibicije, A_{uz} - apsorbancija uzorka na 412 nm, A_{blank} - apsorbancija blanka (slepe probe) i $A_{kontrola}$ - apsorbancija kontrole, obe na 412 nm.

3.5.3. Inhibicija Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaza (E-NTPDaza) izolovanih iz sinaptičkih plazma membrana (SPM)

Metoda za određivanje enzimске aktivnosti NTPDaze iz prečišćenih SPM izolovanih iz korteksa mozga pacova, zasnovana je na modifikovanoj metodi po Seals-u (1978) i modifikovanoj metodi Torres i saradnika (2003). Izolovanje SPM je izvedeno po ranije opisanoj metodi (Gray i sar., 1962; Nedeljković i sar., 1998).

Standardna inkubaciona smeša za ispitivanje aktivnosti enzima NTPDaze sadrži: 50 mM Tris-HCl, pH=7.4, EGTA, MgCl₂, ATP (za ispitivanje ATPazne aktivnosti) ADP (za ispitivanje ADPazne aktivnosti), zatim naznačene količine SPM i dejonizovane vode do 200 μL zapremine. Inkubacija se obavlja na temperaturi od 37°C. U inkubacionu smešu se dodaje SPM sa koncentracijom proteina od 10 μg. Finalne koncentracije navedenih jedinjenja su: 50 mM tris pufera, pH=7,4, 1 mM MgCl₂, zatim 0,1 mM ATP u ukupnoj reakcionoj zapremini od 200 μL. Preinkubacija enzima traje 5 minuta, na 37° C u termobloku ili vodenom kupatilu. Zatim se dodaje inhibitor, odnosno ekstrakti lincure, smeša konstituenata ili pojedinačnih jedinjenja i inkubira narednih 15 minuta, na istoj temperaturi. Inhibitori treba da budu rastvoreni u što manjoj količini organskog rastvarača (manje od 1%) ili u vodi, da bi se sprečio njihov inhibitorski uticaj na enzim. Nakon dodatka ATP-a, nastavlja se inkubacija još 10 minuta, na 37°C. Reakcija se prekida dodavanjem PCA (3M perhlorne kiseline) u količini od 22 μL, na ukupno 200 μL reakcione smeše i ostavlja na ledu narednih 10 minuta. Pored uzoraka, pripremaju se slepa proba i kontrola. Kao slepa proba 1 koristi se smeša tris pufera i ATP-a, čime se eliminiše uticaj spontane hidrolize ATP-a, kao slepa proba 2, koristi se pufer, ekstrakt i ATP, čime se eliminiše uticaj fosfata prisutnih u ekstraktu i oslobođenih hidrolizom ATPa. Kao slepa proba 3, koristi se pufer, ATP i enzim, da bi se eliminisao uticaj fosfata koji su vezani za enzimski preparat, obzirom da se radi o membranama a ne čistom enzimu. Kao kontrola koristi se smeša tris pufera, MgCl₂, proteina (SPM) i ATP-a. Kontrola ima 100% enzimsku aktivnost i priprema se u tirplikatu. Određivanje fosfata nastalih hidrolizom ATP-a se vrši pomoću malahit zelenog reagensa na sledeći način: radni reagens se dobija mešanjem reagensa A i

reagensa B u odnosu 100:1 (v/v) i tako pripremljen je stabilan 24h, na sobnoj temperaturi. Reagensi A i B su deo malahit zelenog fosfatnog kita POMG-25H. U bunaru mikrotitar pločice pomeša se 80 μL uzorka i 20 μL RR. Rastvor pomešati nekoliko puta, kako bi se izbacili mehurići i inkubira 30 minuta na sobnoj temepraturi. Apsorbancija se meri na spektrofotometru-čitaču pločica (plate reader Victor, na 650 nm) na A od 600 do 660 nm. Ako se detektuju fosfati (Pi) oslobođeni ATPaznom aktivnošću, koncentracija ATP-a mora biti manja od 0,025 mM. Standardna prava dobija se pripremom premiks rastora (PR) koji sadrži 40 μL 1 mM standarda fosfata u 960 μL dejonizovane vode ili pufera. Finalna koncentracija fosfata u ovom premixu je 40 μM . Od ovako pripremljenog premiksa prave se razblaženja u opsegu koncentracija od 40 (nerazblažen, 200 μL PR) do 0 μM Pi.

3.5.3.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je modifikovanom kolorimetrijskom metodom Lowry-a po Markwell-u (Markwell i sar.,1978). Modifikacija se odnosi na dodavanje SDS-a (SDS) u alkalni reagens i povećanje koncentracije bakar-tartarata, što omogućava primenu ove metode na uzorke koji sadrže saharozu i EDTA, a to je uobičajeno pri izolovanju subćelijskih frakcija (membranskih frakcija). Za ovu metodu korišćeni su sledeći reagensi: (A)-1M NaOH, (B)-4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, (C)-2% Na_2CO_3 , 0.16% Na-K-tartarat i 1% SDS, (D)-1 ml reagensa B, dopuni se do 100 ml reagensom C (pravi se neposredno pre upotrebe) i reagens (F)-Folin-Ciocalteu's fenolni reagens se razblažuje bidestilovanom vodom (biH_2O) u odnosu 1:1. Slepa proba sadrži 900 μL biH_2O , bez proteina, dok se u ostale epruvete dodaje po 10 μL rastvora proteina (SPM) i dodaje biH_2O do finalne zapremine od 900 μl . U epruvete dodati po 100 μL rastvora A, promešati i inkubirati na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon toga dodati 3 mL rastvora D, promešati i ostaviti da stoji 20 min. Po isteku ovog vremena, dodati 0,3 mL reagensa F, ponovo promešati i inkubirati na sobnoj temperaturi još 45 min, do razvijanja plave boje. Apsorbanciju meriti na $\lambda=750$ nm. Kao standard proteina (za dobijanje standardne prave) koristi se goveđi serum albumina (BSA) od koga se pripremaju serijska razblaženja.

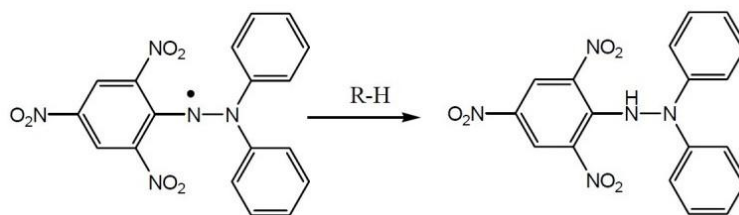
3.5.4. Predviđanje mesta vezivanja konstituenata lincure za E-NTPDazu-docking studija

Kao model sistem proteina za *docking* studiju izabrana je kristalna struktura E-NTPDaze2 iz *Rattus norvegicus*, jedina dostupna u proteinskoj banci podataka (*Protein Data Bank-PDB code: 4CD3*) (Zebisch i sar., 2014). Da bi se dobile strukture čistog proteina, molekuli vode i ostali ligandi se uklanjaju iz ove strukture. Optimizovane strukture inhibitora (izogentizina, amarogentina, genciopikrozida, izoviteksina i loganske kiseline) i ATPa su dobijene kvantno hemijskim proračunima na B3LYP/6-31G** nivou, pomoću programa Gaussian09 (Frisch i sar., 2009). Dimerna struktura izogentizina (1,3- dihidroksi-7-metoksiksanton) je uzeta iz kristalne strukture, ekstrahovane iz baze kristalnih struktura malih molekula, poznata pod imenom Kembrička baza strukturnih podataka (*Cambridge Structural Databases-CSD refcode: ABEK01*) (Evans i sar., 2004). Priprema proteina i liganada za *docking* studiju je urađena pomoću programa *AutoDockTools*, dok je *docking* studija izvedena pomoću *AutoDockVina* programa (Trott i Olson, 2010). U toku studije, struktura proteina je održavana rigidnom, dok su sve proste (jednostruke) veze na ligandima tretirane kao rotabilne.

3.6. Antioksidativna i antimikrobna aktivnost i određivanje ukupnih polifenola

3.6.1. DPPH inhibicija i određivanje ukupnih polifenola

Antioksidativna aktivnost ekstrakata lincure je ispitivana inhibiranjem DPPH radikala i cikličnom voltametrijom. U reakciji sa antioksidantom, DPPH radikal (slika 3.1) se neutrališe, što je praćeno promenom boje iz plave u bezbojnu ili slabo žutu boju.



Slika 3.1. Struktura DPPH radikala i reakcija inhibicije (preuzeto i modifikovano iz Mohammadpour i sar., 2015)

Reagens se priprema rastvaranjem 7,8 mg DPPH u 100 mL metanola. Rastvori ekstrakata i pojedinačnih konstituenta lincure se rastvore u metanolu ili vodi u opsegu koncentracija od 0,1 do 10 mg/mL, za ekstrakte i od 0,005 do 0,1 mg/mL za konstituente. Zatim se 50 μ L uzorka razblaži metanolom do 4 mL, pomeša sa 1 mL DPPH reagensa i ostavi u mraku 30 minuta (Brand-Williams i sar., 1995). Nakon toga meri se apsorbanacija na $\lambda=517$ nm, uz kontrolu u koju je dodata voda umesto ekstrakata, naspram metanola kao slepe probe. Inhibicija se izračunava na osnovu sledeće formule:

$$I (\%) = 100 \times (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{uzorak}}) / A_{\text{DPPH}} \quad [3.2]$$

gde je A_{DPPH} apsorbanacija kontrolnog rastvora DPPH a A_{uzorak} , apsorbanacija uzorka. Na osnovu dobijenih vrednosti inhibicije za svaku od koncentracija, konstruiše se grafik zavisnosti procenta DPPH inhibicije od koncentracije i određuje IC_{50} vrednost, odnosno koncentracija ispitivane supstance koja inhibira 50% DPPH. Ukupni polifenoli su određivani kolorimetrijski, po metodi (Singleton i Rossi.,1965). Pripremljeni su ekstrakti u koncentraciji od 1 mg/mL i 100 μ L svakog ekstrakta je pomešano sa 500 μ L Folin-Ciocalteu reagensa. Ovoj smeši dodato je 2 mL, 15% rastvora Na_2CO_3 , sve je pomešano na vorteksu i razblaženo do 10 mL sa dejonizovanom vodom. Apсорbanacija se meri nakon 2h na talasnoj dužini od 750 nm, uz kontrolu pripremljenu sa vodom, naspram vode kao slepe probe. Kalibraciona prava na osnovu koje je određivana ukupna količina polifenola se dobija snimanjem rastvora galne kiseline u koncentracionm opsegu od 2 do 200 μ g/mL po istoj procedure. Rezultati se izražavaju kao mg ekvivalenata galne kiseline na 100 g suvog biljnog ekstrakta.

3.6.2. Ciklična voltametrija

Snimanja cikličnom voltametrijom su izvedena na sobnoj temperaturi, na uređaju Gamry PCI-4/750, brzinom skeniranja od 100 mVs^{-1} , na GC (glass carbon) elektrodi površine 0,19625 cm^2 , u opsegu potencijala od -0,4 do 1,2 V. Pre svakog eksperimenta elektroda je detaljno ispolirana sa dijamantskom pastom (1-2 μ m čestice) oprana etanolom i dejonizovanom vodom. Pre svakog merenja, snimljena je bazna linija GC elektrode u 10 mL 0,1 M K_2SO_4 a nakon toga uzorci su preneti u osnovni elektrolit,

nakon čega je izvršeno njihovo merenje. Naime, 1 mL rastvora ekstrakata ili konstituenta, koncentracije 20 mg/mL odnosno 0,1 mg/mL je razblaženo sa 0,1 M rastvorom K₂SO₄ do zapremine od 10 mL. Ovako pripremljeni rastvori su snimani cikličnom voltametrijom. Pre i u toku svakog eksperimenta rastvori su deaerisani azotom visoke čistoće.

3.6.3. Antimikrobna aktivnost

Za ispitivanje antimikrobne aktivnosti korišćena je metoda dilucije u agaru tako što se u sterilisani i otopljeni sladni agar (SA) ili Saborou Dextrose agar (SDA) dodaju različite zapremine rastvora ispitivanih ekstrakata, da bi se postigle finalne koncentracije u agaru u opsegu od 0,2 do 0,5 mg/mL. Analizirani su vodeni, alkoholno vodeni (25-96% EtOH, v/v) ekstrakti, zatim metanolni a od standarda loganska kiselina, u koncentraciji od 0,04 mg/mL u agarizovanoj podlozi. Kao pozitivna kontrola korišćen je fungicid aktidion u finalnoj koncentraciji u agaru od 0,02 mg/mL. Osnovni rastvori ekstrakata su rastvarani u vodi i DMSO-u, a negativna kontrola je pravljena sa DMSO. Nakon homogenizacije i očvršćavanja podloge naneto je 20 µL suspenzije ispitivanih spora plesni u koncentraciji od 10⁵ CFU/ml (u fiziološkom rastvoru). Nakon inkubacije na T od 28° C, 48h, određivana je inhibicija rasta na osnovu merenja zone rasta plesni u odnosu na kontrolni uzorak (bez inhibitora) prema formuli:

$$\text{Inhibicija (\%)} = \frac{R_{\text{kontrola}} - R_{\text{uzorka}}}{R_{\text{kontrola}}} \times 100 \quad [3.3]$$

3.7. Mikronukleusni test, analiza proliferativnog potencijala ćelija, apoptoza i protočna citometrija

Uzorak pune krvi dobijen je od zdravog donora, starosti 35 godina. Puna krv uzeta je venepunkcijom, u vakutanere sa heparinom kao antikoagulansom. Alikvoti heparinizirane pune krvi (0,5 mL), neozračeni i ozračeni, dodati su u 4,5 mL PBmax hranljivog medijuma (Invitrogen-Gibco, Paisley, Velika Britanija). Postavljen je set

ćelijskih kultura u koje su dodate odgovarajuće zapremine ekstrakata lincure i rastvora konstituenata kako bi se postigle sledeće finalne koncentracije: 1, 10 i 100 µg/mL za konstituente i 0,05, 0,2 i 0,4 mg/mL za ekstrakte. Sve kulture limfocita postavljene su u triplikatu. Netretirani uzorci služili su kao kontrola. Alikvoti heparinizirane humane venske krvi su ozračeni izvorom γ-zračenja, ⁶⁰Co dozom 2 Gy. Ozračivanje uzoraka krvi obavljeno je u komori od tkivno-ekvivalentnog pleksiglasa, dimenzije 15 x 15 cm. Brzina doze iznosila je 18,16 Gy/min, a udaljenost od izvora 82 cm. Uzorci krvi su ozračeni na sobnoj temperaturi i postavljeni u kulture 30 minuta nakon ozračivanja.

3.7.1. Analiza mikronukleusa

Analiza mikronukleusa rađena je citokinezis blok-mikronukleusnim (CB-MN) testom (Fenech, 1993). Kulture limfocita su gajene 72 sata na 37 °C, od čega poslednja 24 sata u prisustvu citohalazina B (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka) finalne koncentracije 4 µg/mL. Nakon toga ćelije su isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0,56 % KCl : 0,9 % NaCl, 1:1) i fiksirane u McCarnoy fiksativu (metanol: glacijalna sirćetna kiselina= 3:1) 3 - 4 puta. Između svakog koraka ćelije su centrifugirane 10 min na 1600 rpm, a supernatant aspiriran. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopska predmetna stakla. Na vazduhu osušeni preparati su obojeni 2%-tnim rastvorom alkalne Gimze (Merck). Analizirano je najmanje 1000 ćelija po uzorku, upotrebom Optech mikroskopa (Minhen, Nemačka). Sva merenja su rađena u triplikatu.

3.7.2. Analiza proliferativnog potencijala ćelija (Citokinezis-blok proliferativnog indeksa)

Proliferativni potencijal ćelija *in vitro* procenjen je izračunavanjem citokinezis-blok proliferativnog indeksa (CBPI) (Surralles i sar., 1995). CBPI je izračunat prema sledećoj formuli:

$$\text{CBPI} = (\text{MI} + 2\text{MII} + 3[\text{MIII} + \text{MIV}]) / \text{N} \quad [3.4]$$

gde MI – MIV predstavljaju broj ćelija (limfocita) sa jednim, dva, tri, odnosno 4 jedra, a N predstavlja ukupan broj prebrojanih ćelija. Za određivanje CBPI korišćeni su isti preparati na kojima je izvršena analiza mikronukleusa, upotrebom Optech mikroskopa (Minhen, Nemačka) na uveličanju 400x. Sva merenja su rađena u triplikatu.

3.7.3. Priprema ćelija za apoptozu

Za ispitivanje apoptoze, neozračeni, neozračeni tretirani, ozračeni i ozračeni tretirani uzorci krvi postavljaju se u hranljivi medijum bez fitohemaglutinina: 0,5 ml pune krvi doda se u 5 ml medijuma RPMI-1640 (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK). Zatim se dodaju ispitivana jedinjenja-konstituenti lincure: svertiamarin, sverozid i izogentizin u finalnoj koncentraciji od 10 µg/mL. Nakon opisane pripreme, kulture ćelija se inkubiraju 24h na 37°C. Kao kontrolni uzorak korišćen je 50% metanol u vodi (v/v) sa finalnom koncentracijom od 2% metanola. Nakon tretmana, preparacija kultura je izvršena ispiranjem ćelijske suspenzije fiziološkim rastvorom i fiksacijom ćelija u McCarnoy fiksativu (metanol: glacijalna sirćetna kiselina= 3:1) nekoliko puta (Crompton i Ozsazin, 1997). Nakon toga ćelije se ispiraju 96%-tnim etanolom i čuvaju u frižideru na +4°C.

3.7.4. Priprema ćelija za protočnu citometriju i mikroskopiju atomskih sila (AFM)

Pre merenja na protočnom citometru, suspenzije ćelija (leukociti) centrifugiraju 10 min na 1200 rpm, odbaciti supernatant, a ćelije resuspendovati u fosfatnom puferu sa 50 µg/mL propidijum jodida i 100 µg/mL ribonukleaze A. Uzorke inkubirati 30 min na 37°C u mraku (Elstein i sar. 1995). Apoptoza je ispitana protočnom citometrijom (FACS Calibur, Becton Dickinson), merenjem UV fluorescencije, propidijum jodidom obojene DNK. Procenti ćelija u apoptozi su određeni primenom CellQuest softvera (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Mikrostrukturne i morfološke promene na leukocitima izolovanim iz krvi neozračenih i ozračenih γ -zracima i nakon toga tretiranim odabranim konstituentima lincure (svertiamartin, sverozid i izogentizin)

praćene su AFM mikroskopijom u *tapping* modu. Brzina skeniranja je bila 1 Hz a eksperimenti su izvedeni na ambijentalnoj temperaturi ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) pri relativnoj vlažnosti vazduha od $50 \pm 1\%$. Za AFM analizu $20 \mu\text{L}$ ćelijske suspenzije (u 96% etanolu) nanese se na liskun disk-pločicu i ostavi na sobnoj temperaturi da rastvarač ispari. Po potrebi pločica se centrifugira *spin coating* tehnikom, 3500 rpm/min, i nakon toga ostavi 5 minuta da se osuši (Stanić i sar., 2015).

3.7.5. Statistička analiza

Za statističku obradu rezultata analiziranih parametara korišćeni su Student-ov T-test i linearna regresiona analiza, statistički paket “Statistika 8.0” i “OriginPro 8” za Windows 7. Vrednosti $P < 0.05$ su smatrane statistički značajnim.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Kvalitativna analiza ekstrakata korena lincure-*G. lutea* i prinos ekstrakcije

Kao što je pomenuto, za ispitivanje biološke aktivnosti odabrani su vodeni, kiseli (4% sirćetna kiselina u vodi, v/v) i etanolno vodeni ekstrakti (25, 50, 75 i 96% EtOH, v/v). Međutim pored navedenih, za kvalitativnu i kvantitativnu analizu pripremljeni su i metanolni i etarski ekstrakti, jer je ekstrakcija pojedinačnih komponenti uslovljena polarnošću rastvarača. Etarski ekstrakt, zbog svoje slabe rastvorljivosti nije dalje ispitivan. Ekstrakti su kvantifikovani na osnovu karakterističnih fragmenata pomoću UPLC-TQD masene spektrometrije u MRM modu. Nakon ekstrakcije, određen je procenat suve supstance u svim ekstraktima i na osnovu toga je obračunat ukupan prinos ekstrakcije. Prinos ekstrakcije obračunat je u odnosu na polaznu količinu spraćenog praha lincure sa poznatim procentom suve susptance, a rezultati su prikazani u tabeli 4.1.

Tabela 4.1. Prinos ekstrakcije u zavisnosti od vrste rastvarača. Osim vodenog ekstrakta, svi ekstrati su pripremani na sobnoj T.

Vrsta ekstrakta	Prinos (%)
vodeni	44,59±4,33
kiseli	38,29±3,74
25% EtOH	32,83±4,57
50% EtOH	43,38±8,05
75% EtOH	34,48±3,84
96% EtOH	40,63±4,52
MeOH	35,67±0,47
Etarski	3,79±1,21

4.1.1. Analiza ekstrakata korena lincure MALDI-TOF masenom spektrometrijom

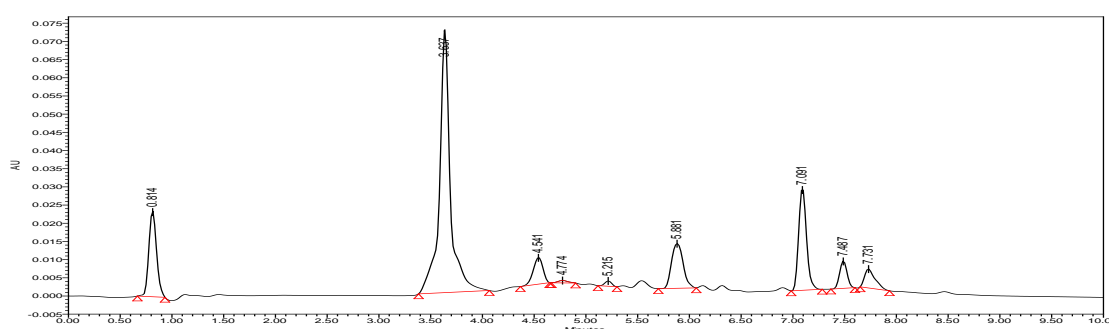
Ova metoda je izabrana zbog brzine izvodjenja i preciznosti kojom je moguće istovremeno identifikovati veliki broj različitih klasa jedinjenja, bez komplikovanih koraka pripreme i analize koje zahtevaju druge tehnike. MALDI TOF-om su analizirani

sirovi ekstrakti pre i nakon njihovog hromatografskog razdvajanja na UPLC hromatografu. Etarski ekstrakt je zbog svojih karakteristika analiziran bez prethodnog hromatografskog razdvajanja. Identifikacijom su obuhvaćena jedinjenja za koje je prethodno utvrđeno da se nalaze u korenu ove biljke, na osnovu literaturnih podataka i poređenjem sa njihovim izotopskim sastavom (EMA, 2009). Pre analize MALDI-TOF masenom spektrometrijom, metanolni ekstrakt je hromatografski razdvojen na BEH koloni, u gradijentu sa 0,1% mravljom kiselinom, kao eluentom A i smešom acetonitrila i metanola (85:15, v/v) kao eluentom B, tabela 4.2.

Tabela 4.2. Gradijent korišćen za eluiranje metanolnog ekstrakta lincure, C=0,1 mg/mL

Vreme (min.)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,3	95	5
2	0,3	95	5
3	0,3	75	25
5	0,3	35	65
7	0,3	20	80
8	0,3	5	95
10	0,3	2	98

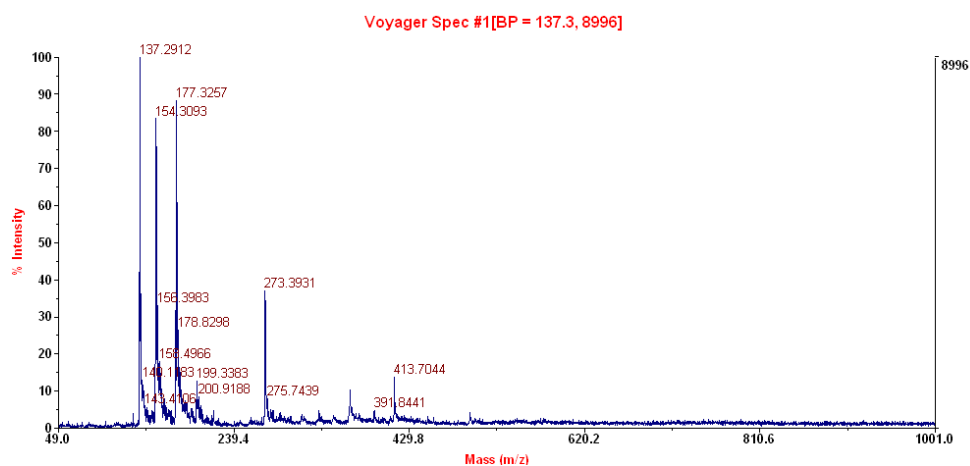
Hromatogram dobijen pod navedenim uslovima, prikazan je na slici 4.1.



Slika 4.1. Hromatogram metanolnog ekstrakta lincure (C=0,1 mg/mL). Označena retenciona vremena predstavljaju frakcije koje su sakupljane i analizirane MALDI-TOF masenom spektrometrijom.

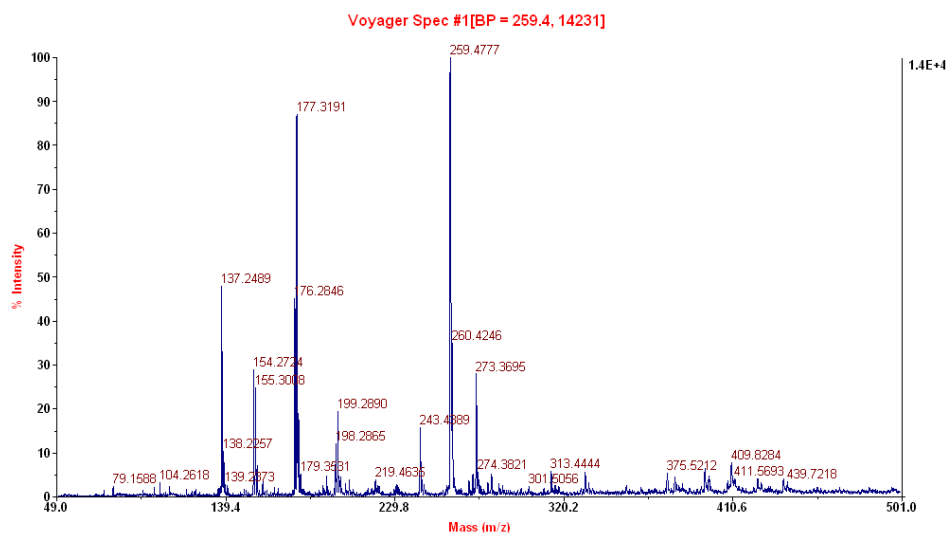
Nakon sakupljanja frakcija eluati su nanošeni na pločicu za MALDI, sa DHB i CHCA koje su korišćene kao matrice. Pored analize ekstrakata nakon njihovog

hromatografskog razdvajanja, analizirani su etarski i metanolni ekstrakti bez prethodnog razdvajanja. Ekstrakti su nanoseni na MALDI pločicu standardnom i sendvič tehnikom. Spektri sakupljenih frakcija metanolnog ekstrakta, analizirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom, dati su u **prilogu 1**. Dominantni joni sa m/z 273,3931, potiču od same matrice DHB u obliku $[2\text{DHB}+\text{H}-2\text{H}_2\text{O}]^+$, kao i mase sa m/z : 154,3093 i 137,2912 u obliku $[\text{DHB}+\text{H}]^+$, odnosno $[\text{DHB}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$, slika 4.2.



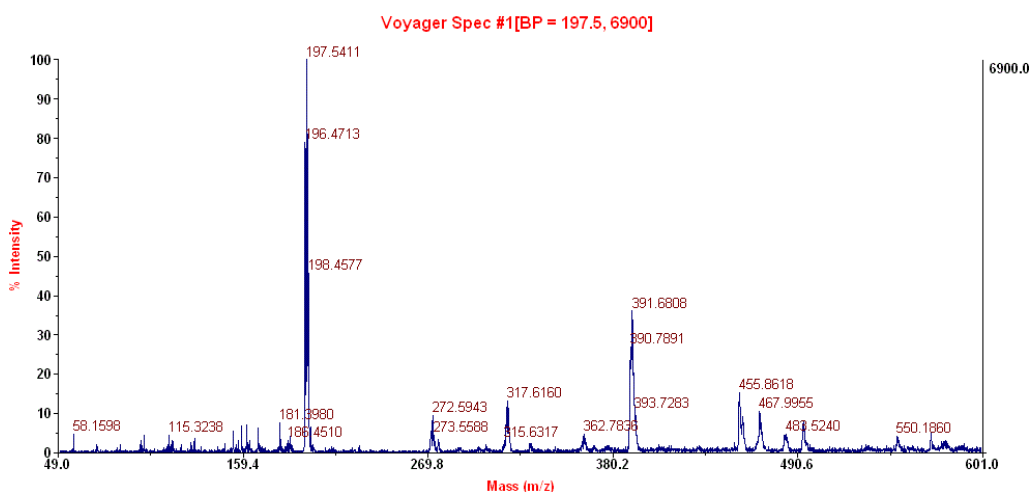
Slika 4.2. Maseni spektar matrice DHB, snimljen u reflektornom pozitivnom modu.

Na slici 4.3, prikazan je maseni spektar etarskog ekstrakta bez prethodnog hromatografskog razdvajanja, dobijen MALDI-TOF masenom spektrometrijom, u reflektornom pozitivnom modu, sa DHB matricom. Jedinjenja identifikovana analizom masenih spektara eluiranih frakcija kao i spektara dobijenih analizom nefracionisanih ekstrakata prikazana su u tabeli 4.3. Rezultati analize MALDI-TOF masenom spektrometrijom daju odličan uvid u kvalitativni sastav korena lincure. Iz literaturnih podataka je poznato da su sekoiridoidi najzastupljeniji konstituenti karakteristični za lincuru, a zatim ksantoni i glukoflavoni, koji su prisutni u tragovima. Veliki procenat čine i šećeri (EMA, 2009). Međutim na osnovu masa identifikovanih u spektrima dobijenim MALDI-TOF-om, može se videti da najintenzivnij pikovi potiču ili od ksantonskih jedinjenja (etarski ekstrakt) ili od šećera (neke frakcije u metanolnom ekstraktu).



Slika 4.3. Maseni spektar sirovog etarskog ekstrakta (ekstrakt:DHB=1:2) snimljen u reflektornom pozitivnom modu.

Ostali konstituenti su prisutni sa manjim intenzitetima. Ova nas može navesti na pogrešan zaključak o njihovoj relativnoj zastupljenosti. Međutim ovde se najverovatnije radi o različitom stepenu jonizacije među pojedinim klasama jedinjenja. Ovo upravo potvrđuje sam ksanton, koji i bez dodatka matrice daje dobar signal, odnosno, dobro se jonizuje MALDI-TOFom, slika 4.4.



Slika 4.4. Maseni spektar ksantona (9-ksanten-9-on; $C_{13}H_8O_2$) dobijen u reflektornom pozitivnom modu MALDI-TOF masenom spektrometrijom.

Tabela 4.3. Karakteristični konstituenti *G.lutea*, detektovani u metanolnom i etarskom ekstraktu MALDI-TOF masenom spektrometrijom.

Naziv jedinjenja	m/z detektovano	Jonska vrsta
demetilbelidifolin	243,4889/	$[M-H_2O+H]^+$ /
	261,6107	$[M+H]^+$
izogentisin/gentizin	259,4777	$[M+H]^+$
gentiobioza/saharoza	365,5818	$[M+Na]^+$
svertiamarin	375,5212	$[M+H]^+$
genciopikrozid	339,61/	$[M-H_2O+H]^+$ /
	379,7141	$[M+Na]^+$
belidifolin-8-O-glukozid	437,7850	$[M+H]^+$
svertiabisksanton	501,6560	$[M-H_2O+H]^+$ /
	518,9286	$[M+H]^+$
gentiozid	575,8136	$[M+Na]^-$

Ovakve karakteristike ksantona, kao i njegovih derivata prisutnih u ekstraktima lincure, ukazuju na mogućnost njihove primene kao matrica sa dobrim karakteristikama u MALDI-TOF masenoj spektrometriji.

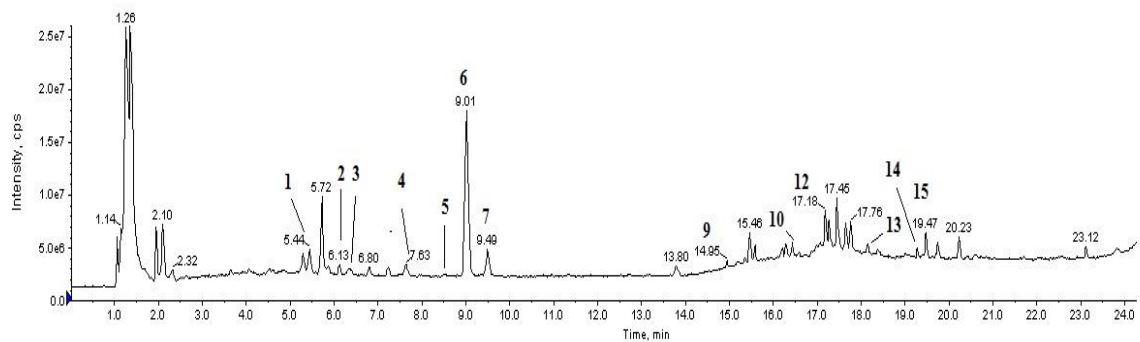
4.1.2. Kvalitativna analiza ekstrakata korena lincure HPLC hromatografijom sa PDA i MS/ESI-TOF detekcijom

Hromatogrami vodenog ekstrakta dobijeni HPLC metodom sa PDA i MS/ESI-TOF detekcijom prikazani su na slici 4.5. Kompletno razdvajanje u ovom slučaju se postiže za oko 25 minuta analize. Na ovaj način određen je kvalitativni sastav vodenog, 96% etanolnog i metanolnog korena lincure. Odabrana su ova tri ekstrakta jer se razlikuju po polarnosti što doprinosi različitom stepenu ekstrakcije pojedinih konstituenata lincure. Hromatogrami 96% EtOH i metanolnog ekstrakta, dobijeni takođe PDA i MS/ESI-TOF detekcijom dati su u **prilogu 2 i 3**. Komponente su razdvojene na koloni Zorbax Eclipse Plus C18 (150 mm × 4,6 mm; 1,8 μm), termostatiranoj na 40°C, pomoću 1% mravlje kiseline u dejonizovanoj vodi (A) i acetonitrila (B), čiji se odnos za vreme analize menjao na sledeći način: : 2-10% B, 0-3 min, 10-15% B, 3-10,8 min, 15% B, 10,8-12 min, 15-30% B, 12-15 min, 30-70% B, 15-18 min, 70-100% B, 18-24 min, 100% B, 24-29 min, 100-2% B, 29-30 min, 2% B, 5 min, pri protoku od 1,3 mL/min. U tabeli 4.4. prikazana su jedinjenja, detektovana u sva tri ekstrakta sa odgovarajućim retencionim vremenima. Mase m/z i jonske vrste koje su ovom prilikom detektovane: $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$, $[M+HCOO]^-$, $[M+NH_4]^+$ i $[M+Na]^+$ zajedno sa izračunatim (teorijskim) masama jedinjenja date su u **prilogu 4**. Na slici 4.5, može se uočiti da u hromatogramu vodenog ekstrakta nedostaju pikovi nekih jedinjenja koja su navedena u tabeli 4.4. Ova jedinjenja su nađena u 96% EtOH i metanolnom ekstraktu (**prilog 4**).

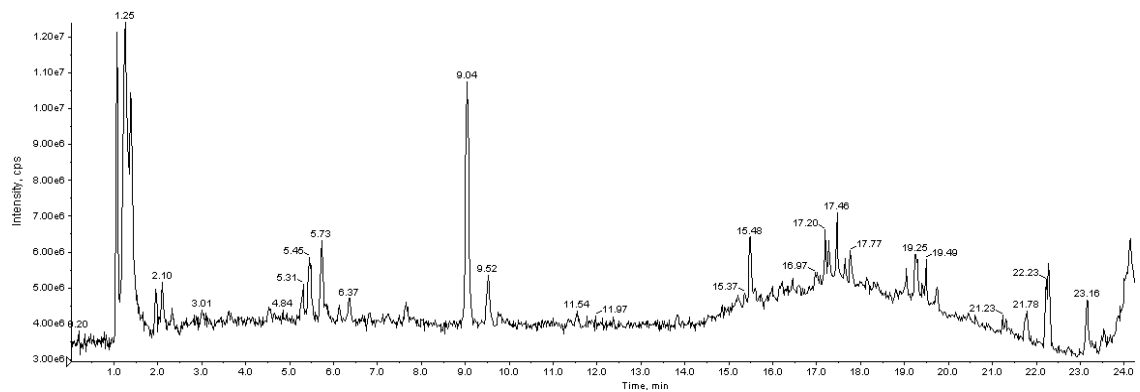
Neka jedinjenja se javljaju u obliku molekuskog jona, u ESI pozitivnom i negativnom modu. Ista jedinjenja mogu se naći, ali sa različitom zastupljenošću i u obliku adukta sa Na^+ , NH_4^+ i K^+ u ESI pozitivnom modu. U negativnom ESI modu neka od jedinjenja grade adukte sa acetatnim $HCOO^-$ i hloridnim Cl^- anjonima. Takođe, prilikom identifikacije u obzir se mogu uzeti i dimeri molekuskih jona u formi $[2M+Na]^+$, zatim klasteri sa vodom u formi $[M(H_2O)+H]^+$ i $[M(H_2O)-H]^-$, koji se mogu minimizirati upotrebom mobilne faze, nižeg pH, sa većim procentom kiseline i do 1% ($HCOOH$ i/ili CH_3COOH) čime se pospešuje proces jonizacije. Kao što se može videti

u tabeli 4.4, u nekim slučajevima detektovane mase odgovaraju jednom ili većem broju jedinjenja, ukoliko se radi o strukturnim izomerima, koji imaju istu molekulsku formulu a različitu strukturu.

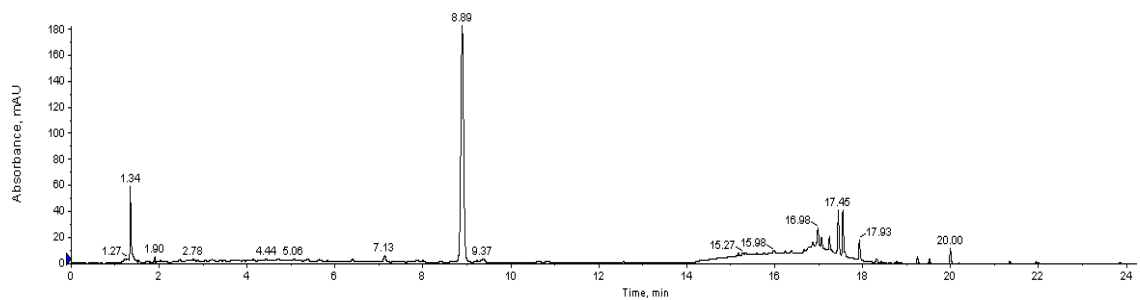
A



B



C



Slika 4.5. Hromatogrami vodenog ekstrakta korena lincure (A) LC-ESI-TOF, negativni mod; (B) LC-ESI-TOF, pozitivni mod; (C) LC-PDA (275 nm).

Tabela 4.4. Jedinjenja identifikovana u metanolnom, etanolnom i vodenom ekstraktu korena *G.lutea* analiziranih pomoću HPLC/PDA/MS-ESI-TOF.

Redosled	Rt (min)	Molek. formula	Naziv jedinjenja
1.	5,45	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	loganska kiselina
2.	6,13	C ₁₈ H ₁₈ O ₈	eustomin
3.	6,35	C ₁₇ H ₁₆ O ₈	demetil eustomin
4.	7,64	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	svertimamarin
5.	8,53	C ₇ H ₆ O ₄	2,3-dihidroksi benzoeva kiselina
6.	9,02	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	genciopikrozid
7.	9,51	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	sverozid
8.	12,21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	izoorientin
9.	14,92	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	izoviteksin
10.	16,44	C ₂₅ H ₂₈ O ₁₄	gentiozid (gentiozid isomer)
11.	16,60	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	1,3-dihidroksi-2,5-dimetoksiksanton; 1,6-dihidroksi-3,5-dimetoksiksanton; 1,3-dihidroksi-4,5-dimetoksiksanton; metilsvertianin; metilbelidifolin
12.	17,18	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₃	amarogentin
13.	18,16	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	1-hidroksi-3,5-dimetoksiksanton
14.	19,27	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	1-hidroksi-2,3,4,5-tetrametoksiksanton; 1-hidroksi-2,3,4,7-tetrametoksiksanton
15.	19,46	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	gentizin; izogentizin; (mesuaksanton A)

Bez dodatne fragmentacije molekula masenom spektrometrijom i jasnih apsorpcionih spektara ili poređenja sa odgovarajućim standardima u ovim slučajevima nije bilo moguće pouzdano utvrditi njihovo postojanje.

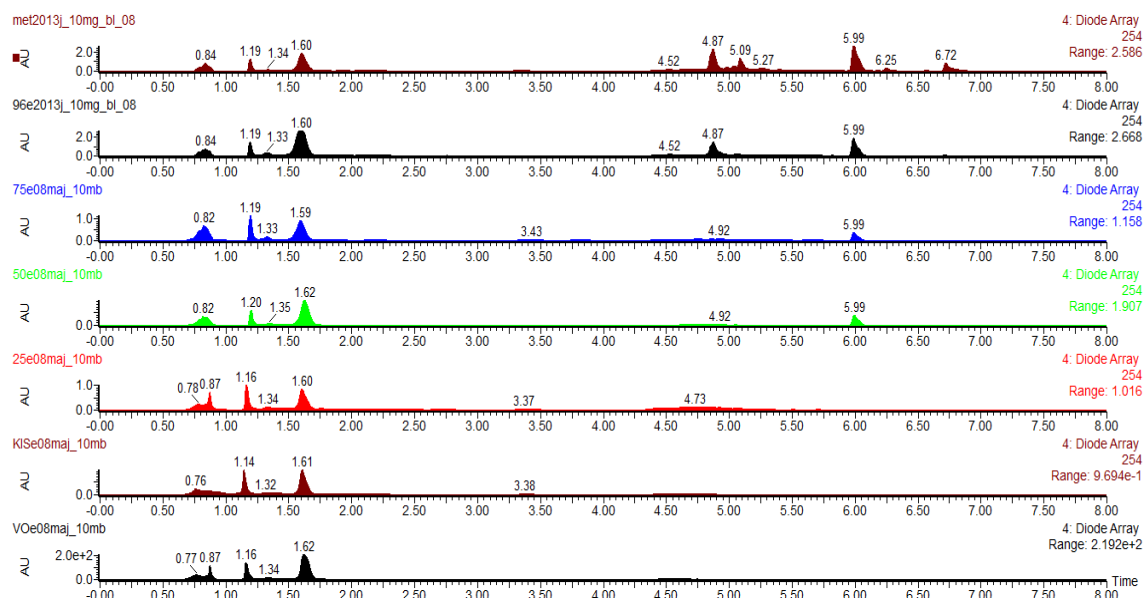
4.1.3. Analiza ekstrakta lincure UPLC hromatografijom sa PDA i TQD detekcijom

Kvalitativna analiza ostalih ekstrakata je određivana pomoću Waters Acquity UPLC hromatografa, sa PDA i Acquity TQD detektorima, pod uslovima opisanim u odeljku 3. UPLC omogućava efikasno razdvajanje kompleksnih smeša u kraćem vremenskom periodu od HPLC, jer su radni pritisci oko 3 puta veći, odnosno do 1034 bar (15000 psi) sa posebnim kolonama koje u sebi sadrže čestice adsorbensa, veličine od 1,7 μm do 2,5 μm . Hromatografsko razdvajanje ekstrakata lincure ispitivano je na sledećim kolonama: UPLCTM BEH C18 RP, Synergi Polar RP, Phenomenex i DB PAH pinnacale, Restek. Gradijent je podešavan tako da se obezbedi optimalno razdvajanje konstituenata lincure, sa posebnim osvrtom na logansku kiselinu, svertiamarin, genciopikrozid, sverozid, izoviteksin, amarogentin i izogentizin, koji su zatim kvantifikovani masenom spektrometrijom. Uporedni hromatogrami ekstrakata lincure razdvojeni na koloni Synergi Polar PP, sa 0,1% mravljom kiselinom (A) i acetonitrilom (B) koji su korišćene kao mobilne faze, prikazani su na slici 4.6. Sverozid ovom prilikom nije ispitivan a ostale komponente u standardnoj smeši, kao i ekstrakti razdvojeni su gradijentom koji počinje sa 80% mobilne faze A u trajanju od 3 minuta (0-3min), zatim se tokom tri minuta gradijent postepeno menja do 6 minute gde počinje sa 10% A da bi se u 11 minuti ponovo vratio na 80% A. Protok je bio konstantan 0,3 mL/min, a temperatura kolone ambijentalna. U navedenom slučaju za 6 minuta je postignuto razdvajanje šest ispitivanih konstituenata lincure dok je u ekstraktima detektovano više od 20 različitih komponenti, razdvojenih za oko 8 minuta.

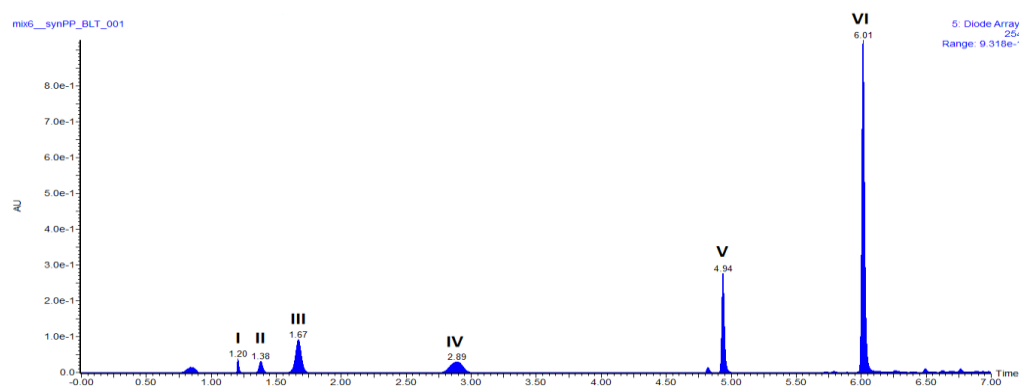
Konstituenti lincure prisutni u ekstraktima identifikovni su na osnovu retencionog vremena i karakterističnih apsorpcionih spektara, datih u **prilogu 5**. Karakteristični apsorpcioni spektri su ekstrahovani iz 3D hromatograma na $\lambda=254$ nm. Iako je razdvajanje na Synergi Polar koloni bilo zadovoljavajuće nije postignuto u

potpunosti razdvajanje genciopikrozida i sverozida, koji su strukturno i po polarosti vrlo slični pa je dalja analiza ekstrakata radjena na UPLCTM BEH C18 RP koloni. Takođe, izmenjen je gradijent za eluiranje a kao mobilne faze korišćeni su 1% rastvor mravlje i sirćetne kiseline u vodi, u odnosu 0,9:0,1% (v/v) kao eluent A i smeša n-propanola i acetonitrila u odnosu 50:50 % (v/v) kao eluent B.

A



B



Slika 4.6. Hromatogrami (A) ekstrakata lincure (voda, kiseli, 25% do 96% EtOH i metanolni) u koncentraciji od 10 mg/mL i (B) standardnog miksa 6 konstituenata (I-loganska kiselina, II-svertiamarin, III-genciopikrozid, IV-izoviteksin, V-amarogentin, VI-izogentizin) u koncentraciji od 0,01 mg/mL, na $\lambda=254\text{nm}$ (obrađeni u programu MassLynx 4.0). Kolona Synergy Polar PP.

Gradijent koji je korišćen za razdvajanje omogućava razdvajanje svih ispitivanih komponenti u vremenskom periodu od 10 minuta i prikazan je u tabeli 4.5.

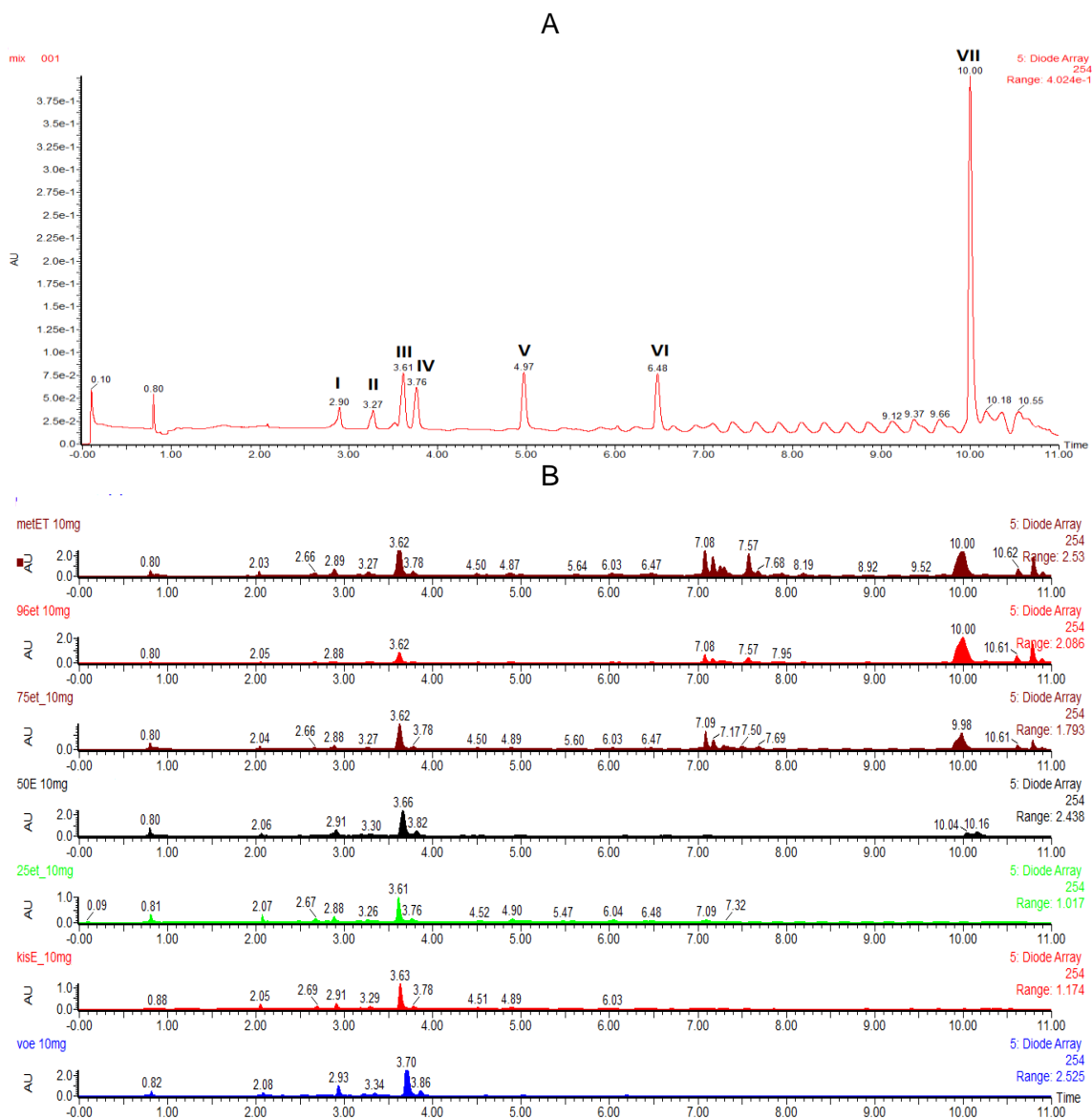
Tabela 4.5. Gradijent korišćen za hromatografsko razdvajanje ekstrakata lincure na BEH koloni, sa 1% smešom mravlje i sirćetne kiseline (A) i smešom acetnitrila i n-propanola (B) korišćenim kao mobilne faze.

Vreme (min)	Protok (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0,30	99	1
6,00	0,30	70	30
6,05	0,30	60	40
8,00	0,30	60	40
9,05	0,30	40	60
10,00	0,30	5	95

Ovakav sistem rastvarača je pokazao dobro razdvajanje ekstrakata i konstituenata lincure u prethodnim istraživanjima (Aberham i sar., 2007) ali je metoda modifikovana i prilagođena uslovima UPLC hromatografije kao i karakteristikama kolone. Retenciona vremena konstituenata lincure, razdvojenih na BEH koloni, kao i njihovi apsorpcioni maksimumi, prikazani su u tabeli 4.6. Hromatogram smeše standarda lincure i uporedni hromatogrami ekstrakata lincure prikazani su na slici 4.7.

Tabela 4.6. Retenciona vremena i apsorpcioni maksimumi konstituenata lincure, razdvojenih na BEH koloni, eluiranih u gradijentu. Konstituenti su rastvoreni u metanolu.

konstituent	Rt (min)	apsorpcioni maksimumi (nm)
loganska kiselina	2,90	235,8
svertiamarin	3,27	238,8
genciopikrozid	3,61	210,8; 243,1; 273,7
sverozid	3,76	229,2
izoviteksin	4,97	213,8; 269,4; 337,3
amarogentin	6,48	227,8; 260,5; 303,3
izogentizin	10,00	259,0; 309,5; 369,7



Slika 4.7. Hromatogrami (254nm) konstituenata (A) i ekstrakata lincure (B) dobijeni na UPLCTM BEH C18 RP koloni: (I) loganska kiselina, (II) svertiamarin, (III) genciopikrozid, (IV) sverozid, (V) izoviteksin, (VI) amarogentin i (VII) izogentizin. Koncentracija konstituenata u smeši je bila 0,001 mg/mL a ekstrakata 10 mg/mL. Standardi i ekstrakti su rastvarani u metanolu. Hromatogram je dobijen u programu MassLynx 4.0 NT.

Identifikacija konstituenata je izvršena na osnovu poređenja retencionih vremena i apsorpcionih spektara standarda sa spektrima konstituenata nađenim u ekstraktima, na odgovarajućem Rt.

Na ovaj način, razdvojeno je više od 30 različitih komponenti u vremenu od 11 minuta, što je duže od metode u gradijentu korišćene pri razdvajanju na Synergi Polar PP koloni. Ovakvi rezultati bi se verovatno postigli i pomoću Synergi Polar kolone kada bi se koristile iste mobilne faze i gradijent za eluiranje jer je ta kolona po svojim karakteristikama hibridna (u odnosu na BEH C18-RP) i omogućava simultano razdvajanje i polarnih i nekih nepolarnih jedinjenja (Whelan i sar., 2005).

4.2. Kvantitativna analiza sekoiridoida, ksantona i glukozilflavona u ekstraktu korena *G. lutea*

Pošto su pojedini konstituenti u lincuri prisutni u tragovima ili se pojavljuju sporadično u biljci, poput izoviteksina i amarogentina, njihova pouzdana kvantifikacija moguća je samo uz dodatak internog standarda ili masenom spektrometrijom. Stoga je dalja potvrda njihovog prisustva, ali i prisustva ostalih konstituenata, izvršena masenom spektrometrijom a za kvantifikaciju je korišćen tandem maseni spektrometar nakon hromatografskog razdvajanja na UPLC-u, sa ESI jonizacijom u MRM modu.

Kvantitativna analiza ekstrakata lincure i njihovih konstituenata izvršena je UPLC hromatografijom sa PDA i TQD detektorima, na BEH koloni, pod uslovima opisanim u prethodnom poglavlju. Pošto su uslovi za hromatografsko razdvajanje već bili poznati, izvršena je optimizacija uslova jonizacije i fragmentacije. Standardi lincure, rastvoreni u metanolu ubrizgavani su u maseni detektor pri protoku od 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Takođe optimizacija uslova jonizacije je vršena i nakon prolaska standarda kroz BEH kolonu, pri protoku od 0,3 mL/min (injektirano po 5 μL standardnog rastvora) u koncentracionom opsegu od 0,01 mg/mL do 0,1 mg/mL. Prilikom optimizacije direktnim ubrizgavanjem u maseni detektor, korišćena je i mogućnost kombinovanog

protoka, kojim se rastvarač u kome je rastvoren analit meša sa mobilnom fazom koja se koristi za njegovo hromatografsko razdvajanje na koloni. Time se postižu uslovi najbliži onima koji se dobijaju propuštanjem analita kroz kolonu, pre dolaska u maseni detektor. Treba pomenuti da sastav mobilne faze značajno utiče na pojavljivanje određenih jonskih vrsta. Uslovi jonizacije i fragmentacije su potom ispitivani ili automatski (Intelstart) pomoću softvera ili ručno. U oba slučaja ispitivan je uticaj napona (ili jačine struje) na konusu i na kapilari masenog spektrometra. Temperature jonskog izvora i desolvacionog gasa su bile konstantne, kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Nakon optimizacije uslova jonizacije u MS/ESI pozitivnom i negativnom modu, optimizovani su uslovi fragmentacije u MS² modu, promenom kolizione energije uz pomoć Ar kao kolizionog gasa. Pored optimizacije ESI jonizacijom, izvršena je i optimizacija uslova za APCI jonizaciju.

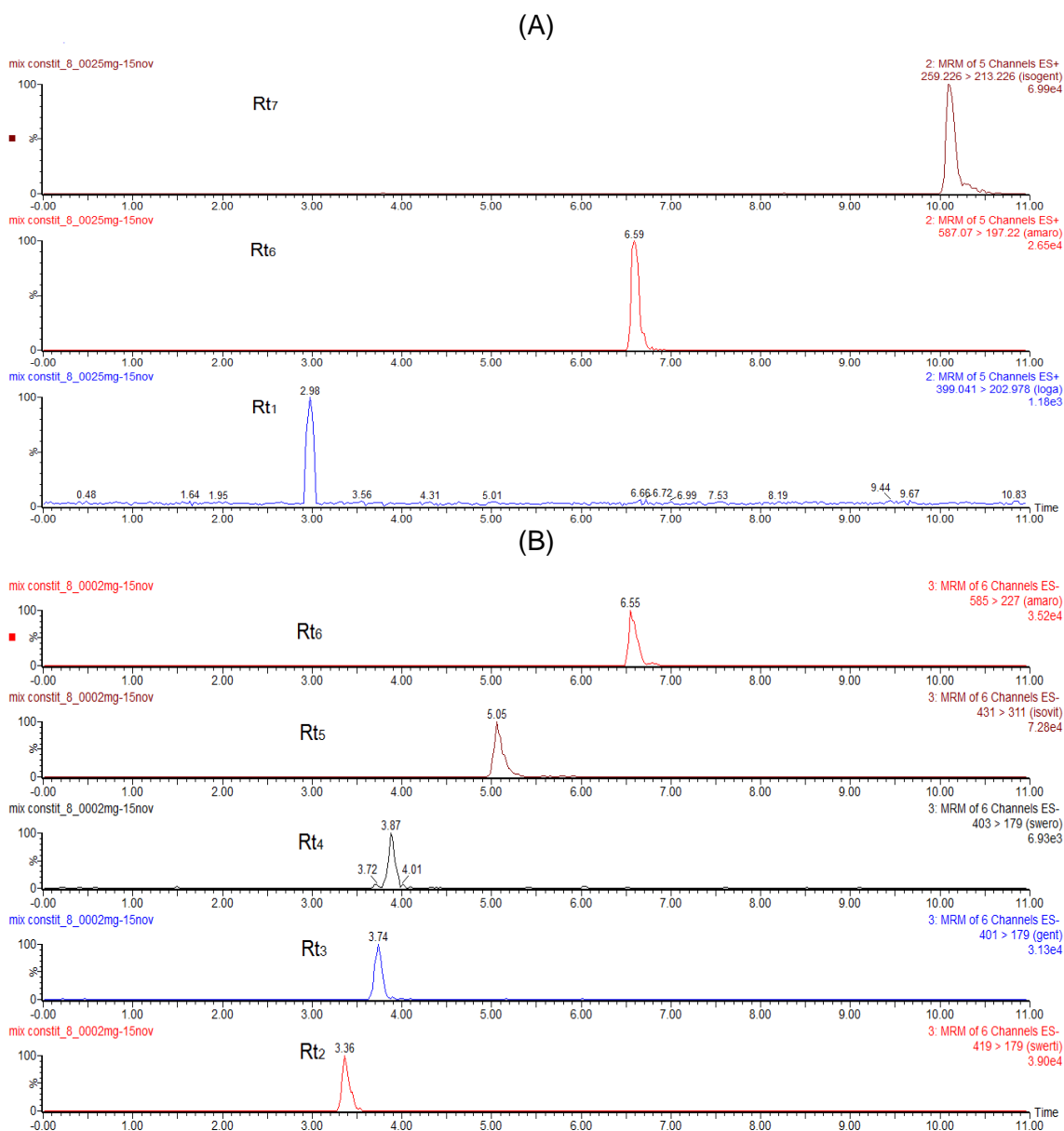
Tokom optimizacije uslova za APCI, pored promene napona na konusu, optimizovan je i napon (jačina struje) na vrhu korone, koja se u ovom slučaju umesto kapilare koristi za jonizaciju analita. Water Acquity TQD detektor omogućava rad u oba jonizaciona moda, posebno i zajedno, menjajući pri tom periodično mod jonizovanja. Nakon optimizacije dobijeni su uslovi jonizacije i fragmentacije koji su potom korišćeni za identifikaciju i kvantifikaciju konstituenata lincure u MRM modu i prikazani su u tabeli 4.7. Primenjeni uslovi su omogućili analizu ekstrakata, odnosno kvantifikaciju na osnovu fragmentacije roditeljskih jona, koji su se pojavljivali ili kao protonovani ili deprotonovani molekularni joni, zatim kao adukti sa natrijumom ili sa mravljom kiselinom. Maseni hromatogrami (MRM i TIC) standardne smeše konstituenata i ekstrakata lincure prikazani su na slikama 4.8. i 4.9 (strane 76 i 77).

Tabela 4.7. Parametri korišćeni u masno spektrometrijskoj analizi ekstrakata *G. lutea* u MRM modu.

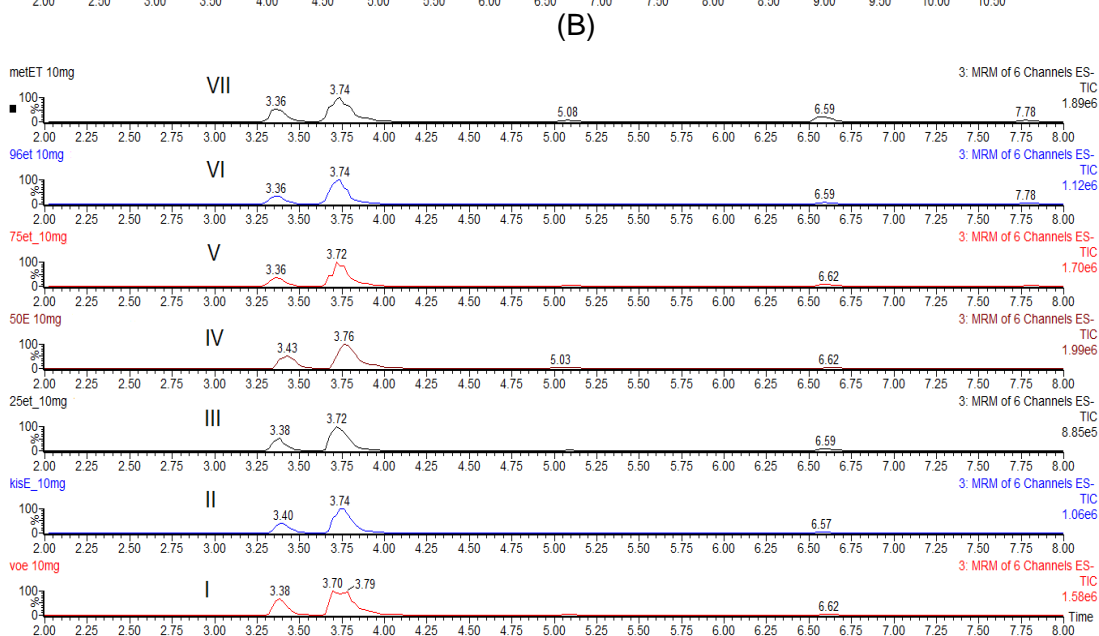
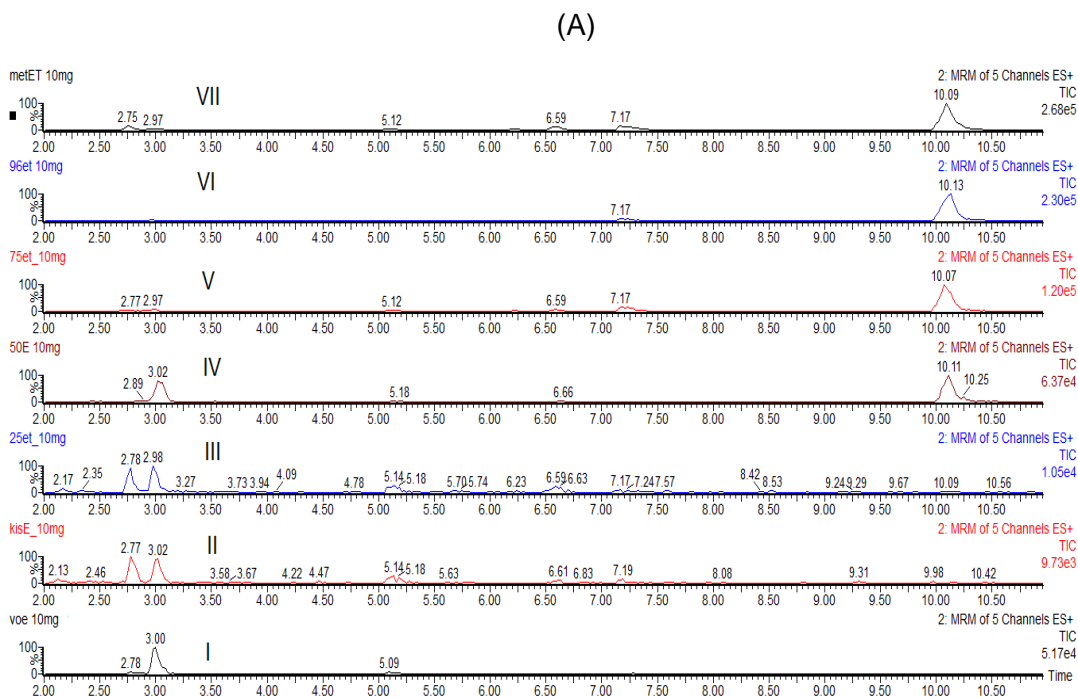
Konstituent (empirijska formula)	Rt (min)	Detektovani molekulski jon/adukt	MRM m/z*	Napon na konusu (V)	Koli. E(eV) **	ESI mod
loganska kiselina (C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀)	3,0	[M+Na] ⁺	399,41 >202,97	44	22	+
svertiamarin (C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀)	3,36	[M- H+HCOOH] ⁻	419,00 >179	20	12	-
genciopikroz id (C ₁₆ H ₂₀ O ₉)	3,74	[M- H+HCOOH] ⁻	401,11 >179	20	12	-
sverozid (C ₁₆ H ₂₂ O ₉)	3,90	[M- H+HCOOH] ⁻	403 >179	20	12	-
izoviteksin (C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀)	5,15	[M-H] ⁻	431,10 >311	45	20	-
amarogentin (C ₂₉ H ₃₀ O ₁₃)	6,79	[M-H] ⁻ /[M+H] ⁺	585,00 >227 587,07 >197,12	60/24	12/10	-
izogentizin (C ₁₄ H ₁₀ O ₅)	10,07	[M+H] ⁺	259,00 >213	50	35	+

*Multi Reaction Monitoring (MRM) mod detektuje analit na osnovu karakterističnog prelaza, koji potiče od roditeljskog jona i ćerki jona, nastalih nakon fragmentacije molekula.

** koliziona energija.



Slika 4.8. MRM hromatogrami konstituenata lincure u (A) ESI pozitivnom modu, sa karakterističnim prelazima za logansku kiselinu ($Rt_1=2,98$), amarogentin ($Rt_2=6,59$) i izogentizin ($Rt_7=10,07$) i (B) ESI negativnom modu za svertiamarin ($Rt_2=3,36$), genciopikrozid ($Rt_3=3,72$), sverozid ($Rt_4=3,87$), izovitekzin ($Rt_5=5,05$) i amarogentin ($Rt_2=6,59$). Hromatogrami su ekstrahovani iz programa MassLynx 4.0 NT.



Slika 4.9. Ukupni MRM hromatogrami vodenog (I), kiselog (II), etanolno vodenih (25, 50, 75, 96% EtOH u vodi, od III do VI) i metanolnog ekstrakta (VII) u pozitivnom (A) i negativnom (B) ESI modu.

Kao što se može videti na slici 4.9 (A), osnovna razlika između ekstrakata je prisustvo izogentizina u alkoholno vodenim ekstraktima, počevši od 50 pa do 96% EtOH kao i u metanolnom ekstraktu ($R_t=10,11$ min). Na slici 4.9 (B) prikazani su ukupni MRM hromatogrami ekstrakata u negativnom ESI modu.

Loganska kiselina je prisutna u svim ekstraktima ali sa najvećim intenzitetom u vodenom, dok je amarogentin najvećeg intenziteta u 96% i 75% EtOH ekstraktu. Sa slike 4.9 (B) uočavamo da najveće intenzitete daje genciopikrozid u 50%, metanolnom i vodenom ekstraktu, na $R_t=3,72$ min. Izoviteksin je najvećeg intenziteta u 50% etanolnom i metanolnom ekstraktu, $R_t=5,03$ min. Iz ukupnih MRM hromatograma ekstrakata lincure (slika 4.9 (A) i (B)) i MRM hromatograma konstituenata, ekstrahovani su pojedinačni hromatogrami za svaki karakterističan prelaz (tabela 4.7). Navedeni MRM hromatogrami, zatim hromatogrami dobijeni u MS skenirajućem modu i odgovarajući spektri, kao i jednačine prave korišćene za kvantifikaciju ekstrakta, dati su u **prilogu 6, 7 i 8**.

Pored hromatograma dobijenih masenom spektrometrijom, za kvantifikaciju su korišćeni i hromatogrami dobijeni PDA detekcijom koji su zatim ekstrahovani na 254 nm i nakon toga integraljeni u programima MassLynx NT 4.0 i Empower 2.0. Zastupljenost konstituenata lincure prikazana je u tabeli 4.8. (strana 79) i odnosi se na ekstrakte lincure pripremljene od korena biljke kupljene u biljnoj apoteci “Josif Pančić”, u Beogradu 2013. godine. Ovi ekstrakti su korišćeni pri ispitivanju inhibicije enzima acetilholinesteraze i E-NTPD-aze dok su ispitivanja inhibicije MPO, kao i antioksidativna aktivnost i sadržaj ukupnih polifenola određivane sa ekstraktima lincure napravljenim od korena kupljenog 2010, godine, takođe u biljnoj apoteci.

Zbog navedenog, ove dve vrste ekstrakta se razlikuju po sadržaju pojedinih komponenti, posebno genciopikrozida i amarogentina. Kao što je u uvodnom delu pomenuto u zavisnosti od populacije i lokaliteta gde se *G. lutea* uzgaja kao i u zavisnosti od vremena branja i načina obrade korena, može doći do variranja u sadržaju pojedinačnih komponenti (Radanović i sar, 2014). Ekstrakti lincure koji su korišćeni za inhibiciju MPO i ukupnog sadržaja polifenola, kao i za određivanje antioksidativne aktivnosti razdvajani su hromatografski na istoj BEH koloni, ali u prisustvu 0,1% mravlje kiseline kao eluenta A i smeše acetonitrila i metanola (85:15, v/v), po metodi u gradijentu opisanoj u poglavlju 4.1.1. Ovom prilikom u biljnim ekstraktima je kvantifikovano 18,08 % genciopikrozida u 96% EtOH ekstraktu i 13,92% u 50% EtOH, dok je u vodenom i metanolnom ekstraktu sadržaj bio od 6,5 do 7,8% (Ozturk i sar., 1998; Nastasijević i sar., 2012). U istraživanjima drugih autora takođe je utvrđeno da se

visoke količine genciopikrozida najbolje ekstrahuju smešama etanola i vode posebno u zapreminskom odnosu 55:45 (Arino i sar, 1997).

Tabela 4.8. Procentualna zastupljenost konstituenata u korenu lincure. Svi eksperimenti su urađeni u triplikatu a rezultati su izraženi kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija.

*konstituent	vodeni	kiseli	25% EtOH	50% EtOH	75% EtOH	96% EtOH	Me- OH
loganska kiselina	0,98 $\pm 0,13$	0,72 $\pm 0,11$	0,30 $\pm 0,07$	0,84 $\pm 0,02$	0,64 $\pm 0,04$	0,54 $\pm 0,02$	0,61 $\pm 0,03$
svertiamarin	0,51 $\pm 0,02$	0,19 $\pm 0,03$	0,21 $\pm 0,08$	0,41 $\pm 0,10$	0,28 $\pm 0,04$	0,20 $\pm 0,01$	0,55 $\pm 0,01$
genciopikrozid	2,53 $\pm 0,27$	1,16 $\pm 0,01$	0,95 $\pm 0,09$	2,50 $\pm 0,31$	1,65 $\pm 0,02$	1,35 $\pm 0,08$	2,64 $\pm 0,20$
sverozid	0,39 $\pm 0,05$	0,18 $\pm 0,01$	0,19 $\pm 0,04$	0,58 $\pm 0,13$	0,26 $\pm 0,13$	0,18 $\pm 0,01$	0,53 $\pm 0,11$
izoviteksin	0,004 $\pm 0,001$	n.d.	0,003 $\pm 0,001$	0,022 $\pm 0,003$	0,011 $\pm 0,002$	0,003 $\pm 0,001$	0,026 $\pm 0,001$
amarogentin	0,014 $\pm 0,003$	0,023 $\pm 0,005$	0,024 $\pm 0,002$	0,025 $\pm 0,002$	0,032 $\pm 0,001$	0,038 $\pm 0,006$	0,172 $\pm 0,035$
izogentizin	n.d. **	n.d.	n.d.	0,24 $\pm 0,01$	0,48 $\pm 0,03$	0,96 $\pm 0,08$	1,07 $\pm 0,10$

*zastupljenost konstituenata u ekstraktima korena lincure je izražena u procentima, preračunatih na sadržaj suve supstance svakog od ekstrakta.

**n.d. – odgovarajući pik konstituenta nije detektovan ili je površina < LOD.

Međutim, visok stepen ekstrakcije genciopikrozida takođe se može postići i nakon ekstrakcije samlevenog korena u ključaloj vodi. Zastupljenost konstituenata lincure prikazanih u tabeli 4.8, može se uporediti sa rezultatima dobijenim u prethodnim studijama (Aberham i sar., 2007; Mustafa i sar., 2015). Kao što se iz tabele 4.8 može videti, genciopikrozid i loganska kiselina su najzastupljnija jedinjenja u korenu lincure, zatim slede svertiamarin i sverozid i izogentizin. U malim količinama prisutni su i amarogentin i izoviteksin, čija koncentracija, kao i u slučaju izogentizina dosta zavisi od ekstrakcionih uslova. Stoga, rezultati dobijeni u ovom radu u odnosu na rezultate koje se mogu naći u drugim studijama potiču od različite podvrste (u našem slučaju *G. lutea*

ssp. *symphyandra*) korišćene za analizu ali i rastvarača korišćenog za ekstrakciju. Najuočljivija razlika među ispitivanim ekstraktima je prisustvo izogentizina, posebno u slučaju ekstrakata sa udelom alkohola većim od 50%. Zastupljenost amarogentina u ekstraktima lincure se kreće od 0,01 do 0,04% ali je utvrđeno da se u nekim podvrstama samo povremeno nalazi, a sadržaj varira od 0,03 do 0,3%, zavisno od porekla i načina obrade korena (Azman i sar., 2014; Aiello i sar., 2013; Gonzalez-Lopez, 2014). Kada je reč o sverozidu i svertiamarinu, sekoiridoidima, po strukturi sličnim genciopikrozidu, njihov sadržaj u ekstraktima se kreće od 0,2 do 0,7 % u slučaju sverozida i od 0,2 do 0,5% u slučaju svertiamarina. Ksantoni su u lincuri zastupljeni u ukupnoj količini od oko 1%, a zastupljenost izogentizina detektovanog u ispitivanim ekstraktima varira od 0,05 do 0,48%. Rezultati kvalitativne analize su pokazali da se pored izogentizina, u korenu lincure nalaze i druga ksantonska jedinjenja poput: gentiozida, 1,3-dihidroksi-2,5-dimetoksi ksantona, metilbelidifolina, metilsvertianina, gentizina i eustomina, koji u ovoj studiji nisu kvantifikovani. Pored navednih klasa jedinjenja, u korenu lincure su prisutni i mnogi drugi konstituenti poput: lako isparljivih ulja, u koncentraciji do 0,2%, zatim, ugljenih hidrata, mono, di- i trisaharida (EMA, 2009).

4.3. Inhibicija enzima ekstraktima *G. lutea* i njenim konstituentima

Ekstrakti lincure i njeni konstituenti su ispitivani kao potencijalni inhibitori enzima MPO, AChE i E-NTPDaze sa membrane sinaptozoma pacova.

MPO pripada familiji hem peroksidaza i najviše je eksprimiran u neutrofilima, u manjem stepenu u monocitima i nekim tipovima makrofaga. Učestvuje u inicijalnom imunom odgovoru formiranjem mikrobicidnih oksidanata i difuzabilnih radikalskih vrsta. Posebnost ovog enzima se ogleda u mogućnosti formiranja HOCl korišćenjem hlorida kao kosupstrata u reakciji sa vodonik peroksidom. Hipohlorna kiselina, jak antimikrobni agens sa druge strane dovodi do oštećenja okolnog tkiva i inicijacije i progresije vaskularne inflamacije (Malle i sar, 2007). Povezanost MPO sa aterosklerozom je ustanovljena nakon potvrde da njenim delovanjem dolazi do oksidacije lipoproteina niske i visoke gustine (LDL i HDL) čime se smanjuje mogućnost uklanjanja aterosklerotičnih naslaga (Nicholls i Hazen, 2005). Takođe, MPO svojim delovanjem učestvuje u nastanku inflamatornih, neurodegenerativnih, autoimunih i bolesti bubrega, zbog čega je razvoj novih inhibitora sve više aktuelan.

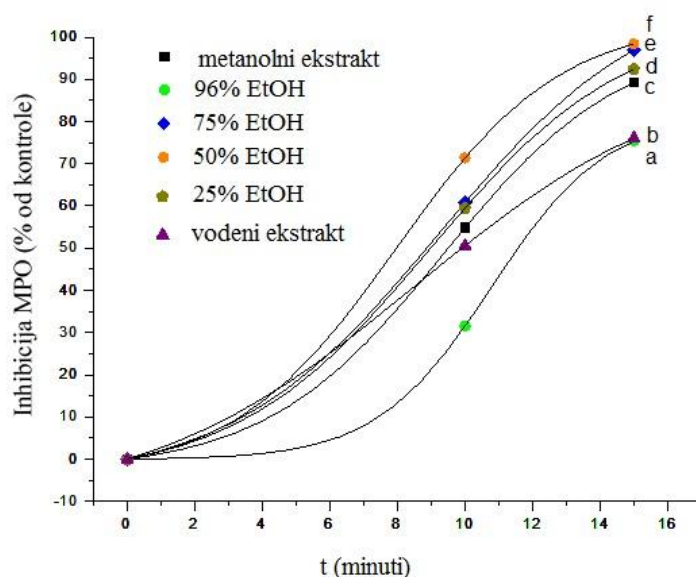
Pronalaženje inhibitora AChE je sa druge strane važno iz nekoliko razloga. Procenjuje se da oko 4,5% populacije starije od 70 godina pati od Alchajmerove bolesti. Inhibitori AChE su za sada jedini odobreni lekovi u tretmanu ove bolesti a koriste se i u tretmanu drugih neuroloških bolesti i demencije. Tretman inhibitorima je uglavnom palijativan, često sa varijabilnim kliničkim odgovorom. Stoga je pronalaženje novih inhibitora i dalje aktuelno prvenstveno u cilju sprečavanja formiranja amiloidnih naslaga. Pored navedenog, pronalaženje novih inhibitora je značajno i za reaktivaciju AChE inaktiviranog organofosfatnim pesticidima i drugim toksičnim jedinjenjima. Smatra se da je periferno vezujuće mesto, najverovatnije ciljno mesto za delovanje inhibitora kojim bi se aktivnost AChE modulirala (Johnson i Moore, 2006).

Ekstraćelijski ATP i drugi nukleozidi predstavljaju važne signalne molekule posredstvom kojih se ostvaruju različiti efekti u skoro svim organima i tkivima, uključujući i neadrenergičku i neholinergičku kontraktilnost glatkih mišića, zatim nociceptivne (i antinociceptivne) efekte i neuroaktivnost u CNSu (Yegutkin, 2014).

Smatra se da su ATP i adenzin uključeni u mehanizam sinaptičkog plasticiteta i procesa pamćenja. Adenzin takođe deluju preko svojih A1 receptora, kao endogeni homeostatski faktor spavanja. Najzad, smatra se da je poremećaj purinergičke signalizacije prisutan kod većeg broja neurodegenerativnih bolesti, poput Alchajmerove, Parkinsonove, Hantingtonove bolesti i multipleks skleroze. Takođe, postoje indicije da je aktivnost E-NTPDaza promenjena i kod epilepsije i nekih psihijatrijskih bolesti (Burnstock, 2010). Zbog svega navedenog kao i usled nedostatka dovoljno specifičnih inhibitora E-NTPDaza, postoji potreba za razvojem novih inhibitora ovih enzima sa ciljem njihove terapijske primene.

4.3.1. Inhibicija mijeloperoksidaze (MPO)

Uticao ekstrakata lincure na aktivnost MPO je ispitivana u funkciji inkubacionog vremena, pri finalnoj koncentraciji ekstrakta od 100 µg/mL, u toku 15 minuta. Rezultati inhibicije su prikazani na slici 4.10 i predstavljaju procenat enzimske inhibicije u odnosu na kontrolu.



Slika 4.10. Inhibicija MPO (% u odnosu na kontrolu) u funkciji od vremena. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri eksperimenta rađenih u duplikatu (Nastasijević i sar., 2012).

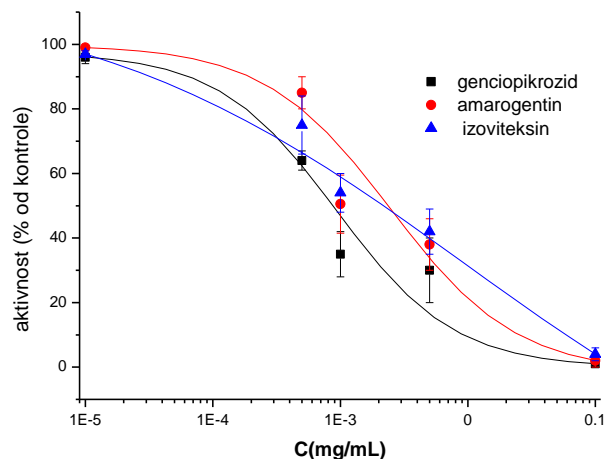
Rezultati pokazuju da procenat enzimske inhibicije raste sa vremenom inkubacije, dostižući plato nakon petnaestog minuta. Najveći procenat inhibicije u grupi ispitivanih ekstrakata pokazali su 50% i 75% etanolno-vodeni ekstrakti, jer su nakon 15 minuta inkubacije indukovali 100% inhibiciju MPO. Međutim ako uporedimo procenat inhibicije dostignut u kraćem vremenskom periodu, od 10 minuta, uočavamo da je 50% etanolno vodeni ekstrakt najpotentniji inhibitor MPO. Naime, on inhibira 71% MPO, nakon 10 minuta izlaganja enzima ekstraktima, za razliku od 96% etanolnog ekstrakta, koji za isto vreme inhibira 31% enzima. Prethodna istraživanja su pokazala da neki antiinflamatorni lekovi inhibiraju aktivnost MPO (Vieira i sar., 2011). Stoga, inhibitorna aktivnost ekstrakata prema MPO ukazuje na antiinflamatornu aktivnost lincure. Ovaj podatak može biti koristan prilikom razmatranja bioloških efekata preparata koji su bazirani na ekstraktima lincure, koja se inače tradicionalno koristi za lečenje digestivnih problema. Pored antiinflamatornih lekova, mnoga polifenolna jedinjenja, poput kvercetina, kurkumina, galne i derivata hidroksibenzoeve kiseline (ferulna i kofeinska kiselina) pokazuju inhibitornu aktivnost prema MPO (Kato i sar., 2003).

S obzirom da su ekstrakti pokazali visok stepen inhibitorne aktivnosti, kao potencijalni inhibitori MPO izabrani su pojedini konstituenti lincure, koji su se u prethodnim studijama pokazali kao farmakološki aktivna jedinjenja. Genciopikrozid, amarogentin i izoviteksin su se pokazali kao potentni inhibitori enzima, a njihova inhibitorna aktivnost je ispitivana u zavisnosti od koncentracije, slika 4.11 i tabela 4.9.

Tabela 4.9. Inhibicija MPO (odnosu na kontrolu) indukovana konsituentima lincure.

$C_{\text{inhibitora}}$ (mg/mL)	Inhibicija MPO (% od kontrole)		
	0.005	0.001	0.0005
amarogentin	62	49.5	15
izoviteksin	58	46	25
genciopikrozid	70	65	36

Na osnovu analize sigmoidne inhibicione krive, izračunata je IC_{50} vrednost, koja predstavlja koncentraciju inhibitora koja indukuje 50% inhibicije enzimske aktivnosti.



Slika 4.11. Inhibicione krive konstituenata lincure, na osnovu kojih su određene IC_{50} vrednosti konstituenata. Rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri eksperimenta rađenih u duplikatu.

U grupi ispitivanih konstituenata, genciopikrozid je pokazao najveći stepen inhibicije sa $IC_{50} = 0,8 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$, zatim izoviteksin ($IC_{50} = 2,2 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$) i amarogentin ($IC_{50} = 2,4 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$). U poređenju sa kvercetinom (flavonoid) koji inhibira MPO sa $IC_{50} = 0,33 \mu\text{g/ml}$, genciopikrozid je slabiji inhibitor (Momić i sar. 2008). Ovaj rezultat je interesantan za dalja istraživanja, s obzirom na to da inhibicija enzima zavisi od strukture inhibitora a genciopikrozid pripada klasi sekoiridoida, jedinjenja koja su dominantna u korenu lincure ali i drugih biljnih vrsta u porodici *Gentianaceae*.

Da bi utvrdili pojedinačni doprinos konstituenata inhibiciji MPO, testirane su različite smeše inhibitora i upoređivane sa inhibicijom dobijenom sa pojedinačnim konstituentima. Iz rezultata prikazanih u tabeli 4.10 se uočava da smeše koje ne sadrže genciopikrozid značajno manje inhibiraju MPO. Ovaj podatak ukazuje da njegovo prisustvo dovodi do povećanja stepena inhibicije enzima, tretiranih smešama konstituenata.

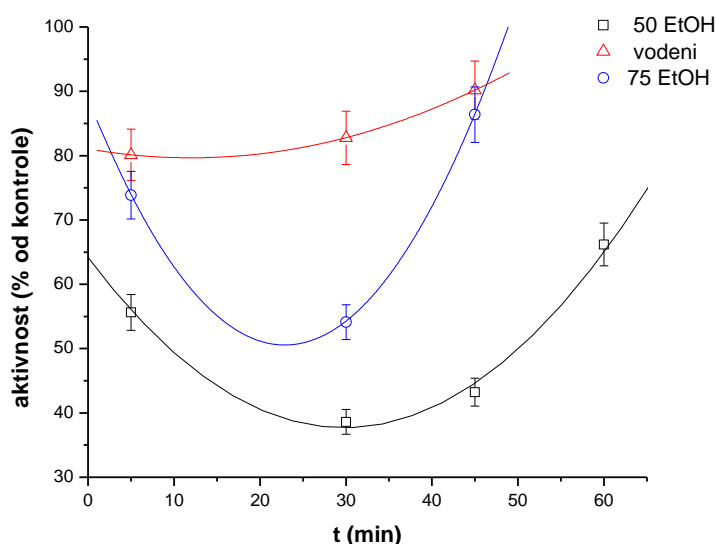
Tabela 4.10. Inhibicija aktivnosti MPO indukovana pojedinačnim konstituentima i njihovim smešama: (I) amarogentin i izoviteksin, (II) amarogentin i genciopikrozid, (III) izoviteksin i genciopikrozid i (IV) amarogentin, izoviteksin i genciopikrozid. Koncentracija pojedinačnih konstituenata kao i svakog od njih u smeši bila je 1 µg/mL.

Inhibitor	Inhibicija MPO (% od kontrole)
Amarogentin	49±2
Izoviteksin	46±2
Genciopikrozid	65±3
A+I	18±1
A+G	44±2
I+G	46±2
A+I+G	43±2

Rezultati dobijeni sa smešama konstituenata su u saglasnosti sa dobijenim IC₅₀ vrednostima konstituenata, koji takođe pokazuju da je genciopikrozid najpotentniji inhibitor MPO. Najzad, oni donekle objašnjavaju visok stepen inhibicije koji pokazuju etanolno vodeni ekstrakti koji sadrže najveći stepen genciopikrozida. Naime, rezultati kvantitativne analize ekstrakta (Nastasijević i sar., 2012) pokazali su da 50% i 96% etanolno vodeni ekstrakti sadrže najveću koncentraciju genciopikrozida (13,92 i 18,08 %). Međutim iako 96% etanolno vodeni ekstrakt sadrži veću količinu genciopikrozida, on i dalje inhibira MPO u manjoj meri od 50% etanolno vodenog ekstrakta, što ukazuje na mogućnost da i druga jedinjenja koja se nalaze u ovim ekstraktima značajno doprinose inhibiciji enzima.

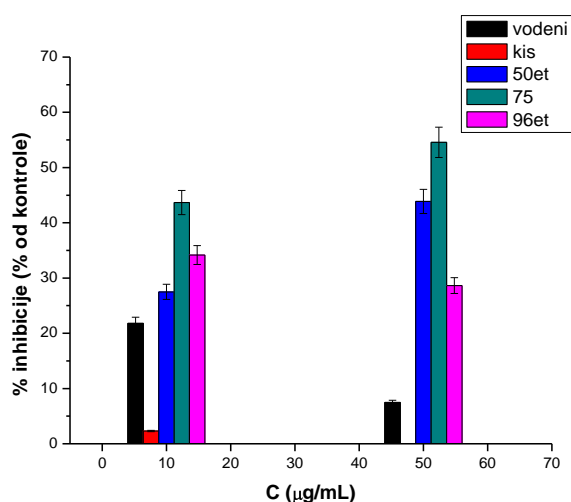
4.2.2. Inhibicija acetilholinesteraze (AChE)

U preliminarnim eksperimentima ispitivano je optimalno vreme inkubacije enzima sa inhibitorom (ekstrakti lincure) kao i optimalna koncentracija enzima prisutnog u reakcionoj smeši. AChE iz električne jegulje je tetramer, sastavljen iz 4 jednake subjedinice, od kojih svaka ima 70 kDa. Rezultati inhibicije AChE u funkciji od inkubacionog vremena prikazani su na slici 4.12. U početnim ispitivanjima aktivnost enzima u reakcionoj smeši je bila 0,038U, a koncentracija ekstrakata 10 µg/mL.



Slika 4.12. Aktivnost AChE u odnosu na kontrolu, u zavisnosti od inkubacionog vremena, u prisustvu vodenog i etanolno vodenih ekstrakata (50 i 75 %).

Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da je najveći stepen inhibicije enzimske aktivnosti postignut sa etanolno-vodenim ekstraktima, nakon 30 minuta inkubacije. Stoga su u daljim eksperimentima ekstrakti i konstituenti lincure inkubirani 30 minuta sa AChE. Pošto su ekstrakti u koncentraciji od 10 µg/mL pokazali značajan stepen inhibicije (od 20 do 60%) u daljim eksperimentima, ispitivan je stepen inhibicije enzima u zavisnosti od koncentracije ekstrakata u koncentracionom opsegu od 1 do 100 µg/mL a rezultati su prikazani na slici 4.13.



Slika 4.13. Inhibicija AChE ekstraktima lincure: vodeni, kiseli i etanolno vodeni (50, 75 i 96 %, v/v).

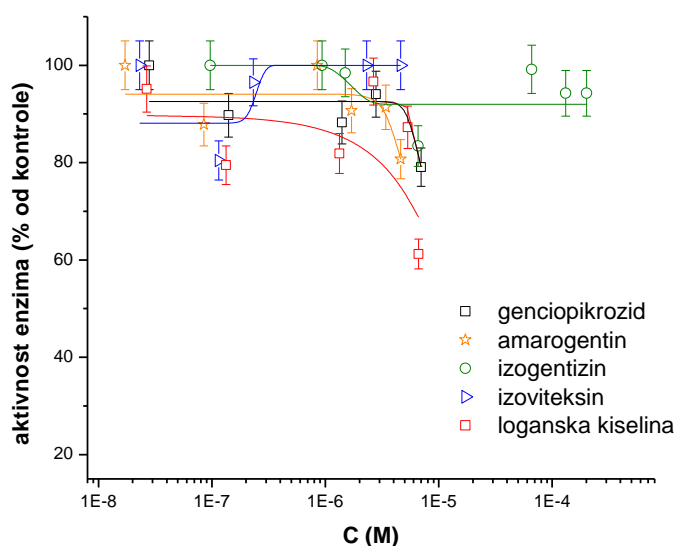
Sa porastom koncentracije ekstrakta, većom od 50 µg/mL nije došlo do povećanja inhibicije AChE, već je u slučaju vodenog i kiselog ekstrakta došlo do smanjenja procenta inhibicije. Rezultati inhibicije AChE sa ekstraktima lincure pokazuju da su etanolno vodeni ekstrakti bolji inhibitori ovog enzima od vodenih ekstrakata. Ekstrakti su takođe ispitivani u finalnoj koncentraciji od 5 µg/mL sa manjom količinom enzima, tj. aktivnošću u reakcionoj smeši od 0,03 U, sa vremenom inkubacije od 15 minuta a rezultati su prikazani u tabeli 4.11.

Tabela 4.11. Inhibicija AChE ekstraktima lincure, u finalnoj koncentraciji od 5 µg/mL i smanjenom količinom enzima (0,03U).

Ekstrakt	% inhibicije (u odnosu na kontrolu)
vodeni	54,89
kiseli	26,92
25% et. vodeni	46,01
50% et. vodeni	62,39
75% et. vodeni	56,75
96% et. vodeni	20,66

Dobijeni rezultati potvrđuju inhibitornu sposobnost 50 i 75% etanolno vodenih ekstrakata, međutim u ovom slučaju i vodeni ekstrakt se pokazao kao dobar inhibitor AChE. Pošto se vodeni i etanolno vodeni ekstrakti razlikuju po svom kvantitativnom sastavu, pri čemu vodeni i kiseli ekstrakt ne sadrže ksantonska jedinjenja, dalje su ispitivani konstituenti lincure, kao i njihove smeše, kao potencijalni inhibitori AChE.

Aktivnost AChE ispitivana je u prisustvu konstituenata lincure u koncentracionom opsegu od $1,7 \times 10^{-8}$ M (amarogentin) do 2×10^{-4} M (izogentizin) odnosno u opsegu masenih koncentracija od 0,01 do 2,5 $\mu\text{g/mL}$, slika 4.14.

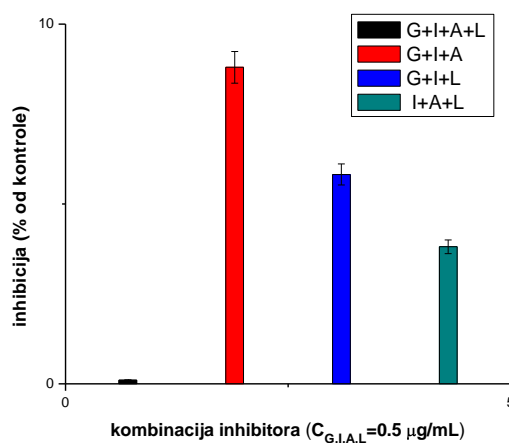


Slika 4.14. Aktivnost enzima AChE (0,03 U) u prisustvu: genciopikrozida, amarogentina, izogentizina, izoviteksina i loganske kiseline kao inhibitora.

Na osnovu rezultata dobijenih inhibicijom AChE konstituentima lincure, možemo zaključiti da je stepen enzimske inhibicije u opsegu, od 15 do 40%, pri koncentracijama od 4 do 7 μM . Najveći stepen inhibicije pokazali su loganska kiselina i amarogentin. Loganska kiselina inhibira oko 39% AChE aktivnosti pri koncentraciji od 6,77 μM , dok amarogentin dostiže 19,28% inhibicije pri koncentraciji od 4,61 μM . Takođe je primećeno da pri najvišim koncentracijama inhibitora aktivnost enzima ostaje nepromenjena, odnosno 100%. Već je navedeno da AChE može biti inhibiran i samim supstratom, kad je prisutan u povećanoj koncentraciji. Pretpostavlja se da je mesto vezivanja viška susprata, periferno anjonsko mesto sa nekompetitivnim mehanizmom

inhibicije. U slučaju drugih ispitivanih jedinjenja, bilo *in vitro* ili *in silico*, utvrđeno je da većina inhibitora interaguje sa amino kiselinama smeštenim u perifernom anjonskom mestu AChE. Samo kod pet ispitivanih inhibitora su zabeležene dodatne interakcije u aktivnom katalitičkom centru (Berg i sar., 2011).

U eksperimentima u kojima je ispitivana inhibicija enzima ekstraktima, pokazano je da etanolno vodeni ekstrakti (50 i 75 %, v/v) ispoljavaju najviši nivo inhibicije AChE pri koncentraciji od 50 $\mu\text{g/mL}$. Najdominantnije komponente u etanolno vodenim ekstraktima su genciopikrozid, loganska kiselina i izogentizin. Prilikom testiranja inhibitorne moći konstituenata, genciopikrozid i izogentizin nisu pokazali visok nivo inhibicije. Loganska kiselina kojom je postignut najviši nivo inhibicije prisutna je u najvećoj koncentraciji u vodenom ekstraktu. Ipak, vodeni ekstrakt pokazuje slabiju inhibiciju AChE. Jedno od mogućih objašnjenja je da druga jedinjenja, takođe prisutna u ekstraktima lincure mogu da utiču sinergistički na ukupnu inhibiciju koju pokazuju ekstrakti. Zbog ovoga je dalje ispitivana inhibicija AChE smešama konstituenata a rezultati su prikazani na slici 4.15.



Slika 4.15. Inhibicija AChE smešama konstituenata (konstituenti su označeni početnim slovima). Finalna koncentracija svakog od konstituenta u smeši je 0,5 $\mu\text{g/mL}$.

Finalna koncentracija svakog od konstituenata u ispitivanim smešama bila je 0,5 $\mu\text{g/mL}$. Pri navedenim uslovima, smeša sva četiri konstituenta pokazala je inhibiciju manju od 1%. Druga testirana kombinacija bez loganske kiseline dostigla je najviši nivo inhibicije, oko 9%. Najniža inhibicija postignuta je sa smešom koja je sadržala

izoviteksin, amarogentin i logansku kiselinu. Rezultati ukazuju na antagonističko delovanje loganske kiseline, kada je prisutna u ovako pripremljenoj sintetičkoj smeši. Štaviše u eksperimentu u kojem je AChE inhibirana pojedinačnim konstituentima (slika 4.14) nivo inhibicije pojedinačnih konstituenata (pri koncentraciji od 0,5 µg/mL) bila je u opsegu od 10 do 30%. Zbog ovoga su pripremljene nove smeše konstituenata, ali u koncentraciji od 0,01 µg/mL. Smeše su bile sastavljene od po dva konstituenta, a rezultati inhibicije prikazani su u tabeli 4.12.

Tabela 4.12. Inhibicija AChE u prisustvu smeša konstituenata lincure ($C_{G,A,L,I}=0,01$ µg/mL). Svaki konstituent označen je svojim početnim slovom.

Smeša konstituenata	% inhibicije
G+A	10,52
G+I	18,10
G+L	22,19
L+A	0,9
L+I	2,23

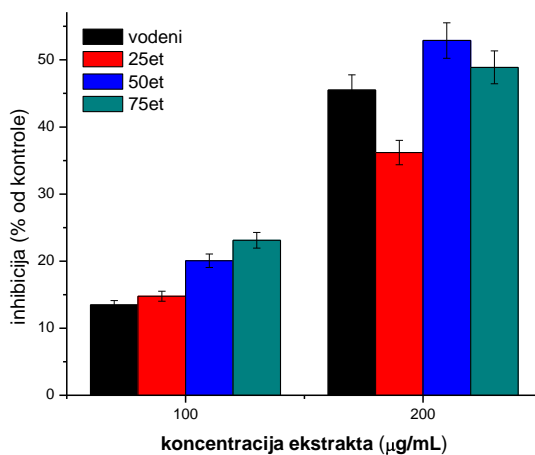
U ovom slučaju dobijen je veći stepen inhibicije u svim smešama koje su sadržale genciopikrozid. Smeše bez genciopikrozida a sa loganskom kiselinom, nisu pokazale značajan nivo inhibicije. U navedenom slučaju loganska kiselina je pokazala antagonističko a genciopikrozid sinergističko delovanje. Na osnovu dobijenih rezultata ne može se pouzdano utvrditi doprinos svakog od testiranih jedinjenja inhibiciji koju pokazuju ekstrakti. Takođe, treba pomenuti da je loganska kiselina, na pH 8, pri kojem se ispituje aktivnost AChE, negativno naelektrisana, zbog svoje karboksilne grupe. Jedino mesto u aktivnom centru enzima za koje bi ovako naelektrisan molekul mogao da se veže je His na poziciji 440, estarskog vezivnog mesta. Takođe, pored ispitivanih konstituenata, u literaturi se navodi da koren lincure sadrži i alkaloida, koji sadrže heterociklični prsten sa azotovim atomom. Moguće je da upravo ova jedinjenja doprinose boljoj inhibiciji ekstrakata koji ih sadrže.

Bez obzira na mehanizam kojim ekstrakti inhibiraju AChE, dobijni rezultati su značajni sa medicinskog aspekta, jer se inhibitori AChE koriste kao lekovi kod Alchajmerove bolesti. Kada je reč o ekstraktima iz drugih biljaka koje pripadaju porodici *Gentianaceae*, pokazano je da *G. asclepiadea*, *G. cruciata*, *G. olivieri*, *G. septemfida* i *G. verna* inhibiraju aktivnost AChE i butirilholinesteraze (BChE) za oko 50% (Senol i sar., 2012). U ovoj studiji, najveći stepen inhibicije je postignut sa dihlormetanskim ekstraktom lista *G. verna*, koji u koncentraciji od 100 µg/mL inhibira 53,65% AChE, dok se etilacetatni ekstrakt korena *G. cruciata* pokazao kao najbolji inhibitor BChE (50,72%) (Senol i sar., 2012). Glavni konstituenti u ispitivanim ekstraktima su bili genciopikrozid, svertiamarin, izoorientin, izovitksin i viteksin. Izoorientin i uopšte C-glukozilflavoni su inače u većoj koncentraciji prisutni u nadzemnim delovima biljaka iz roda *Gentiana*. U pomenutom istraživanju genciopikrozid i svertiamarin se nisu pokazali kao efikasni inhibitori AChE.

Međutim pomenuti autori takođe navode mogućnost da loganska kiselina predstavlja potencijalni inhibitor AChE jer je intermedijer u biosintezi indolnih alkaloida kod *Gentana*, što je u našim ispitivanjima i potvrđeno. Kada je reč o C-glukozilflavonima, izoorientinu i izoviteksinu, u istraživanjima drugih autora potvrđeno je da poseduju zapaženu inhibitornu aktivnost prema AChE (Conforti i sar. 2009). U našim ispitivanjima izogentizin kao predstavnik ksantonskih jedinjenja nije pokazao značajan nivo inhibicije. Međutim u ispitivanju aktivnosti AChE u prisustvu ksantonskih jedinjenja iz *Gentiana campestris*, inhibiciju su pokazali belidifolin i belidifolin-8-O-glukozopiranozid. Štaviše belidifolin je pokazao sličnu inhibitornu aktivnost kao i galantamin, koji se koristi za tretman blažih simptoma Alchajmerove bolesti (Urbain i sar., 2004). U poređenju sa inhibitornom aktivnošću drugih biljaka, poput ekstrakata izolovanih iz biljaka koje pripadaju porodici *Asteraceae* i *Solanaceae*, ekstrakti lincure pokazali su bolju inhibitornu aktivnost. Naravno u pitanju su samo određene vrste iz pomenutih porodica: *Schistocarpha sinforosi* Cuatrec. (IC₅₀ = 145,31 mg/l) (*Asteraceae*), *Solanum leucocarpum* Dunal (IC₅₀ = 204,59 mg/l), i *Witheringia coccoloboides* (Damm.) Hunz (IC₅₀ = 220,68 mg/l) (Nino i sar., 2006).

4.3.3. Inhibicija Ekto-nukleotid trifosfat difosfohidrolaza (E-NTPDaze)

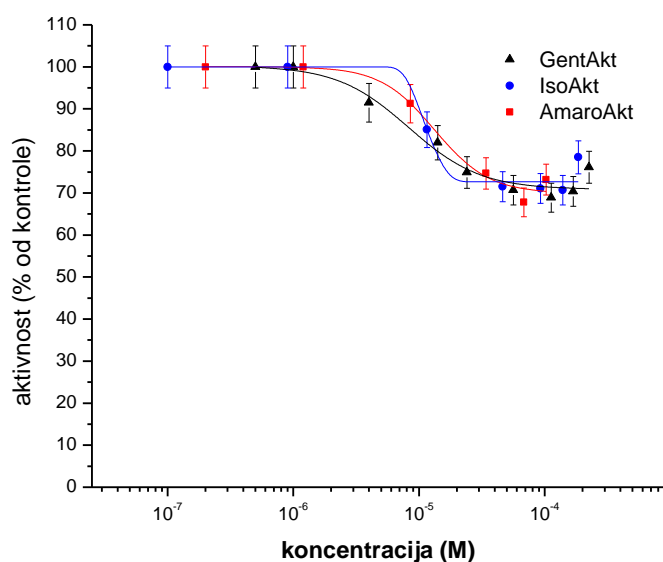
Pre ispitivanja interakcija između odabranih konstituenata lincure i E-NTPDaze, ispitan je uticaj vodenog i etanolno vodenih ekstrakta lincure (25, 50 i 75% etanola u vodi, v/v) u koncentracijama od 100 i 200 $\mu\text{g/mL}$, u reakcionoj smeši. Radni rastvori su pripremani u vodi da bi se izbegla enzimaska inhibicija organskim rastvaračem, odnosno metanolom. Naime, u našem preliminarnom ispitivanju utvrđeno je da 2% sadržaj metanola u vodi inhibira 24,82% E-NTPDazne aktivnosti, što je takođe potvrđeno i u prethodnoj studiji (Rico i sar., 2006). Optimalno vreme inhibicije je utvrđeno u eksperimentu sa 50% etanolno vodenim ekstraktom i iznosi 20 minuta. Rezultati inhibicije enzima ekstraktima ukazuju na značajan nivo enzimske inhibicije, u opsegu od 35 do 50%, u prisustvu 200 $\mu\text{g/mL}$ ekstrakata lincure, slika 4.16.



Slika 4.16. Inhibicija E-NTPDaze u prisustvu ekstrakata lincure u funkciji od koncentracije. Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri eksperimenta rađena u duplikatu \pm SD (Nastasijević i sar, 2016).

Pošto su ekstrakti pokazali različitu inhibitornu aktivnost, u daljim eksperimentima ispitan je uticaj pojedinačnih konstituenata na enzimsku inhibiciju, uzimajući u obzir i njihovu zastupljenost u ekstraktima. Kao inhibitori E-NTPDaze testirani su amarogentin, izoviteksin i genciopikrozid, kao i njihove sintetičke smeše.

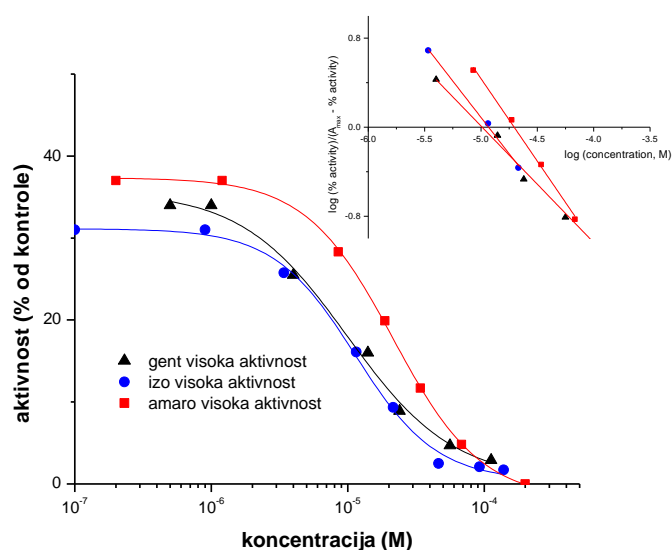
Loganska kiselina je u preliminarnim eksperimentima pokazala nizak nivo inhibicije pa nije korišćena u daljim eksperimentima. Odabrani konstituenti su ispitivani u koncentracionom opsegu od 1×10^{-7} do 3×10^{-4} M u standardnom enzimskom eseju kao što je opisano u odeljku Materijal i metode. Ovaj koncentracioni opseg je odabran na osnovu zastupljenosti konstituenata u 200 μ g ekstrakata. Rezultati ispitivanja konstituenata sa E-NTPDazom, ukazuju na bifazni odgovor enzima, slika 4.17, u slučaju sve tri ispitivane komponente.



Slika 4.17. Aktivnost E-NTPDaze u prisustvu amarogentina (kvadrat), genciopikrozida (trougao) i izoviteksina (krug). Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost tri eksperimenta rađena u duplikatu \pm SEM. (Nastasijević i sar, 2016).

Naime, izvestan stepen inhibicije enzimske aktivnosti, oko 35%, postignut je u koncentracionom opsegu od 10^{-6} do 10^{-4} M, a daljim povećanjem koncentracije inhibitora enzimska aktivnost ostala je nepromenjena, odnosno oko 65%, u odnosu na kontrolu. Štaviše, došlo je do poklapanja inhibicionih krivih, što ukazuje na sličan odgovor konstituenata na enzim, koji je koncentraciono zavisna. Takođe, treba napomenuti da visoke koncentracije inhibitora nisu ispitivane zbog njihove slabe rastvorljivosti u vodi (amarogentin i izoviteksin). Na osnovu eksperimentalnih rezultata

dobijenih sa konstituentima, očigledno je da grafik zavisnosti enzimske aktivnosti od koncentracije inhibitora, u svim slučajevima predstavlja zbirnu vrednost sigmoidnih krivih i platoa. Matematičkom analizom rezultata prikazanih na slici 4.17, pretpostavljeno je da je princip zakona o dejstvu masa u potpunosti zadovoljen i da grafik totalne aktivnosti, ustvari predstavlja liniju koja potiče od “dva enzima koji deluju na isti supstrat” (Krstić i sar., 2004; Vasić i sar., 1999). Teorijske krive izoenzima sa visokom aktivnošću, dobijene su oduzimanjem vrednosti platoa, dobijenog na osnovu ekperimentalnih podataka i predstavljeni su na slici 4.18.



Slika 4.18. Inhibicione krive visoko afinitetnih izoformi E-NTPDaza. U insetu je prikazana Hilova analiza inhibicionih krivih. (Nastasijević i sar, 2016).

Krive su zatim fitovane sigmoidnom funkcijom, a pored toga urađena je Hilova analiza inhibicione krive u delu sa visokom aktivnošću enzima, slika 4.18, inset. Vrednosti Hilovog koeficijenta n , određene Hilovom analizom predstavljene su u tabeli 4.13, zajedno sa IC_{50} vrednostima koje su dobijene fitovanjem inhibicionih krivih pomoću sigmoidne funkcije. Kao što se može videti, Hill-ov koeficijent je veći od 1 ($n > 1$), što ukazuje da se inhibitor kooperativno vezuje za enzim. Korišćenjem izračunatih IC_{50} vrednosti, izračunate su totalne aktivnosti predstavljene na slici 4.17. Rezultati teorijske analize pokazali su odlično poklapanje sa eksperimentalno dobijenim

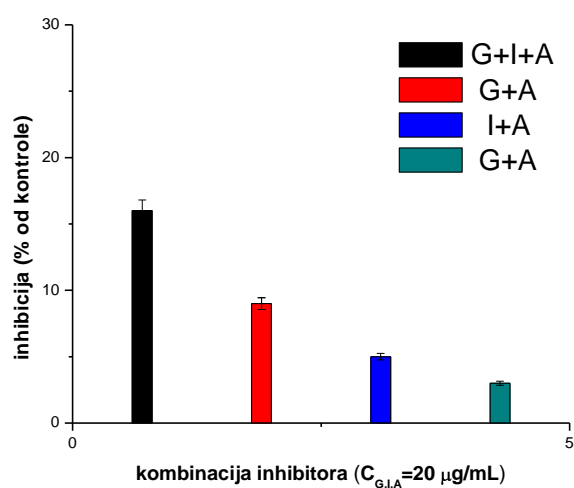
podacima. Pošto su testirani konstituenti pokazali sličan nivo inhibicije, a ekstrakti razliku u enzimskoj inhibiciji, napravljene su smeše pojedinačnih inhibitora da bi se utvrdio njihov međusobni uticaj i doprinos inhibiciji E-NTPDaze.

Tabela 4.13. Parametri inhibicije E-NTPDaze indukovani amarogentinom, izoviteksinom i gencipikrozidom.

Inhibitor	sigmoidna kriva IC ₅₀ (M)	p*	Hilova analiza IC ₅₀ (M)	n**	IC ₅₀ (µg/mL)
amarogentin	9,89x10 ⁻⁶	1,12	(1,02x10 ⁻⁵)	1,04	5,79
izoviteksin	1,13 x10 ⁻⁵	1,45	(1,17x10 ⁻⁵)	1,31	4,88
gentiopirosid	2,15 x10 ⁻⁵	1,35	(1,95x10 ⁻⁵)	1,48	7,66

* parameter sigmoidne funkcije; **Hilov koeficijent

Zbog navedenog razloga, napravljene su četiri različite smeše, koje su sadržale kombinacije gencipikrozida, amarogentina i izoviteksina, slika 4.19.



Slika 4.19. Inhibicija E-NTPDaze sa smešom konstituenata (imena su predstavljena početnim slovima). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost dobijena u dva odvojena eksperimenta ±S.D.

Najviši nivo inhibicije, oko 16% postignut je sa smešom koja se sastojala od genciopikrozida, izoviteksina i amarogentina, svakog u finalnoj koncentraciji od po 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sve ostale kombinacije, koje su sadržale dva konstituenta inhibirale su enzim u manjem stepenu, odnosno, 3, 5 i 10%, slika 4.19. Inhibicije E-NTPDaze dobijene u eksperimentu sa pojedinačnim konstituentima, u istoj koncentraciji (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bile su oko 30%, kao što je prikazano u tabeli 4.14.

Tabela 4.14. Aktivnost enzima E-NTPDaze u prisustvu pojedinačnih konstituenata i njihovih smeša. Svi eksperimenti su urađeni u duplikatu a rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SD.

Inhibitor	Koncentracija* (μM)	Aktivnost E-NTPDaze (inhibicija) (% od kontrole)
Genciopikrozid (G)	56	70,7 (29,3 \pm 1,2)
Izoviteksin (I)	46	71,5 (28,5 \pm 0,8)
Amarogentin (A)	34	74,7 (25,3 \pm 1,8)
G+I+A	56+46+34	84,5 (15,5 \pm 3,4)
G+I	56+46	90,2 (9,8 \pm 0,2)
G+A	56+34	97,0 (3,0 \pm 1,2)
I+A	46+34	94,7 (5,3 \pm 0,9)

* C=20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ svakog od konstituenata pojedinačno i u smeši.

Poređenje rezultata enzimske inhibicije dobijenih sa smešama i sa pojedinačnim konstituentima ukazuje na zaključak da ova tri jedinjenja pokazuju antagonistički efekat kada su prisutni u smeši u istoj masenoj koncentraciji. Stoga, rezultati enzimske inhibicije dobijeni sa smešama ne mogu da objasne visok nivo inhibicije (preko 50%) koju pokazuju ekstrakti lincure.

Međutim, moguće objašnjenje može se dati ako se u obzir uzme koncentracija konstituenata u testiranim ekstraktima (tabela 4.8, procentualna zastupljenost konstituenata lincure). Naime, prilikom testiranja pojedinačnih konstituenata, kao inhibitora E-NTPDaze, najmanja koncentracija svih inhibitora bila je 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, što

odgovara molarnom koncentracionom opsegu od 8×10^{-6} do $1,2 \times 10^{-5}$ M. Pri pomenutim koncentracijama genciopikrozid, izoviteksin i amarogentin pokazuju inhibiciju od 18,0; 14,9 i 8,7% (po redu kojem su navedeni). Očigledno je na osnovu rezultata kvantitativne analize da jedino 200 μg vodenog i 50% etanolno-vodenog ekstrakta, sadrže 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ genciopikrozida. Koncentracije izoviteksina i amarogentina u 200 μg svih ispitivanih ekstrakata su isuviše niske (mnogo manje od 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da bi inhibirale E-NTPDazu. Rezultati inhibicije sa pojedinačnim konstituentima, jasno ukazuju da u koncentracionom opsegu od 10^{-9} do 10^{-7} M ne dolazi do inhibicije enzima. Uprkos tome, ekstrakti u koncentraciji od 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibiraju E-NTPDazu u opsegu od 36 do 52%. Iako na prvi pogled možemo zaključiti da je povećana koncentracija genciopikrozida, u opsegu od 0,9 do 2,5% u korelaciji sa povećanim stepenom inhibicije E-NTPdaze (od 36 do 52%), 75% ekstrakt sadrži manju količinu genciopikrozida od vodenog ekstrakta a inhibira enzim u većem stepenu.

Ovakav stepen inhibicije je očigledno rezultat sinergističkog efekta genciopikrozida i drugih konstituenata prisutnih u ekstraktima korena lincure. Ova jedinjenja uključuju, svertiamarin i sverozid, koji takođe pripadaju sekoiridoidima kao i izogentizin i njegov strukturni izomer gentizin, koji pripadaju ksantonskoj klasi jedinjenja. Takođe, treba istaći da je izogentizin nađen samo u 50 i 75% etanolno vodenim ekstraktima. Stoga, može se pretpostaviti da izogentizin značajno doprinosi inhibitornoj aktivnosti etanolno vodenih ekstrakta koji ga sadrže.

Rezultati kvalitativne analize korena lincure, potvrđuju pretpostavku da povećana inhibitorna aktivnost ekstrakta, posebno vodeno etanolnih, potiče jednim delom od konstituenata lincure koji u ovom radu nisu ispitivani. Sa druge strane ako inhibiciju E-NTPDaze posmatramo kao rezultat sinergističkog efekta pojedinačnih komponenti, treba istaći da su konstituenti u svakom od ekstrakta prisutni u tačno određenom odnosu.

Ove pretpostavke su delimično potvrđene i u eksperimentima izvedenim sa smešama konstituenata. Čak i kada su ispitivani u višim koncentracijama od onih u koje se nalaze u ekstraktima, pojedinačni konstituenti nisu dostigli nivo inhibicije koji dostižu ekstrakti. Kao što je ranije pomenuto, druga farmakološki važna jedinjenja prisutna u korenu lincure su svertiamarin i sverozid, sekoiridoidi slične strukture kao i genciopikrozid, sa zastupljnošću od 0,2 do 0,4% (sverozid i svertiamarin). Ksantoni

prisutni u korenu lincure, se nalaze u ukupnoj količini do 1%, ali se, kao što je pomenuto ranije, ekstrahuju sa različitim prinomom u zavisnosti od polarnosti rastvarača. Tako u slučaju etanolno vodenih ekstrakta koncentracija izogentizina dostiže do 0,48%, u slučaju 75% EtOH ekstrakta (tabela 4.8). Pored izogentizina i gentizina, u korenu lincure nalaze se i gentiozid, kao i gentizin-1-O-primverozid. U poređenju sa inhibitorima, koji pripadaju drugim klasama jedinjenja, u prethodnim istraživanjima je pokazano, da neselektivni inhibitori E-NTPD-aza dostižu 25% inhibicije u koncentracionom opsegu od 17 do 62 μM . U ovu grupu inhibitora ubrajaju se “*cibacron blue, uniblue i reactive blue*”, kao i aromatični izotiocijanato sulfonati u koncentracionom opsegu od 10 do 464 μM (Rashida i Iqbal, 2013). U skorašnjem istraživanju, koje je obuhvatilo analizu 438 strukturno različitih jedinjenja, pretpostavljeno je da se jedinjenje koje pokaže najmanje 30% inhibicije E-NTPD-aze, pri koncentraciji od 20 μM , može smatrati kao potencijalno dobar inhibitor enzima (Fiene i sar., 2015). U stvari, jedinjenja koja su do sada poznata kao potentni inhibitori ovog enzima pripadaju grupi polioksometalata, sa IC_{50} vrednostima u opsegu od 1,7 do 3,4 μM , za 12- tungstosilicijumovu kiselinu i 12- tungstofosforu kiselinu (Čolović i sar., 2011).

Stoga, posmatrajući ekstrakte *G. lutea*, odnosno njihove konstituentne, možemo reći da predstavljaju potencijalne kandidate za razvoj inhibitora E-NTPDaze, pošto je njihov IC_{50} u opsegu koncentracija od 10 do 20 μM . Sa druge strane, u literaturi nema puno podataka o inhibiciji E-NTPDaze sa biljnim ekstraktima. U jednom od nedavnih istraživanja, u grupi od pedeset ispitivanih ekstrakta, izdvojeno je šest koji pokazuju značajni stepen inhibicije E-NTPDaze (iznad 50%) a izolovane su iz jetre (Ashraf i sar., 2011). Ovaj tip E-NTPDaze nađen u jetri, kostima i bubrezima predstavlja ustvari nespecifičnu alkalnu fosfatazu, koja pokazuje afinitet prema različitim monoestrima fosforne kiseline. Razlika ove ekto-ATPaze u odnosu na E-NTPDazu koja je prisutna na sinaptozomalnoj membrane pacova (izoforma 3) je u afinitetu prema ATP-u i u finalnom proizvodu enzimske reakcije.

Biljni ekstrakti do sada ispitivanih inhibitora ekto-ATPaza koji pripadaju familijama *Lilliaceae*, *Astreaceae* i *Apiceae* pokazuju inhibiciju E-NTPD-aza u opsegu od 51 do 58% pri koncentraciji od 125 $\mu\text{g/mL}$. Među njima, najjača inhibitorna aktivnost postignuta je sa etanolnim ekstraktom *Asparagus officinalis*, oko 58%.

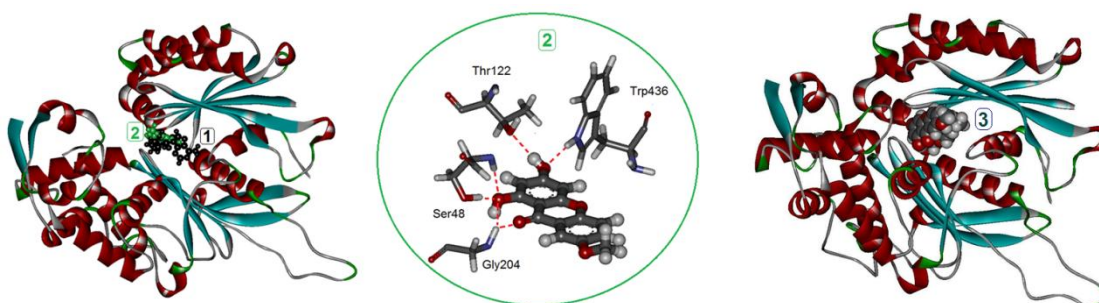
Rezultati inhibicije dobijeni sa ekstraktima lincure, kao i pomenutih familija biljaka mogu imati i širi značaj pošto se različite izoforme E-NTPD-aza eksprimiraju u različitim tkivima u drugačijem odnosu, nego u mozgu ili jetri, zbog čega imaju različit afinitet prema ATP-u i ADP-u (Zimmermann, 2001; Zimmermann i sar., 2012). Stoga, može se očekivati različit uticaj ekstrakata lincure na različite izoforme E-NTPDaze što može prouzrokovati i različite fiziološke efekte. Na primer, inhibicija E-NTPDaze koja se nalazi na površini limfocita i pripada familiji CD39 (izoforma 1) uzrokuje proinflamatorne efekte (Chadwick i sar. 1998).

Rezultati inhibicije E-NTPDaze sa sinaptozomalne membrane pacova su značajni zbog uloge ATPa u mozgu, gde on deluje kao brz neurotransmiter vezujući se za P2X purinoreceptore, jonske kanale koji se otvaraju nakon vezivanja liganda. Aktivacija ovih receptora sa druge strane povlači procese poput demijelinizacije i remijelinizacije aksona, terminaciju purinergičke signalizacije i razvoj neurona. Bilo koja promena u odnosu na fiziološku koncentraciju ATPa može izazvati neki od neželjenih efekata. Na primer, kod obolelih od epilepsije ustanovljena je smanjena aktivnost E-NTPDaze, tako da svako dodatno smanjenje aktivnosti, koje može biti rezultat primene nekih biljnih preparata koji deluju inhibitorno na ovaj enzim, može prouzrokovati hiperaktivnost i povećanu ekscitabilnost u mozgu osoba sa epilepsijom (Horvat i sar., 1998).

4.3.3.1. Predviđanje mesta vezivanja konstituenata lincure za E-NTPDazu- *docking* studija

Pošto izogentizin nije testiran kao inhibitor E-NTPDaze u *in vitro* eksperimentu sa sinaptozomalnim membranama, njegov afinitet prema enzimu je ispitivan *docking* studijom, izračunavanjem mogućih energija vezivanja. Rezultati su upoređivani sa energijom vezivanja ATP-a, koji predstavlja supstrat ovog enzima. Za predviđanje mesta vezivanja (molekulski *docking*) izabrana je kristalna struktura E-NTPDaze 2, izoforme izolovane iz pacova, jer je najbližnja E-NTPDazi 3 (Vorhoff i sar., 2005). Kao što je ranije pomenuto, na osnovu imunohistohemijskih analiza utvrđeno je da je na sinaptozomalnoj membrani najdominantnija izoforma ekto-ATPaze, E-NTPDaza 3 (Belcher i sar., 2006). Kristalna struktura E-NTPDaze 2 je inače jedina dostupna,

okarakterisana izoforma ekto-ATPaza u proteinskoj bazi podataka (PDB). Analiza rezultata *docking* studije predviđa jedno vezujuće mesto izogentizina na E-NTPDazi 2, prikazanog na slici 4.20, koje se poklapa sa vezujućim mestom za ATP na enzimu (nukleozid vezujuće mesto).

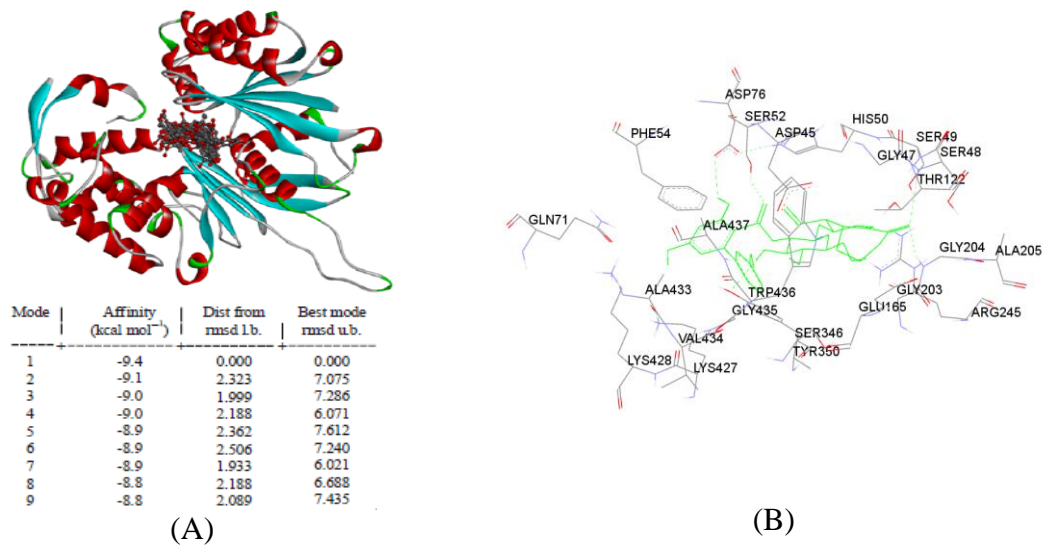


Slika 4.20. Mesta vezivanja ATPa (struktura 1, slika levo) monomerna struktura izogentizina (struktura 2, slika levo) i struktura dimera izogentizina (struktura 3, slika desno) na E-NTPDazi 2. Vodonične veze izogentizina monomera sa aminokiselinskim ostacima Ser-48, Thr-122, Gly-204 i Trp-436 su predstavljene u sredini (crvena isprekidana linija).

Energija vezivanja za ATP je neznatno veća (-9.3 kcal/mol) u poređenju sa monomerom izogentizina (-8.0 kcal/mol). Razlika u energijama vezivanja najverovatnije potiču od većeg broja vodoničnih veza između ATPa i aminokiselinskih ostataka enzima (Gly-47, Ser-48, Ala-123, Gly-124, Gly-204, Ala-205 i Val-434) u odnosu na broj vodoničnih veza između izogentizina i enzima (Ser-48, Thr-122, Gly-204 i Trp-436), slika 4.20. Međutim vezivanje izogentizina za aktivno mesto enzima, uprkos nižoj vezujućoj energiji u odnosu na ATP, može se objasniti manjom veličinom izogentizina i njegovom gotovo planarnom strukturom koja mu omogućava veću mobilnost, u odnosu na ATP molekul. *Docking* studija sa amarogentinom, genciopikrozidom, izoviteksinom i loganskom kiselinom kao inhibitorima E-NTPDaze je takođe urađena, radi poređenja sa ekperimentalno dobijenim rezultatima.

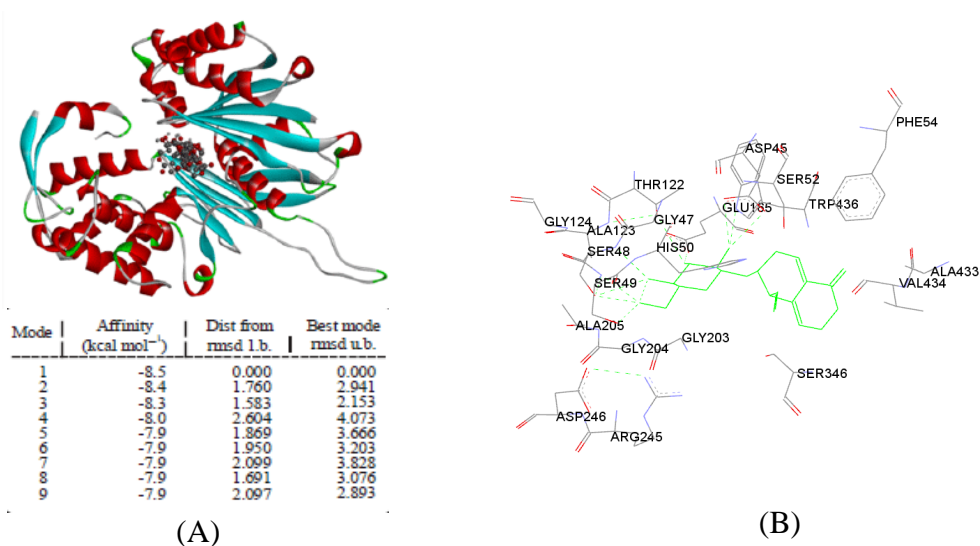
Rezultati ukazuju na kompetitivnu inhibiciju, jer je identifikovano samo jedno vezujuće mesto za amarogentin, genciopikrozid, izoviteksin i logansku kiselinu na E-NTPDazi 2, koje se preklapa sa vezujućim mestom ATP-a na enzimu. Na slici 4.21, prikazane su strukture amarogentina i E-NTPDaze 2 sa aminokiselinskim ostacima koji

se nalaze u okruženju inhibitora (Gln71, Ala437, Ala433, Val434, Lys428, Lys427, Gly435, Trp436, Ser346, Tyr350, Glu165, Gly203, Gly204, Ala205, Arg245, Phe54, Asp76, Ser52, Asp45, His50, Gly47, Ser49, Ser48, Thr122).



Slika 4.21 (A) Vezujuće mesto amarogentina i devet najstabilnijih klastera amarogentina i E-NTPDaze 2; (B) struktura amarogentina (zelena struktura) i aminokiselinski ostaci u najstabilnijem kompleksu (klaster) sa E-NTPDazom 2 (Nastasijević i sar., 2016).

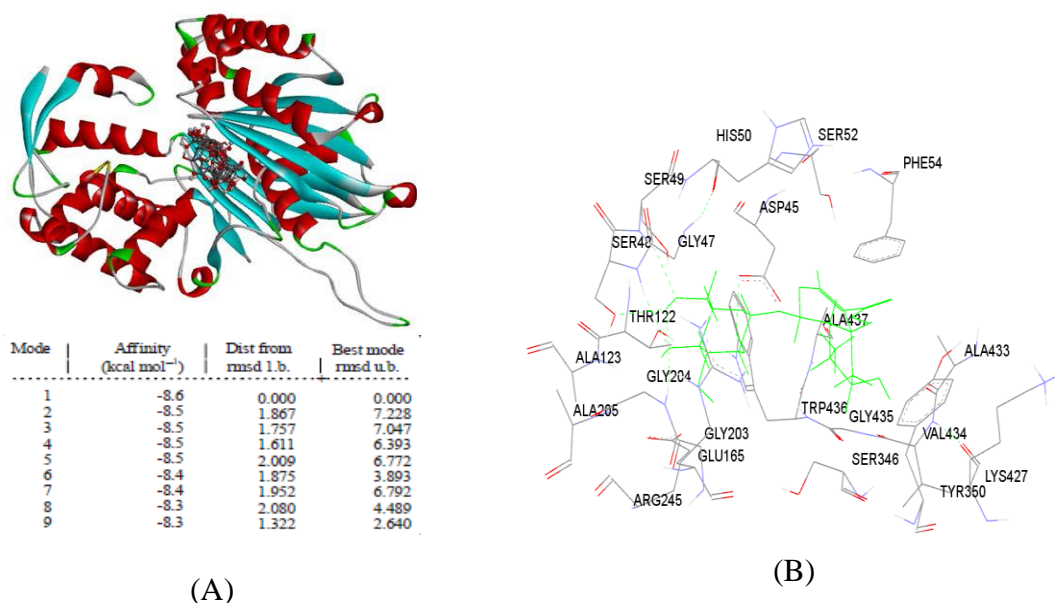
Na slici 4.22, prikazane su strukture genciopikrozida i E-NTPDaze 2.



Slika 4.22 (A) Vezujuće mesto genciopikrozida i devet najstabilnijih klastera genciopikrozida i E-NTPDaze 2; (B) struktura genciopikrozida (zelena struktura) i aminokiselinski ostaci u najstabilnijem kompleksu sa E-NTPDazom 2.

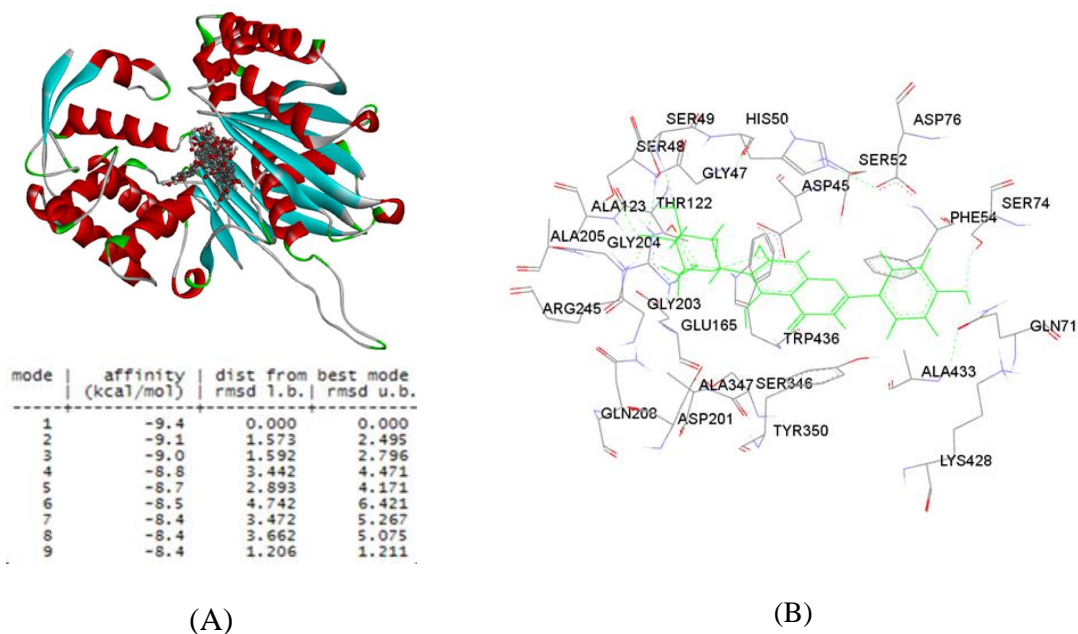
Aminokiselinski ostaci koji učestvuju u interakciji enzima i genciopokrozida su: Gly204, Gly203, Ala205, Asp246, Arg245, Ser346, Val434, Ser433, Ser48, Ser49, Ala123, Gly124, Gly47, His50, Thr122, Asp45, Glu165, Ser52, Trp436 i Ser346.

Strukture loganske kiseline, E-NTPDaze 2 i vezujuće energije 9 najstabilnijih kompleksa između inhibitora i enzima, kao i aminokiselinski ostacima koji učestvuju u interakciji (Ala123, Ala205, Thr122, Gly204, Gly203, Glu165, Arg245, Ala437, Trp436, Gly435, Ser346, Val434, Tyr350, Ala433, Lys427, Ser48, Ser49, Gly47, His50, Asp45, Ser52, Phe54) prikazani su na slici 4.23.



Slika 4.23 (A) Vezujuće mesto loganske kiseline i devet najstabilnijih klaster loganske kiseline i E-NTPDaze 2; (B) struktura loganske kiseline (zelena struktura) i aminokiselinski ostaci u najstabilnijem kompleksu loganske kiseline i E-NTPDaze 2.

Strukture izoviteksina, E-NTPDaze 2 i vezujuće energije 9 najstabilnijih kompleksa između inhibitora i enzima, kao i aminokiselinski ostaci (Arg245, Gly203, Glu165, Gln208, Ala347, Trp436, Asp201, Ser346, Tyr350, Ala433, Lys428, Gln71, Ala205, Ala123, Gly204, Thr122, Ser48, Ser49, His50, Gly47, Asp45, Ser52, Asp76, Phe54, Ser74) koji učestvuju u interakciji prikazani su na slici 4.24.



Slika 4.24 (A) Vezujuće mesto izoviteksina i devet najstabilnijih klastera izoviteksina i E-NTPDaze 2; (B) struktura izoviteksina (zelena struktura) i aminokiselinski ostaci u najstabilnijem kompleksu izoviteksina i E-NTPDaze 2.

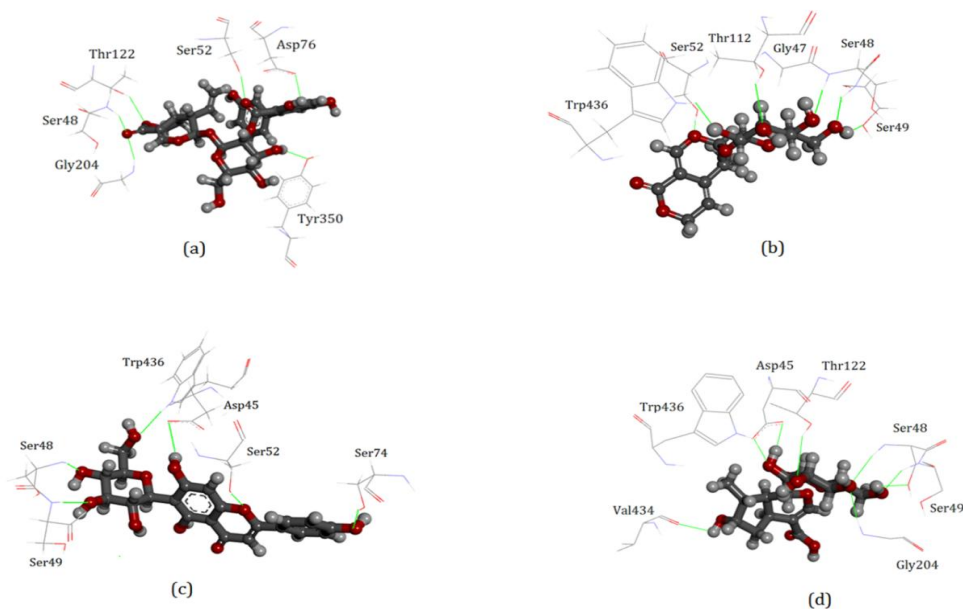
Energije vezivanja, određene u *docking* studiji, za amarogentin, genciopikrozid, izoviteksin i logansku kiselinu su veće od energije vezivanja izogentizina, tabela 4.15. Razlike u energiji vezivanja mogle bi da se objasne razlikama u veličini inhibitora, kao i prirodnom interakcija koje se javljaju između inhibitora i aminokiselinskih ostataka enzima.

U poređenju sa izogentizinom, amarogentin, genciopikrozid, izoviteksin i loganska kiselina formiraju veći broj nekovalentnih interakcija sa aminokiselinskim ostacima enzima, kao što je prikazano na slikama od 4.20 do 4.24. Poznato je da vodonične veze značajno doprinose stabilnosti proteina (Pace i sar., 2014). Na slikama 4.20 i 4.25 prikazane su vodonične veze koje se formiraju u najstabilnijim klasterima (kompleks protein i liganda) inhibitora i E-NTPDaze.

Tabela 4.15. Energije vezivanja odabranih konstituenata lincure sa inhibitorima E-NTPDaze i ATPom kao suspsratom enzima.

Ligand	E vezivanja (kcal/mol)
ATP	-9,3
Izogentizin	-8,0
Izogentizin(dimer)	-10,0
Amarogentin	-9,4
Izoviteksin	-9,4
Genciopikrozid	-8,5
Loganska kiselina	-8,6

U navedenom slučaju, uočava se veći broj vodoničnih veza između amarogentina, genciopikrozida, izoviteksina i loganske kiseline sa E-NTPDazom (slika 4.25), u poređenju sa izogentizinom (slika 4.20).



Slika 4.25. Vodonične veze između amarogentina (a), genciopikrozida (b) izoviteksina (c) i loganske kiseline (d) u najstabilnijim klasterima inhibitora i enzima E-NTPDaze 2. Vodoničene veze su prikazane zelenom bojom.

Uprkos činjenici da pri vezivanju amarogentina, genciopikrozida, izoviteksina i loganske kiseline za aktivni centar enzima postoje mnogo veće sterne smetnje nego u slučaju planarnog izogentizina, veća fleksibilnost pomenuta četiri inhibitora (izražena većim brojem rotabilnih veza) doprinosi njihovom jačem vezivanju. Na osnovu analize kristalne strukture strukturnog analoga izogentizina, nađene u PDB bazi, moguće je dodatno objašnjenje za njegovo vezivanje za E-NTPDazu 2. Naime, kristalne strukture (PDB kod: 4CDI i 4CD3) sulfoantrahinonskog inhibitora (PSB-071) enzima E-NTPDaze, vezuju se za aktivno mesto enzima u formi dimera, odnosno sendviča sastavljenog od dva planarna molekula (Trott i sar., 2010). Stoga postoji mogućnost da i izogentizin u formi dimera ostvaruje interakcije sa amino kiselinama u aktivnom centru enzima.

Rezultati *docking* studije su u saglasnosti sa eksperimentalno dobijenim rezultatima jer se i u eksperimentu sa E-NTPDazom i u *docking* studiji amarogentin pokazao kao najbolji potencijalni inhibitor. Energija vezivanja amarogentina određena *docking* studijom je -9,4 kcal/mol dok je $IC_{50} = 9,89 \mu M$. Energija vezivanja izoviteksina je ista kao i kod amarogentina, ali je IC_{50} izoviteksina, eksperimentalno određena 11,3 μM . Energija vezivanja genciopikrozida je -8,5 kcal/mol a eksperimentalno određen $IC_{50} = 21,5 \mu M$. Loganska kiselina koja je u eksperimentu pokazala nizak nivo inhibicije, ima energiju vezivanja -8,6 kcal/mol, a najniža energija vezivanja je određena za izogentizin, -8,0 kcal/mol. Međutim, *docking* studijom je utvrđeno da se dimer izogentizina vezuje sa najvišom energijom vezivanja u odnosu na sve ispitivane konstituente i ATP, u iznosu od -10,0 kcal/mol. Bolje vezivanje dimerne strukture za aktivni centar enzima je važan parameter ali nije odlučujući za inhibitornu aktivnost, jer u interakcijama enzim-inhibitor, monomer izogentizina i ATP-a imaju manje sternih smetnji nego u slučaju dimera izogentizina. Mogućnost vezivanja monomer izogentizina bez obzira na manju energiju vezivanja u odnosu na ATP ipak postoji zbog manje veličine molekula izogentizina i njegove skoro planarne strukture, koja mu omogućava veću mobilnost, u odnosu na ATP. Takođe, postoje jos dva moguća objašnjenja koja idu u prilog mogućnosti inhibicije E-NTPDaze izogentizinom. Pored strukturne sličnosti sa sulfoantrahinonom, poznatim inhibitorom E-NTPDaze, postoji u izvesnoj meri i strukturna sličnost sa sulfonovanom bojom pod nazivom "reactive blue 2" (Muller i sar., 2006; Rashida i Iqbal, 2013). U eksperimentu izvedenim sa ATPom koji aktivira

agregaciju trombocita, pokazano je da ksantonski derivati mogu da inhibiraju ovaj proces, što ukazuje na inhibiciju E-NTPDaze, koja se nalazi na površini krvnih pločica (Rajtar i sar.,1999). Iako trombociti sadrže izoforme E-NTPDaze u različitom odnosu nego sinaptozomi, ovo saznanje ide u prilog hipotezi iznetoj u ovom radu.

4.4. Antioksidativna aktivnost ekstrakta lincure

Antioksidativna aktivnost ekstrakata lincure ispitivana je inhibicijom DPPH radikala i cikličnom voltametrijom (CV). Ispitivani su vodeni, metanolni (100%, v/v) i etanolno vodeni ekstrakti (25, 50, 75 i 96%, v/v). U navedenim ekstraktima je određen ukupni sadržaj polifenola jer se smatra da antioksidativna aktivnost biljnih ekstrakata u najvećoj meri zavisi od polifenolnih jedinjenja. Takođe, ukupan sadržaj polifenolnih jedinjenja korelisan je sa IC_{50} vrednostima dobijenim inhibicijom DPPH radikala kao i sa rezultatima CV (Q_{tot} svakog ekstrakta).

4.3.1. Inhibicija DPPH radikala i sadržaj ukupnih polifenola

Rezultati testa inhibicije DPPH radikala, pokazali su da 50 i 75% etanolno vodeni ekstrakti imaju najveću antiradikalnu aktivnost, sa IC_{50} vrednostima 20,6 $\mu\text{g/mL}$, odnosno 25,4 $\mu\text{g/mL}$. Vodeni i 96% etanolno vodeni ekstrakt su pokazali najnižu antiradikalnu aktivnost u grupi ispitivanih ekstrakata, tabela 4.16. U prethodnim istraživanjima, koja su takođe zasnovana na inhibiciji DPPH radikala, pokazano je da je antioksidativni kapacitet kvercetina (flavonoid) izražen preko IC_{50} vrednosti 3,2 $\mu\text{g/ml}$, zatim 10,62 $\mu\text{g/ml}$ za α -tokoferol, dok su etanolni ekstrakti biljke *Salvia fruticosa* (grčka žalfija) u opsegu od 9,4 do 40,1 $\mu\text{g/ml}$ (Pasias i sar., 2010; Gulcin i sar., 2009). U poređenju sa drugim biljnim ekstraktima koji sadrže mnogo veće količine flavonoida, ekstrakti lincure pokazuju umerenu antioksidativnu aktivnost.

Table 4.16. Antiradikalska aktivnost ekstrakata lincure dobijena DPPH testom i sadržaj ukupnih polifenola u ekstraktima^a.

Vrsta ekstrakta	Inhibicija DPPH IC ₅₀ (µg/ml)	Ukupni sadržaj polifenola ^b (mg GK /g)
25 % etanolno vodeni	36,1±0,6	78,1
50 % etanolno vodeni	20,6±0,4	96,1
75% etanolno vodeni	25,4±0,9	74,4
96 % etanolno vodeni	82,4±1,1	58,3
100% metanolni	48,4±0,4	51,1
Vodeni ekstrakt	77,2±0,8	99,6

^a Vrednosti predstavljaju srednje vrednosti ± standardna devijacija tri nezavisna eksperimenta

^b Ukupni sadržaj polifenola je izražen kao mg ekvivalenata galne kiseline (GK) na 1 g suvog ekstrakta.

Osim pomenutih C-glukozilflavona koji se samo u tragovima nalaze u korenu lincure, najzastupljeniji su sekoiridoidi, ksantoni kao i dihidrobenzojeva kiselina (Calliste i sar., 2001, Menković i sar., 2000, Khadem i sar. 2010).

Radi korelacije ukupne antioksidativne aktivnosti ekstrakata i sadržaja polifenola određen je njihov ukupni sadržaj u ekstraktima. Korišćen je Folin-Ciocalteu metoda kojom se mogu kvantifikovati flavonoidi, antocijanini i neflavonoidna fenolna jedinjenja prisutna u uzorku. Kao što je prikazao u tabeli 4.16, vodeni i 50% etanolno vodeni ekstrakti imaju najviši sadržaj polifenola. Uopšteno, sa povećanjem polarnosti rastvarača povećava se i ekstrakcija polifenola iz biljnog materijala (Turkmen i sar. 2006). Štaviše u nekim slučajevima, zavisno od biljnog materijala i polifenolnih jedinjenja koja ulaze u njihov sastav, ekstrakcija polifenola sa smešama etanola i vode, može biti veća od one koja se postiže vodom (Ozcelik i sar, 2003).

U svakom slučaju očekuje se da ekstrakti koji sadrže povećani sadržaj polifenola pokazuju i veći antioksidativni kapacitet. Međutim, ova pretpostavka u slučaju ekstrakta lincure i DPPH radikala nije potvrđena u svim slučajevima. Štaviše između ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja lincure i DPPH inhibicije postoji slaba korelacija ($r = -$

0,18). Čak i u slučaju vodenog ekstrakta koji sadrži visok stepen polifenola nije postignut najviši nivo inhibicije DPPH radikala. Zbog ovoga, antioksidativna aktivnost ekstrakta određivana je i cikličnom voltametrijom (CV).

Korišćenje više od jedne metode za određivanje antioksidativnog kapaciteta je čest slučaj s obzirom da svaki od testova ima izvesna ograničenja (Ozcelik i sar., 2003). Naime, iako je DPPH test u širokoj upotrebi za merenje i poređenje antioksidativnog statusa fenolnih jedinjenja, dobijene rezultate treba pažljivo interpretirati. Apsorbancija na kojoj apsorbuje DPPH radikal je 517 nm, međutim nakon reakcije sa antioksidantima, može doći do pomeranja apsorpcionog maksimuma pod uticajem svetla, kiseonika, pH i prisustva nekih tipova rastvarača (Ozcelik i sar., 2003). U eksperimentima sa CV, antioksidativni kapacitet pojedinačnih jedinjenja ili u kompleksnoj smeši povezan je sa niskim potencijalima na kojima počinje proces oksidacije.

4.3.2. Ciklična voltometrija (CV) ekstrakata lincure i antioksidativni kapacitet

U svim prikazanim voltamogramima korigovana je bazna linija. S obzirom da procedura dobijanja bazne linije ne garantuje konstantnu jonsku jačinu, moguća su mala odstupanja od bazne linije (u delu gde nema faradejskih procesa) za jedinjenja prisutna u uzorku (od 0 do ~ 0,35 V prema zasićenoj kalomelovoj elektrodi- ZKE). Međutim ova odstupanja su manja od ~300 nA i u odnosu na signal su sasvim prihvatljiva. Takodje, ova mala odstupanja mogu da se objasne i adsorpcijom jedinjenja iz ekstrakta na površini elektrode i malih modifikacija kapacitativnih svojstava površine radne elektrode.

Cikličnom voltametrijom nisu detektovani faradejski procesi na potencijalima nižim od ~ 330 mV nasuprot ZKE, ni za jedan biljni ekstrakt koji je analiziran. Štaviše, u slučaju vodenog ekstrakta nije detektovan elektrohemijski odziv. Stoga, elektrohemijske karakteristike vodenog ekstrakta nisu dalje razmatrane u ovom odeljku. Oksidacioni procesi su primećeni na samom startu, u opsegu potencijala od 330 do 400 mV nasuprot ZKE (E_{onset} , tabela 4.17). Kod nekih ekstrakata primećen je mali anodni pik na potencijalima ispod 600 mV prema ZKE, dok su drugi pokazali monotoni porast anodne struje, bez jasno uočljivih karakteristika. Voltamogrami ovih ekstrakata,

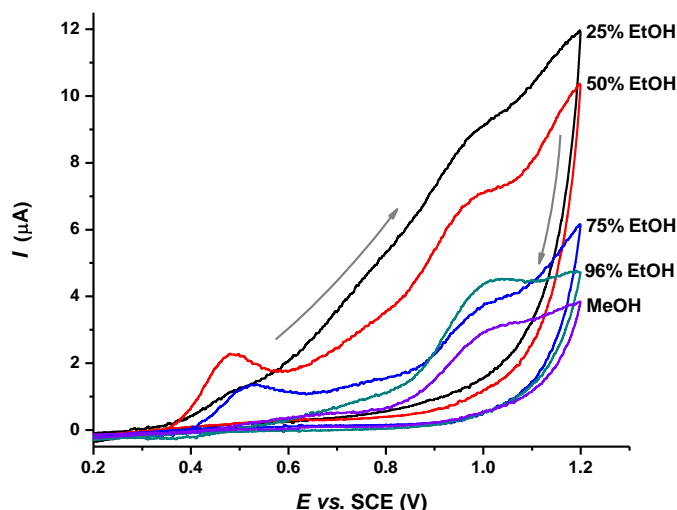
pokazuju ireverzibilno ponašanje, pri čemu nije došlo do pojave reverznog katodnog pika. Prvi anodni pik je okarakterisan kod voltamograma ekstrakata gde god je bilo moguće i izražen je preko potencijala anodnog pika ($E_{p,a}$) (tabela 4.17).

Tabela 4.17. Elektrohemijske karakteristike anodnih oksidacionih procesa ispitivanih biljnih ekstrakata (E_{onset} – potencijal na kome oksidacioni proces počinje, $E_{p,a}$ – potencijal prvog anodnog pika, Q_1 – količina naelektrisanja pri oksidacionim procesima između E_{onset} i 600 mV vs. ZKR, Q_{tot} – ukupna količina naelektrisanja ispod anodnog talasa.

Uzorak	E_{onset} / mV vs. ZKE	$E_{p,a}$ / mV vs. ZKE	Q_1 / μC	Q_{tot} / μC
25% EtOH ekstrakt	355	486	2,63	45,3
50% EtOH ekstrakt	334	484	4,03	37,0
75% EtOH ekstrakt	359	527	2,18	19,7
96% EtOH ekstrakt	395	-	0,52	17,4
MeOH ekstrakt	400	-	0,43	11,7

Da bi parametre dobijene u CV eksperimentima koristio za procenu antioksidativnog kapaciteta, Ševion sa grupom autora je pretpostavio da je ukupna količina naelektrisanja ispod anodnog pika srazmerna sadržaju antioksidanata male molekulske mase. Ova pretpostavka je posebno korisna u situacijama kada anodni pik nastaje kao rezultat oksidacije više od jednog molekula, kao i kada je identitet komponenti u smeši nepoznat (Chevion i sar., 1999).

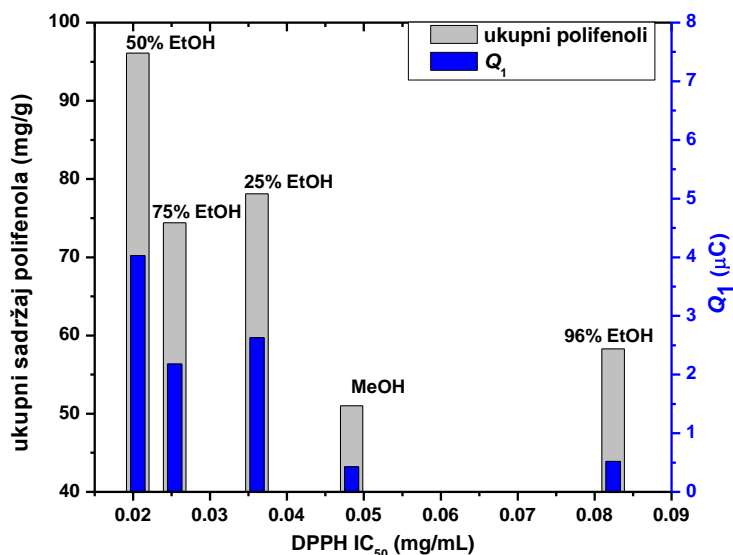
Zbog toga se potencijal prvog anodnog pika, $E_{p,a}$, smatra kao relevantna mera antioksidativnog kapaciteta. Pored već opisanih parametara, takođe su integraljeni i voltamogrami do potencijala od 600 mV prema ZKE (Q_1) a rezultati su prikazani u tabeli 4.17 i na slici 4.26.



Slika 4.26. Ciklični voltamogrami biljnih ekstrakta nakon korekcije pozadine, rastvoreni u 0,1 M K_2SO_4 rastvoru, snimljeni na GC elektrodi, sa brzinom skeniranja od 100 mV s^{-1} . Opseg potencijala u kome su vršena snimanja je između 0,2 i 1,2 V vs. ZKE.

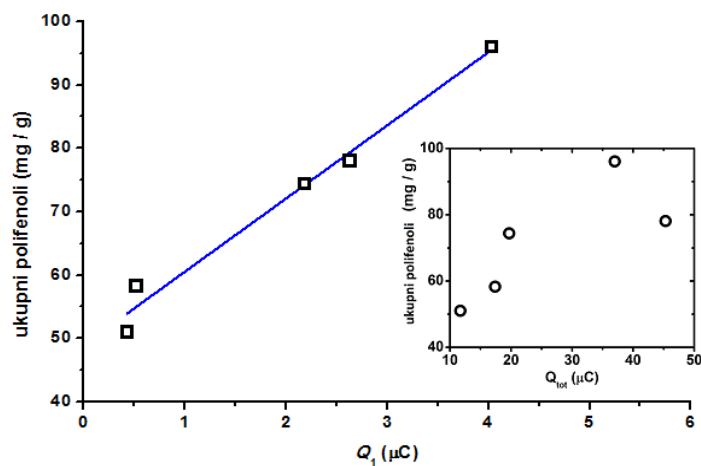
Pomenute parametre smo izabrali jer smo smatrali da su adekvatni za procenu kako antioksidativnog kapaciteta tako i ukupnog sadržaja polifenolnih jedinjenja. Potvrdu za ovakav način analize rezultata možemo naći u teoriji CV i linearnoj skenirajućoj voltametriji. Stoga su rezultati dobijeni CV eksperimentima dalje korelisani sa rezultatima DPPH testa (posmatrane su dobijene IC_{50} vrednosti) i vrednostima ukupnog sadržaja polifenola (prikazane u prethodnom poglavlju 4.3.1). Sadržaj ukupnih polifenola je odabran za korelaciju sa rezultatima DPPH i CV jer se smatra da su ova jedinjenja nosioci antioksidativne aktivnosti biljnih ekstrakata (Anesini i sar., 2008).

Korelacija navedenih parametara je izvedena bez razmatranja vodenog ekstrakta, pošto njegov elektrohemijski signal nije detektovan i prikazana je na slici 4.27. Sa slike se jasno vidi da niže koncentracije ukupnih polifenola, kao i vrednosti količine naelektrisanja Q_I odgovaraju višim IC_{50} vrednostima DPPH testa (manja sposobnost inhibicije DPPH radikala). Pirsonov korelacioni koeficijent za zavisnot Q_I od $\text{IC}_{50}\text{DPPH}$ iznosi $r = -0,80$, za razliku od zavisnosti između ukupnog sadržaja polifenola i $\text{IC}_{50}\text{DPPH}$, sa Pirsonovim koeficijentom, $r = -0,73$. Sa druge strane, vrednosti E_{onset} su u veoma dobroj korelaciji sa IC_{50} vrednostima DPPH testa, sa $r = 0,81$.



Slika 4.27. Ukupni sadržaj polifenola i količine naelektrisanja (Q_1) u zavisnosti od IC_{50} vrednosti DPPH testa.

Najzad, najmanji stepen korelacije pokazuje ukupna količina naelektrisanja Q_{tot} u odnosu na IC_{50} vrednosti DPPH testa gde je $r = -0,49$. Najveći stepen korelacije primećen je između količine naelektrisanja Q_1 i ukupnog sadržaja polifenola ($r = 0,99$), dok je korelacija Q_{tot} sa ukupnim polifenolima nešto niža, odnosno $r = 0,78$, prikazano na slici 4.28.



Slika 4.28. Zavisnost ukupnog sadržaja polifenola i Q_1 . Linearna zavisnost je prikazana kao: sadržaj ukupnih polifenola (mg/g) = $49 + 11,9 Q_1$ (µC), sa $R^2 = 0,98$. U insetu je prikazan grafik zavisnosti ukupnih polifenola i Q_{tot} .

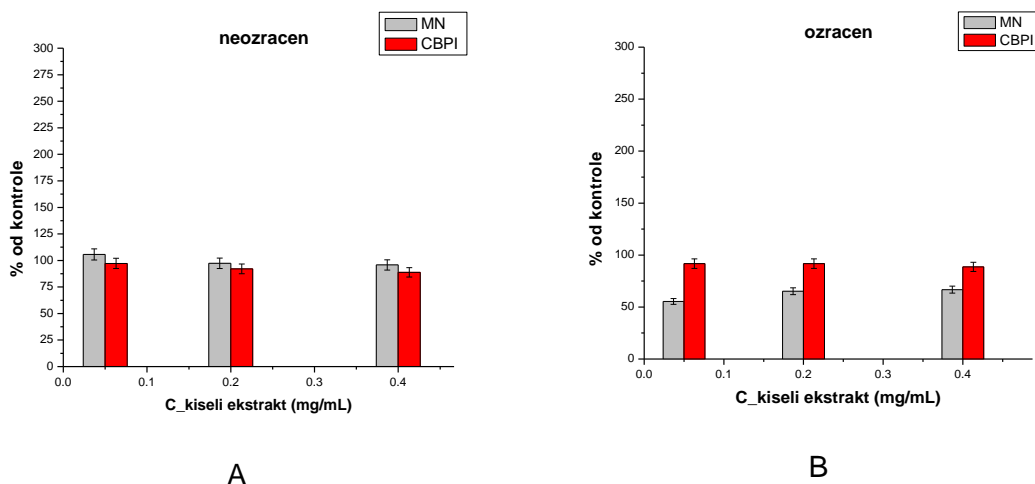
Rezultati dobijeni u CV eksperimentima potvrđuju da su jedino elektrohemijski odgovori na niskim potencijalima relevantni za procenu antioksidativnog kapaciteta kompleksnih smeša. Takođe, jednostavna CV merenja mogu biti veoma korisna za brzu evaluaciju antioksidativne aktivnosti biljnih konstituenata.

4.5. Radioprotektivni efekti ekstrakata i konstituenata lincure

U uvodnom delu je pomenuto da neki ekstrakti lincure, kao i pojedini konstituenti prisutni ne samo u *G. lutea* već i u drugim biljnim vrstama iz familije *Gentianaceae* poseduju radioprotektivnu aktivnost. Takođe, poznata je povezanost između antioksidativne i radioprotektivne aktivnosti. Iz navedenih razloga u ovom radu je ispitivan uticaj ekstrakata lincure, kao i pojedinih konstituenata, koji do sada nisu ispitivani na radiobiološki odgovor kulture ćelija limfocita nakon γ -zračenja. Radiobiološki odgovor je ispitivan određivanjem učestalosti mikronukleusa, indeksa proliferacije i procesa apoptoze.

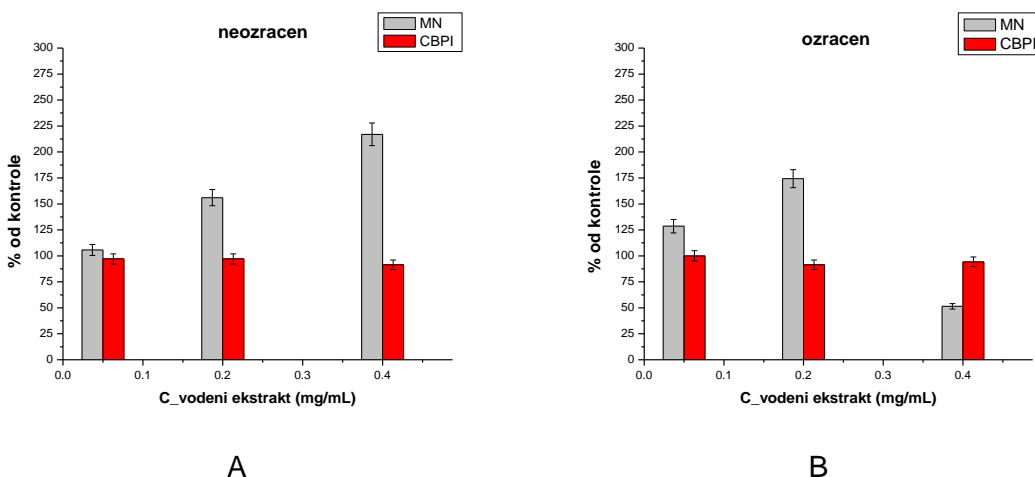
4.5.1. Uticaj ekstrakata i konstituenata lincure na učestalost mikronukleusa i indeks proliferacije ćelija

Rezultati dobijeni tretiranjem kultura humanih limfocita sa rastućim koncentracijama ekstrakata *G. lutea*, pre i nakon tretmana γ - zračenjem, prikazani su na slikama 4.29-4.32. Kiseli ekstrakt (4 % sirćetna kiselina u vodi, v/v) lincure nije uticao na učestalost mikronukleusa (MN) u neozračenim limocitima, dok je indeks proliferacije (IP) u neozračenim uzorcima blago smanjen (slika 4.29) i nalazi se na granici statističke značajnosti ($p=0,065$). Nakon ozračivanja, primećena je redukcija učestalosti MN u poređenju sa kontrolom pri svim ispitivanim koncentracijama ($p<0.01$) pri čemu je najveće sniženje (za 44,57%) zapaženo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,05 mg/mL.



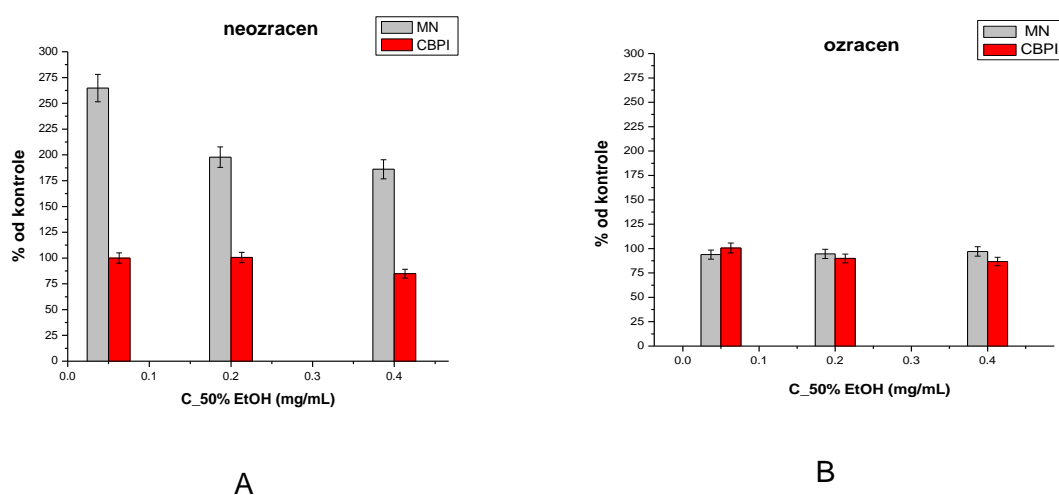
Slika 4.29. Učestalost MN i IP u neozračenim (A) i ozračenim (B) limfocitima, tretiranim kiselim ekstraktom. Vrednosti MN i IP su izraženi u procentima u odnosu na kontrolni uzorak čija je vrednost 100 %. Eksperimenti su urađeni u triplikatu, a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm S.D.

Indeks proliferacije limfocita je bio značajno snižen samo pri tretmanu sa najvišom koncentracijom (0,4 mg/mL). Osim kiselog ekstrakta pri koncentraciji od 0,05 mg/mL, svi ekstrakti su indukovali porast učestalosti MN u neozračenim limfocitima. Nakon ozračivanja, jedino je vodeni ekstrakt uzrokovao povećanje učestalosti formiranja MN, dok su se 50% i 75% EtOH ekstrakti, kao i metanolni svojim delovanjem približili kontrolnom uzorku, slike 4.30, 4.31, 4.32 i 4.33.



Slika 4.30. Učestalost MN i IP u neozračenim (A) i ozračenim (B) limfocitima, tretiranim vodenim ekstraktom (vrednosti su izražene kao procenat od kontrole). Eksperimenti su urađeni u triplikatu a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm S.D.

Vodeni ekstrakt je u neozračenim uzorcima povećao učestalost MN od 50 do 117%, dok je u ozračenim uzorcima povećao učestalost MN samo pri nižim koncentracijama za 29-74%. Pri najvišoj testiranoj koncentraciji od 0,4 mg/mL, vodeni ekstrakt je uzrokovao značajno smanjenje učestalosti MN, za oko 50%. Na osnovu dobijenih rezultata, kiseli ekstrakt se može smatrati ekstraktom sa najboljom radioprotektivnom aktivnošću u grupi ispitivanih ekstrakta *G. lutea*. Tretman neozračenih i ozračenih limfocita sa 50% EtOH ekstraktom prikazana je na slici 4.31.

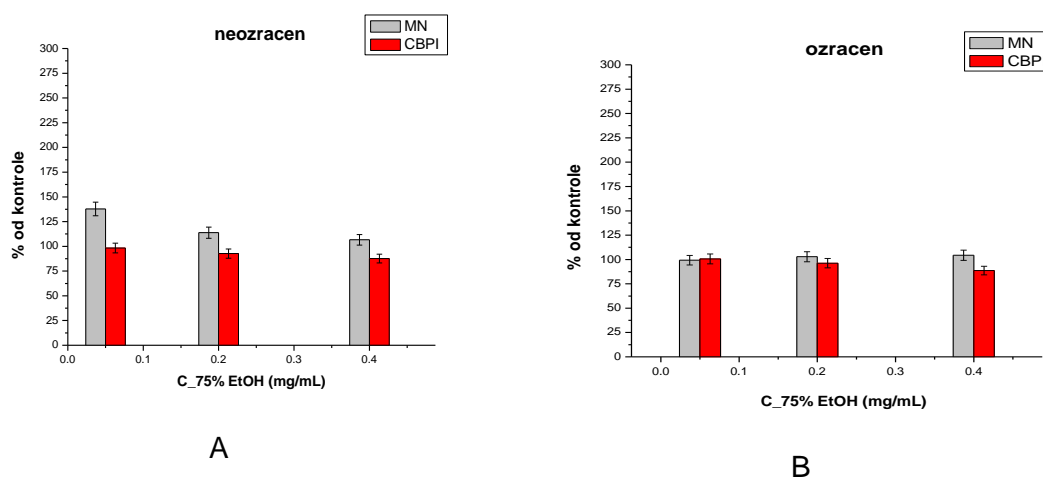


Slika 4.31. Učestalost MN i IP u neozračenim (A) i ozračenim (B) limfocitima, tretiranim 50% EtOH ekstraktom (izraženo kao procenat od kontrole). Eksperimenti su urađeni u triplikatu a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm S.D.

Tretman neozračenih limfocita sa 50% EtOH ekstraktom je indukovao značajno povećanje učestalosti MN pri svim ispitivanim koncentracijama, u poređenju sa kontrolom ($p=0,04$). Maksimalna učestalost MN je utvrđena kod najniže ispitivane koncentracije i opada sa porastom koncentracije. Drugim rečima, promena učestalosti MN u ovom slučaju je koncentraciono zavisna. Proliferacioni kapacitet ćelija ostaje nepromenjen u poređenju sa kontrolom, osim pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji gde se zapaža značajno smanjenje proliferacije ($p=0,006$). Nasuprot neozračenim limfocitima, pri istim koncentracijama 50% EtOH ekstrakt značajno smanjuje učestalost MN u ćeljskoj kulturi ozračenih limfocita ($p=0,04$), što je takođe praćeno i značajnim

padom ćelijske proliferacije pri koncentracijama od 0,2 mg/mL i 0,4 mg/mL ($p=0,0013$ i $p=0,0008$).

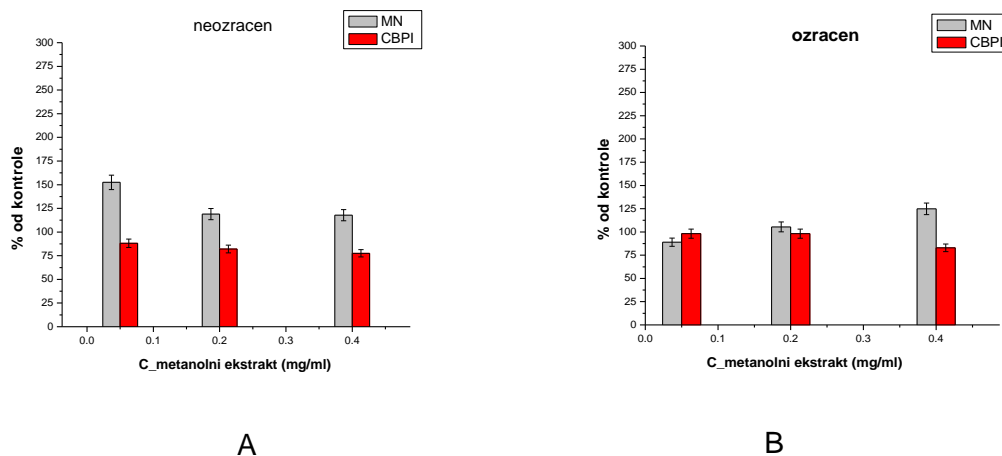
Na slici 4.32, prikazani su rezultati tretmana neozraćenih i ozraćenih limfocita, sa 75% EtOH ekstraktom.



Slika 4.32. Učestalost MN i IP u neozraćenim (A) i ozraćenim (B) limfocitima, tretiranim 75% EtOH ekstraktom (izraženo kao procenat od kontrole). Eksperimenti su urađeni u triplikatu a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm S.D.

Kao i u prethodno navedenom slučaju i 75% EtOH ekstrakt značajno povećava učestalost formiranja MN kod neozraćenih limfocita jedino pri najnižim testiranim koncentracijama ($p=0,0005$). Nakon ozračivanja, učestalost MN je slična kao kod kontrole. Proliferacioni kapacitet ćelija opada sa koncentracijom, kako u neozraćenim tako i u ozraćenim uzorcima, ali je pad statistički značajan samo kod najviših ispitivanih koncentracija ($p=0,01$ i $p=0,02$).

Kada je reč o metanolnom ekstraktu lincure, u neozraćenim uzorcima, dolazi, kao i u slučaju etanolno vodenih ekstrakata do povećane učestalosti MN, a statistički značajno povećanje se javlja pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji od 0,05 mg/mL ($p=0,00006$) (slika 4.33).



Slika 4.33. Učestalost MN i IP u neozračenim (A) i ozračenim (B) limfocitima, tretiranim metanolnim ekstraktom (izraženo kao procenat od kontrole). Eksperimenti su urađeni u triplikatu a rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm S.D.

Nasuprot ovome, kod neozračenih limfocita, pri istoj ispitivanoj koncentraciji, metanolni ekstrakt značajno smanjuje učestalost MN ($p=0,000022$). Drugim rečima, učestalost MN raste ali je statistički značajan samo pri višim koncentracijama ($p=0,015$). Proliferacioni potencijal neozračenih ćelija značajno opada sa porastom koncentracije ($p=0,02$) dok je nakon zračenja, značajna redukcija proliferacije primećena samo pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji ($p=0,0005$).

Opšte uzevši, u svim ispitivanim neozračenim kulturama limfocita tretiranim ekstraktima *G. lutea*, učestalost MN i indeks proliferacije (IP) su pozitivno korelisani, bez statističkog značaja ($p > 0,05$). Nasuprot ovome, kod ozračenih ćelijskih kultura limfocita, tretiranih istim koncentracijama ekstrakata *G. lutea* primećena je obrnuta korelacija. Da bi objasnili razliku u delovanju ekstrakata lincure, u daljim eksperimentima ispitivane su aktivnosti pojedinačnih konstituenata. U tabeli 4.18, prikazana je učestalost pojave MN, pre i nakon ozračivanja limfocita tretiranih rastućim koncentracijama konstituenata lincure.

Tabela 4.18. Učestalost pojave MN u ozračenim i neozračenim uzorcima humanih limfocita, tretiranih konstituentima lincure.

C (finalno) u eseju (mg/mL)		0.001	0.01	0.1
Uzorak		Učestalost pojave MN izražena kao % od kontrole*		
loganska kiselina	-	100	100	120
	γ^{**}	54,27	49,75	49,25
svertiamarin	-	68,10	79,40	138,43
	γ	69,13	108,76	119,24
genciopikrozid	-	150	183	200
	γ	15,07	19,09	39,94
sverozid	-	58,99	76,19	89,90
	γ	73,29	76,41	85,09
izoviteksin	-	63	67	60
	γ	90,45	80,40	42,21
amarogentin	-	50	67	100
	γ	41,51	56,73	25,62
izogentizin	-	50,84	79,93	87,88
	γ	74,79	150,96	citotoksično dejstvo

*kontrola predstavlja uzorak ćelijske kulture limfocita, koja nije tretirana

konstituentima (učestalost MN određen u kontrolnom uzorku izražava se kao 100%)

**uzorak pre (-) i nakon (γ) zračenja.

Statistički značajno smanjenje učestalosti MN, pre ozračivanja, utvrđeno je u kulturama limfocita tretiranih:

- Svertiamarinom, pri najnižoj koncentraciji, od 1 μ g/mL, dolazi do statistički značajnog smanjenja od 31,90% u odnosu na kontrolni uzorak (p<0,001).
- Sverozidom, pri svim ispitivanim koncentracijama dolazi do značajnog smanjenja učestalosti MN (p<0,005) a posebno pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji (1 μ g/mL) za 26,71% .

- Izoviteksinom, takođe pri svim ispitivanim koncentracijama, a posebno pri koncentraciji od 100 µg/mL, za 40%, dok pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji (1 µg/mL) smanjenje iznosi 37 %.
- Amarogentinom, kod dve ispitivane koncentracije, od 1 i 10 µg/mL, dolazi do značajnog smanjenja učestalosti MN, za oko 50%
- Izogentizinom, kod najniže ispitivane koncentracije (1 µg/mL) dolazi do smanjenja učestalosti MN od 49,15%.

Statistički značajno (p od 0,001 do 0,01) povećanje učestalosti MN zabeleženo je u kulturama limfocita, pre zračenja, koje su tretirane sa:

- Svertiamarinom, pri najvišoj koncentraciji (100 µg/mL), u iznosu oko 38,44 % u odnosu na kontrolu.
- Loganskom kiselinom, pri najvišoj koncentraciji, u iznosu od 20%
- Genciopikrozidom, kod svih ispitivanih koncentracija (od 0,1 do 100 µg/mL) u opsegu od 50 do 100%.

Statistički značajno (p od 0,001 do 0,01) povećanje učestalosti MN zabeleženo je u kulturama limfocita, pre zračenja, koje su tretirane sa:

- Loganskom kiselinom, pri najvišoj koncentraciji za 20%
- Svertiamarinom, pri najvišoj koncentraciji (100 µg/mL) za 38,44% (p<0,001).
- Genciopikrozidom, kod svih ispitivanih koncentracija (od 0,1 do 100 µg/mL) u opsegu od 50 do 100%.

Nakon ozračivanja, učestalost MN statistički značajno opada kod kultura ćelija tretiranih sa:

- Loganskom kiselinom, pri svim ispitivanim koncentracijama, a najviše pri koncentracijama od 10 i 100 µg/mL, za 50,25% odnosno 50,75%.
- Svertiamarinom, pri najmanjoj koncentraciji od 1 µg/mL, za 30,87% (p<0,001).

Genciopikrozidom, pri svim ispitivanim koncentracijama (od 0,1 do 100 µg/mL), za 84,93% pri najnižoj koncentraciji i 60,06% pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji.

Sverozidom, pri svim ispitivanim koncentracijama, od 26,71% do 14,91% (p<0,005).

- Izoviteksinom, pri svim ispitivanim koncentracijama, najviše za 57,79% pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji.

- Amarogentinom, pri svim ispitivanim koncentracijama, najviše za 74,38% pri koncentraciji od 100 µg/mL.
- Izogentizinom za 25,21%, ali samo pri najnižoj ispitivanoj koncentraciji ($p < 0,005$).

Na osnovu dobijenih rezultata uočavamo da se genciopikrozid izdvaja po svom delovanju, jer izaziva značajno povećanje učestalosti MN, pre ozračivanja. Takođe, u najvećoj meri, u oko 85% izaziva smanjenje učestalosti MN, nakon ozračivanja. Zatim slede amarogentin, sverozid i loganska kiselina, koji najviše smanjuju učestalost MN, nakon ozračivanja. Na osnovu navedenog pomenuta jedinjenja bi mogla da se posmatraju kao potencijalni radioprotektori. Međutima, u neozračenim uzorcima genciopikrozid i loganska kiselina povećavaju učestalost MN. Od navedenih jedinjenja, jedino amarogentin i pre i nakon zračenja značajno smanjuje učestalost MN zbog čega bi mogao da bude okarakterisan kao najpodesniji radioprotektor. Pored određivanja učestalosti MN, određivan je i indeks proliferacije (IP) koji takođe treba uzeti u razmatranje prilikom evaluacije potencijalnih radioprotektora. Naime, ukoliko ispitivano jedinjenje sprečava ćelijsku proliferaciju, smanjuje se i mogućnost pojave MN. Idealni radioprotektor bi trebao da smanji učestalost MN bez većih uticaja na ćelijsku proliferaciju.

U tabeli 4.19 prikazan je indeks proliferacije ozračenih i neozračenih ćelija, nakon tretmana konstituentima lincure. Kao i u prethodnom slučaju (određivanje učestalosti MN) i prilikom određivanja proliferativnog potencijala, genciopikrozid je pokazao najjače antiproliferativno delovanje. Kod neozračenih uzoraka pri svim ispitivanim koncentracijama došlo je do smanjenja indeks proliferacije u opsegu od 43,24% pri najnižoj koncentraciji genciopikrozida (1 µg/mL) do 37,14 % u slučaju najviše ispitivane koncentracije. Nakon zračenja, takođe je došlo do značajnog smanjenja indeksa proliferacije, pri svim ispitivanim koncentracijama, u opsegu od 35,9% (1 µg/mL, genciopikrozida) do 23,08% u slučaju najviše koncentracije. Od drugih ispitivanih konstituenata koji su smanjili indeks proliferacije treba pomenuti: svertiamarin, sverozid i izogentizin.

Svertiamarin statistički značajno ($p < 0,01$) smanjuje IP, za približno 10% u odnosu na kontrolu. Nakon zračenja, nije utvrđena statistički značajna razlika u ispitivanom

parametru između tretiranih i kontrolnih uzoraka. Takođe utvrđeno je da sa porastom učestalosti MN, opada proliferativni potencijal limfocita u svim tretiranim uzorcima. Linearna regresiona analiza je pokazala statistički visoko značajnu negativnu korelaciju između učestalosti mikronukleusa i proliferativnog potencijala ćelija u ozračenim uzorcima ($r = -0,95$, $p < 0,05$), dok u neozračenim uzorcima statistički značajne korelacije nisu utvrđene.

Tabela 4.19. Indeks proliferacije (IP) u uzorcima humanih limfocita pre i nakon γ -zračenja, u prisustvu konsituenata *G. lutea*.

Uzorak	γ -zračenje	C (finalno) u eseju (mg/mL)		
		0,001	0,01	0, 1
		Proliferativni indeks (% u odnosu na kontrolu)		
Loganska kiselina	-	97,84	101,12	102,86
	+	96,79	95,51	96,15
svertiamarin	-	94,32	89,77	86,93
	+	103,35	100,67	98,66
genciopikrozid	-	56,76	61,45	62,86
	+	64,10	70,51	76,92
sverozid	-	97,16	92,05	88,64
	+	103,36	98,66	90,60
izoviteksin	-	97,31	100,56	100,57
	+	99,36	95,51	95,51
amarogentin	-	96,77	100	101,14
	+	87,82	87,18	98,07
Izogentizin	-	87,5	92,05	81,25
	+	106,04	95,97	citotoksično dejstvo

Proliferativni potencijal ćelija tretiranih sverozidom je statistički značajno smanjen u odnosu na kontrolu (za 5-10%, $p < 0,01$) u neozračenim uzorcima, dok je nakon ozračivanja značajno povišen samo pri najnižoj koncentraciji ($p < 0,05$) i statistički značajno smanjen pri koncentraciji od 100 $\mu\text{g/mL}$ (oko 9%, $p < 0,05$). Linearna regresiona analiza nije pokazala statistički značajne korelacije između učestalosti mikronukleusa i indeksa proliferacije ćelija.

Proliferativni potencijal svih ćelija tretiranih izogentizinom, u neozračenim uzorcima statistički je značajno niži ($p < 0,05$) za približno 10% u odnosu na kontrolu. Nakon zračenja, nije utvrđena statistički značajna promena ispitivanog parametra između tretiranih i kontrolnih uzoraka. Linearnom regresionom analizom nisu utvrđene statistički značajne korelacije između učestalosti mikronukleusa i proliferativnog potencijala ćelija.

Amarogentin, izoviteksin i loganska kiselina nisu pokazali značajno smanjenje indeksa proliferacije u tretiranim ćelijama, pre ozračivanja. Nakon ozračivanja od pomenuta tri jedinjenja samo je amarogentin, pokazao statistički značajno smanjenje proliferacije za oko 12%, u odnosu na kontrolu.

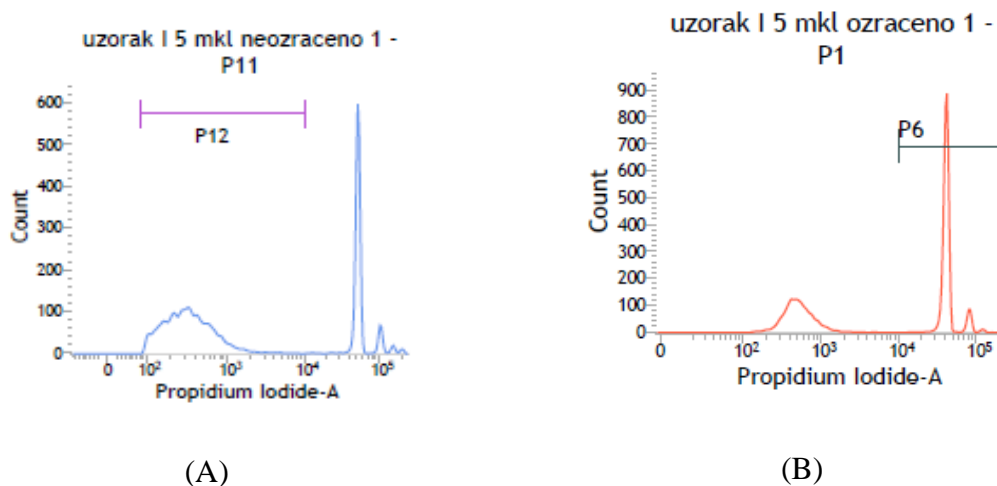
Rezultati dobijeni ispitivanjem IP mogu biti od koristi pri razvoju novih citostatika, posebno kada je reč o genciopikrozidu koji u značajnoj meri smanjuje indeks proliferacije. Najzad, rezultati dobijeni ispitivanjem učestalosti MN i IP indukovanih pojedinačnim konstituentima, mogu da se uporede sa rezultatima koji su dobijeni tretiranjem limfocita ekstraktima lincure. Naime, etanolno vodeni ekstrakti (50 i 75%, EtOH, v/v) su izazvali visoku učestalost MN u neozračenim uzorcima. Vodeni ekstrakt je takođe pokazao visoku učestalost MN i IP, a ono što je zajedničko pomenutim ekstraktima je visoka zastupljenost genciopikrozida, koji i sam ispoljava slično delovanje kao i ekstrakti. Međutim, razlika kojom ekstrakti indukuju pojavu MN nakon zračenja, pri čemu vodeni ekstrakt i dalje povećava učestalost MN a 50% EtOH smanjuje mogao bi da se objasni delovanjem drugih jedinjenja koja su prisutna u etanolno vodenim ekstraktima a nema ih u vodenom. To su pre svega izogentizin, gentizin i gentiozid, koji pripadaju ksantonima, kao i svertiamarin i sverozid koji pripadaju sekoiridoidima. Sverozid je najviše zastupljen u 50% EtOH (0,58%), dok je svertiamarin najzastupljeniji u vodenom ekstraktu (0,51%). Radioprotektivna aktivnost ksantona je već ispitivana u ranijim istraživanjima, gde je pokazano da magniferin,

ksanton iz *G. lutea* pokazuje značajnu radioprotektivnu aktivnost (Menković i sar., 2010). Takođe potvrđeno je da ekstrakti biljaka *G. dinarica* i *G. austriaca* (*Gentianella*) pokazuju takođe značajnu radioprotektivnu aktivnost. Konstituenti izolovani iz ove dve biljke koji su pokazali visoku radioprotektivnu aktivnost pripadaju ksantonima (tetraoksigenisani ksantoni) i C-glukozilflavonima (izoorientin) (Petrović i sar., 2008; Leskovic i sar., 2007). U literaturi međutim ne postoje podaci o radioprotektivnoj aktivnosti izogentizina i gentizina, osim što je utvrđeno njihovo mutageno dejstvo u modifikovanom ejmsovom testu (Marimoto i sar., 1983).

Takođe ostaje da se ustanovi zbog čega jedino kiseli ekstrakt značajno smanjuje učestalost MN i u neozračenim i u ozračenim uzorcima. Koncentracije ispitivanih konstituenata u kiselom ekstraktu (tabela 4.8) su manje u odnosu na vodeni i etanolno-vodene ekstrakte (50-96% EtOH) osim u slučaju loganske kiseline. Jedno od mogućih objašnjenja je da se ekstrakcijom razblaženim kiselinama ekstrahuju slobodna i esterifikovana fenolna jedinjenja, zatim organske baze (amini), kao i alkaloidi, u većoj meri nego primenom neutralnih ili slabo kiselih rastvarača. Štaviše, tokom različitih procesa kojim se uzorak koncentruje, može doći do hidrolize labilnih, acil i glikozil ostataka (Dai i sar., 2010).

4.5.2. Uticaj konstituenata lincure na apoptozu leukocita

Pošto su rezultati analize indeksa proliferacije pokazali da pri tretmanu neozračenih limfocita sa svertiamarinom, sverozidom i izogentizinom dolazi do značajnog pada proliferativnog indeksa, što ukazuje na njihov uticaj na regulaciju ćelijskog ciklusa, ispitan je uticaj navedenih jedinjenja na proces apoptoze u kulturi ćelija humanih leukocita. Izogentizin je pokazao citotoksično delovanje u kulturi humanih limfocita pre i nakon ozračivanja, sprečavajući u potpunosti ćelijsku proliferaciju pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji. Procenat ćelija u apoptozi određivan je protočnom citometrijom sa dodatkom propidijum jodida. Rezultati dobijeni analizom ćelija protočnom citometrijom, nakon tretmana leukocita svertiamarinom, prikazani su na slici 4.34.



Slika 4.34. Određivanje apoptoze neozračenih (A) i ozračenih (B) ćelija tretiranih svertiamarinom, protočnom citometrijom.

Na slici 4.34(A) sa P12 su označene hipoploidne ćelije čija je pojava karakteristična za ćelije u apoptozi (Krysko i sar, 2008). Odnos broja ćelija koje se nalaze u P12 u odnosu na ukupnu populaciju ćelija, P11 se procentualno izražava kao broj ćelija u apoptozi. Ista analiza je urađena i u kontrolnom uzorku, koji nije bio tretiran svertiamarinom. Procenat ćelija u apoptozi u kontrolnom uzorku, pre zračenja (za sva tri konstituenta) bio je $37,95 \pm 1,34$ a nakon ozračivanja broj ćelija u apoptozi je porastao na $75,53 \pm 5,29$. U kulturi neozračenih ćelija tretiranih svertiamarinom procenat ćelija u apoptozi bio je $65,1 \pm 3,06\%$, što u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak predstavlja statistički značajno povećanje ($p=0,002210$). Nakon ozračivanja, procenat ćelija u apoptozi ($51,32 \pm 1,94$) bio je značajno snižen u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($p=0,006$).

Na isti način određen je i broj ćelija u apoptozi nakon tretmana sa sverozidom i izogentizinom, a rezultati su sumirani u tabeli 4.20.

Tabela 4.20. Procenat ćelija u apoptozi nakon tretmana svertiamarinom, sverozidom i izogentizinom, određen protočnom citometrijom.

Uzorak	kontrola	svertiamarin	sverozid	izogentizin
neozračen	37,95±1,34	65,1±3,06	53,63±3,61	30,72±2,49
ozračen	75,53±5,29	51,32±1.94	56,03±1,21	60,30±2,22

U neozračenim kulturama sverozid je izazvao statistički značajno povećanje broja ćelija u apoptozi u odnosu na kontrolni uzorak ($p=0,007$). Nakon ozračivanja sverozid izaziva statistički značajno smanjenje apoptoze, u odnosu na odgovarajuću kontrolu ($p=0,015$). Jedino izogentizin u neozračenim uzorcima nije pokazao značajno povećanje ćelija u apoptozi ($p=0,067$), dok je u ozračenim pokazao smanjenje ćelija u apoptozi ($p=0,013$) ali manje u poređenju sa svertiamarinom i sverozidom.

Mehanizam antiproliferativne aktivnosti ekstrakata *G. lutea* nije u potpunosti rasvetljen, ali je u skorašnjim istraživanjima pokazano da vodeni ekstrakt *Gentiana* indukuje kaspaza nezavisnu ćelijsku smrt, koja se dovodi u vezu sa promenom aktivnosti mitohondrijskih enzima (Ogata i sar., 2011). U pomenutom istraživanju je pokazano da su različiti tipovi ćelija u manjoj ili većoj meri osetljivi na ekstrakte *Gentiana*, u zavisnosti od energetskeg statusa mitohondrija. Ovo je potvrđeno u eksperimentu sa prokaspaznim inhibitorom, kamptotekinom, koji sprečava ćelijsku smrt izazvanu kaspazom. Naime, u svim kulturama ćelija koje su sadržale ovaj inhibitor, u prisustvu vodenog ekstrakta *Gentiana* došlo je do indukcije apoptoze.

4.5.3. Analiza ozračenih i neozračenih leukocita mikroskopijom atomskih sila

(AFM)

U prethodnom poglavlju je pokazano kako konstituenti lincure deluju na proces apoptoze u kulturi ozračenih i neozračenih leukocita. Takođe, prilikom ispitivanja radioprotektivnih efekata pojedini konstituenti su pokazali jako antiproliferativno delovanje, sprečavajući deobu limfocita u kulturi ćelija. Ozračene i neozračene ćelije

koje su analizirane protočnom citometrijom nakon tretmana konstituentima lincure takođe su posmatrane i AFMom.

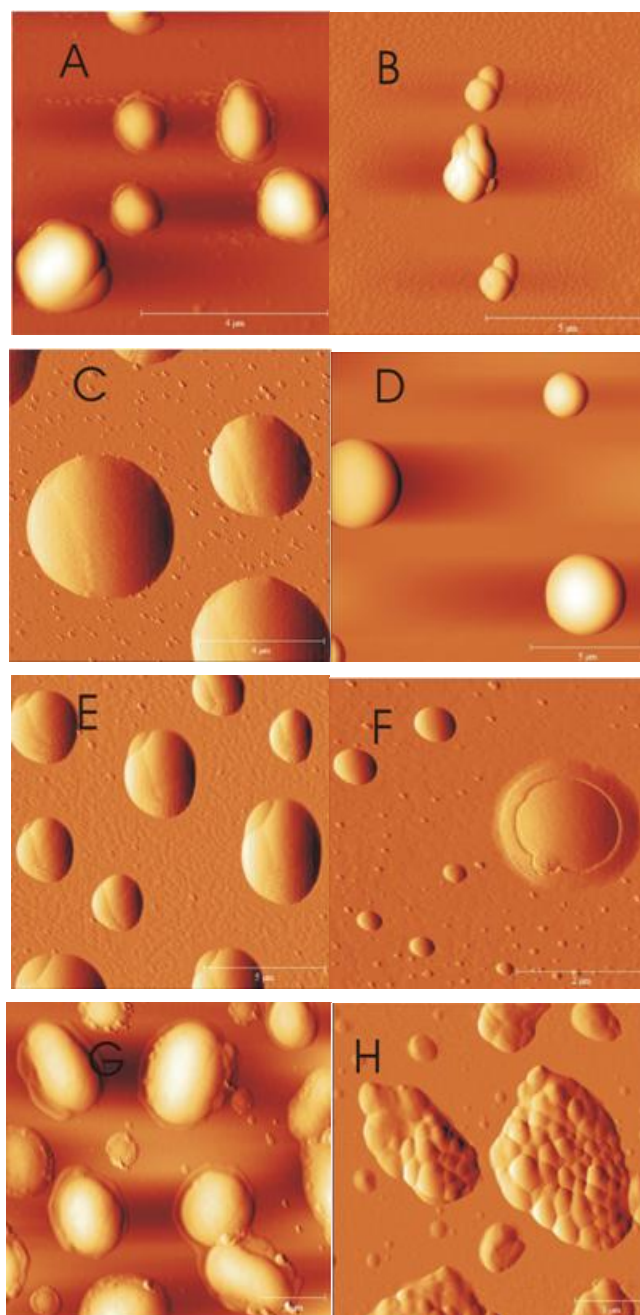
AFM mikroskopija se u poslednjih par godina u sve većoj meri koristi za detektovanje morfoloških i nanostrukturnih promena bioloških uzoraka. Ovom vrstom mikroskopije moguće je dobiti informacije o topografskim karakteristikama i biomehanici površine ćelije. Ćelijska membrana ima ključnu ulogu u fiziološkim procesima, kao što su ćelijska adhezija, migracija, signalna transdukcija, provodljivost jonskih kanala, ćelijski transport i ćelijsko prepoznavanje. Stoga svaka promena u strukturi ćelijske membrane predstavlja osetljiv pokazatelj stanja u kome se ćelija nalazi i pruža uvid u morfološke karakteristike normalnih i ćelija koje se nalaze u procesu apoptoze ili nekroze (Jin i sar., 2013).

Ćelije koje prolaze kroz proces apoptoze pokazuju dobro definisane morfološke karakteristike, koje uključuju bubrenje ćelijske membrane, kondenzaciju hromatina, fragmentaciju jedra i formiranje apoptoznih tela (Krysko i sar., 2008). Pored navedenog, apoptoza se karakteriše i biohemijским promenama, kao što su izloženost fosfatidilserina ka spoljašnjoj strani plazmine membrane, promena mitohondrijske propustljivosti, oslobađanje proteina iz međumembranskog prostora u mitohondrijama i aktivacija kaspazom aktivirane DNKaze (Krysko i sar., 2008; Enari i sar., 1998). Neke od navedenih promena mogu se vizualizovati AFMom a pojedine strukturne promene se takođe mogu i kvantifikovati. Tako na primer, u toku apoptoze dolazi do smanjenja zapremine ćelija, visine i prečnika. Najizraženije promene mogu se uočiti na membrani same ćelije pri čemu dolazi do promena hrapavosti membrane u zavisnosti od stanja (faze) u kojem se ćelija nalazi. Veličina navedenih promena srazmerna je fazi u kojoj se apoptična ćelija nalazi (Hessler i sar., 2005).

Fotografije ozračenih i neozračenih leukocita, tretiranih svertiamarinom, sverozidom i izogentizinom u koncentraciji od 0,01 mg/mL, dobijene AFM mikroskopijom, prikazane su na slici 4.35.

Kao što se može videti sa slike 4.35, morfološke i nanostrukturne promene na ćelijama se uočavaju nakon ozračivanja u kontrolnom uzorku (B) ali i u neozračenim uzorcima nakon tretmana svertiamarinom, sverozidom i izogentizinom (C, E i G).

Najuočljivije promene su prisutne u ozračenom uzorku, nakon tretmana izogentizinom (H). U navedenom slučaju dolazi do izraženog bubrenja ćelije.



Slika 4.35. Reprezentativne AFM fotografije leukocita: u koloni levo su neozračene ćelije a u desnoj ćelije nakon ozračivanja. Kontrolni uzorci su označeni sa: (A) i (B); ćelije tretirane svertiamarinom: (C) i (D); sverozidom: (E) i (F) i izogentizinom: (G) i (H).

Treba pomenuti da je protočnom citometrijom utvrđeno da izogentizin pri ispitivanoj koncentraciji u najmanjoj meri smanjuje zračenjem izazvanu apoptozu (oko 20%) u odnosu na svertiamarin i sverozid koji smanjuju apoptozu ćelija za 32 odnosno 25%. Takođe, prilikom poređenja efekata koje izazivaju navedena jedinjenja treba uzeti u obzir i njihove koncentracije. Koncentracija u finalnoj podlozi (za sva tri ispitivana konstituenta) od 0,01 mg/mL odgovara molarnim koncentracijama: 26,71; 27,90 i 38,72 μM za svertiamarin, sverozid i izogentizin (po redosledu navođenja). Ovo takođe delimično objašnjava razliku u efektima između navedenih jedinjenja.

Kada je reč o neozračenim uzorcima tretiranim konstituentima lincure, protočnom citometrijom je pokazano da svertiamarin i sverozid značajno povećavaju procenat ćelija u apoptozi, u neozračenim uzorcima (Tabela 4.20). U ovom slučaju jedino izogentizin blago smanjuje procenat ćelija u apoptozi. Kao što je pomenuto, prilikom apoptoze, pored ostalih karakterističnih promena dolazi i do strukturnih promena na membrani ćelija. Ove promene se mogu efikasno interpretirati pomoću AFM mikroskopije, određivanjem prosečne visine, prosečne hrapavosti površine (ili kvadrata srednje vrednosti hrapavosti) zapremine i prečnika ćelije. Kvadrat srednje vrednosti hrapavosti i profili visine ozračenih i neozračenih ćelija, nakon tretmana konstituentima lincure, određeni AFM prikazani su u tabeli 4.21.

Tabela 4.21. Kvadrat srednje vrednosti hrapavosti i prosečna visina ozračenih i neozračenih ćelija tretiranih konstituentima lincure, analizirane AFM mikroskopijom.

Parametar	Kontrolne ćelije	Ćelije tretirane svertiamarinom	Ćelije tretirane sverozidom	Ćelije tretirane izogentizinom	
Kvadrat srednje vrednosti hrapavosti (nm)	neozračene	38	25,2	27,6	55,8
	ozračene	67,7	26,7	17,8	82,3
prosečna visina (μm)	neozračene	0,12	0,16	0,12	0,27
	ozračene	0,2	0,13	0,07	0,34

U radovima pojedinih autora je pokazano (AFM mikroskopijom) da limfociti u normalnom stanju (neaktivirani) imaju tipičan sferni oblik, sa veoma glatkom površinom, koja se karakteriše niskom hrapavošću membrane (Hu i sar., 2009). U navedenom istraživanju je pokazano da membrana aktiviranih limfocita (konkavalinom A) ima nešto veću hrapavost dok je prosečna visine ćelije skoro duplo povećana. Nasuprot navedenom, kod limfocita koji su u apoptozi izazvanoj deksametazonom, dolazi do najizraženije promene (povećanje) u hrapavosti površine, kao i do značajnog smanjenja visine (Hu i sar., 2009). Ovakvi rezultati su potvrđeni i u slučaju ćelija humanog karcinoma tretiranih staurosporinom, (indukuje apoptozu) kod kojih dolazi do smanjenja visine za 32%, zapremine ćelije za oko 50% i prečnika za oko 15% (Hessler i sar., 2005).

Međutim u radovima drugih autora je pokazano da u nekim slučajevima dolazi do značajnog smanjenja prosečne hrapavosti ćelija u apoptozi (Jin i sar., 2013). U navedenom istraživanju indukovana je apoptoza K562 ćelija, nakon kultivacije zajedno sa limfocitima. U eksperimentima u kojima su T limfociti tretirani aminofilinom primećene su različite promene u zavisnosti od vremena trajanja tretmana. Nakon 48h tretmana aminofilinom došlo je do povećanja zapremine ćelije, profila visine i hrapavosti, dok je nakon 72h a posebno 96h došlo do značajnog smanjenja svih navedenih parametara (Huang i sar., 2014).

Na osnovu rezultata prikazanih u tabeli 4.21, zapažamo da nakon zračenja u netretiranim uzorcima (kontrolni) dolazi do povećanja hrapavosti ćelija, za oko 78% kao i visine za oko 67%. Nakon tretmana svertiamarinom i sverozidom, u neozračenim a posebno u ozračenim uzorcima dolazi do smanjenja hrapavosti površine ćelija. U neozračenim uzorcima tretiranim svertiamarinom i sverozidom ne dolazi do značajnog povećanja prosečne visine ćelija. Međutim u ozračenim uzorcima, tretiranim pomenutim konstituentima, dolazi do značajnog smanjenja visine ćelija. Dobijeni rezultati se delimično poklapaju sa literaturnim podacima, osim u slučaju apoptoze izazvane aminofilinom, gde je pokazano da nakon tretmana dužeg od 48h dolazi do smanjenja hrapavosti, visine i volumena ćelije (Huang i sar., 2014). Za razliku od pomenuta dva jedinjenja, jedino kod ćelija tretiranih izogentizinom dolazi do značajnog povećanja hrapavosti i povećanja prosečne visine i u ozračenim i u neozračenim uzorcima, što

ukazuje da su ćelije na drugačiji način aktivirane izogentizinom, u poređenju sa ćelijama tretiranim sverozidom i svertiamarinom. Ovakvo delovanje izogentizina je potvrđeno i protočnom citometrijom i mikronukleusnim testom. Ovde takođe treba napomenuti da su strukturne promene na ćelijama analizirane nakon 24h izlaganja ćelija konstituentima lincure, pri jednoj ispitivanoj koncentraciji. Prilikom analize rezultata razlike u tumačenju potiču i od načina obrade navedenih parametara. Na primer kod određivanja prosečne hrapavosti (ili kvadrata srednje vrednosti hrapavosti) i visine treba obraditi reprezentativni broj ćelija odnosno površina membrane, kako bi se dobili pouzdani rezultati (Kim i sar, 2012). Najzad, način pripreme uzoraka za AFM mikroskopiju takođe utiče na neke od morfoloskih karakteristika ćelija (Wu i sar., 2009).

4.6. Antimikrobna aktivnost ekstrakata i konstituenata lincure

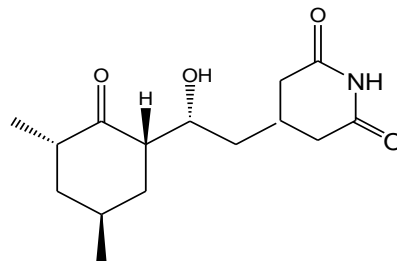
Antimikrobna aktivnost ekstrakta lincure ispitivana je na fitopatogenim plesnima *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* i tri vrste iz roda *Fusarium*: *proliferatum*, *verticillioides* i *graminearum*. Korišćena je metoda dilucije u agaru a antifungalna aktivnost je određivana na osnovu zone inhibicije, u odnosu na kontrolni netretirani uzorak. U preliminarnim eksperimentima, finalna koncentracija ispitivanih ekstrakata u hranljivoj podlozi je bila 0,2 mg/mL, a loganske kiseline 0,04 mg/mL. Rezultati delovanja ekstrakata na rast *Aspergillus flavus* prikazani su u **prilogu 9**. Osim ekstrakata prikazanih u daljem tekstu, ostali ekstrakti lincure (vodeni, kiseli i 25% EtOH) nisu dalje ispitivani jer u preliminarnim eksperimentima nisu pokazali značajniju antifungalnu aktivnost.

Nijedan od testiranih ekstrakata nije značajno inhibirao rast *A. flavus*, pri C= 0,2 mg/mL. Inhibicija rasta *A. flavus* etanolno vodenim ekstraktima (50 i 96% EtOH, v/v) se kreće od 6,6 do 8,8%. Rezultati testiranja tri vrste plesni roda *Fusarium* sa ekstraktima lincure, prikazani su na slici 4.36. Sa slike se jasno vidi da je *F. proliferatum* skoro potpuno rezistentan na delovanje ekstrakata lincure pri ispitivanoj koncentraciji. Međutim druga dve vrste roda *Fusarium*, pokazuju izvestan stepen osetljivosti. Od tri ispitivane vrste, najveću osetljivost prema 50% EtOH ekstraktu lincure pokazao je *F. verticillioides*, čiji je rast inhibiran za oko 35%, dok 96% EtOH ekstrakt uzrokuje nešto manju inhibiciju rasta *F. verticillioides* za oko 31%.



Slika 4.36. Antifungalna aktivnost ekstrakta *G. lutea*: uzorak 3 (50% EtOH ekstrakt), uzorak 4 (96% EtOH ekstrakt) i uzorak 7 (MeOH ekstrakt), u koncentracijama od po 0,2 mg/mL.

Kao što se može videti sa slike 4.36, *F. graminearum* je rezistentniji na delovanje ekstrakata lincure u poređnju sa *F. verticillioides*. Esktrakti lincure inhibiraju njegov rast u opsegu od 2 do 13% (96 i 50% EtOH ekstrakti). Pošto su 50% i 96% EtOH ekstrakti pokazali izvesnu antifungalnu aktivnost, u narednim eksperimentima testirana je njihova antifungalna aktivnost pri većim koncentracijama, u opsegu od 0,2 do 0,5 mg/mL (finalna koncentracija u podlozi). Njihova antifungalna aktivnost je zatim poređena sa poznatim fungicidom, aktidionom, čija je struktura prikazana na slici 4.37 a rezultati inhibicije su prikazani u tabeli 4.22.



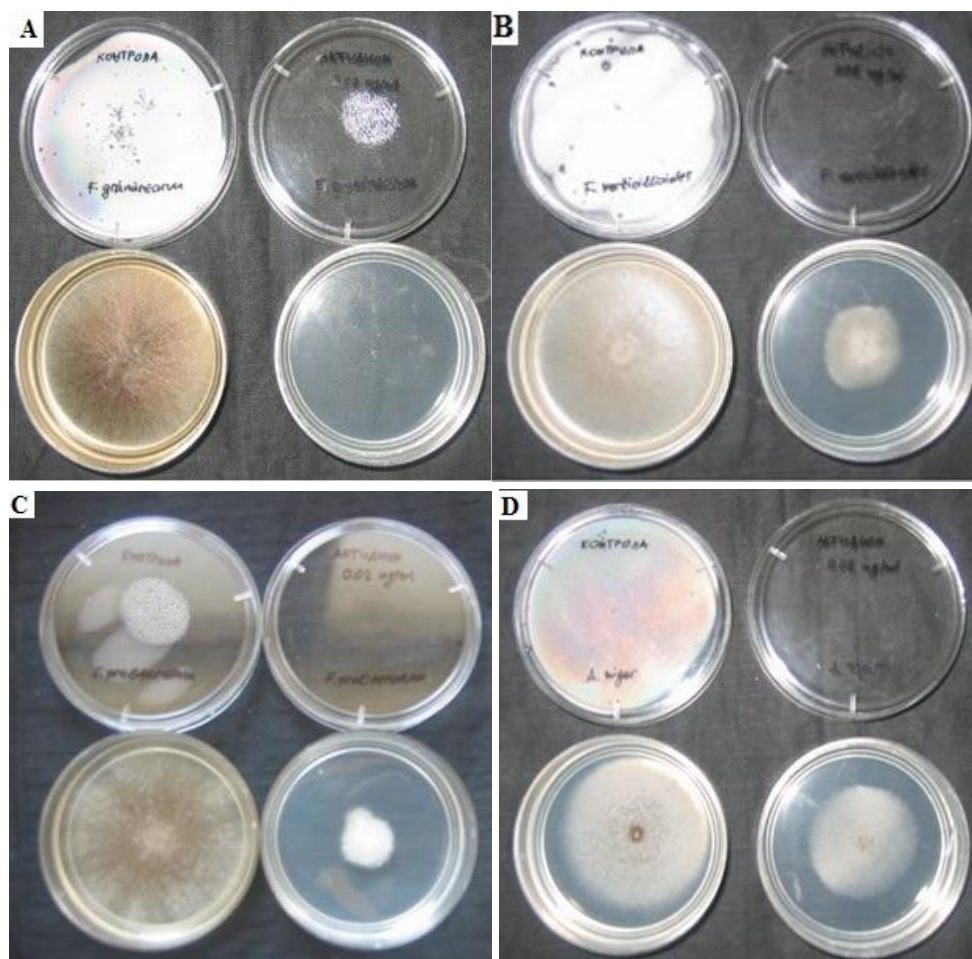
Slika 4.37. Struktura cikloheksimida. Komercijani naziv aktidion.

Tabela 4.22. Antifungalna aktivnost ekstrakata lincure: E3- 50% EtOH; E4- 96% EtOH; E7- 100% MeOH. Kao kontrola korišćen je fungicid aktidion.

Vrsta plesni	Inhibicija rasta (%)							
	Aktidion (mg/mL)	E3 (mg/mL)			E4 (mg/mL)			E7 (mg/mL)
	0,02	0,2	0,4	0,5	0,2	0,4	0,5	0,2
<i>Fusarium proliferatum</i> 4016/8-1	68	12	32	48	6	20	56	4
<i>Fusarium verticillioides</i> 4011/4-1	61	13	33	54	31	-*	-	18
<i>Fusarium graminearum</i> 4009/6-1	100	13	-	-	2	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	24	29	57	71	-	-	-	-

*- nije određivano

Delovanje aktidiona u koncentraciji od 0,02 mg/mL, prema ispitivanim plesnima, prikazano je na slici 4.38. Kao što se može videti iz tabele 4.22 i na slici 4.38, najosetljivija vrsta iz roda *Fusarium* je *graminearum*, čiji je rast inhibiran 100% u prisustvu aktidiona u koncentraciji od 0,2 mg/mL.

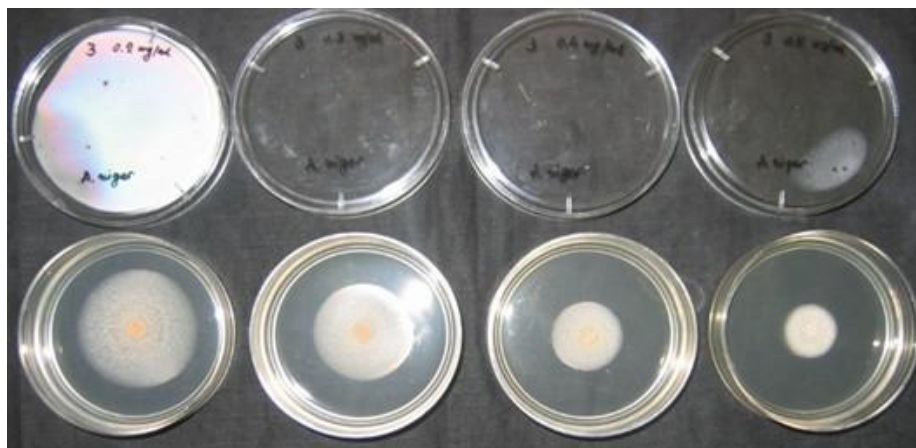


Slika 4.38. Inhibicija rasta: (A) *F. graminearum*; (B) *F. verticillioides*; (C) *F. proliferatum* i (D) *A. niger*, aktidionom u koncentraciji od 0,2 mg/mL.

Nesto manje osetljivi su *F. proliferatum* i *F. verticillioides* čiji je rast inhibiran za oko 68%, odnosno 61%. Najmanje osetljiva plesan je *A. niger*, jer je njegov rast inhibiran 24% u prisustvu aktidiona.

U poređenju sa aktidionom najjača antifungalna aktivnost prema *F. proliferatum* je postignuta sa 50 i 96% EtOH ekstraktima u koncentraciji od po 0,5 mg/mL (**Prilog 9**). Pri ovoj koncentraciji pomenuti ekstrakti inhibiraju rast *F. proliferatum* za 48% i 56% (tabela 4.22). U grupi ispitivanih ekstrakata, 50% EtOH pokazuje antifungalnu aktivnost prema *F. verticillioides*, takođe sličnu kao i u prethodnom eksperimentu, inhibirajući njegov rast za 54,16%, pri koncentraciji od 0,5 mg/mL (tabela 4.22 i **Prilog 9**).

Ispitivanje uticaja ekstrakata lincure na rast plesni *A. niger* prikazano je na slici 4.39.



Slika 4.39. Inhibicija rasta *A. niger*, 50% EtOH ekstraktom lincure u koncentracionom opsegu od 0,2 do 0,5 mg/mL.

Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih na slici 4.39 i tabeli 4.22 zapažamo da je 50% EtOH ekstrakt u finalnoj koncentraciji u podlozi od 0,5 mg/mL pokazao značajno bolju antimikrobnu aktivnost prema *A. niger*, u poređenju sa aktivdionom. Takođe 50% EtOH ekstrakt pokazao je veću antimikrobnu aktivnost prema *A. niger* u poređenju sa aktivnošću koju ispoljava prema sve tri vrste *Fusarium*, tabela 4.22. Pri koncentraciji od 0,4 mg/mL, 50% EtOH inhibira rast *A.niger* 57% dok pri koncentraciji od 0,5 mg/mL, inhibicija dostiže 71 %.

Kao što je već pomenuto u uvodnom delu, vrste iz roda *Fusarium* su često kontaminanti cerealijsa (kukuruz, ječma, pšenice, ovas, raži i pirinča) zatim namirnica koje ih sadrže (brašno, hleb, kolači itd.) voća i povrća (Pit i Hocking, 1997; Lević i sar., 2004). Svojim delovanjem navedene plesni prouzrokuju kvarenje hrane, što ima nesagledive ekonomske posledice. Pored navedenog, vrste iz roda *Fusarium* su izvor veoma štetnih mikotoksina kao što su: zearalenon, trihotecen, deoksinivalenol, nivalenol, fumonizin, moniliformin, fuzarin C i drugi (Thrane, 2001; Lević i sar., 2004, Kocić-Tanackov i sar., 2011). Konzumiranje hrane koja je kontaminirana navedenim toksinima predstavlja rizik po zdravlje ljudi i životinja. Zbog svega navedenog u praksi se primenjuju brojni konzervansi, kako bi se sprečio rast štetnih mikroorganizama i kvarenje hrane. Pored sintetičkih konzervanasa u poslednje vreme postoje sve veći

zahtevi za prirodnim konzervansima, koji nisu toksični i minimalno utiču na organoleptička svojstva namirnica. Takvi konzervansi su pojedini biljni ekstrakti i etarska ulja (Burt, 2004; Bakkali i sar., 2008; Kocić-Tanackov i sar., 2011).

U literaturi je najčešće opisivano delovanje etarskih ulja na različite sojeve vrsta *Fusarium* i *Aspergillus*. Antifungalno delovanje prema *F. proliferatum*, koji je izolovan sa površine zrna kukuruza, pokazala su etarska ulja cimeta, karanfilića, limun trave i origana (Velluti i sar, 2003). Etarska ulja bogata monoterpenima, kao što su ulje žalfije i ulje crnog bibera takođe pokazuju dobru antifungalnu aktivnost prema različitim vrstama roda *Fusarium* i *Aspergillus* a najbolje antifungalno delovanje pokazuje etarsko ulje ruzmarina. Pomenuta etarska ulja pokazuju inhibitornu aktivnost izraženu minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) u opsegu od 1,2 do 22,6 mg/mL (Stević i sar, 2014). Etarsko ulje izolovano iz eukaliptusa pokazuje inhibitorno delovanje prema *F. graminearum* (Mehani i sar., 2014). Biljni ekstrakti sa inhibitornom aktivnošću prema *F. verticillioides* su metanolni ekstrakti ambrozije, čamparala (*L. tridentata*) i nima (*A. indica*). Rezultati pokazuju da bi ekstrakt nima mogao da bude efektivan u kontroli rasta *F. verticillioides* jer utiče inhibitorno na klijanje spora i micelujuma (Suarez-Jimenez i sar, 2007). Metanolni i vodeni ekstrakti pojedinih korovskih biljaka, a posebno vigne (*V. unguiculata*) i *A. spinosus* inhibiraju rast *Fusarium spp.* nakon 48h kultivacije sa MIC koji je manji od 0,5 mg/mL (Thembo i sar., 2009). Pri tom, ove dve biljke nemaju uticaja na rast *Aspergillus spp.* Glavni konstituenti vigne su nehlorogena, hlorogena i kofeinska kiselina (Zia-Ul-Haq i sar, 2013). Ekstrakti korena lincure takođe inhibiraju rast različitih vrsta iz roda *Fusarium* za oko 50% i *A. niger* za oko 70%, pri koncentraciji od 0,5 mg/mL. To znači da bi u većoj koncentracij ekstrakti lincure najverovatnije u potpunosti inhibirali rast navedenih fitopatogena.

Dobijeni rezultati su značajni za dalja istraživanja u ovoj oblasti jer mogu doprineti identifikaciji jedinjenja ili klase jedinjenja koja pokazuju još efikasniju inhibitornu aktivnost. Krajnji cilj navedenih istraživanja bila bi njihova praktična primena.

5. ZAKLJUČCI

1. Kvalitativnom i kvantitativnom analizom ekstrakata lincure potvrđeno je da je genciopikrozid najzastupljeniji konstituent u ekstraktu korena ove biljke. Rastvarači kojima se postiže najviša ekstrakcija genciopikrozida su etanolno vodeni, sa udelom etanola većim od 50% (v/v, u vodi). Ekstrakcijom sa vodom dobijaju se takođe visoki prinosi genciopikrozida, ukoliko se koristi ključala voda. Najupečatljivija razlika među ekstraktima je prisustvo ksantonskih jedinjenja, poput izogentizina, čija se koncentracija povećava sa smanjenjem polarnosti rastvarača.
2. Pored navedenog, u ovom radu su ekstrakti lincure po prvi put analizirani MALDI-TOF masenom spektrometrijom, pri čemu su konstituenti u ekstraktima identifikovani bez prethodnog hromatografskog razdvajanja (etarski i metanolni ekstrat).
3. Pojedini ekstrakti i konstituenti *G.lutea* pokazuju značajnu inhibitornu aktivnost prema ispitivanim enzimima:
 - Humanoj mijeloperoksidazi (*in vitro*) - u najvećem stepenu etanolno-vodeni ekstrakti i to: 50% i 75% EtOH smanjuju aktivnost MPO za 100%, pri koncentraciji od 100µg/mL u toku 15 minuta. Od konstituenata napotentniji inhibitor je genciopikrozid, $IC_{50}=0,8 \mu\text{g/mL}$ (2,25µM).
 - Acetilholinesterazi (*in vitro*) – najviši stepen inhibicije pokazuje 75% EtOH, pri koncentraciji od 50 µg/mL, smanjuje aktivnost enzima za 54%. Od konstituenata najviši nivo inhibicije pokazuje loganska kiselina, 39% pri C=6, 77 µM.
 - E-NTPDazi (*in vitro*) – svi ispitivani ekstrakti pokazuju značajan stepen inhibicije, u opsegu od 45 do 53% (voda i 50% EtOH), pri koncentraciji od 200 µg/mL. Od konstituenata u *in vitro* ispitivanju genciopikrozid, amarogentin i izoviteksin su smanjili aktivnost enzima za oko 30%. Na osnovu *docking* studije dimer izogentizina bi bio najpotentniji inhibitor enzima, sa energijom vezivanja većom od ATPa (-10 kcal/mol nasuprot -9,3 kcal/mol za ATP) a zatim amarogentin i izoviteksin (oba -9,4 kcal/mol).

4. Ekstrakti lincure pokazuju umerenu antioksidativnu aktivnost a u grupi ispitivanih ekstrakata 50% EtOH u najvećoj meri inhibira DPPH radikal sa $IC_{50}=20,6\pm 0,4$ $\mu\text{g/ml}$. U CV, 50% EtOH pokazuje najveći anodni pik. Vodeni i 50% EtOH ekstrakt sadrže najveću količinu ukupnih polifenola (99,6 odnosno 96,1 mg GK/g ekstrakta).
5. Kiseli ekstrakt lincure pokazuje najbolja radioprotektivna svojstva jer u najvećoj meri smanjuje učestalost mikronukleusa (za 44,57%) u kulturi humanih limfocita izloženih jonizujućem zračenju, dok 50% EtOH u najvećoj meri (preko 100%) povećava učestalost MN kod neozračenih uzoraka, što ukazuje na njegove genotoksične efekte. U grupi ispitivanih konstituenata lincure, amarogentin možemo izdvojiti kao najpodesniji radioprotektor, jer značajno smanjuje učestalost MN kod uzoraka tretiranih γ -zračenjem (74,38%) ali i kod neozračenih uzoraka za oko 50%.
6. Genciopikrozid pokazuje najjaču antiproliferativnu aktivnost u odnosu na sve ispitivane konstituente (43,2% smanjenja u odnosu na kontrolu, pri $C=1$ $\mu\text{g/mL}$). Na ovaj način genciopikrozid deluje kao citostatik.
7. Etanolno vodeni ekstrakti pokazuju najbolju antifungalnu aktivnost. U koncentraciji od 0,5 mg/mL, 50% i 96% EtOH ekstrakti inhibiraju rast *F. proliferatum* za 48 odnosno 56%. Pri koncentraciji od 0,5 mg/mL, 50% EtOH inhibira rast *F. verticillioides* za 54% a *A. niger* za 71%.

Dobijeni rezultati ukazuju da su biološka aktivnost ekstrakata korena lincure a samim tim i mogućnosti njihove primene mnogo šire od tradicionalnog načina upotrebe. U narodnoj medicini i u većini farmakopeja lekovita svojstva lincure su vezana za tretman gastrointestinalnih poremećaja. Međutim inhibitorna aktivnost ekstrakata lincure i njenih konstituenata prema enzimima MPO, AChE i E-NTPDazi mogu biti polazna tačka u razvoju inhibitora koji bi imali terapijske efekte.

Povećana aktivnost MPO je prisutna kod kardiovaskularnih, inflamatornih i neurodegenerativnih bolesti, pa je razvoj novih i efikasnih inhibitora vrlo značajan. Inhibitori AChE se već koriste u tretmanu Alchajmerove bolesti pa je razvoj novih inhibitora takođe značajan. Kada je reč o inhibitorima E-NTPDaza, razvoj novih inhibitora je aktuelan ne samo zbog nedostatka dovoljno specifičnih inhibitora već i zbog brojnih fizioloških efekata koji se dovode u vezu sa aktivnošću ovog enzima.

Pored neurodegenerativnih bolesti, modulacija aktivnosti E-NTPDaze ima uticaja i na stanja poput depresije i anksioznosti.

Antiproliferativni efekti pojedinih konstituenata lincure mogu biti iskorišćeni pri razvoju novih jedinjenja sa citostatskim efektima.

Najzad antifungalna aktivnost ekstrakta lincure prema fitopatogenima iz rodova *Fusarium* i *Aspergillus* mogu imati primenu u poljoprivredi i industriji hrane s obzirom da su navedene plesni najčešći uzročnici bolesti pšenice i kukuruza.

6. LITERATURA

1. Aberham, A., Schwaiger, S., Stuppner, H., and Ganzera, M., Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthonones and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *J Pharmaceut Biomed Anal.*, 4 (2007) 437-442.
2. Aiello, N., Bontempo, R., Vender, C., Use of morphological features and amarogentin content for characterization of wild yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) populations in North-East Italy, *Acta Botanica Gallica: Bot Lett.*, 160 (2013) 33-41.
3. Akileshwari, C., Muthenna, P., Nastasijevic, B., Joksic, G., Petrash, J.K., Reddy, G.B., Inhibition of Aldose Reductase by *Gentiana lutea* Extracts, *Exp Diabetes Res.*, 2012 (2012) 147965, doi:10.1155/2012/147965.
4. Al Rashida, M., Iqbal, J., Therapeutic potentials of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase, ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, ecto-5'-nucleotidase and alkaline phosphatase inhibitors, *Med Res Rev.*, 34 (2014) 703-743.
5. Anesini, C., Ferraro, G.E., Filip, R., Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Commercially Available Tea (*Camellia sinensis*) in Argentina, *J Agric Food Chem.*, 56 (2008) 9225-9229.
6. Arberas, I., Leiton, M.J., Dominguez, J.B., Bueno, J.M., Arino, A., de Diego, E., Renobales, G., de Renobales, M. (1995) The volatile flavor of fresh *Gentiana lutea* L. roots, in: G. Charambous, *Food Flavours: generation, analysis and process influence*. *Developments in food science 37A*, Elsevier, Amsterdam, pp 207-234.
7. Arino, A., Arberas, I., Leiton, J., de Renobales, M., Dominguez, J.B., The extraction of yellow gentian root (*Gentiana lutea*), *Z. Lebensm Unters. Forsch. A*, 205 (1997) 295–299.
8. Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T (Eds.), *Recent Advances in Phytochemistry*, in; *Phytochemistry of Medicinal Plant*, vol. 29 (1995) Springer, New York, pp 206-210.

9. Arora, R., Gupta, D., Chawla, R., Sagar, R., Sharma, A., Kumar, R., Prasad, J., Singh, S., Samanta, N., Sharma, R.K., Radioprotection by plant products: present status and future prospects, *Phytother Res.*, 19 (2005) 1-22.
10. Ashraf, M., Shah, S.M., Ahmad, I., Ahmad, S., Arshad, S., Ahmad K., Nasim, F. H., Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases (NTPDase) inhibitory activity of some medicinal plants, *J Med Plants Res.*, 5 (2011) 2090-2094.
11. Azman, N., Segovia, F., Martinez-Farre, X., Gil, E., and Almajano, M.A., Screening of antioxidant activity of gentian lutea root and its application in oil-in-water emulsions, *Antioxidants*, 3 (2014) 455-471.
12. Assessment of plants/herbs, plant/herbs extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in Animal production CFT/EFSA/2005/01.
13. Baba, S.A., Malik, S.A., Evaluation of antioxidant and antibacterial activity of methanolic extracts of *Gentiana kurroo royle*, *Saudi J Biol Sci.*, 21 (2014) 493–498.
14. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M., Biological effects of essential oils - A review, *Food Chem Toxicol.*, 46 (2008) 446-475.
15. Beherens, M., Brochkoff, A., Batram, C., Kuhn, C., Appendino, G., Meyerhof, W., The Human Bitter Taste Receptor hTAS2R50 Is Activated by the Two Natural Bitter Terpenoids Andrographolide and Amarogentin, *J Agric Food Chem.*, 57 (2009) 9860–9866.
16. Belcher, S.M., Zsarnovszky, A., Crawford, P.A., Hemani, H., Spurling, L., Kirley, T.L., Immunolocalization of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3 in rat brain: Implications for modulation of multiple homeostatic systems including feeding and sleep-wake behaviors. *Neuroscience*, 137 (2006) 1331-1346.
17. Berg, L., Andersson, C.D., Artursson, E., Hornberg, A., Tunemalm, A.K., Linusson, A., Ekstrom, F., Targeting Acetylcholinesterase: Identification of Chemical Leads by High Throughput Screening, Structure Determination and Molecular Modeling, *PIOSone*, 6 (2011) <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0026039>.

18. Bjelaković, G., Stojanović, I., Bjelaković, G. B., Pavlović, D., Kocić, G., Daković-Milić, A., Competitive inhibitors of enzymes and their therapeutic application, *Med Biol.*, 9 (2002) 201-206.
19. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V., Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review, *Ann Bot.*, 91 (2003) 179-194.
20. Bradley, P.P., Priebat, D.A., Christensen, R.D., Rothstein, G., Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J Invest Dermatol.*, 78 (1982) 206–209.
21. Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Sci Technol.*, 28 (1995) 25–30.
22. Bruneton, J., (2012) Principles of herbal pharmacology. In: Principles and Practice of Phytotherapy: Modern Herbal Medicine, K. Bone, S. Mills, Churchill Livingstone, Elsevier, pp 45-82.
23. Buffa, M., Rosetti, V., Lombard, A., Sancin, P., Bosia, P.D., *Gentiana lutea* L. fresh roots: variations in composition as a function of harvest location, *Acta. Pharm. Jugosl.* 41 (1991) 67-73.
24. Burnstock, G., Ralevic, V., Purinergic signaling and blood vessels in health and disease. *Pharmacol Rev.*, 66 (2014) 102–192.
25. Burnstock, G., Purinergic Signalling in the CNS. *Open Neurosci J.* 4 (2010) 24-30.
26. Burt S., Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review, *Int J Food Microbiol.*, 94 (2004) 223-253.
27. Calixto, J.B., Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbla medicined (Phytotherapeutic agents), *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (2000) 179-189.
28. Calliste, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., Duroux, J.-L., Free Radical Scavenging Activities Measured by Electron spin Resonance Spectroscopy and B16 Cell Antiproliferative behavior of Seven Plants, *J Agric Food Chem.*, 49 (2001) 3321-3327.
29. Chialva, F., Frattini, C., Mertelli, A., Unusual essential oils with aromatic properties. III. Volatile components of gentian roots, *Z Lebensm Unters Forsch.*, 182 (1986) 212-214.

30. Chitchumroonchokchai, C.K., Riedl, M., Suksumrarn, S., Clinton, S.K., Kinghorn, A.D., Failla, M.L., Xanthones in Mangosteen Juice Are Absorbed and Partially Conjugated by Healthy Adults, *J Nutr.*, 142 (2012) 675-680.
31. Chadwick, B.P., Frischauf, A.M., The CD39-like Gene Family: Identification of Three New Human Members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), Their Murine Homologues, and a Member of the Gene Family from *Drosophila melanogaster*, *Genomics*, 50 (1998) 357–367.
32. Chevion, S., Chevion, M., Chock, P.B., Beecher, G.R., Antioxidant Capacity of Edible Plants: Extraction Protocol and Direct Evaluation by Cyclic Voltammetry, *J Med Food*, 2 (1999) 1-10.
33. Clark, A.A., Dotson, C.D. Elson, A.E., Voigt, A., Boehm, U., Meyerhof, W., Steinle, N.I., Munger, S.D., TAS2R bitter taste receptors regulate thyroid function, *FASEB J.*, 29 (2014) 164-172.
34. Conforti, F., Rigano, D., Menichini, F., Loizzo, M.R., Senatore, F., Protection against neurodegenerative diseases of *Iris pseudopumila* extracts and their constituents, 80 (2009) 62-67.
35. Copeland, R.A. (2005) Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery, A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists, 2nd ed., Wiley, New York.
36. Crompton, N.E., Ozsahim, M., A versatil and rapid radiosensitivity assay of peripheral blod leukocytes based on DNA and surface marker assessment of cytotoxicity, *Radiation Research?* 147 (1997) 55-56.
37. Čolović, M.B., Bajuk-Bogdanović, D.V., Avramović, N.S., Holclajtner-Antunović, I.D., Bošnjaković-Pavlović, N.S., Vasić, V.M., Krstić, D.Z., Inhibition of rat synaptic membrane Na⁺/K⁺-ATPase and ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolases by 12-tungstosilicic and 12-tungstophosphoric acid, *Bioorg Med Chem.*, 19 (2011) 7063-7069.
38. Dewick, P.M., Medicinal Natural Products, A Biosynthetic Approach (2002) 2nd edition, John Wiley and Sons, Chichester, England, ISBN: 0471496405, pp 187-190.
39. Dhanavathy, G., Immunohistochemistry, histopathology, and biomarker studies of swertiamarin, a secoiridoid glycoside, prevents and protects streptozotocin-

- induced β -cell damage in Wistar rat pancreas, *J Endocrinol Invest.*, 38 (2015) 669-684.
40. Duthie, G.G., Duthie, S.J., Kyle, J.A., Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants, *Nutr Res Rev.* 13 (2000) 79-106.
 41. Dai, J., Mumper, R.J., Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties, *Molecules* (2010) 15:7313-7352.
 42. Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T.L., Sussman, J.L., Acetylcholinesterase: From 3D Structure to Function, *Chem Biol Interact.*, 187 (2010) 10-22.
 43. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.*, 7 (1961) 88–95.
 44. El-Sedawy, A.I., Hattori, M., Kobashi, K., Namba, T., Metabolism of gentiopicroside (gentiopicrin) by human intestinal bacteria, *Chem Pharm Bull.*, 37 (1989) 2435-2437.
 45. Elstein, K.H., Thomas, D.J., Zucker, R.M., Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis, *Cytometry*, 21 (1995) 170-176.
 46. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Nagata, S., A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature* 391 (1998) 43-50.
 47. European Medicines Agency (2009) Assessment report on *Gentiana lutea* L., radix, Doc. Ref.: EMA/HMPC/578322/2008.
 48. European Scientific Cooperative on Phytotherapy (2003) *Gentianae radix*, Monographs on the Medicinal Uses of Plant Drugs., ESCOP, 2nd Edition, Thieme, Stuttgart, pp 175-177.
 49. Evans, I.R., Howard, J.A.K., Savikin-Fodulović, K., Menković, N., Isogentisin (1,3-dihydroxy-7-methoxyxanthone). *Acta Crystallogr.* 60 (2004) 1557-1559.
 50. Eweas, A.F., Maghrabi, I.A., Namarneh, A.I., Advances in molecular modeling and docking as a tool for modern drug discovery, *Der Pharma Chemica*, 6 (2014) 211-228.

51. Fenech, M., The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations, *Mutat Res.*, 285 (1993) 35-44.
52. Fields, R.D., Burnstock, G., Purinergic signalling in neuron-glia interactions, *Nat Rev Neurosci.*, 7 (2006) 423–436.
53. Fiene, A., Baqi Y., Lecka, J., Sevigny, J., Muller, C.E., Fluorescence polarisation immunoassays for diphosphohydrolase (NTPDase) activity, *RCS Adv.*, 140 (2015) 140-148.
54. Folador, P., Cazarolli, L.H., Gazola, A.C., Reginatto, F.H., Schenkel, E.P., Silva, F.R., Potential insulin secretagogue effects of isovitexin and swertisin isolated from *Wilbrandia ebracteata* roots in non-diabetic rats, *Fitoterapia*, 81 (2010) 1180-1187.
55. Forbes, L.V., Sjögren, T., Auchère, F., Jenkins, D.W., Thong, B., Laughton, D., Hemsley, P., Pairaudeau, G., Turner, R., Eriksson, H., Unitt, J.F., Kettle, A.J., Potent Reversible Inhibition of Myeloperoxidase by Aromatic Hydroxamates, *J Biol Chem.*, 288 (2013) 36636-36647.
56. Frisch, M. J., Trucks, G. W., Schlegel, H. B., Scuseria, G. E., Robb, M. A., Cheeseman, J. R., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G. A., Nakatsuji, H., Caricato, M., Li, X., Hratchian, H. P., Izmaylov, A. F., Bloino, J., Zheng, G., Sonnenberg, J. L., Hada, M., Ehara, M., Toyota, K., Fukuda, R., Hasegawa, J., Ishida, M., Nakajima, T., Honda, Y., Kitao, O., Nakai, H., Vreven, T., Montgomery, J. A., Jr., Peralta, J. E., Ogliaro, F., Bearpark, M., Heyd, J. J., Brothers, E., Kudin, K. N., Staroverov, V. N., Kobayashi, R., Normand, J., Raghavachari, K., Rendell, A., Burant, J. C., Iyengar, S. S., Tomasi, J., Cossi, M., Rega, N., Millam, J. M., Klene, M., Knox, J. E., Cross, J. B., Bakken, V., Adamo, C., Jaramillo, J., Gomperts, R., Stratmann, R. E., Yazyev, O., Austin, A. J., Cammi, R., Pomelli, C., Ochterski, J. W., Martin, R. L., Morokuma, K., Zakrzewski, V. G., Voth, G. A., Salvador, P., Dannenberg, J. J., Dapprich, S., Daniels, A. D., Farkas, Ö., Foresman, J. B., Ortiz, J. V., Cioslowski, J., Fox, D. J. (2009) Official Gaussian 09 literature citation. Gaussian Inc., Wallingford CT. http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/ m_citation.htm.

57. Galperin, M.Y., Koonin, E.V., From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends Biotechnol.*, 28 (2010) 398-406.
58. Gilbert, B., Ferreira, J.L.P., Almeida, M.B.S., Carvalho, E.S., Caascon, V., Rocha, L.M., The official use of medicinal plants in public health, *Journal of Brazilina Association for the Advancement of Science*, 49 (1997) 339-344.
59. Gonzalez-Lopez, O., Carro, G., Aiello, N., Scartezzini, F., Casquero, P.A., Main bitter compounds *Gentiana lutea* var. *aurantiaca* roots wild collected in the Leon Province (Spain) *Planta Med.*, 80 (2014) DOI: 10.1055/s-0034-1394899.
60. Gray, E.G., Whittaker, V.P., The isolation of nerve endings from brain: an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation, *J Anat.*, 96 (1962) 79-88.
61. Gulcin, I., Elias, R., Gepdiremen, A., Taoubi, K., Koksall, E., Antioxidative secoiridoids from fringe three (*Chionantus virginicus* L), *Wood Sci Technol.*, 43 (2009) 195-212.
62. Hall, E.J., Giaccia, E., Editors (2006) *Radiobiology for the Radiologist*, 6th edition, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, USA.
63. Halliwell, B., Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312-322.
64. Han, H., Xiong, A.Z., He, C.Y., Liu, Q., Yang, L., Wang, Z.T., Combination of UHPLC/Q-TOF-MS, NMR spectroscopy, and ECD calculation for screening and identification of reactive metabolites of gentiopicroside in humans, *Anal Bioanal Chem.*, 406 (2014) 1781-1793.
65. Haraguchi, H., Tanaka, Y., Kabbash, A., Fujioka, T., Ishizu, T., Yagi, A., Monoamine oxidase inhibitors from *Gentiana lutea*, *Phytochemistry*, 65 (2004) 2255-2260.
66. Hermans, N., Cos, P., Maes, L., De Bruyne, T., Vanden Berghe, D., Vlietinck, A.J., Pieters, L., Challenges and pitfalls in antioxidant research, *Curr Med Chem.*, 14 (2007) 417-430.
67. Hessler, J.A., Budor, A., Putschakayala, K., Mecke, A., Rieger, D., Banaszak Holl, M.M., Orr, B.G., Bielinska, A., Beals, J., Baker, J., Atomic Force Microscopy Study of Early Morphological Changes during Apoptosis, *Langmuir*, 21 (2005) 9280-9286.

68. Horvat, A., Orlic, T., Banjac, A., Momic, T., Petrovic, S., Demajo, M., Inhibition of Rat Brain Ecto-ATPase Activity by Various Drugs, *Gen Physiol Biophys.*, 25 (2006) 91-105.
69. Hostettmann-Kaldas, M., Hostettmann, K., Sticher, O., Xanthones, flavones and secoiridoids of American *Gentiana* species, *Phytochemistry*, 20 (1981) 443-446.
70. Hu, M., Wang, J., Zhao, H., Dong, S., Cai, J., Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: From resting, activated to apoptosis, *J Biomech.*, 42 (2009) 1513-1519.
71. Huang, X., He, J., Liu, M., Zhou, C., The influence of aminophylline on the nanostructure and nanomechanics of T lymphocytes: an AFM study, *Nanoscale Res Lett.*, 9 (2014) 1-8.
72. International Atomic Energy Agency-IAEA (2010) *Radiation Biology: A Handbook for teachers and students*, Technical Report Series No. 42 Vienna, Austria.
73. Janssen, K., Mensink, R.P., Cox, F.J., Harryvan, J.L., Hovenier, R., Hollman, P.C., Katan, M.B., Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study, *Am J Clin Nutr.*, 67 (1998) 255-262.
74. Jensen, S.R., Schripsema, J. (2002) Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. in: L. Struwe, V. Albert (Eds.) vol.6, *Gentianaceae - Systematics and Natural History*, Cambridge University Press, pp 573-631.
75. Ji, H.F., Li, X.J., Zhang, H.Y., Natural products and drug discovery, Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *EMBO Rep.*, 10 (2009) 194-200.
76. Jiang, D.J., Jiang, J.L., Zhu, H.Q., Tan, G.S., Liu, S.Q., Xu, K.P., Li, Y.J., Demethylbellidifolin preserves endothelial function by reduction of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor level, *J Ethnopharmacol.*, 93 (2004) 295-306.
77. Jin, H., Zhao, H., Liu, L., Jiang, J., Wang, X., Ma, S., Cai, J., Apoptosis induction of K562 cells by lymphocytes: an AFM study, *Scanning*, 35 (2013) 7-11.

78. Johnson, G., Moore, S.W., The Peripheral Anionic Site of Acetylcholinesterase: Structure, Functions and Potential Role in Rational Drug Design, *Curr Pharm Des.*, 12 (2006) 217-225.
79. Kasote, D.M., Flaxseed phenolics as natural antioxidants, *Int Food Res J.*, 20 (2013) 27-34.
80. Kasote, D.M., Katyare, S.S., Hegde, M.V., Bae, H., Significance of Antioxidant Potential of Plants and its Relevance to Therapeutic Applications, *Int J Biol Sci.*, 11 (2015) 982-991.
81. Kato, Y., Nagao, A., Terao, J., Osawa, T., Inhibition of myeloperoxidase-catalyzed tyrosylation by phenolic antioxidants in vitro, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 67 (2003) 1136-1139.
82. Kesavan, R., Potunuru, U.R., Nastasijević, B., Avaneesh, T., Joksić, G., Dixit, M., Inhibition of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation by *Gentiana lutea* Root Extracts, *PLoS ONE*, 8 (2013) e61393.
83. Khadem, S., Marles, R.J., Monocyclic Phenolic Acids, Hydroxy-and Polyhydroxybenzoic Acids: Occurrence and Recent Bioactivity Studies, *Molecules*, 15 (2010) 7985-8005.
84. Kim, K.S., Cho, C.H., Park, E.K., Jung, M-H., Yoon, K-S., Park, H.K., AFM-Detected Apoptotic Changes in Morphology and Biophysical Property Caused by Paclitaxel in Ishikawa and HeLa Cells, *PLoS ONE* 7 (2012) e30066.
85. Klebanoff, J.S, Myeloperoxidase: friend and foe, *J Leukoc Biol.*, 77 (2005) 598-625.
86. Klebanoff, S.J., Kettle, A.J., Rosen, H., Winterbourn, C.C., Nauseef, W.M., Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms, *J Leukoc Biol.*, 93 (2013) 185-198.
87. Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Lević, J., Tanackov, I., Tuco, D., Antifungal activities of basil (*Ocimum basilicum* L.) extract on *Fusarium* species, *Afr J Biotechnol.*, 10 (2011) 10188-10195.
88. Kondo, Y., Takano, F., Hojo, H., Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicroside in mice, *Planta med.*, 60 (1994) 414-416.

89. Krstić, D.Z., Čolović, M.B., Krinulović, K.S., Djurić, D.M., Vasić, V.M., Inhibition of AChE by single and simultaneous exposure to malathion and its degradation products, *Gen Physiol Biophys.*, 26 (2007) 247-253.
90. Krstić, D., Krinulović K., Spasojević Tišma V., Joksić G., Momić T., Vasić V., Effects of digoxin and gitoxin on the enzymatic activity and kinetic parameters of Na⁺/K⁺-ATPase, *J Enzyme Inhib Med Ch.*, 19 (2004) 409-415.
91. Krysko, D.V., Vanden Berghe, T., D'Herde, K., Vandenabeele, P., Apoptosis and necrosis: Detection, discrimination and phagocytosis, *Methods*, 44 (2008) 205-221.
92. Kumar, S., Pandez, A.K., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview, *The Scientific World journal*, 2013 (2013) Article ID 162750.
93. Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P.J., Jaspars, M., Sarker, S.D., Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaureum erythraea*, *Phytomedicine*, 10 (2003) 344-347.
94. Küpeli, E., Asian, M., Gurbuz, I., Yesilada, E., Evaluation of in vivo Biological Activity Profile of Isoorientin, *Z. Naturforsch. C*, 59 (2004) 787-790.
95. Leskovac, A., Joksić, G., Janković, T., Savikin, K., Menković, N., Radioprotective Properties of the Phytochemically Characterized Extracts of *Crataegus monogyna*, *Cornus mas* and *Gentianella austriaca* on Human Lymphocytes in vitro, *Planta Med.*, 73 (2007) 1169-1175.
96. Lević, J., Stanković, S., Bočarov-Stančić, A., Škrinjar, M., Mašić, Z. (2004) The Overview on Toxigenic Fungi and Mycotoxins in Serbia and Montenegro, in: Logrieco A, Visconti A (Eds.), *An Overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, pp 201-218.
97. Lin, M.C., Chen, C.S., Chen, C.T., Liang, Y.C., Lin, J.K., Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase, *Biochem Biophys Res Commun.*, 294 (2002) 167-172.
98. Lin, C.M., Huang, S.T., Liang, Y.C., Lin, M.S., Shih, C.M., Chang, Y.C., Chen, T.Y., Chen, C.T., Isovitexin suppresses lipopolysaccharide-mediated inducible nitric oxide synthase through inhibition of NF-kappa B in mouse macrophages, *Planta Med.*, 71 (2005) 748-753.

99. Liu, S.B., Ma, L., Guo, H.J., Feng, B., Guo, Y.Y., Li, X.Q., Sun, W.J., Zheng, L.H., Zhao, M.G., Gentiopicroside Attenuates Morphine Rewarding Effect through Downregulation of GluN2B Receptors in Nucleus Accumbens, *CNS Neurosci Ther.*, 18 (2012) 652-658.
100. Liu, S.B., Zhao, R., Li, X. S., Guo, H.J., Thian, Z., Zhang, N., Gao, G.D., Zhao, M.G., Attenuation of Reserpine Induced Pain/Depression Dyad by Gentiopicroside Through Downregulation of GluN2B Receptors in the Amygdala of Mice, *Neuromolecular Med.*, 16 (2014) 350-359.
101. Mahendran, G., Thamotharan, G., Sengottuvelu, S., Bai, V.N., Evaluation of Anticonvulsant, Sedative, Anxiolytic, and Phytochemical Profile of the Methanol Extract from the Aerial Parts of *Swertia corymbosa* (Griseb.) Wight ex C.B. Clarke, *BioMed Res Int.*, 2014 (2014) Article ID 542385.
102. Maliszewski, C.R., Delespesse, G.J., Schoenborn, M.A., Armitage, R.J., Fanslow W.C., Nakajima, T., Baker, E., Sutherland, G.R., Poindexter, K., Birks, C., The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization, *J Immunol.*, 153 (1994) 3574-3583.
103. Malle, E., Furtmüller, P.G., Sattler, W., Obinger, C., Myeloperoxidase: a target for new drug development? *Br J Pharmacol.*, 152 (2007) 838-854.
104. Markwell, M.A.K., Haas, S.M., Bieber, L.L., Tolbert, N.E., A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples, *Anal Biochem.*, 87 (1978) 206-210.
105. Mehani, M., Salhi, N., Valeria, T., Ladjel, S., Antifungal effect of essential oil of eucalyptus camaldulensis plant on *Fusarium graminearum* and *Fusarium sporotrichioides*, *Int J Curr Res.*, 6 (2014) 10795-10797.
106. Meier, B., Meier-Liebi M., (1993) *Gentiana*, in: Hansel, R, Keller, K., Rimpler, H, Scheider, G., (eds.) *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, 5th ed, Volume 5: Droge E-O. Springer-Verlag, Berlin, pp 227-247.
107. Menković, N., (1997) Fitohemijsko ispitivanje in vitro kultura vrsta *Gentiana lutea* L i *Gentiana punctata* L., doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu.
108. Menković, N., Savikin-Fodulović, K., Cebedzik, R., Investigation of the activity of *Gentiana lutea* extracts against *Mycobacterium bovis*, *Pharm Pharmacol Lett.*, 9 (1999) 74-75.

109. Menković, N., Juranić, Z., Stanojković, T., Raonić-Stevanović, T., Šavikin, K., Zdunić, G., Borojević, N., Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin, *Phytother Res.*, 24 (2010) 1693-1696.
110. Menković, N., Savikin-Fodulović, K., Savin, K., Chemical Composition and Seasonal Variations in the Amount of Secondary Compounds in *Gentiana lutea* Leaves and Flowers, *Planta Med.*, 66 (2000) 178-180.
111. Mhady, G.B., Pendland, S.L., Stoia, A., Hamill, F.A., Fabricant, D., Dietz, B.M., Chadwick, L.R., *In Vitro* Susceptibility of *Helicobacter pylori* to Botanical Extracts used Traditionally for the Treatment of Gastrointestinal Disorders, *Phytother Res.*, 19 (2005) 988–991.
112. Mihailović, V., Vuković, N., Nićiforović, N., Solujić, S., Mladenović, M., Mašković, P., Stanković, M.S., Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L, *J Med Plants Res.*, 5 (2011) 1164-1174.
113. Miroddi, M., Calapai, G., Navarra, M., Minciullo, P.L., Gangemi, S., *Passiflora incarnata* L.: ethnopharmacology, clinical application, safety and evaluation of clinical trials, *J Ethnopharmacol.*, 150 (2013) 791-804.
114. Mohammadpour, M., Sadeghi, A., Fassihi, A., Saghaei, L., Movahedian, A., Rostami, M., Synthesis and antioxidant evaluation of some novel ortho-hydroxypyridine-4-one iron chelators, *Res Pharm Sci.*, 7 (2012) 171-179.
115. Momić, T., Vujčić, Z., Vasić, V., Kinetics of inhibition of peroxidase activity of MPO by quercetin, *Int J Chem Kinet.*, 40 (2008) 384-394.
116. Morimoto, I., Nozaka, T., Watanabe, F., Ishino, M., Hirose, Y., Okitsu, T., Mutagenic activities of gentisin and isogentisin from *Gentiana radix* (Gentianaceae), *Mutat Res.*, 116 (1983) 103-117.
117. Muller, C., Iqbal, J., Baqi, Y., Zimmermann, H., Rollich, A., Stephan, H., Polyoxometalates-a new class of potent ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase) inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett.*, 16 (2006) 5943-5947.
118. Mustafa, A.M., Caprioli, G., Ricciutelli, M., Maggi, F., Marin, R., Vittori, S., Sagratini, G., Comparative HPLC/ESI-MS and HPLC/DAD study of different

- populations of cultivated, wild and commercial *Gentiana lutea* L, Food Chem., 174 (2015) 426–433.
119. Nastasijević, B., Lazarević-Pasti, T., Dimitrijević-Branković, S., Pasti, I., Vujačić, A., Joksić, G., Vasić, V., Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts, J Pharmaceut Biomed Anal., 66 (2012) 191-196.
 120. Nastasijević, B., Milosević, M., Janjić, G., Stanić, V., Vasić, V., *Gentiana lutea* Extracts and their Constituents as Inhibitors of Synaptosomal Ecto-NTPDase, Int J Pharm., 12 (2016) 272-289.
 121. Nedeljković, N., Nikezić, G., Horvat, A., Peković, S., Stojiljković, M., Martinović, J.V., Properties of Mg²⁺-ATPase rat brain synaptic plasma membranes, Gen Physiol Biophys., 17 (1998) 3-13.
 122. Nicholls, S.J., Hazen, S.L., Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease, Arterioscler Thromb Vasc Biol., 25 (2005) 1102-1111.
 123. Nino, J., Hernandez, J.A., Correa, Y.M., Mosquera, O.M., In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora, Mem Inst Oswaldo Cruz., 101 (2006) 783-785.
 124. Odajima, T., Yamazaki, I., Myeloperoxidase of the leukocyte of normal blood. I. Reaction of myeloperoxidase with hydrogen peroxide., Biochim Biophys Acta, 206 (1970) 71-77.
 125. Ogata, M., Matsukawa, K., Kogusuri, K., Yamashita, T., Hikage, T., Ito, K., Saitoh, Y., Tsutsumi, K.I., Gentian extract induces caspase-independent and mitochondria-modulated cell death, Adv Biol Chem., 1 (2011) 49-57.
 126. O’Keefe, M.G., Thorne, P.R., Housley, G.D., Robson, S.C., Vlajkovic, S.M., Distribution of NTPDase5 and NTPDase6 and the regulation of P2Y receptor signalling in the rat cochlea, Purinergic Signal., 6 (2010) 249–261.
 127. Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B., Effects of Light, Oxygen, and pH on The Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl, J Food Sci., 68 (2003) 487-490.
 128. Öztürk, N., Herekman-Demir, T., Öztürk, Y., Bozan, B., Başer, K.H.C., Choleric activity of *Gentiana lutea* ssp. *symphyandra* in rats, Phytomedicine, 5 (1998) 283-288.
 129. Pace, C.N., Fu, H., Lee, Fryar, K., Landua, J., Trevino, S.R., Schell, D., Thurlkill, R.L., Imura, S., Scholtz, J.M., Gajiwala, K., Sevcik, J., Urbanikova, L., Myers,

- J.K., Takano, K., Hebert, E.J., Shirley, B.A., Grimsley, G.R., Contribution of hydrogen bonds to protein stability, *Protein Sci.*, 23 (2014) 652-661.
130. Pal, D., Sur, S., Mandal, S., Das, A., Roy, A., Das, S., Panda, C.K., Prevention of liver carcinogenesis by amarogentin through modulation of G1/S cell cycle check point and induction of apoptosis, *Carcinogenesis*, 33 (2012) 2424-2431.
131. Partap, S., Pandey, S., A Review on Herbal Antioxidants, *J Pharmacognosy Phytochem.*, 1 (2012) 26-37.
132. Pasiás, N.I., Farmaki, G.E., Thomaidis, N.S., Piperaki, E.A., Elemental Content and Total Antioxidative activity of *Salvia Fruticosa*, *Food Anal Methods*, 3 (2010) 195-204.
133. Petrović, S., Leskovac, A., Joksić, G., Radioprotective properties of *Gentiana dinarica* polyphenols on human lymphocytes in vitro, *Curr Sci.*, 95 (2008) 1035-1041.
134. Pinto, M.M., Sousa, M.E., Nascimento, M.S., Xanthone derivatives: New insights in biological activities, *Curr Med Chem.*, 12 (2005) 2517-2538.
135. Pitt, I.J., Hocking, D.A. (1997) *Fungi and food spoilage*, Second Edition, Blackie Academic and Professional, University Press, Cambridge, pp 411-415.
136. Prantner, D., Perkins, D.J., Lai, W., Williams, M.S., Sharma, S., Fitzgerald, K.A., Vogel, S.N., 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic Acid (DMXAA) Activates Stimulator of Interferon Gene (STING)-dependent Innate Immune Pathways and Is Regulated by Mitochondrial Membrane Potential, *J Biol Chem.*, 287 (2012) 39776-39788.
137. Radanović, D., Marković, T., Aiello, N., Fusani, P., Cultivation trials on *Gentiana lutea L.* in Southern and South-eastern Europe, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 1 (2014) 113-122.
138. Rajtar, G., Zolkovska D., Kleinrok, Z., Marona, H., Antiplatelets activity of some xanthone derivatives, *Acta Pol. Pharm.*, 56 (1999) 319-324.
139. Rashida, M., Iqbal, J., Therapeutic Potential of Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase, Ecto-Nucleotide Pyrophosphatase/phosphodiesterase, Ecto-5'-Nucleotidase, and Alkaline Phosphatase Inhibitors, *Med Res Rev.*, 34 (2013) 703-743.
140. Rates, S.M.K., Plants as source of drugs, *Toxicon*, 39 (2011) 603-613.

141. Ray, S., Majumder, H.K., Chakravarty, A.K., Mukhopadhyay, S., Gil, R.R., Cordell, G.A., Amarogentin, a naturally occurring secoiridoid glycoside and a newly recognized inhibitor of topoisomerase I from *Leishmania donovani*, *J Nat Prod.*, 59 (1996) 27-29.
142. Ricna, D., Lengerova, M., Palackova, M., Hadrabova, M., Kocmanova, I., Weinbergerova, B., Pavlovsky, Z., Volfova, P., Bouchnerova, J., Mayer, J., Racil, Z., Disseminated fusariosis by *Fusarium proliferatum* in a patient with aplastic anaemia receiving primary posaconazole prophylaxis – case report and review of the literature, *Mycoses*, 59 (2016) 48–55.
143. Rico, E.P., Rosemberg, D.B., Senger, M.R., Arizi Mde, B., Bernardi, G.F., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Methanol alters ecto-nucleotidases and acetylcholinesterase in Zebrafish brain, *Neurotoxicol Teratol.*, 28 (2006) 489-496.
144. Roszek, K., Czarnecka, J., Is ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase)-based therapy of central nervous system disorders possible? *Mini Rev Med Chem.*, 15 (2015) 5-20.
145. Savikin, K., Menković, N., Zdunić, G., Stević, T., Radanović, D., Janković, T., Antimicrobial activity of *Gentiana lutea* L. extracts, *Z Naturforsch C*, 64 (2009) 339-342.
146. Schmieder, A., Schwaiger, S., Csordas, A., Backovic, A., Messner, B., Wick, G., Stuppner, H., Bernhard, D., Isogentisin-A novel compound for the prevention of smoking-caused endothelial injury, *Atherosclerosis*, 194 (2007) 317-325.
147. Senol, F.S., Tuzun, C.Y., Toker, G., Orhan, I. E., An *in vitro* perspective to cholinesterase inhibitory and antioxidant activity of five *Gentiana* species and *Gentianella caucasea*, *Int J Food Sci Nutr.*, 63 (2012) 802-812.
148. Shu, Y.Z., Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective, *Journal of Natural Products*, 61 (1998) 1053-1071.
149. Shukla, S., Bafna, K., Sundar, D., Thorat, S.S., The Bitter Barricading of Prostaglandin Biosynthesis Pathway: Understanding the Molecular Mechanism of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibition by Amarogentin, a Secoiridoid Glycoside from *Swertia chirayita*, *PLoS ONE*, 9 (2014) e90637.

150. Singleton, V.L., Rossi, J.A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am J Enol Viticult.*, 16 (1965) 144–158.
151. Sperlagh, B., Csolle, C., Ando, R.D., Goloncser, F., Kittel, A., Baranyi, M., The role of purinergic signaling in depressive disorders, *Neuropsychopharmacol Hung.*, 14 (2012) 231-237.
152. Stanić, V., Radosavljević-Mihajlović, A.S., Živković-Radovanović, V., Nastasijević, B., Marinović-Cincović, M., Marković, J.P., Budimir, M.D., Synthesis, structural characterisation and antibacterial activity of Ag⁺-doped fluorapatite nanomaterials prepared by neutralization method, *Appl Surf Sci.*, 337 (2015) 72-80.
153. Stepien L., Koczyk, G., Waskiewicz, A., Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species, *J Appl Genetics*, 52 (2011) 487–496.
154. Stevanović, V., Jakovljević, K., Distribution, Ecology, and Some Taxonomical Notes of the Genera *Gentiana* (L) and *Gentianella* Moench (Gentianaceae) in the Balcans, in: Rybczyński, J.J., Davey, M.R., Mikula, A (Eds.) *The Gentianaceae - Volume 1: Characterization and Ecology* (2014) Springer-Verlag, Berlin, Heildeberg, pp 169-173.
155. Stević, T., Stanković, S., Šavikin, K., Gođevac, D., Dimkić, I., Soković, M., Berić, T., Chemical composition and inhibitory activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant, *Lek. Sirov.*, 34 (2014) 69-80.
156. Stierna P., Popp M., Ismail C., Use of *Gentiana lutea* extracts as an antimicrobial agent (2005) WO 2005025585 A1.
157. Struwe, L., Classification and Evolution of the Family of Gentianaceae, in: Rybczyński, J.J., Davey, M.R., Mikula, A (Eds.) *The Gentianaceae - Volume 1: Characterization and Ecology* (2014) Springer-Verlag, Berlin, Heildeberg, pp 13-22.
158. Struwe, L., Kadereit, J.W., Klackenberg, J. Nilsson, S., Thiv, M., Von Hagen, K.B., Albert, V.A., Systematics, character evolution, and biogeography of Gentianaceae, including a new and subtribal classification, in: Struwe, L., and

- Albert, V (Eds.) *Gentianaceae-Systematic and Natural History* (2002) Cambridge University Press, Cambridge, pp 21.
159. Suárez-Jiménez, G.M., Cortez-Rocha, M.O., Rosas-Burgos, E.C., Burgos-Hernández, A., Plascencia-Jatomea, M., Cinco-Moroyoqui, F.J., Antifungal Activity of Plant Methanolic Extracts Against *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. and Fumonisin B1 Production, *Rev Mex Fitopatol.*, 25 (2007) 134-142.
 160. Sun, H., Li, L., Zhang, A., Zhang, N., Lv, H., Sun, W., Wang, X., Protective effects of sweroside on human MG-63 cells and rat osteoblasts, *Fitoterapia*, 84 (2013) 174-179.
 161. Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R., Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures, *Mutat Res.*, 341 (1995) 169-184.
 162. Sussman, J.L., Silman, I., Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions, *Curr Opin Struct Biol.*, 2 (1992) 721-729.
 163. Suzuki, O., Katsumata, Y., Oya, M., Chari, V.M., Klapfenberger, R., Wagner, H., Hostettmann, K., Inhibition of type A and type B monoamine oxidase by isogentisin and its 3-o-glucoside, *Planta Med.*, 39 (1980) 19–23.
 164. Tančić, S., Stanković, S., Lević, J., Varijabilnost patogenih svojstava *Fusarium* spp. poreklom iz zrna kukuruza i pšenice, *Pestic. fitomed.*, 24 (2009) 259-269.
 165. Thembo, K.M., Vismer, H.F., Nyazema, N.Z., Gelderblom, W.C.A., Katerere, D.R., Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi, *Journal of Applied Microbiology*, 109 (2010) 1479-1486.
 166. Thrane, U. (2001) Developments in the taxonomy of *Fusarium* species based on secondary metabolites, in: Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L.W. (Eds.), *Fusarium – Paul E. Nelson Memorial Symposium*, APS Press, St. Paul, Minnesota, pp 29–49.
 167. Toriumi, Y., Kakuda, R., Kikuchi, M., Yaoita, Y., Kikuchi, M., New triterpenoids from *Gentiana lutea*, *Chem Pharm Bull.*, 51 (2003) 89-91.
 168. Trott, O., Olson, A.J., AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *J Comput Chem.*, 31 (2010) 455-461.

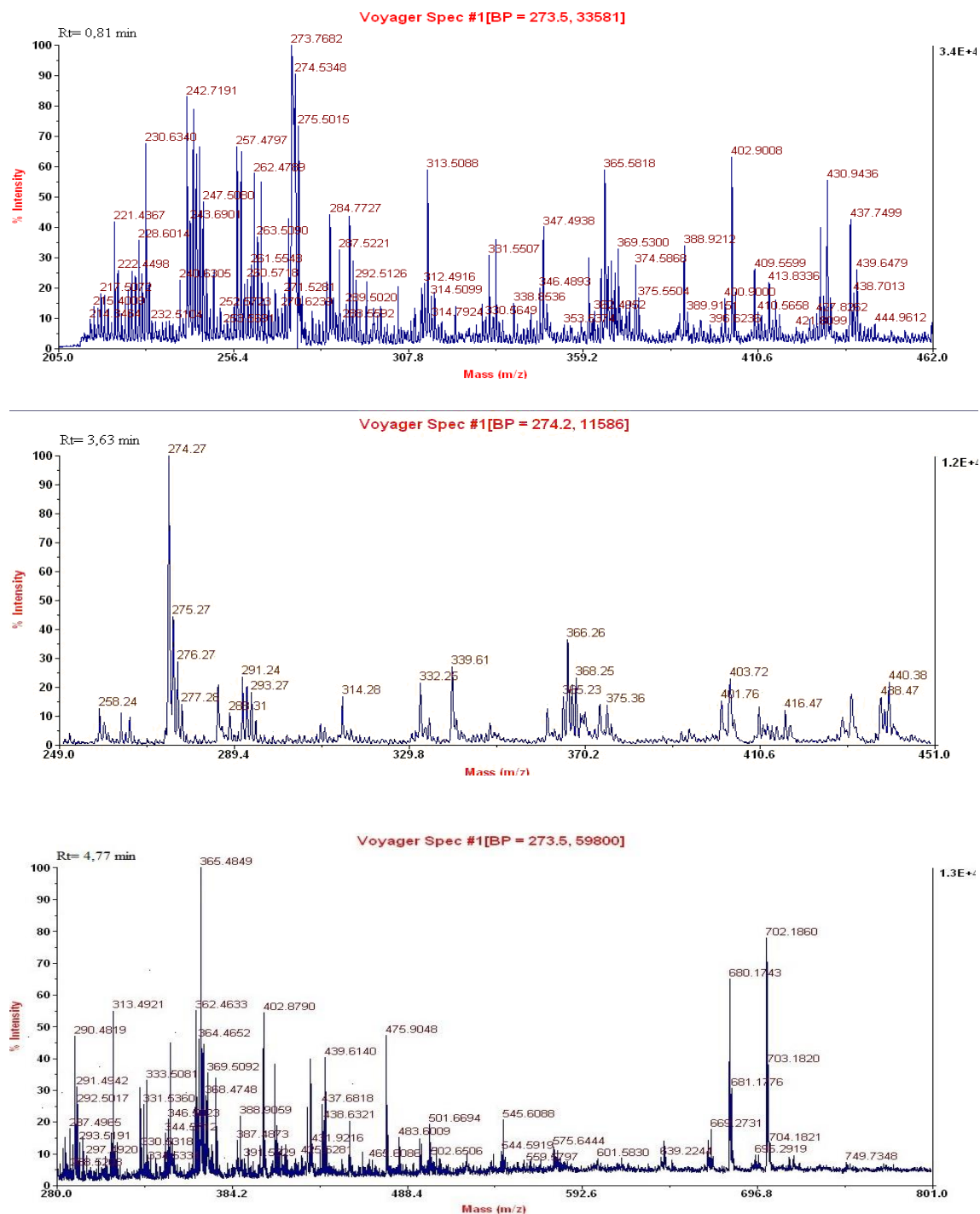
169. Trujillo, K.A., Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioral plasticity? A review of preclinical studies, *Psychopharmacology (Berl)*, 151 (2000) 121–141.
170. Turkmen, N., Sari, F., Velioglu, Y.S., Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods, *Food Chem.*, 99 (2006) 835-841.
171. Urbain, A. Marston, A., Queiroz, E.F., Ndjoko, K., Hostettmann, K., Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors, *Planta Med.*, 70 (2004) 1011–1014.
172. Vaidya, H., Goyal, R.K., Cheema, S.K., Anti-diabetic Activity of Swertiamarin is due to an Active Metabolite, Gentianine, that Upregulates PPAR-g Gene Expression in 3T3-L1 cells, *Phytother Res.*, 27 (2013) 624–627.
173. Vaidya, H.B., Goyal, R.K., Cheema, S.K., Acetylated and propionated derivatives of swertiamarin have anti-adipogenic effects, *J Pharmacol Pharmacother.*, 5 (2014) 232-238.
174. Van de Waterbeemd, H, Gifford, E., ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise, *Nature reviews Drug discovery*, 2 (2003) 192-204.
175. Vasić, V., Jovanović D., Krstić, D., Nikezić, G., Horvat, A., Vujisić, L., Nedeljković, N., Prevention and recovery of CuSO₄-induced inhibition of Na⁺/K⁺-ATPase and Mg²⁺-ATPase in rat brain synaptosomes by EDTA, *Toxicol Lett.*, 110 (1999) 95–104.
176. Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A.J., Egado, J., Marin, S., Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain, *Int J Food Microbiol.*, 89 (2003) 145–154.
177. Vieira, T.O., Seifriz, I, Charao, C.C.T., Oliveira, S.Q., Creczynski-Pasa, T.B., Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger, *Rev bras farmacogn.*, 21 (2011) 601-607.
178. Vorhoff, T., Zimmermann, H., Pelletier, J., Sévigny, J., Braun, N., Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: Predicted

- secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin, *Purinergic Signal.*, 1 (2005) 259–270.
179. Waltenberger, B., Liu, R., Atanasov, A., Schwaiger, S., Heiss, E., Dirsch, V., Stuppner, H., Nonprenylated Xanthones from *Gentiana lutea*, *Frasera carolinensis*, and *Centaurium erythraea* as Novel Inhibitors of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, *Molecules*, 20 (2015) 20381-20390.
 180. Wang, Z., Tang, S., Jin, Y., Zhang, Y., Hattori, M., Zhang, H., Zhang, N., Two main metabolites of gentiopicroside detected in rat plasma by LC-TOF-MS following 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization, *J Pharm Biomed Anal.*, 107 (2015) 1-6.
 181. Wei, S., Chi, H., Kodama, H., Chen, G., Anti-inflammatory effect of three iridoids in human neutrophils, *Nat Prod Res.*, 27 (2013) 911-915.
 182. Wegner, T., Anwendung eines Trockenextraktes aus *Gentianae luteae radix* bei dyspeptischem Symptomkomplex, *Z. Phytotherapie*, 19 (1997) 163-164.
 183. Whelan, T.J., Gray, M.J., Slonecker, P.J., Shalliker, R.A., Wilson, M.A., Study of the selectivity of reversed-phase columns for the separation of polycarboxylic acids and polyphenol compounds, *J Chromatogr A*, 1097 (2005) 148-156.
 184. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues (2007) WHO Press, Geneva, Switzerland.
 185. WHO Consultation on Selected Medicinal Plants, *Plants, Medicinal. 2. Angiosperms. 3. Medicine, Traditional I*, (2001) 3rd ed., Ottawa Ont., II WHO.
 186. Wölfle, U., Elsholz, F.A., Kersten, A., Haarhaus, B., Müller, W.E., Schempp, C.M., Expression and Functional Activity of the Bitter Taste Receptors TAS2R1 and TAS2R38 in Human Keratinocytes, *Skin Pharmacol Physiol.*, 28 (2015) 137-146.
 187. Wölfle, U., Haarhaus, B., Schempp, C.M., Amarogentin Displays Immunomodulatory Effects in Human Mast Cells and Keratinocytes, *Mediators Inflamm.*, 2015 (2015) Article ID 630128.
 188. Wu, Y., Lu, H., Cai, J., He, X., Hu, Y., Zhao, H.X., Wang, X., Membrane Surface Nanostructures and Adhesion Property of T Lymphocytes Exploited by AFM, *Nanoscale Res Lett.*, 4 (2009) 942-947.

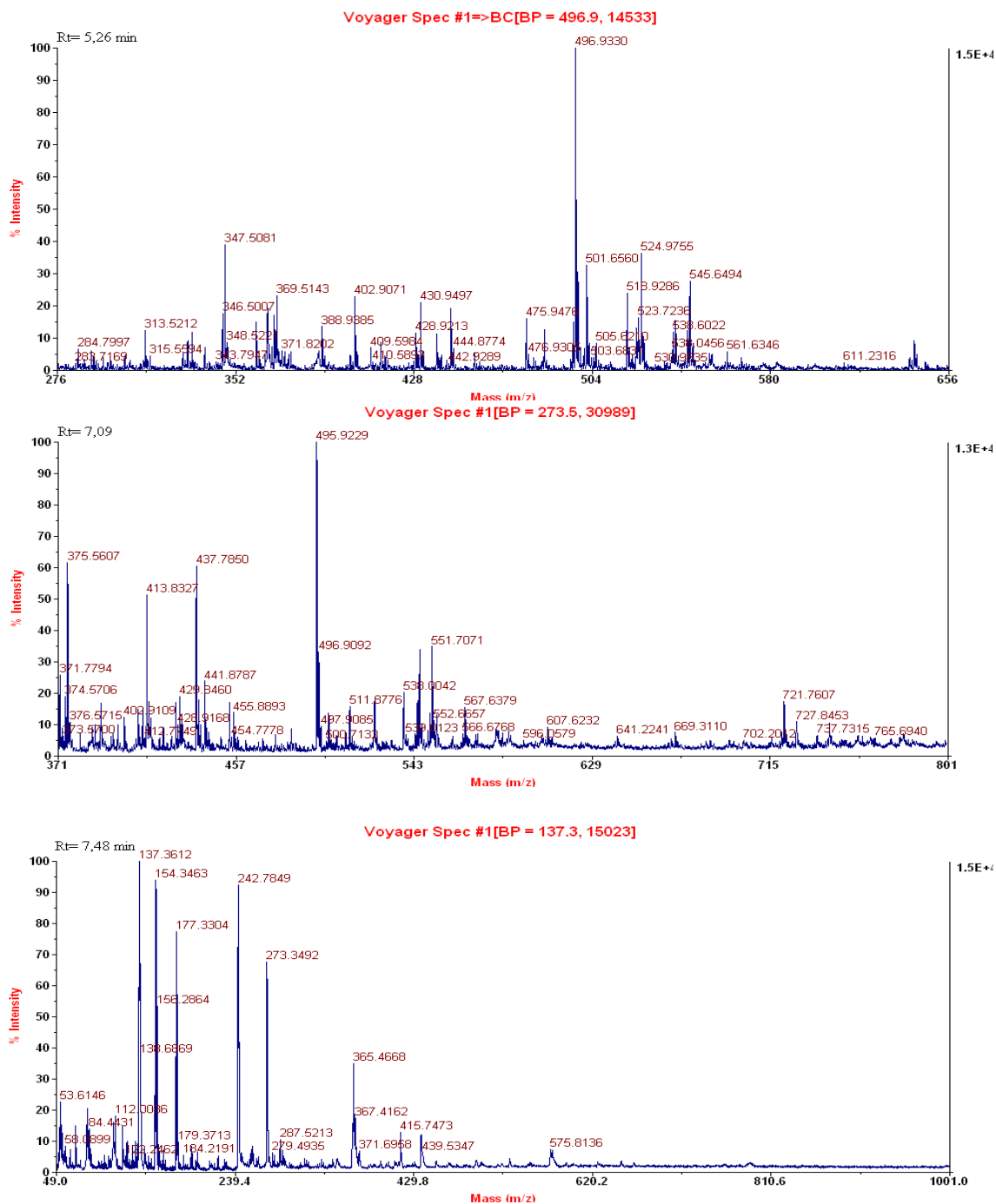
189. Yegutkin, G., Enzymes involved in metabolism of extracellular nucleotides and nucleosides: Functional implications and measurement of activities, *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, 49 (2014) 473-497.
190. Yen, T.L., Lu, W.J., Lien, L. M., Thomas, P.A., Lee, T.Y., Chiu, H.C., Sheu, J.R., Lin, K.H., Amarogentin, a secoiridoid glycoside, abrogates platelet activation through PLC γ 2-PKC and MAPK pathways, *Biomed Res Int.*, 2014 (2014) Article ID 728019.
191. Zebisch, M., Baqi, Y., Schafer, P., Muller, C.E., Strater, N., Crystal structure of NTPDase2 in complex with the sulfoanthraquinone inhibitor PSB-071, *J Struct Biol.*, 185 (2014) 336-341.
192. Zebisch, M., Strater, N., Structural insight into signal conversion and inactivation by NTPDase2 in purinergic signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (2008) 6882–6887.
193. Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., De Feo, V., Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan, *Molecules* 18 (2013) 2005-2017.
194. Zimmermann, H., Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides, *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*, 362 (2000) 299–309.
195. Zimmermann, H., Ectonucleotidases: Some recent developments and a note on nomenclature, *Drug Dev Res.*, 52 (2001) 44–56.
196. Zimmermann, H., Zebisch, M., Strater, N., Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases, *Purinergic Signall.*, 8 (2012) 437-502.

7. PRILOZI

Prilog 1



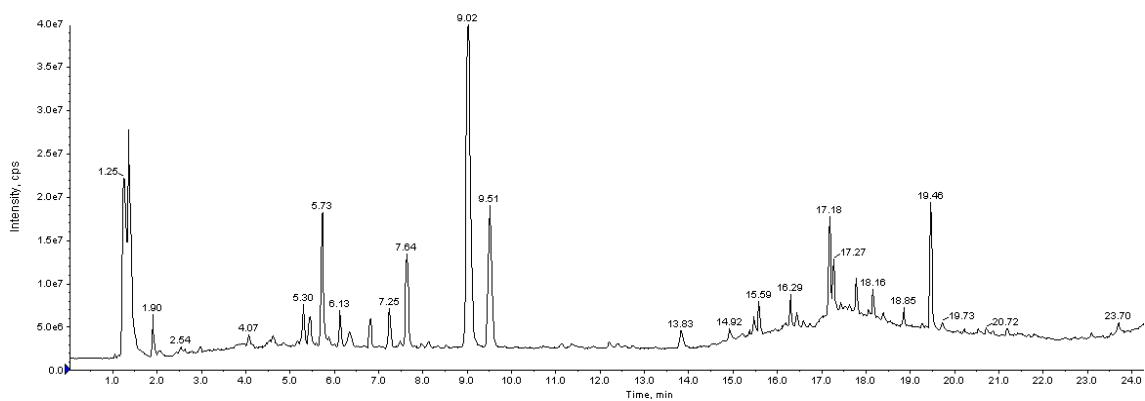
Slika P1. MALDI-TOF spektri frakcija metanolnog ekstrakta lincure, nakon hromatografskog (UPLC-PDA) razdvajanja na RP C18 BEH Acquity koloni na Rt (min) = 0,81; 3,63 i 4,77. Snimljeni u reflektornom pozitivnom modu sa DHB-om.



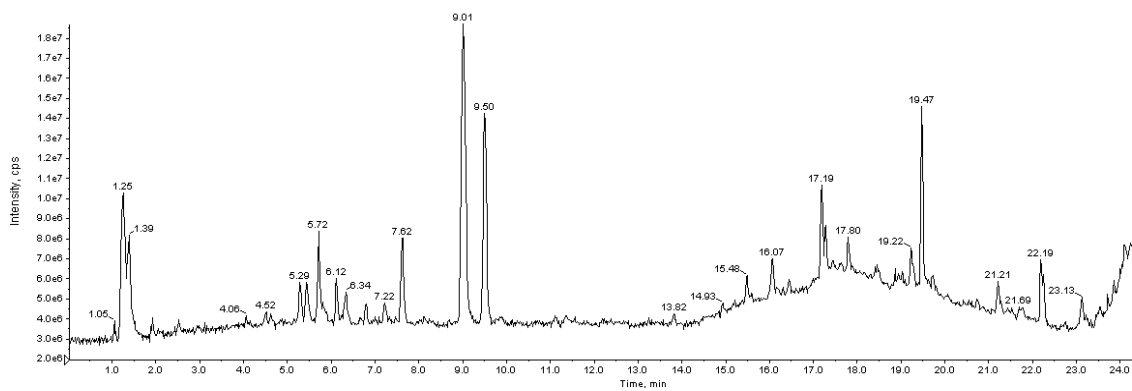
Slika P1A. MALDI-TOF spektri frakcija metanalnog ekstrakta lincure, nakon hromatografskog (UPLC-PDA) razdvajanja na RP C18 BEH Acuity koloni na Rt (min) = 5,26; 7,09 i 7,48. Snimljeni u reflektornom pozitivnom modu sa DHB-om.

Prilog 2

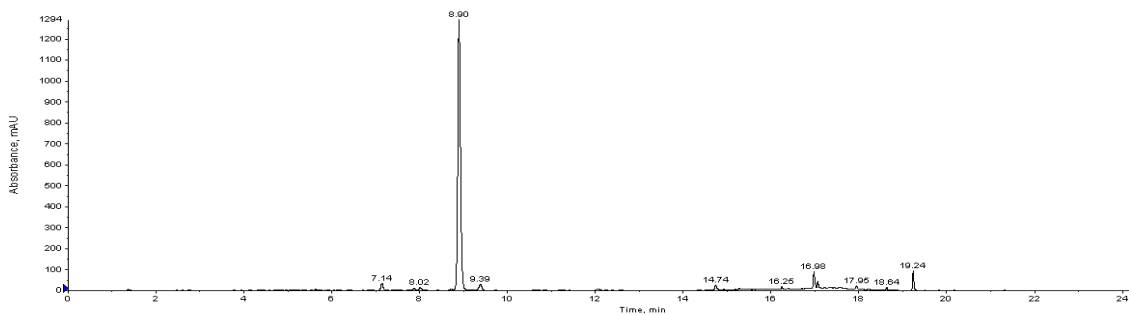
A



B



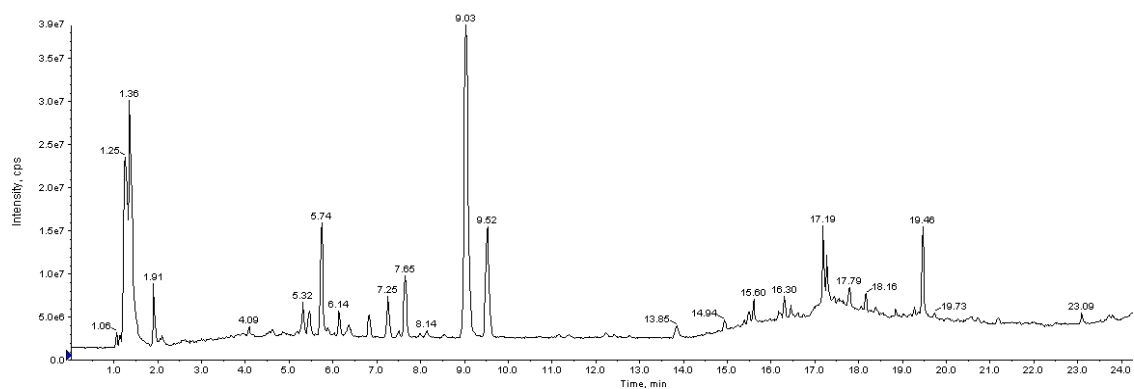
C



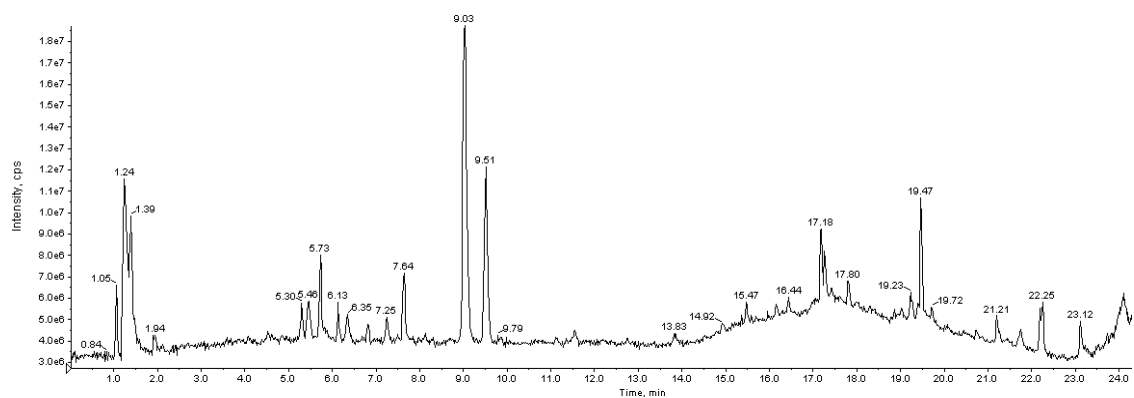
Slika P2. Hromatogrami 96% ekstrakta korena lincure (A) LC-ESI-TOF, negativni mod; (B) LC-ESI-TOF, pozitivni mod; (C) LC-PDA (275 nm).

Prilog 3

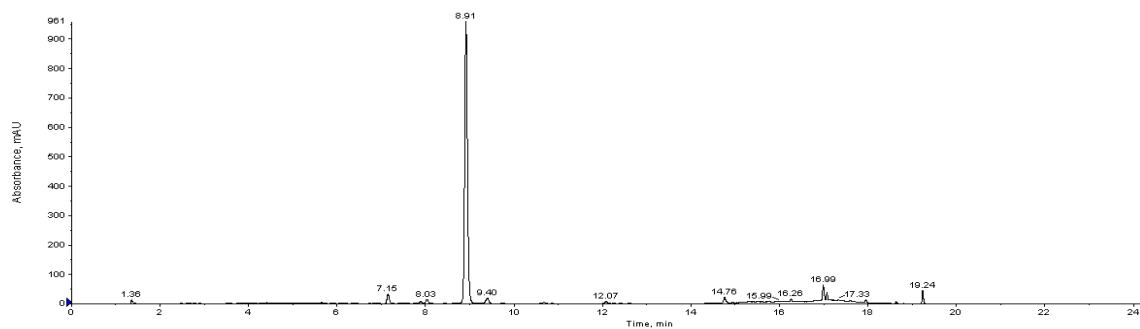
A



B



C



Slika P3. Hromatogrami metanolnog ekstrakta korena lincure (A) LC-ESI-TOF, negativni mod; (B) LC-ESI-TOF, pozitivni mod; (C) LC-PDA (275 nm).

Prilog 4

Tabela P1 Kvalitativni sastav metanolnog, etanolnog i vodenog ekstrakta korena *G. lutea* određen HPLC/PDA/MS-ESI-TOF

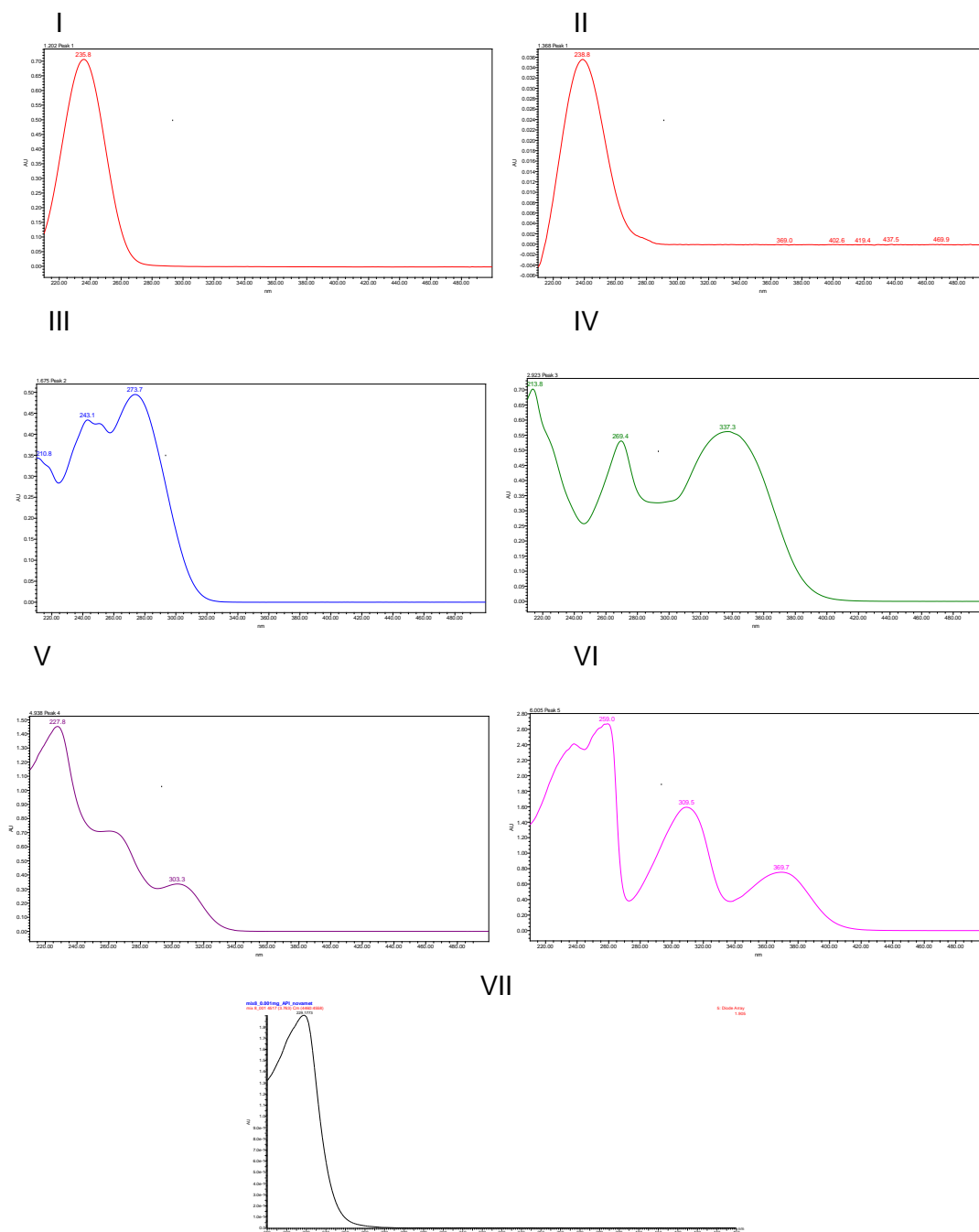
Rt (min)	Molek. formula	Izrač. masa	Mase koje su detektovane i jonska vrsta						Naziv jedinjenja
			[M-H] ⁻ / [M+H] ⁻	[M+Cl] ⁻	[M+HCOO] ⁻	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺		
5.45	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	376,1369	375,1325	411,1088	421,1384	394,1690	399,1249	loganska kiselina	
6.13	C ₁₈ H ₁₈ O ₈	362,1002	362,1562	397,1299	407,1588	-*	-	eustomin	
6.35	C ₁₇ H ₁₆ O ₈	348,0845	-	383,1144	393,1430	366,1739	371,1297;	demetil eustomin	
7.64	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374,1213	373,1221	409,0935	419,1228	-	397,1080	svertimamarin	
8.53	C ₇ H ₆ O ₄	154,0266	153,0198	-	-	-	-	2,3-dihidroksi benzoeva kiselina	
9.02	C ₁₆ H ₂₀ O ₉	356,1107	-	391,0838	401,1133	374,1358	379,0889	genciopikrozid	
9.51	C ₁₆ H ₂₂ O ₉	358,1264	-	393,0991	403,1278	376,1567	381,1132	sverozid	
12.21	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1006	447,0961	483,0738	493,1045	-	471,0881	izoorientin	
14.92	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432,1056	431,1012	467,0778	477,1070	-	455,0942	izoviteksin	

(-) nije detektovano

Tabela P1A Kvalitativni sastav metanolnog, etanolnog i vodenog ekstrakta korena *G. lutea* određen HPLC/PDAMS-ESI-TOF

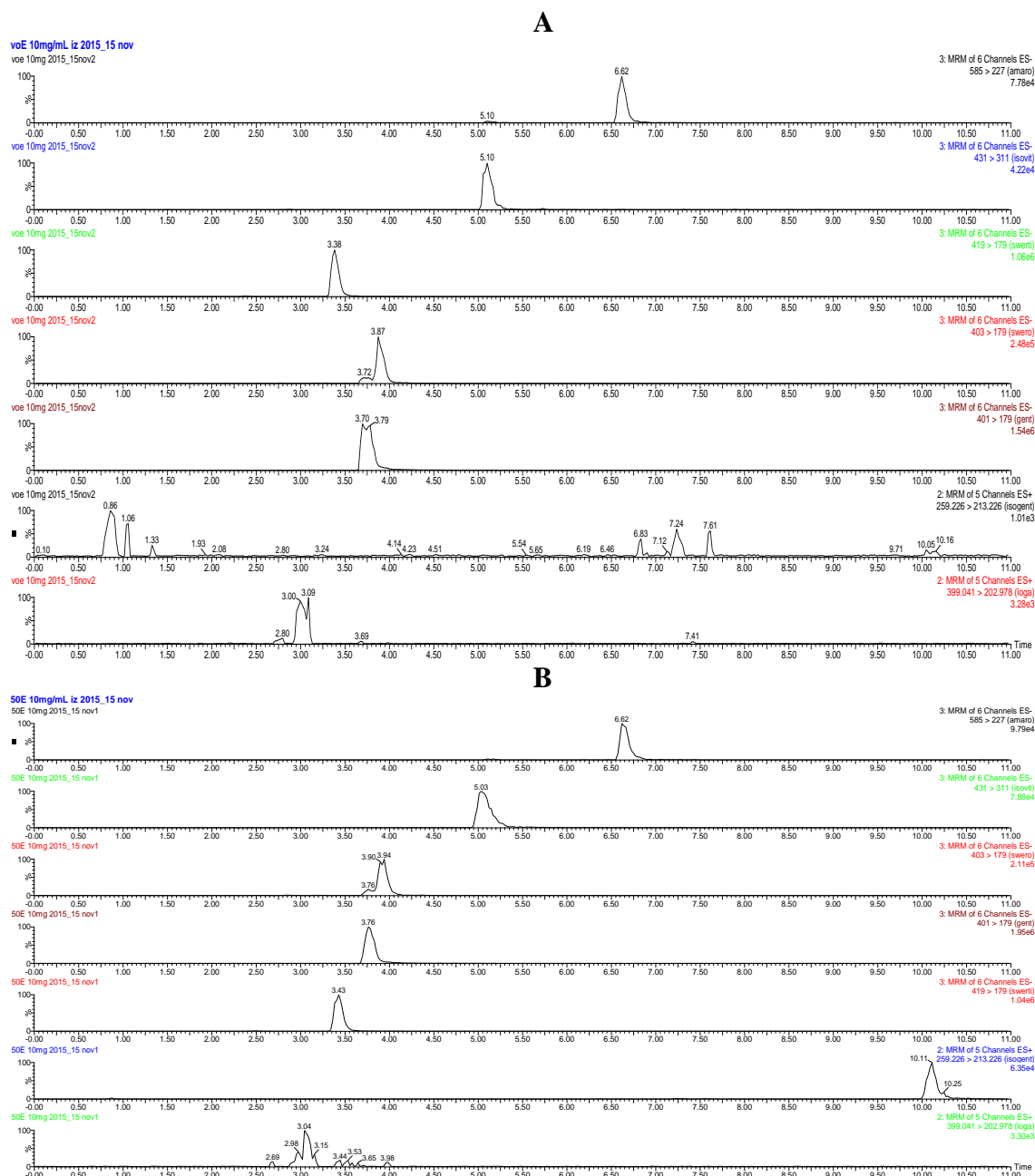
Rt (min)	Molek. formula	Izrač. masa	Mase koje su detektovane i jonska vrsta					Naziv jedinjenja
			[M-H] ⁻ / [M+H] ⁺	[M+Cl] ⁻	[M+HCOO] ⁻	[M+NH ₄] ⁺	[M+Na] ⁺	
16.44	C ₂₃ H ₃₈ O ₁₄	552,1479	551,1438/ 553,1542	587,1205	597,1488	-	575,1359	Gentiozid (gentiozid isomer)
16.60	C ₁₃ H ₁₂ O ₆	288,0634	287,0586/ 289,0691	323,0370	333,0645	-	-	1,3-dihidroksi-2,5- dimetoksikanton; 1,6-dihidroksi-3,5- dimetoksikanton; 1,3-dihidroksi-4,5- dimetoksikanton; metilsvertianin; metilbelidifolin
17.18	C ₂₉ H ₃₀ O ₁₃	586,1686	585,1644/ 587,1752	621,1413	631,1694	-	609,1580	amarogentin
18.16	C ₁₃ H ₁₂ O ₅	272,0685	271,0629 273,0749	307,0393	317,0688	-	-	1-hidroksi-3,5- dimetoksikanton
19.27	C ₁₇ H ₁₆ O ₇	332,2563	331,2514 333,2611	367,2278	377,2546	-	355,2443	1-hidroksi-2,3,4,5- tetrametoksikanton; 1-hidroksi-2,3,4,7- tetrametoksikanton
19.46	C ₁₄ H ₁₀ O ₅	258,0528	257,0476 259,0581	293,0248	303,0537	-	-	Gentizin, izogentizin (mesuaksanton A)

Prilog 5



Slika P4. Spektri konstituenata lincure: (I) loganska kiselina, (II) svertiamarin (III) genciopikrozid, (IV) izoviteksin, (V) amarogentin, (VI) izogentizin, (VII) sverozid. Standardi su rastvoreni u metanolu. Spektri su dobijeni pomoću softvera Empower 2.0.

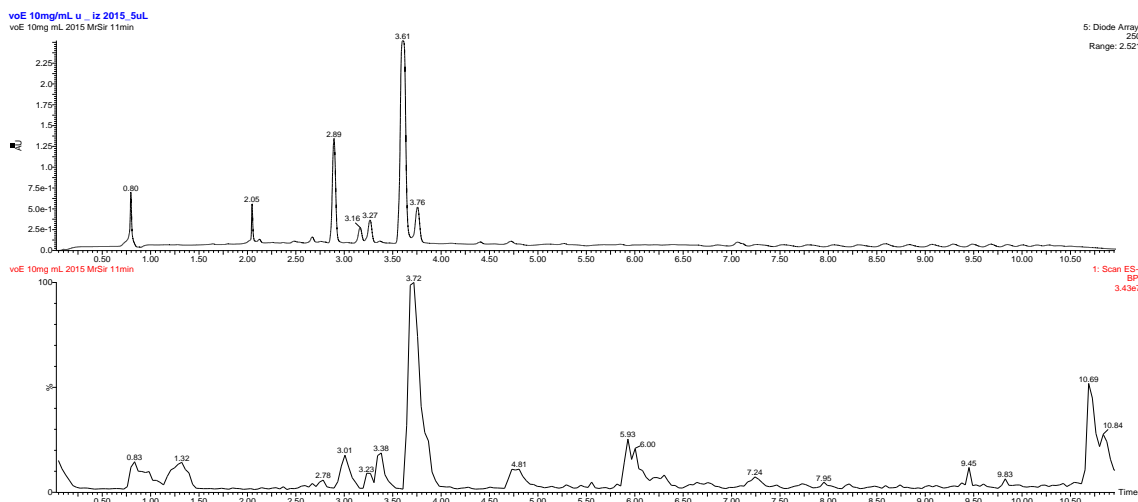
Prilog 6



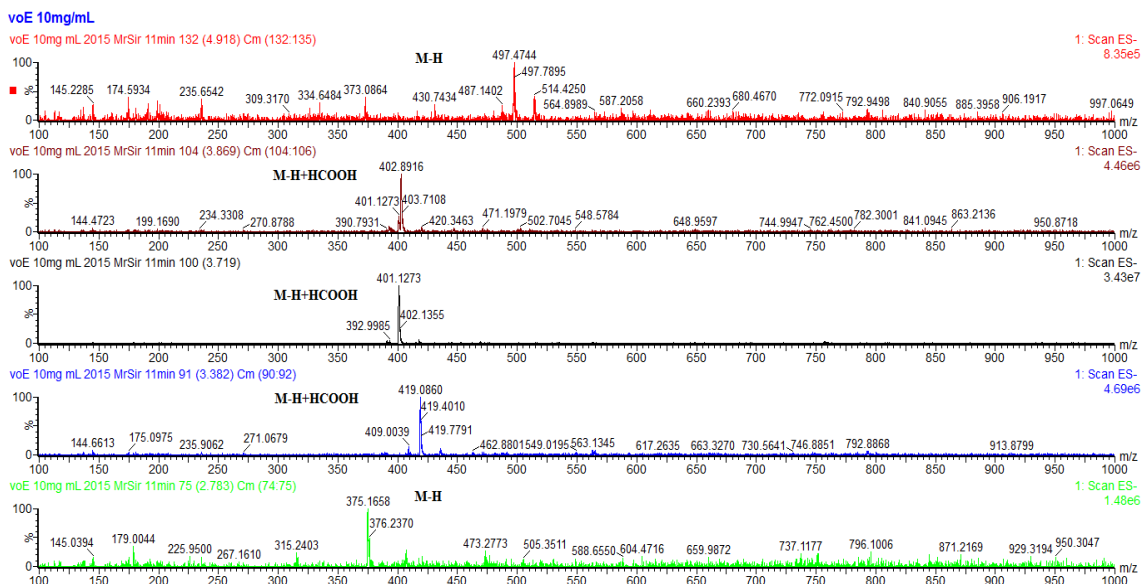
Slika P5. MRM hromatogrami odabranih ekstrakata lincure, dobijeni UPLC-MS/MS/ESI hromatografijom: (A) vodeni i (B) 50% EtOH. Hromatogrami su ekstrahovani iz odgovarajućih TIC hromatograma u ESI pozitivnom i negativnom modu.

Prilog 7

A



B



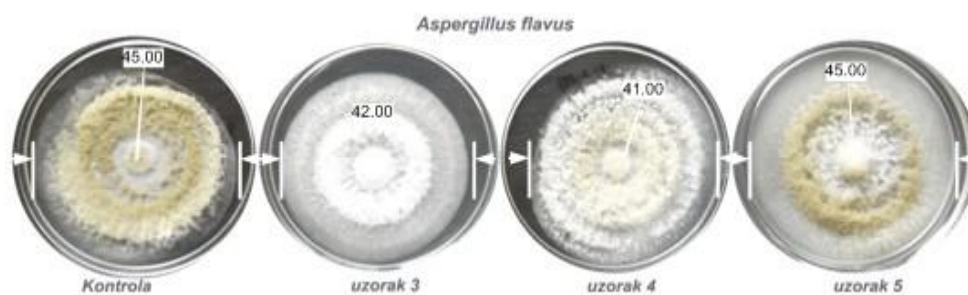
Slika P6. (A) hromatogrami vodenog ekstrakta: ekstrahovan iz 3D hromatograma na 250 nm i UPLC-MS/ESI negativan skenirajući mod; (B) spektri su ekstrahovani na Rt (min): 2,78; 3,38; 3,71; 3,86 i 4,91; odgovaraju loganskoj kiselini, svertiamarinu, genciopikrozidu, sverozidu i izoviteksinu. BEH Acquity kolona i MassLynx 4.0 NT softver.

Prilog 8

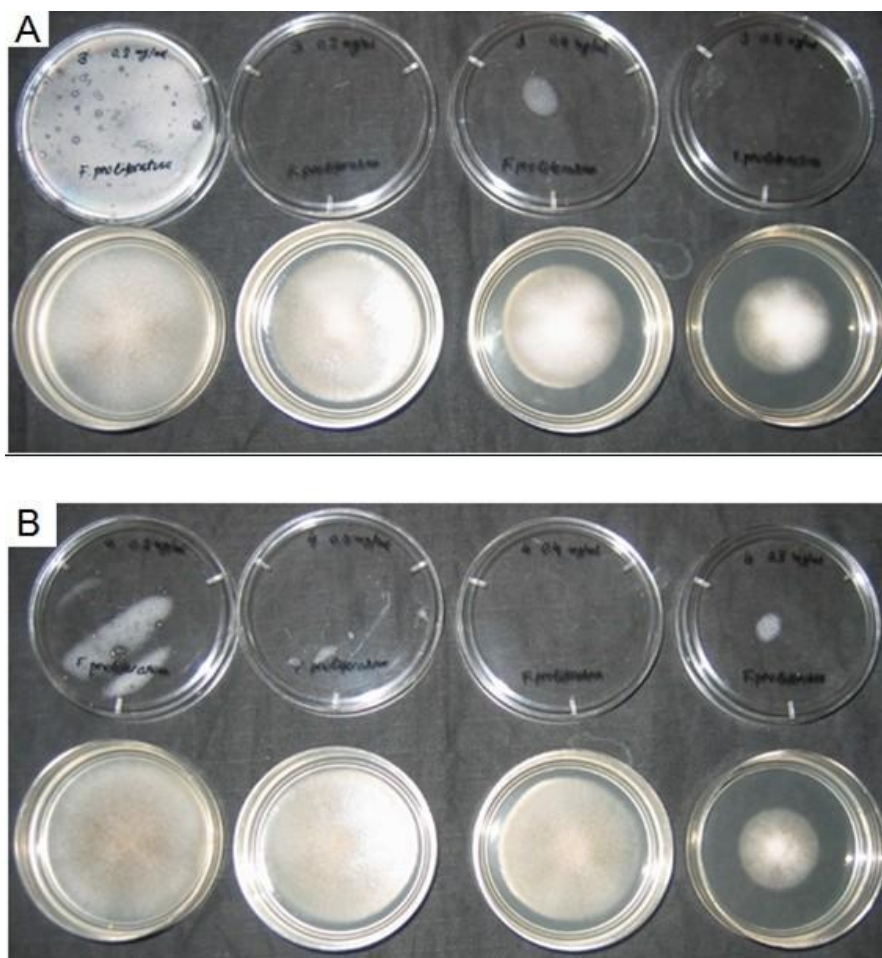
Tabela P2. Jednačine prave korišćene za kvantifikaciju, dobijene analizom konstituenata lincure UPLC-MS/MS/ESI hromatografijom.

Konsituent	Jednačina prave	R ²
loganska kiselina	$y=7328,7x + 123,09$	0,9978
svertiamarin	$y=2 \times 10^6 x + 1400,8$	0,9898
genciopikrozid	$y=1 \times 10^6 x + 1477,5$	0,9911
sverozid	$y=324927x + 379,02$	0,977
izoviteksin	$y=4 \times 10^6 x + 3012,2$	0,9964
amarogentin	$y=3 \times 10^6 x + 2056,8$	0,9942
izogentizin	$y=461458x + 123,09$	0,997

Prilog 9

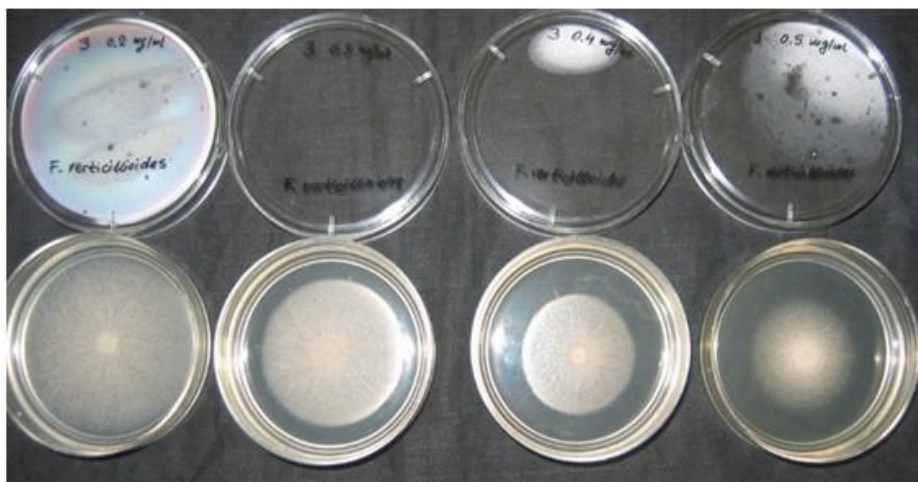


Slika P7. Ispitivanje antifungalne (*Aspergillus flavus*) aktivnosti ekstrakta *G. lutea*: uzorak 3 (50% EtOH ekstrakt), uzorak 4 (96% EtOH ekstrakt), uzorak 5 (25% EtOH ekstrakt).



Slika P8. Inhibicija rasta *F. proliferatum* tretiranog sa: (A) 50% EtOH i (B) 96% EtOH ekstraktom lincure, oba u koncentracionom opsegu od 0,2 do 0,5 mg/mL

Prilog 9 - nastavak



Slika P9. Rast *F. verticillioides* u prisustvu 50% EtOH ekstrakta lincure, u koncentracijama od 0,2 do 0,5 mg/mL.

Biografija

Branislav Nastasijević rođen je 25.05.1972. godine u Beogradu. Diplomirao je na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer biohemija 2000. godine. Magistrirao je na Hemijskom fakultetu u Beogradu, smer biohemija 2009. godine, čime je stekao stručno zvanje magistar biohemijskih nauka.

Od marta 2000. godine do oktobra 2005. angažovan je kao asistent, na Katedri za biohemiju, Hemijskog fakulteta u Beogradu na predmetima: Mikrobiološka hemija sa mikrobiologijom, Osnovi Biotehnologije, Biohemija hrane i ishrane i Biotehnološka i industrijska biohemija. U periodu od oktobra 2005. do decembra 2006. radio je kao istraživač saradnik na Odseku za biohemiju i molekularnu biologiju, klinike Mayo (SAD) na selekciji aptamera specifičnih za proteine mijelinskog omotača, u grupi James L. Mahera. Od jula 2007. do januara 2010. bio je zaposlen u Industriji špirita i kvasca „A.D. Vrenje”, kao rukovodilac hemijske i mikrobiološke laboratorije. Od januara 2010. do sada zaposlen je u Laboratoriji za Fizičku hemiju 050, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, kao istraživač saradnik. U periodu od 2010. do 2014. godine, učestvovao je u realizaciji međunarodnog Fp7 projekata, FUNCFOOD, broj granta 245030. Trenutno je angažovan na projektu Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije, broj 172023, pod nazivom: “Istraživanje interakcija enzima sa toksičnim i farmakološki aktivnim molekulima“.

Branislav Nastasijević je autor i koautor 13 naučnih radova i većeg broja saopštenja, prezentovanih na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu.

Spisak publikacija koje su proistekle iz doktorske disertacije:

1. B. Nastasijević, T. Lazarević-Pašti, S. Dimitrijević-Branković, I. Pašti, A. Vujačić, G. Joksić, V. Vasić, Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66 (2012) 191–196 (IF₂₀₁₁=2,967)
2. B. Nastasijević, M. Milosević, G. Janjić, V. Stanić, V. Vasić, *Gentiana lutea* extracts and their constituents as inhibitors of synaptosomal Ecto-NTPDase, *International Journal of Pharmacology*, 12 (2016) 272-289 (IF₂₀₁₄=0,709).

Spisak publikacija koje uključuju rezultate istraživanja obuhvaćenih doktorskom disertacijom kandidata:

1. C. Akileshwari, P. Muthenna, B. Nastasijević, G. Joksić, J. M. Petrash, G.B. Reddy, Inhibition of aldose reductase by *Gentiana lutea* extracts, *Experimental Diabetes Research* (2012), Article ID 147965, 8: doi:10.1155/2012/147965 (IF₂₀₁₂=1,893).

Saopštenja sa međunarodnih skupova u kojima su predstavljeni rezultati doktorske disertacije:

1. B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, B. Damjanović, T. Kamčeva, G. Joksić, V. Vasić, MALDI-TOF mass spectrometry as a method for the quality control of *Gentiana lutea* extracts, 10th International Conference on Fundamental and Applied Aspects of Physical Chemistry, Sept. 21 (2010) Belgrade, Serbia, C6-P.
2. B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, B. Damjanović, T. Kamčeva, A. Hurajova, V. Vasić, Fingerprint Chromatography As A Method For The Quality Control And Standardization Of Herbal Extracts Of *Gentiana lutea*, 12th Danube-Kris-Mures-Tisa Euroregion Conference on Food, Environment and Health, Novi Sad, Serbia, Sept 14-15 (2010) Book of Abstracts.
3. B. Nastasijević, T. Lazarević Pašti, A. Leskovic, S. Petrović, S. D. Branković, I. Pašti, G. Joksić, V. Vasić, Recent findings about healing properties of *Gentiana lutea* root extracts, 3rd Workshop “Specific Methods on Food Safety and Quality Sept. 27 (2012) Vinca, Belgrade, Serbia, Proceedings OP9.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Бранислав Настасијевић

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ Биолошки ефекти екстраката корена линцуре (*Gentiana lutea*)- инхибиција ензима, антиоксидативна и антимикуробна активност“

- 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, 15.08.2016.

Бранислав Настасијевић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Бранислав Настасијевић _____

Број индекса _____

Студијски програм _хемија и хемијска технологија_____

Наслов рада „ Биолошки ефекти екстраката корена линцуре (*Gentiana lutea*)-
инхибиција ензима, антиоксидативна и антимикробна активност“

Ментор _____ др Сузана Димитријевић-Бранковић и др Весна Васић _____

Потписани/а _____ Бранислав Настасијевић _____

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, 15.08.2016.

Бранислав Настасијевић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биолошки ефекти екстраката корена линцуре (*Gentiana lutea*)- инхибиција ензима, антиоксидативна и антимикробна активност“

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, 15.08.2016.

Вранислав Матићасић

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.