

UNIVERZITET U BEOGRADU
FARMACEUTSKI FAKULTET

Stevan S. Samardžić

**Uporedno hemijsko i farmakološko
ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti
predstavnikaroda *Filipendula* Miller
u Srbiji**

doktorska disertacija

Beograd, 2018

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF PHARMACY

Stevan S. Samardžić

**Comparative chemical and
pharmacological investigation of
lyophilized flower infusions
of the representatives of the
genus *Filipendula* Miller in Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentor

Prof. dr Zoran Maksimović, vanredni profesor, mentor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Članovi komisije

Prof. dr Maja Tomić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Marina Milenković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Prof. dr Jelena Kotur-Stevuljević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet

Dr Jelena Živković, naučni saradnik,
Institut za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Beograd

Datum odbrane _____

Najiskrenije se zahvaljujem mentoru prof. dr Zoranu Maksimoviću na podršci i vođenju tokom perioda osmišljanja eksperimenata, laboratorijskog rada, diskutovanja i tumačenja dobijenih rezultata i pisanja doktorske disertacije. Posebno sam srećan što je nesebično delio svoje ogromno znanje i iskustvo, uvek bio otvoren za nove ideje i podsticao kreativnost.

Prof. dr Maji Tomić, prof. dr Marini Milenković, prof. dr Jeleni Kotur-Stevuljević i dr Jeleni Živković izražavam veliku zahvalnost na saradnji, profesionalnosti, izdvojenom vremenu, diskusijama, vrednim savetima i sugestijama koje su pomogle da se oblikuje finalni tekst ove doktorske disertacije i značajno unapredi njen kvalitet.

Najtoplije se zahvaljujem prof. dr Radici Stepanović-Petrović i asist. mag. farm. Urošu Pecikozi na saradnji prilikom ispitivanja antinociceptivne i antiedematozne aktivnosti, doc. dr Dragani Božić na angažovanju prilikom testiranja gastroprotektivne aktivnosti, prof. dr Veletu Teševiću na velikoj pomoći prilikom određivanja strukture izolovanih jedinjenja, asist. dipl. farm-med. bioh. Milici Miljković na pomoći u laboratorijskom radu prilikom određivanja parametara oksidativnog stresa u serumu, doc. dr Nataši Simin i prof. dr Ivani Beari na dragocenoj pomoći tokom ispitivanja antiinflamatorne aktivnosti, prof. dr Tatjani Stanojković na saradnji tokom testiranja citotoksične aktivnosti i prof. dr Branislavi Lakušić na stručnoj pomoći prilikom mikroskopskog ispitivanja karakteristika praškova, prikupljanja i identifikacije biljnog materijala.

Kolektivu Katedre za farmakognoziju dugujem veliku zahvalnost, posebno prof. dr Nadi Kovačević na ukazanom poverenju, prof. dr Silvani Petrović na pomoći u trenucima kada je pomoć bila najpotrebnija i dr Jeleni Arsenijević na nesebičnoj pomoći, diskusijama i savetima.

Zahvaljujem se porodici i prijateljima na podršci tokom svih prethodnih godina.

Uporedno hemijsko i farmakološko ispitivanje liofilizovanih infuza cvasti predstavnika roda *Filipendula* Miller u Srbiji

Sažetak

Uvod: *Filipendula ulmaria* i *F. vulgaris* se tradicionalno koriste kod peptičkog ulkusa i bolnih stanja.

Cilj: Liofilizovani infuzi cvasti (LIC) ovih vrsta i izolovana jedinjenja *F. vulgaris* su podvrgnuti hemijskim i farmakološkim ispitivanjima u cilju preliminarnе procene terapijskog potencijala i opravdanosti zabeležene etnomedicinske primene.

Metode: Sastav LIC je utvrđen HPLC-UV metodom. Antioksidantna i citotoksična aktivnost je procenjena *in vitro*, antiinflamatorno dejstvo i antiagregacioni potencijal *ex vivo* u humanim trombocitima, dok su antihiperalgezijska, antiedematozna, gastroprotektivna aktivnost i akutna toksičnost ispitani *in vivo*.

Rezultati i diskusija: LIC su se karakterisali visokim sadržajem polifenola, izraženom antioksidantnom aktivnošću, slabom sposobnošću inhibicije biosinteze eikozanoida i citotoksičnošću. Antihiperalgezijsko dejstvo LIC (100–300 mg/kg) je bilo statistički značajno i dozno-zavisno: ED₅₀ ± SEM vrednosti u trenutku maksimalnog efekta su iznosile 164,8 ± 15,4 mg/kg (*F. ulmaria*) i 172,2 ± 6,2 mg/kg (*F. vulgaris*). LIC (100–300 mg/kg), telimagrandin II (40 mg/kg) i spireozid (50 mg/kg) su redukovali intenzitet gastričnih lezija indukovanih etanolom. Nakon akutne primene velikih doza LIC, nisu uočeni znaci toksičnosti u životinja. U sprovedenim eksperimentima je pokazano da flavonoidi, galna kiselina i telimagrandin II doprinose farmakološkim efektima LIC.

Zaključak: Dobijeni rezultati podržavaju primenu cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris* u tradicionalnoj medicini. Polifenoli su aktivni sastojci, što ih čini potencijalnim markerima kvaliteta. Značajna sličnost hemijskih i farmakoloških profila ispitivanih LIC ukazuje da bi vrste *F. ulmaria* i *F. vulgaris* mogle da budu ravnopravni biološki izvor biljne droge *Filipendulae flos*.

Ključne reči: *Filipendula vulgaris*, *Filipendula ulmaria*, tradicionalna primena, liofilizovani infuzi cvasti, flavonoidi, tanini, farmakološka aktivnost.

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakognozija

UDK broj:

Comparative chemical and pharmacological investigation of lyophilized flower infusions of the representatives of the genus *Filipendula* Miller in Serbia

Abstract

Introduction: *Filipendula ulmaria* and *F. vulgaris* are traditionally used in the treatment of peptic ulcer and pain.

Aim of the study: Lyophilized flower infusions (LFIs) of these species and isolated compounds of *F. vulgaris* were subjected to chemical and pharmacological investigations with the goal to preliminary assess therapeutic potential and validity of the recorded ethnomedicinal use.

Methods: Chemical composition of LFIs was analyzed by HPLC-UV method. Antioxidant and cytotoxic activities were assessed *in vitro*, anti-inflammatory effect and anti-aggregation potential were studied *ex vivo* in human platelets, whereas antihyperalgesic, antiedematous, gastroprotective activities and acute toxicity were investigated *in vivo*.

Results and discussion: LFIs were characterized by high polyphenolic content, pronounced antioxidant activity, low capacity to inhibit biosynthesis of eicosanoids and cytotoxicity. Antihyperalgesic effect of LFIs (100–300 mg/kg) was statistically significant and dose-dependent: ED₅₀ ± SEM values, obtained at the time of peak effects, were 164.8 ± 15.4 mg/kg (*F. ulmaria*) and 172.2 ± 6.2 mg/kg (*F. vulgaris*). LFIs (100–300 mg/kg), tellimagrandin II (40 mg/kg) and spiraeoside (50 mg/kg) reduced intensity of gastric lesions induced by ethanol. After acute application of high LFIs doses, signs of toxicity in animals were not observed. In performed experiments, it was shown that flavonoids, gallic acid and tellimagrandin II contributed to the pharmacological actions of LFIs.

Conclusion: The obtained data support use of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* flowers in traditional medicine. Polyphenols are active constituents, and hence potential quality markers. Significant similarity of chemical and pharmacological profiles of tested LFIs suggests that *F. ulmaria* and *F. vulgaris* could be equivalent biological sources of herbal drug *Filipendulae flos*.

Key words: *Filipendula vulgaris*, *Filipendula ulmaria*, traditional use, lyophilized flower infusions, flavonoids, tannins, pharmacological activity.

Scientific field: Pharmacy

Scientific subfield: Pharmacognosy

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Familija Rosaceae – Ruže	1
1.2. Rod <i>Filipendula</i> Miller	1
1.3. <i>Filipendula vulgaris</i> Moench (<i>F. hexapetala</i> Gilib., <i>Spiraea filipendula</i> L.).....	2
1.4. <i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. (<i>Spiraea ulmaria</i> L.)	3
1.5. Sekundarni metaboliti familije ruža (Rosaceae).....	4
1.6. Sekundarni metaboliti <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	5
1.7. Biosinteza sekundarnih metabolita <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	13
1.8. Farmakološka aktivnost <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	17
1.8.1. Farmakološka aktivnost <i>F. ulmaria</i>	17
1.8.2. Farmakološka aktivnost <i>F. vulgaris</i>	20
1.9. Tradicionalna primena <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	22
1.10. Zvanična primena <i>F. ulmaria</i>	25
1.11. Oficinalne droge <i>F. ulmaria</i>	27
2. CILJ	27
3. MATERIJALI I METODE	28
3.1. Biljni materijal	28
3.2. Preliminarna makroskopska, mikroskopska i hemijska analiza cvasti <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	28
3.3. Pripremanje ekstrakata.....	29
3.4. Izolovanje sekundarnih metabolita iz cvasti <i>F. vulgaris</i>	30
3.4.1. Materijali i instrumenti.....	30
3.4.2. Dobijanje frakcija korišćenih u procesu izolovanja	31
3.4.3. Postupak izolovanja sekundarnih metabolita	32
3.5. Utvrđivanje strukture sekundarnih metabolita cvasti <i>F. vulgaris</i>	34
3.6. Analiza hemijskog sastava LIC <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i> visokoefikasnom tečnom hromatografijom	35
3.7. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	39
3.7.1. Test neutralisanja DPPH radikala	40
3.7.2. Test neutralisanja OH• radikala (2-dezoksiriboza test).....	41

3.7.3. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test)	42
3.7.4. Određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu	44
3.8. Ispitivanje uticaja na biosintezu eikozanoida	49
3.9. <i>In vivo</i> farmakološka ispitivanja	50
3.9.1. Eksperimentalne životinje	50
3.9.2. Ispitivanje antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti.....	51
3.9.3. Ispitivanje akutne toksičnosti	54
3.9.4. Ispitivanje gastroprotektivnog delovanja	55
3.10. Ispitivanje citotoksične aktivnosti	57
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	59
4.1. Rezultati preliminarne makroskopske, mikroskopske i hemijske analize cvasti <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	59
4.2. Određivanje strukture sekundarnih metabolita izolovanih iz cvasti <i>F. vulgaris</i> .	61
4.2.1. Spektri flavonoidnih heterozida	62
4.2.2. Spektri elagnih tanina.....	63
4.2.3. Spektri fenolnog heterozida, fenolkarboksilne kiseline i njenog derivata	64
4.2.4. Spektralni podaci izolovanih jedinjenja	65
4.2.5. Strukture i NMR spektri izolovanih jedinjenja	72
4.3. Rezultati analize hemijskog sastava LIC <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i> visokoefikasnom tečnom hromatografijom	115
4.4. Antioksidantna svojstva	122
4.4.1. DPPH, 2-dezoksiriboza i FRAP test	122
4.4.2. Uticaj na parametre oksidativno-stresnog statusa u humanom serumu	124
4.4.3. Antioksidantni potencijal cvasti <i>F. ulmaria</i> i <i>F. vulgaris</i>	128
4.5. Inhibicija biosinteze eikozanoida.....	130
4.6. Antihiperalgezijski i antiedematozni efekat.....	141
4.7. Akutna oralna toksičnost	147
4.8. Gastroprotektivna aktivnost.....	148
4.9. Citotoksična aktivnost.....	152
5. ZAKLJUČCI.....	157
6. LITERATURA	161

1. UVOD

1.1. Familija Rosaceae – Ruže

Familija ruža obuhvata oko 3300 vrsta rasprostranjenih u celom svetu, dominantno na severnoj hemisferi. Njeni pripadnici su zeljaste biljke (jednogodišnje ili višegodišnje), žbunovi i drveće (listopadno ili zimzeleno) (Jančić i Lakušić, 2017).

Listovi su naizmenični, prosti ili složeni, sa zaliscima. Perijant je petočlan. Krunica je horipetalna i aktinomorfna. Andreceum čini veliki broj prašnika, dok gineceum može biti apokarpan, sinkarpan ili monokarpan. Plod je zbirni, koštunica ili pomum. Neke vrste imaju trnove izdanačkog porekla ili trnove nastale od epidermisa i subepidermalnog tkiva. U flori Republike Srbije prisutni su predstavnici 26 rodova (Jančić i Lakušić, 2017). Vrste ove familije imaju značaj kao voće, ukrasne i lekovite biljke (ESCAP, 2003; Jančić i Lakušić, 2017).

Familija ruža obuhvata četiri podfamilije: Spiraeoideae, Rosoideae, Maloideae i Prunoideae (Ball, 1968; Jančić i Lakušić, 2017). U nekim sistemima klasifikacije (Flora Srbije) navedene podfamilije imaju status samostalnih familija (Josifović, 1972).

Podfamiliji Rosoideae pripadaju zeljaste ili drvenaste vrste sa cvetovima koji se karakterišu apokarpnim gineceumom i plodovima koji su najčešće zbirna koštunica ili orašica (Jančić i Lakušić, 2017).

1.2. Rod *Filipendula* Miller

Rod *Filipendula* pripada podfamiliji Rosoideae (Ball, 1968). Obuhvata 16 vrsta, pretežno rasprostranjenih u umerenoj i subarktičkoj zoni severne hemisfere, naročito u oblasti severoistočne Azije uključujući Koreju, Japan, severoistočnu Kinu i istočni Sibir (Lee i sar., 2009; The Plant List, 2013). Pripadnici ovog roda su višegodišnje zeljaste biljke sa rizomom. Listovi su perasto deljeni, perasti ili režnjeviti, sa zaliscima. Cimoznometličastu cvast čini puno dvopolnih, belih, ružičastih ili purpurnih cvetova. Čašičnih listića je 5 ili 6, isti je broj kruničnih listića. Prašnika je 20–40. Karpela je 6–12. Plodići su kožasti, jednosemeni, ne otvaraju se. Ime roda je nastalo od latinskih reči

filum (konac) i *pendulus* (viseći), jer se na končastim ograncima korena nalaze krtolasta zadebljanja koja izgledaju kao da vise (Gajić, 1972).

U flori Evrope i Republike Srbije zastupljene su dve vrste ovog roda *Filipendula vulgaris* Moench i *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (Ball, 1968; Gajić, 1972).

1.3. *Filipendula vulgaris* Moench (*F. hexapetala* Gilib., *Spiraea filipendula* L.)

Višegodišnja zeljasta biljka (narodni nazivi: suručica, končara, mali paprat), visine 30–80 cm, sa čvornatim, kosim rizomom. Na adventivnim korenovima rizoma javljaju se karakteristične duguljasto vretenaste do skoro loptaste krtole. Stabljika je uspravna ili retko ustajuća, gola, retko u gornjem delu granata, okruglasta ili slabo izbrazdana, sa veoma razmaknutim listovima, tanka. Listovi su isprekidano perasti, sa 8–25 pari većih i dužih listića. Sa lica su goli i tamnije zeleni, dok na naličju mogu biti goli ili slabo dlakavi u regionu lisnih nerava. Između parova većih listova se nalazi par sasvim malih listova koji mogu biti perasto režnjeviti ili perasto nazubljeni. Zalisci koji se nalaze na listovima rozete su smeđi i kožasti, dok su zalisci gornjih listova zeljasti i nazubljeni. Cvetovi su šestočlani, relativno veliki, žućkastobeli, spolja bledoružičasti, organizovani u metličasto cimozne cvasti (Slika 1.1.). Prašnici su približno iste dužine kao krunični listići. Karpela je 9–12. Stubić je zadebljao. Plod je sedeća 3–4 mm dugačka ahenija sa kratkim dlakama. Nije spiralno uvijen. Cveta u periodu maj–jul.

Najčešće raste na suvim do prilično vlažnim travnim mestima, dok se ređe može sresti u suvim proređenim šumama. Naseljava Evropu, Sibir, Kavkaz i Malu Aziju. Pripada subborealnom flornom elementu. U Republici Srbiji je rasprostranjena (Ball, 1968; Gajić, 1972).



Slika 1.1. Cvast *F. vulgaris*.

1.4. *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (*Spiraea ulmaria* L.)

Višegodišnja zeljasta biljka (narodni nazivi: suručica, medunika, svinjurak), visine do 2 m, sa simpodijalnim, horizontalno postavljenim rizomom. Adventivni korenovi su končasti. Stabljika je uspravna, uglasta, sa velikim brojem listova, u gornjem delu je granata. Listovi su isprekidano perasti, kruti, sa 2–5 pari listića. Listići su na licu goli, tamnozeleni, dok su na naličju svetlozeleni ili belo pustenasto dlakavi, različito nazubljeni ili plitko režnjeviti. Cvetovi su organizovani u cimozno metličaste 5–25 cm duge cvasti (Slika 1.2.). Žučkastobeličastih kruničnih listića je najčešće 5–6. Mirisavi su i do 6 mm dugački. Prašnici dvostruko duži od kruničnih listića. Karpela je 6–10. Stubić je kratak. Plod je oko 2 mm dugačka, gola, smeđa, spiralno uvijena ahenija. Cveta od juna do avgusta.

Naseljava vlažna mesta, livade, mezofilne šume. Rasprostranjena je u Evropi i Aziji. Pripada evroazijskom flornom elementu. U Republici Srbiji je rasprostranjena (Ball, 1968; Gajić, 1972).

Postoje tri podvrste koje se međusobno razlikuju po indumentumu i nazubljenosti listića: 1) subsp. *denudata*, 2) subsp. *ulmaria* 3) subsp. *picbaueri* (Gajić, 1972).



Slika 1.2. Cvast *F. ulmaria*.

1.5. Sekundarni metaboliti familije ruža (Rosaceae)

Uobičajeni sastojci biljaka familije Rosaceae su: flavoni, flavonoli, antocijanidini, fenolkarboksilne kiseline (C_6-C_3 i C_6-C_1 tipa), leukoantocijanidini i katehini (Chalice, 1974).

1.6. Sekundarni metaboliti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

Sastojci *F. ulmaria* i *F. vulgaris* su bili predmet proučavanja više naučnih studija. Ustanovljeno je da pripadaju grupi polifenola i isparljivih jedinjenja (Tabela 1.1; Slika 1.3., Slika 1.4., Slika 1.5., Slika 1.6., Slika 1.7.) (ESCOP, 2003; Olennikov i Kruglova, 2013).

Flavonoidi predstavljaju značajne sekundarne metabolite cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*: njihov udeo u svežoj cvasti *F. ulmaria* može dostići 6%, dok je u vršnim delovima u cvetu sadržaj manji i kreće se u rasponu 3–4%. Strukturno se mogu definisati kao *O*-heterozidi kvercetina ili kemferola u kojima je najčešće monosaharidna jedinica vezana za aglikon preko hidroksilne grupe u položaju 3 ili 4'. Spireozid (kvercetin 4'-*O*-glukozid) je kvantitativno dominantni sastojak ove grupe jedinjenja (ESCOP, 2003; HMPC, 2011a; Olennikov i Kruglova, 2013).

Monomerni (telimagrandnini I i II; rugozini A i B) i dimerni tanini (rugozini D i E) elagnog tipa su takođe u značajnoj meri prisutni u *F. ulmaria* i *F. vulgaris*. Predstavljaju poliestre centralno postavljenog molekula glukoze sa galnom kiselinom i njenim derivatima. Sadržaj tanina u cvastima pomenutih vrsta iznosi približno 10–20%. Prema literaturnim podacima, rugozin D je najzastupljenije jedinjenje ove grupe metabolita (ESCOP, 2003; Fecka, 2009; HMPC, 2011a; Olennikov i Kruglova, 2013).

Neisparljivi salicilati su zastupljeni u relativno maloj količini (0,5%) u *F. ulmaria*, dok podaci o njihovom sadržaju u *F. vulgaris* nisu dostupni. Važniji predstavnici ove grupe detektovani u *F. ulmaria* su gaulterin (primeverozid metilsalicilata) i spirein (primeverozid salicilaldehida) (ESCOP, 2003).

Destilacijom vodenom parom različitih delova *F. ulmaria* i *F. vulgaris* dobija se isparljiva frakcija bogata derivatima salicilne kiseline.

Isparljiva frakcija (0,05–0,2%) osušene cvasti *F. ulmaria* sadrži značajnu količinu derivata salicilne kiseline. Dominantno jedinjenje je salicilaldehid (35,7–75%). U zastupljenije komponente takođe spadaju metilsalicilat i benzilsalicilat (ESCOP, 2003; Olennikov i sar., 2016). Udeo salicilaldehida u isparljivoj frakciji svežih cvetnih vrhova *F. ulmaria* je 36% (ESCOP, 2003). Smatra se da tokom sušenja i skladištenja droge

dolazi do hidrolize fenolnih heterozida, oslobađanja aglikona i porasta udela isparljive frakcije u ukupnoj masi biljnog materijala (ESCOP, 2003).

Dominantno jedinjenje isparljive frakcije lista *F. vulgaris* (0,05%) je salicilaldehid (68,6%), a prisutan je i metilsalicilat (2,4%) (Radulović i sar., 2007). Nadzemni deo *F. vulgaris*, nakon destilacije vodenom parom, daje malu količinu žućkaste tečnosti (0,1%) u kojoj je najzastupljenije jedinjenje ugljovodonik *n*-trikoza (17,9%). Derivati salicilne kiseline su prisutni u manjoj količini (salicilaldehid, 13,7%; benzilsalicilat, 6,8%; metilsalicilat, 6,7%) (Pavlović i sar., 2007).

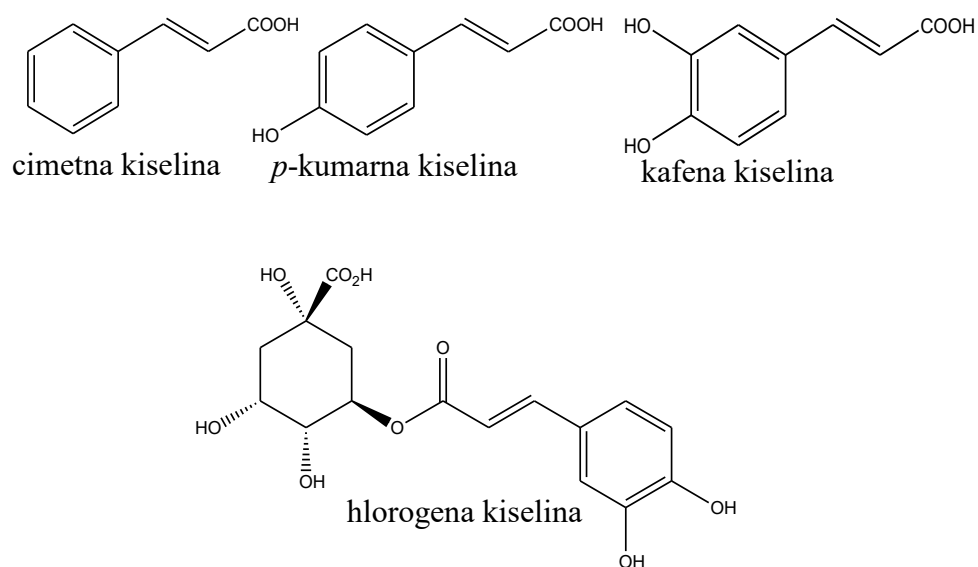
Tabela 1.1. Polifenolni sastojci cvasti *F. ulmaria* (*Fu*) i *F. vulgaris* (*Fv*).

Jedinjenje	<i>Fu</i>	<i>Fv</i>	Literatura
<u>Fenolkarboksilne kiseline i njihovi derivati</u>			
Salicilna kiselina	+	+	1,2,4,5,11
Metilsalicilat	+	-	1
Salicin	+	-	4
Spirein (salicilaldehid-(6-(β -D-ksilozil)- β -D-glukozid)	+	-	8
Monotropitin (gaulterin, metilsalicilat 2- <i>O</i> -primeverozid)	+	-	9
Izosalicin (2-hidroksifenilmetil- β -D-glukozid)	+	-	9
<i>o</i> -Anizinska kiselina	+	-	1
<i>p</i> -Hidroksibenzoeva kiselina	+	-	1
Protokatehinska kiselina	+	-	5
Galna kiselina	+	+	1,2,5,11
Siringinska kiselina	+	+	1,2,11
5- <i>O</i> -Galoilhina kiselina	+	+	1
Elagna kiselina	+	+	1,2,5,11
Kafena kiselina	+	+	1
<i>p</i> -Kumarna kiselina	+	+	1
Cimetna kiselina	+	-	1
3- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina (hlorogena kiselina)	+	+	1,2
4- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	+	+	1
1- <i>O</i> -Kafeoilglukoza	+	+	1

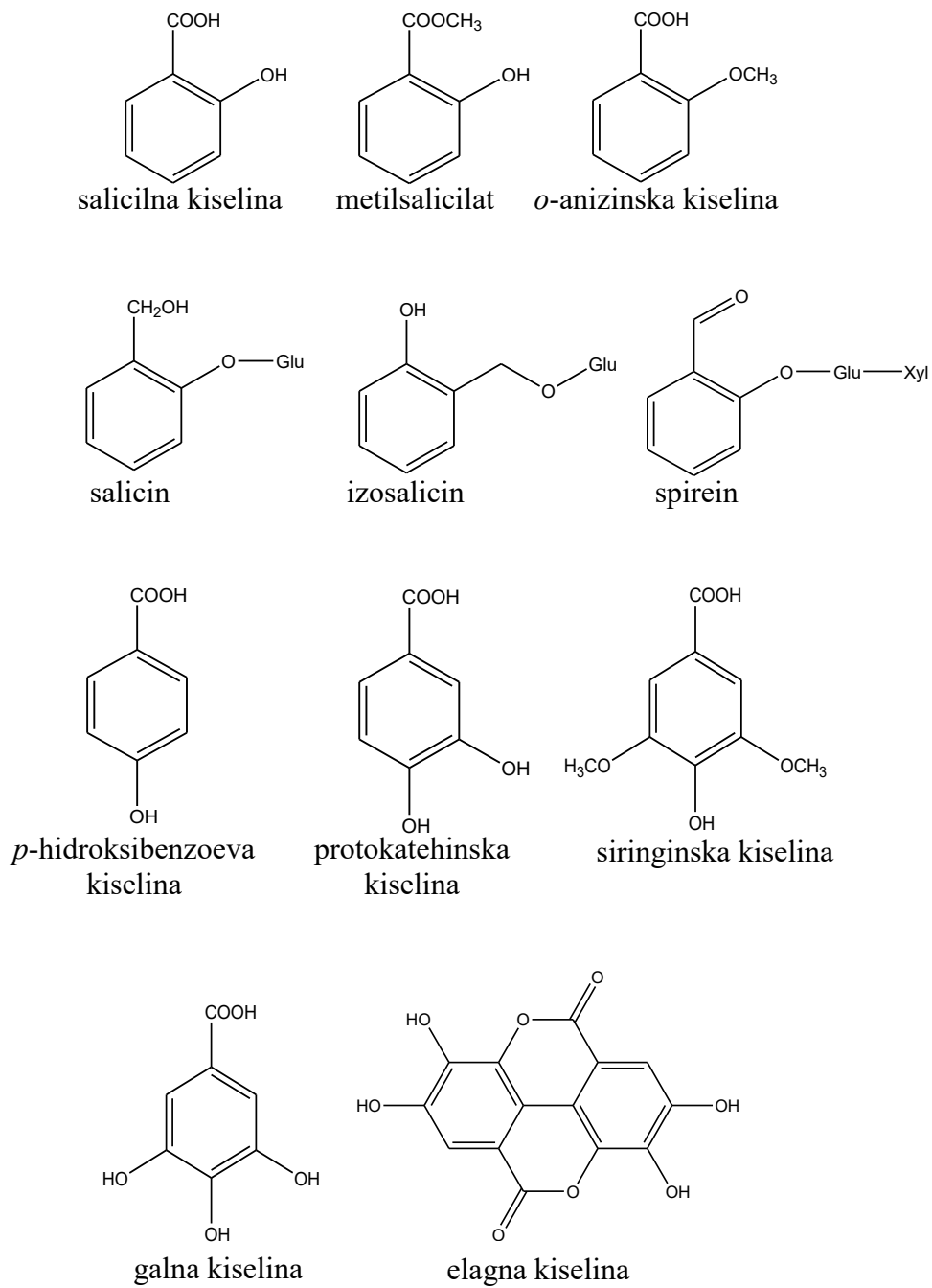
Jedinjenje	<i>Fu</i>	<i>Fv</i>	Literatura
<u>Fenolkarboksilne kiseline i njihovi derivati</u>			
3,4-di- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	+	+	1
3,4,5-tri- <i>O</i> -Kafeoilhina kiselina	+	+	1
<u>Flavonoidi</u>			
(-)-Epikatehin	+	-	2
(+)-Katehin	-	+	11
(-)-Epigalokatehin	+	+	2,11
Apigenin	+	-	1,5
Kvercetin	+	+	1,2,3,6,11
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukozid (izokvercitrin)	+	+	1,3,5
Kvercetin 3- <i>O</i> -galaktozid (hiperozid)	+	+	1,2,5,6,11
Kvercetin 3- <i>O</i> -ramnozid (kvercitrin)	+	+	1,3,5
Kvercetin 3- <i>O</i> -arabinozid (avikularin)	+	+	1,3,6
Kvercetin 3- <i>O</i> -glukuronid (mikvelianin)	+	+	1,3
Kvercetin 3- <i>O</i> -rutinozid (rutin)	+	+	1,2,5,6
Kvercetin 4'- <i>O</i> -glukozid (spireozid)	+	+	1,2,3,5,6,7,11
Kvercetin 4'- <i>O</i> -rutinozid (ulmariozid)	+	+	1
Kvercetin 3- <i>O</i> -(2''- <i>O</i> -galoil- β -D-galaktozid)	-	+	12
Kemferol	+	+	1,2,5,6,11
Kemferol 3- <i>O</i> -glukozid (astragalin)	+	+	1,2,5,11
Kemferol 3- <i>O</i> -rutinozid (nikotiflorin)	+	-	1,5
Kemferol 3- <i>O</i> -ramnozid	+	-	1,3
Kemferol 4'- <i>O</i> -glukozid	+	+	1,3,6
<u>Tanini</u>			
Telimagrandin I ₁	+	+	1,3,5
Telimagrandin I ₂	+	+	1,3,5
Telimagrandin II	+	+	1,3,5
Rugozin A	+	-	5

Jedinjenje	Fu	Fv	Literatura
Tanini			
Metil estar rugozina A	+	-	10
Rugozin B ₁	+	+	1,3,5
Rugozin B ₂	+	+	1,3,5
Rugozin D	+	+	1,3,5
Rugozin E ₁	+	+	1,3,5
Rugozin E ₂	+	+	1,3,5

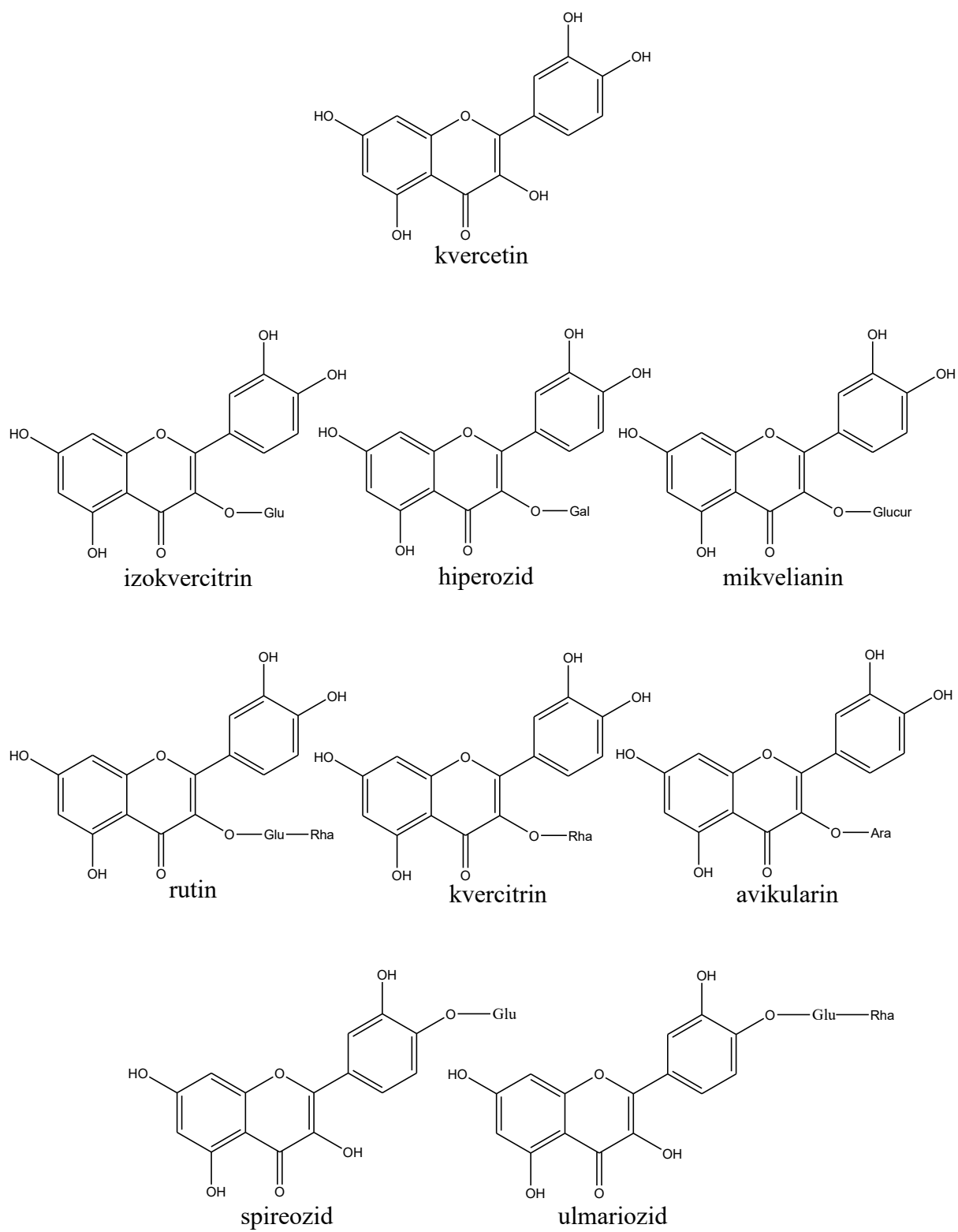
+, prisutan; -, nije detektovan; 1, Olennikov i Kruglova, 2013; 2, Gniewosz i sar., 2014; 3, Olennikov i sar., 2016; 4, Blazics i sar., 2010; 5, Fecka, 2009; 6, Pemp i sar., 2007; 7, Bukreeva i Shukhobodskii, 1987; 8, Thieme, 1965; 9, ESCOP, 2003; 10, Nitta i sar., 2013; 11, Baczek i sar., 2012; 12, Pukalskienė i sar., 2015.



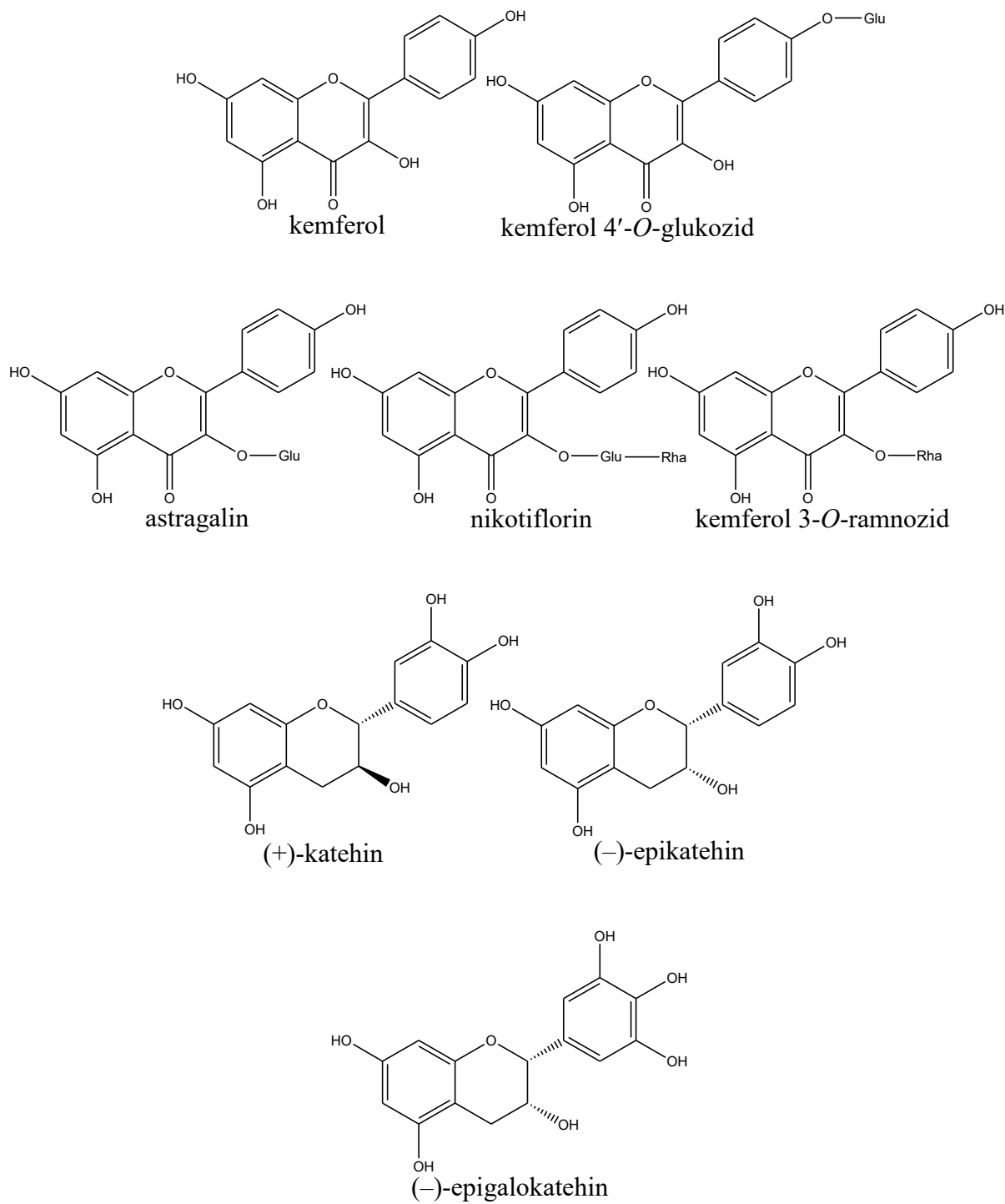
Slika 1.3. Fenolkarboksilne kiseline (C₆-C₃ tipa) i njihov derivat.



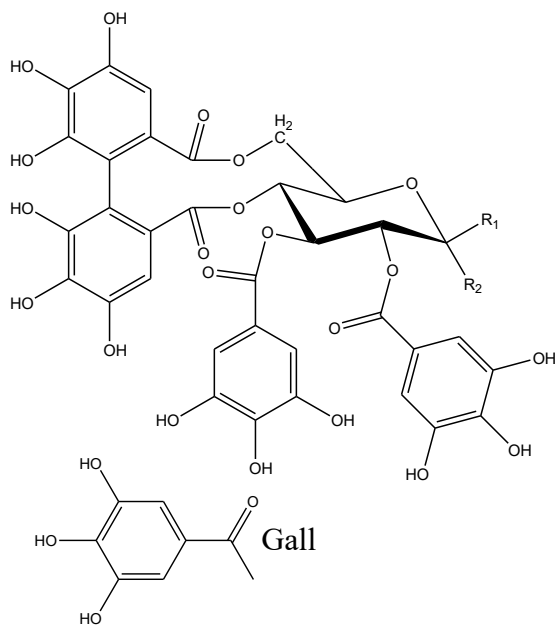
Slika 1.4. Fenolkarboksilne kiseline (C₆-C₁ tipa) i njihovi derivati.



Slika 1.5. Kvercetin i njegovi heterozidi.

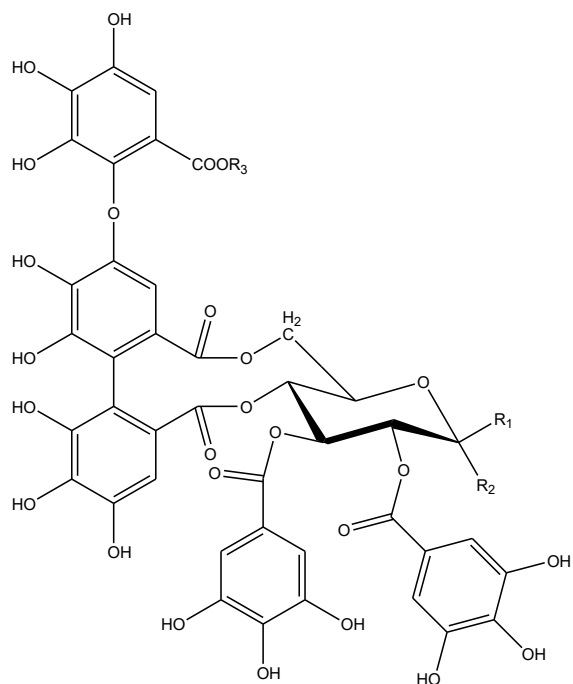


Slika 1.6. Kemferol, heterozidi kemferola i flavan-3-oli.



telimagrandin I ($R_1 = H, R_2 = OH$)

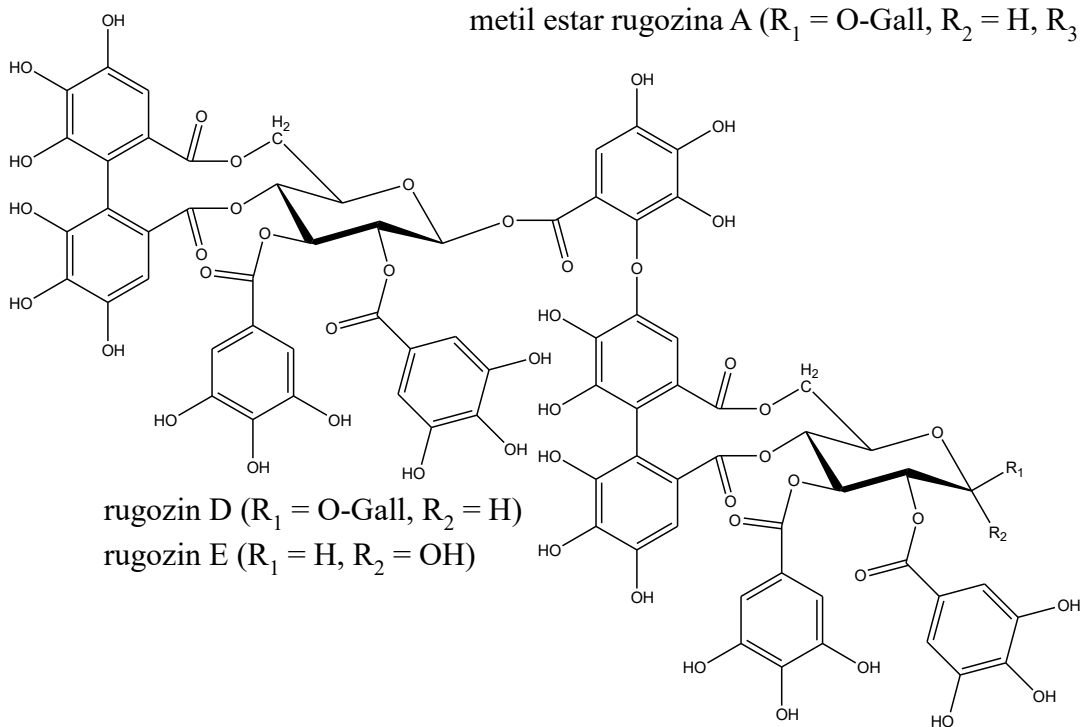
telimagrandin II ($R_1 = O\text{-Gall}, R_2 = H$)



rugozin B ($R_1 = H, R_2 = OH, R_3 = H$)

rugozin D ($R_1 = O\text{-Gall}, R_2 = H, R_3 = CH_3$)

metil ester rugozina A ($R_1 = O\text{-Gall}, R_2 = H, R_3 = H$)



rugozin D ($R_1 = O\text{-Gall}, R_2 = H$)

rugozin E ($R_1 = H, R_2 = OH$)

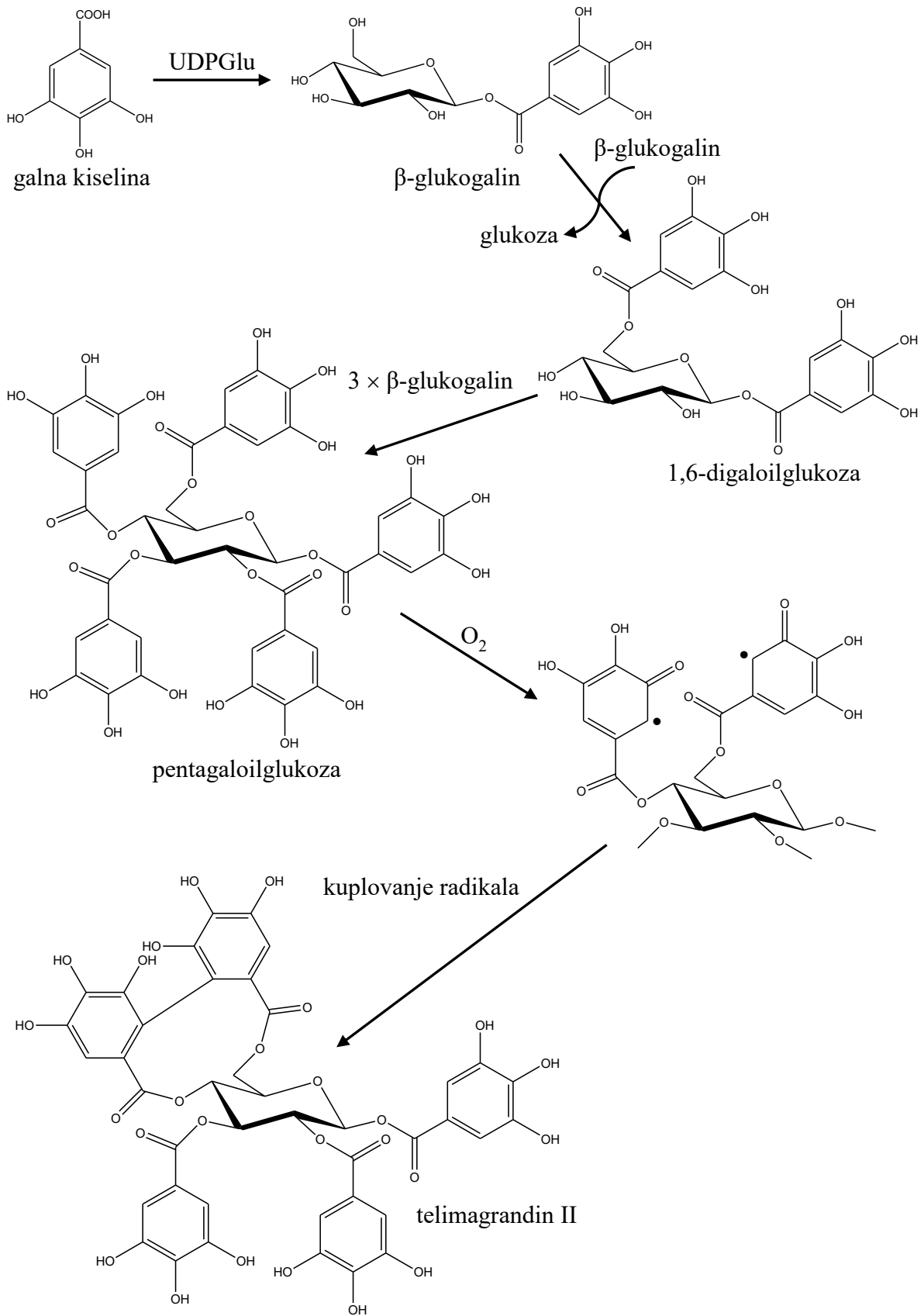
Slika 1.7. Elagni tanini.

1.7. Biosinteza sekundarnih metabolita *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

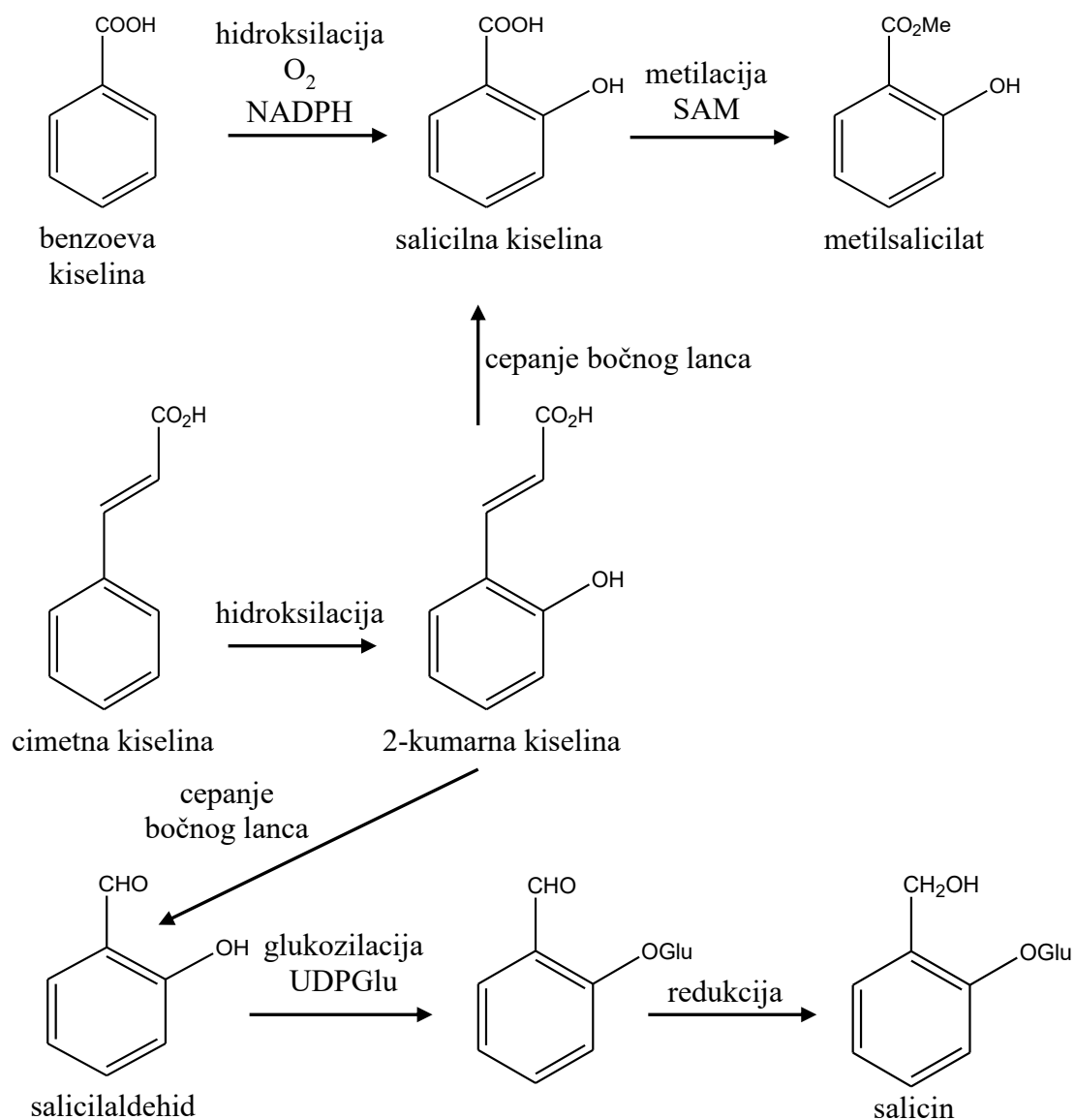
Farmakološki aktivni sastojci (flavonoidi, salicilati, tanini) *F. ulmaria* i *F. vulgaris* u biljkama nastaju u šikimatnom (fenilpropanskom) i acetatnom biosintetskom putu.

Intermedijeri glikolize i ciklusa pentoza fosfata (fosfoenolpiruvat i D-eritroza-4-fosfat) su polazna jedinjenja fenilpropanskog biosintetskog puta. Iz njih se, enzimski posredovanim reakcijama, formira 3-dehidrošikiminska kiselina čijom daljom redukcijom nastaje šikiminska kiselina. 3-Dehidrošikiminska kiselina nakon oksidacije i enolizacije daje aromatičnu galnu kiselinu. Esterifikacijom hidroksilnih grupa poliola galnom kiselinom formiraju se galni tanini. Ukoliko se galoil ostaci taninskog molekula povežu procesom oksidativnog kuplovanja nastaju elagni tanini koji sadrže ostatak heksahidroksidifenske kiseline (Slika 1.8.). β -Glukogalin, aktivna jedinica u sintezi tanina, ima funkciju supstrata za esterifikaciju i donora galoil grupa (Dewick, 2009).

Inkorporiranjem molekula fosfoenolpiruvata u molekul šikiminske kiseline dobija se horizminska kiselina (sa enoletarskim bočnim lancem). Njenom izomerizacijom nastaje prefenska kiselina sa C₆-C₃ strukturom. Formiranju aromatičnih aminokiselina, L-tirozina i L-fenilalanina, prethodi dekarboksilacija, aromatizacija i uvođenje azota reakcijom transaminacije. Tako nastao L-fenilalanin, procesom dezaminacije prelazi u cimetnu kiselinu, koja u daljim reakcijama hidroksilacije i metilacije daje fenolkarboksilne kiseline C₆-C₃ tipa. Hidroksilacija cimetne kiseline u položaju 2 prvi je korak ka derivatima salicilne kiseline. Tako nastala 2-kumarna kiselina, nakon cepanja bočnog lanca (reverznom aldolnom ili reverznom Klajzenovom kondenzacijom), daje salicilnu kiselinu (Dewick, 2009). Alternativni način biosinteze podrazumeva direktnu hidroksilaciju benzoeve kiseline koja je dobijena cepanjem bočnog lanca cimetne kiseline (Hayat i sar., 2007). Daljim transformacijama, npr. metilacijom pomoću S-adenozil metionina dobija se metilsalicilat. Redukcijom karboksilne grupe nastaje salicilaldehid. Kada se šećeri (koji su prethodno prevedeni u aktivnu formu tj. UDP-šećer) vežu za ove molekule nastaju salicilni glikozidi (Slika 1.9.) (Dewick, 2009).

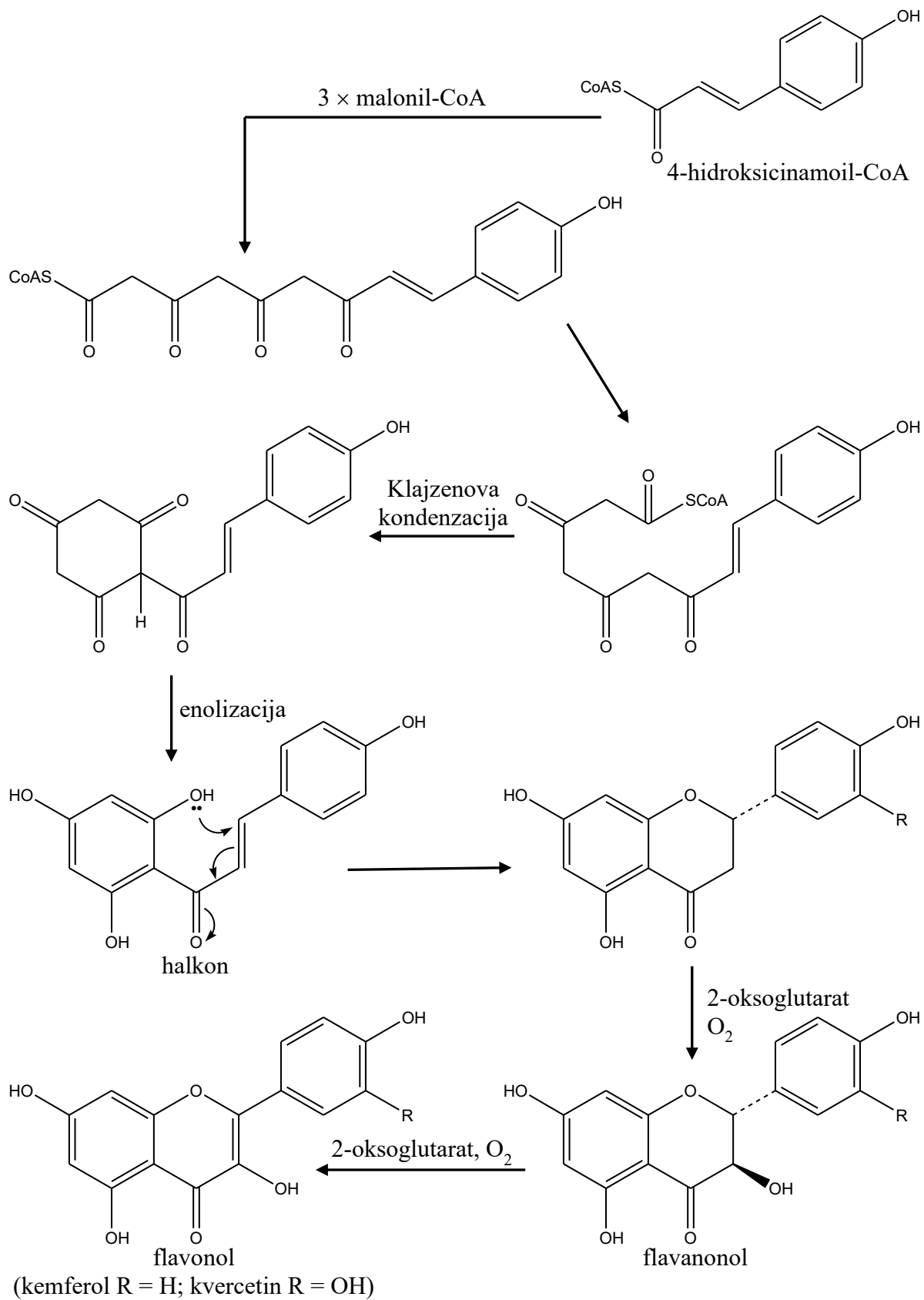


Slika 1.8. Biosinteza elagnog tanina telimagrandina II (Dewick, 2009).



Slika 1.9. Biosinteza salicilne kiseline i nekih njenih derivata (Dewick, 2009).

Derivat cimetne kiseline, 4-kumarna kiselina, služi kao osnova sa kojom se, tokom biosinteze flavonoida, kondenzuju tri molekula malonil-CoA (gradivna jedinica acetatnog biosintetskog puta). Tom prilikom nastaje poliketidni proizvod koji nakon aldolne ili reakcije slične Klajzenovoj kondenzaciji formira halkon. U sledećem koraku, nukleofilnim napadom fenolne grupe na α,β -nezasićeni keton, nastaje šestočlani hetrocikl flavanona (Slika 1.10.). Iz flavanona se oksidacijom/redukcijom centralnog prstena dobijaju flavoni, flavonoli i katehini. Dalje transformacije uključuju metilaciju, hidroksilaciju, glikozilaciju i dr. reakcije (Dewick, 2009).



Slika 1.10. Biosinteza flavonoidnih aglikona (Dewick, 2009).

1.8. Farmakološka aktivnost *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

Delovanje *F. ulmaria* i *F. vulgaris* je proučavano u prethodnom periodu, međutim nedostaju istraživanja u kojima su ispitivani efekti tradicionalno korišćenog preparata – infuza.

1.8.1. Farmakološka aktivnost *F. ulmaria*

Antiinflamatorna aktivnost

Etilacetatni ekstrakt cvasti *F. ulmaria* inhibirao je klasični put aktivacije komplementa *in vitro* ($IC_{50} = 5,4 \mu\text{g/mL}$). Opisana aktivnost pripisana je prisutnim taninima i sastojcima koji ne pripadaju grupi flavonoida i salicilata. Eksperimentalno je utvrđeno da isti ekstrakt smanjuje produkciju reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u humanim polimorfonuklearnim leukocitima i suprimira proliferaciju T limfocita *in vitro* (Halkes i sar., 1997a, 1997b). Slično, prečišćeni vodenoacetonski ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* je smanjio nivo reaktivnih kiseoničnih jedinjenja u humanim neutrofilima *in vitro* nakon stimulacije različitim agensima (Denev i sar., 2014).

U novijem ispitivanju je pokazano da polisaharidi cvasti *F. ulmaria* ispoljavaju antikomplementnu aktivnost (Olennikov i sar., 2016).

Vodeni ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* redukovao je produkciju proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6) u stimulisanim humanim THP-1 makrofazima *in vitro* (Drummond i sar., 2013).

Nakon inkubacije vodenog ekstrakta herbe *F. ulmaria* sa uzorcima humanog fecesa (*ex vivo*) formirani su urolitini A, B i C. Ovi metaboliti poseduju značajan antiinflamatorni potencijal, s obzirom da je utvrđena njihova sposobnost da smanje produkciju TNF- α u humanim THP-1 makrofazima *in vitro*. Dodatno, urolitin C je redukovao nivo IL-6 (Piwowarski i sar., 2014).

Liofilizovani vodeni ekstrakt lista *F. ulmaria* (0,2 mg/mL) slabo je inhibirao produkciju prostaglandina u mikrozosomima goveđih semenih vezikula (36%). Indometacin (kontrolna supstanca, u koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ tj. 2,8 μM) je bio znatno efikasniji (88%). Isti ekstrakt (0,25 mg/mL) je veoma izraženo inhibirao egzocitozu

elastaze (93%) indukovanu faktorom aktivacije trombocita u humanim neutrofilima izolovanim iz periferne krvi (Tunón i sar., 1995). U skladu sa ovim podacima su rezultati Piwowarski-og i saradnika (2011) kojima je pokazano da vodeni ekstrakt herbe *F. ulmaria* inhibira oslobađanje elastaze iz stimulisanih humanih neutrofila *in vitro*.

Metanolni ekstrakt cvasti *F. ulmaria* je inhibirao ksantin oksidazu *in vitro* ($IC_{50} = 6,2 \mu\text{g/mL}$). IC_{50} vrednost referentne supstance alopurinola je iznosila $2,6 \mu\text{g/mL}$ (Kazazi i sar., 2009).

Dihlormetanski ekstrakt cvasti *F. ulmaria* iz kog je uklonjen hlorofil je povećao aktivnost α i γ podtipova receptora aktiviranih proliferatorom peroksizoma, dok su različiti ekstrakti nadzemnog dela inhibirali aktivaciju nuklearnog faktora kB (NF-kB) (Vogl i sar., 2013).

Antimikrobna aktivnost

Različiti ekstrakti *F. ulmaria* su ispoljili antimikrobno delovanja protiv sledećih mikroorganizama: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus faecalis*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium oxysporum* (Barros i sar., 2013; Csedö i sar., 1993; Cwikla i sar., 2010; Denev i sar., 2014; Katanić i sar., 2015a).

Citotoksična i antitumorska aktivnost

Dugotrajna oralna primena dekokta cvasti *F. ulmaria* je smanjila incidencu nastanka malignih tumora nakon izlaganja eksperimentalnih životinja radioaktivnom zračenju (Bespalov i sar., 2017a). Isti ekstrakt je smanjio incidencu nastanka tumora centralnog nervnog sistema prouzrokovanih transplacentalnom izloženošću etilnitrozourei i produžio latentni period (Bespalov i sar., 2017b).

Vodenometanolni ekstrakt polena *F. ulmaria* ispoljio je antiproliferativnu i apoptotsku aktivnost protiv C26 kolorektalne tumorske ćelijske linije miša (Mărgăoan i sar., 2016).

Dekokt cvasti *F. ulmaria* je delovao antiproliferativno na tumorske ćelijske linije pluća (NCI-H460) (Lima i sar., 2014).

Nepolarne frakcije (heksanska i hloroformska) dobijene iz herbe *F. ulmaria* su ispoljile citotoksičnu aktivnost protiv B16 ćelija melanoma (Calliste i sar., 2001).

Vodenoetanolni ekstrakt cvasti *F. ulmaria* je pokazao značajnu citotoksičnu aktivnost protiv humanih Raji ćelija limfoblastoma. Primećeno je da testirani ekstrakt ometa proces citokineze, što dovodi do nastanka „džinovskih” poliploidnih ćelija (Spiridonov i sar., 2005).

Lokalna primena dekokta cvasti *F. ulmaria* je inhibirala kancerogenezu u miševa, indukovanu intravaginalnom aplikacijom 7,12-dimetilbenz[a]antracena. Oralno davanje istog preparata je suprimiralo rast transplantiranih tumora (sarkoma-180 i „Lewis” karcinoma) u miševa (ESCOP, 2003).

Rugozin D, primenjen *i.p.* u dozi 10 mg/kg, produžio je preživljavanje miševa kojima su injektovane ćelije sarkoma-180. Predloženi mehanizam antitumorske aktivnosti ovog jedinjenja je stimulacija imunskog sistema (ESCOP, 2003).

Antioksidantna aktivnost

Metanolni i vodeni ekstrakti herbe *F. ulmaria*, dobijeni sukcesivnom ekstrakcijom rastvaračima rastuće polarnosti, pokazali su sposobnost neutralisanja superoksidnog anjona, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil i hidroksilnog radikala (Calliste i sar., 2001).

Vodeni ekstrakt cvasti *F. ulmaria* ispoljio je značajnu sposobnost neutralisanja elektrogenisanog broma (Abdullin i sar., 2002).

Etilacetatni ekstrakt cvasti *F. ulmaria* ispoljio je značajnu sposobnost neutralisanja vodonik-peroksida (Sroka i Cisowski, 2005).

Prečišćeni vodenoacetonski ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* ispoljio je antioksidantnu aktivnost u ORAC, TRAP i HORAC testu (Denev i sar., 2014).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* ispoljio je značajnu sposobnost „hvatanja” slobodnih radikala (superoksidnog anjona, DPPH i ABTS^{•+} radikala) (Katanić i sar., 2015a).

Hepatoprotektivna i renoprotektivna aktivnost

Vodenoetanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* je smanjio oštećenje jetre u eksperimentalnih životinja izazvano ugljentetrahloridom (Shilova i sar., 2006).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria* je ublažio oksidativni stres u jetri i bubrezima pacova i redukovao oštećenja tkiva koja nastaju kao posledica primene cisplatina (Katanić i sar., 2017).

Gastroprotektivna aktivnost

Oralno primenjeni dekolti cvasti *F. ulmaria* (1:10, 0,5 mL/100 g; 1:20, 2,5 mL/100 g) su redukovali nastanak gastričnih lezija indukovanih fiksiranjem, imobilizacijom i supkutanom injekcijom rezerpina u eksperimentalnih životinja, prevenirali su oštećenje gastrične sluzokože izazvano acetilsalicilnom kiselinom i ubrzali zaceljenje lezija nastalih pod uticajem etanola (ESCOP, 2003).

Dekokt cvasti *F. ulmaria* je potencirao ulcerogeno delovanje histamina u zamoraca (HMPC, 2011a).

Efekat na glatku muskulaturu

U *in vitro* i *in vivo* eksperimentima na različitim životinjskim vrstama je pokazano da vodeni i etanolni ekstrakti cvasti *F. ulmaria* povećavaju intestinalni, bronhijalni i uterusni tonus (HMPC, 2011a).

1.8.2. Farmakološka aktivnost *F. vulgaris*

Antiinflamatorna aktivnost

Dihlormetanski i metanolni ekstrakti cvasti *F. vulgaris* su smanjili ekspresiju proinflamatornih molekula, E-selektina i interleukina-8, u humanim endotelnim ćelijama nakon stimulacije faktorom nekroze tumora α (TNF- α) ili lipopolisaharidom (Vogl i sar., 2013).

Metanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je značajno inhibirao ksantin oksidazu ($IC_{50} = 8,9 \mu\text{g/mL}$). IC_{50} vrednost kontrolne supstance (alopurinola) u istom testu je iznosila $2,6 \mu\text{g/mL}$ (Kazazi i sar., 2009).

Antioksidantna aktivnost

Metanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je ispoljio značajnu antioksidantnu aktivnost *in vitro* u DPPH i FRAP testu, kao i testu inhibicije lipidne peroksidacije (Maksimović i sar., 2007).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. vulgaris* je neutralisao slobodne radikale (DPPH, $ABTS^{\bullet+}$ katjon i superoksidni anjon) (Katanić i sar., 2015c).

Hepatoprotektivna i renoprotektivna aktivnost

Metanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je ispoljio protektivna svojstva *in vivo* u modelu hepatotoksičnosti izazvane ugljentetrahloridom, zahvaljujući dozno-zavisnom smanjenju lipidne peroksidacije i povećanju sadržaja redukovanog glutationa (Ćebović i Maksimović, 2012).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. vulgaris* je smanjio oksidativni stres uzrokovan cisplatinom u tkivima bubrega i jetre pacova (Katanić i sar., 2015b).

Diuretički efekat

Preparati vrhova u cvetu *F. vulgaris* (metanolni ekstrakt, infuz) su ispoljili značajnu diuretičku aktivnost praćenu povećanim izlučivanjem jona natrijuma i kalijuma (Rebuelta i sar., 1988).

Antimikrobna aktivnost

Isparljiva frakcija dobijena destilacijom vodenom parom listova *F. vulgaris* inhibirala je rast gljivica (*Aspergillus niger* i *Candida albicans*), Gram (+) (*Staphylococcus aureus*) i Gram (-) bakterija (*Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*). Utvrđeno je da njeni pojedini

sastojci mogu delovati sinergistički (salicilaldehid i linalol) i antagonistički (salicilaldehid i metilsalicilat) (Radulović i sar., 2007).

Metanolni ekstrakt nadzemnog dela *F. vulgaris* je ispoljio antimikrobnu aktivnost protiv *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Phialophora fastigiata* (Katanić i sar., 2015c).

Citotoksična aktivnost

Vodenoetanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je delovao citotoksično na humane Raji ćelije limfoblastoma (Spiridonov i sar., 2005).

1.9. Tradicionalna primena *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

Korišćenje biljnih vrsta *F. vulgaris* i *F. ulmaria* u tradicionalnoj medicini mnogih naroda je dobro dokumentovano (Tabela 1.2., Tabela 1.3.). Najčešće se infuz ili dekokt cvasti primenjuje interno radi ublažavanja simptoma inflamatornih bolesti, prehlade i želudačnih tegoba. *F. ulmaria* i *F. vulgaris* se takođe mogu koristiti kao hrana. Listom *F. ulmaria* se aromatizuju čajni napici (Papp i sar., 2008), dok se mladi listovi *F. vulgaris* upotrebljavaju kao salata (Guarrera i Savo, 2016; Vračarić i sar., 1990). Korenske krtole *F. vulgaris* su slatko-nagorkog ukusa. Konzumiraju se presne ili nakon obrade. U kombinaciji sa drugim krtolastim biljkama koriste se za spravljanje kaša i hleba (Vračarić i sar., 1990).

Tabela 1.2. Upotreba *F. vulgaris* u tradicionalnoj medicini.

Deo biljke	Primena	Oblik primene	Zemlja	Literatura
cvast	reumatizam giht infekcije groznica	interno (čaj)	Austrija	(Vogl i sar., 2013)
nadzemni deo	reumatizam	eksterno, infuz za natapanje obloga	Italija	(Cappelletti i sar., 1982)

Deo biljke	Primena	Oblik primene	Zemlja	Literatura
cvast	prehlada	čaj	Bosna i Hercegovina	(Šarić-Kundalić i sar., 2010)
cvast	groznica reumatizam prehlada	interno	Bosna i Hercegovina	(Šarić-Kundalić i sar., 2011)
cvast, list	artritis kožne bolesti bolesti srca antiseptik	infuz, tinktura	Rusija	(Stryamets i sar., 2015)
cvast	adstringens tonik hipotenziv	čaj	Srbija	(Jarić i sar., 2007)
cvast, koren	antitusik adstringens diuretik antiseptik astma edem dijareja hemoroidi dizenterija	infuz, dekoka	Rumunija	(Tita i sar., 2009)
koren	proliv srdobolja	–	Srbija	(Tucakov, 1984)

Tabela 1.3. Upotreba *F. ulmaria* u tradicionalnoj medicini.

Deo biljke	Primena	Oblik primene	Zemlja	Literatura
nadzemni deo	antireumatik diuretik	macerat	Bugarska	(Leporatti i Ivancheva, 2003)
vrhovi u cvetu	reumatski bol giht nephritis edem	infuz	Italija	(Leporatti i Ivancheva, 2003)
list, vrhovi u cvetu	reumatizam	infuz	Srbija	(Jarić i sar., 2007)
cvast	prehlada	infuz	Bosna i Hercegovina	(Šarić-Kundalić i sar., 2010)
cvast	reumatizam groznica prehlada kašalj bronhitis	–	Crna Gora	(Menković i sar., 2011)
cvast	reumatizam groznica prehlada	interno	Bosna i Hercegovina	(Šarić-Kundalić i sar., 2011)
cvast nadzemni deo	reumatizam giht groznica infekcije	interno (čaj)	Austrija	(Vogl i sar., 2013)
cvast	analgetik antiinflamator antipiretik (artritis, osteoartritis, prehlada, grip i celulit)	infuz	Italija	(Dei Cas i sar., 2015)

Deo biljke	Primena	Oblik primene	Zemlja	Literatura
nadzemni deo u cvetu	artritis	infuz	Španija	(Cavero i Calvo, 2015)
list	reumatizam	infuz	Srbija	(Tucakov, 1984)
vrhovi u cvetu	gojaznost giht dijaforetik diuretik adstringens tonik			

1.10. Zvanična primena *F. ulmaria*

Relevantne institucije i udruženja (Evropska agencija za lekove, Evropsko naučno udruženje za fitoterapiju – ESCOP, Komisija E nemačkog ministarstva zdravlja) su u prethodnom periodu objavile monografije kojima je uređena primena biljnih lekovitih proizvoda na bazi *F. ulmaria* (Tabela 1.4.) (Blumenthal i sar., 1998; ESCOP, 2003; HMPC, 2011b, 2011c): odgovarajućim biljnim lekovitim proizvodima na bazi herbe/cvasti *F. ulmaria* dodeljen je status tradicionalnih biljnih lekova (HMPC, 2011b, 2011c). Nadležni organi Evropske unije i evropskih zemalja do danas nisu odobrili upotrebu proizvoda na bazi *F. vulgaris*.

Tabela 1.4. Primena biljnih lekovitih proizvoda na bazi *F. ulmaria*.

	Biljna droga	Doziranje	Primena
EMA ^a	<i>Filipendulae ulmariae flos</i>	Usitnjena biljna droga (DD ^d , 2,5–6 g) kao infuz, podeljeno u 1–3 PD ^e .	1) suportivni tretman prehlade 2) ublažavanje bola manjeg intenziteta u zglobovima
EMA ^a	<i>Filipendulae ulmariae herba</i>	<u>Indikacija 1</u> a) Usitnjena biljna droga, kao infuz: PD ^e 1,5–6 g, DD ^d 2–18 g. b) Sprašena biljna droga: PD ^e 250-500 mg, DD ^d 250–1500 mg. <u>Indikacija 2</u> a) Preparati i doze koji se koriste za indikaciju 1. b) Tinktura (1:5, 45% etanol): PD ^e 2–4 mL, DD ^d 6–12 mL.	1) suportivni tretman prehlade 2) ublažavanje bola manjeg intenziteta u zglobovima
ESCOP ^b	<i>Filipendulae ulmariae herba</i>	DD 1–6 g biljne droge, kao infuz.	1) suportivna terapija prehlade 2) pospešivanje renalne eliminacije vode
Kom. E ^c	<i>Spiraeae flos/herba</i>	DD 2,5–3,5 g cvasti, odnosno 4–5 g herbe, kao infuz.	1) suportivna terapija prehlade

^a EMA, Evropska agencija za lekove; ^b ESCOP, Evropsko naučno udruženje za fitoterapiju; ^c Kom. E, Komisija E nemačkog Ministarstva zdravlja; ^d DD, dnevna doza; ^e PD, pojedinačna doza.

1.11. Oficinalne droge *F. ulmaria*

Vrsta *F. ulmaria* je biološki izvor oficinalnih biljnih droga *Filipendulae ulmariae herba* (EDQM, 2013) i *Spiraeae flos* (DAC/NRF-Kommission, 2013).

Specifični kvalitet *Filipendulae ulmariae herba* se izražava kroz sadržaj isparljive frakcije dobijene destilacijom vodenom parom (minimalno 1 mL/kg, računato u odnosu na osušenu biljnu drogu), dok je parametar specifičnog kvaliteta *Spiraeae flos* sadržaj ukupnih flavonoida (minimalno 1,8%, izraženo kao hiperozid u odnosu na osušenu biljnu drogu) (DAC/NRF-Kommission, 2013; EDQM, 2013).

2. CILJ

Cilj doktorske disertacije je preliminarna procena:

- a) opravdanosti tradicionalne primene i novih mogućnosti za primenu cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria*,
- b) farmakološke aktivnosti pojedinih sastojaka cvasti *F. vulgaris* i njihovog značaja za definisanje specifičnog kvaliteta biljnih droga *Filipendulae vulgaris flos* i *Filipendulae ulmariae flos*,
- c) mogućnosti da vrste *F. vulgaris* i *F. ulmaria* budu biološki izvori potencijalno oficinalne droge *Filipendulae flos*.

Realizacija postavljenog cilja obuhvatiće:

1. izolovanje i određivanje strukture polifenolnih jedinjenja cvasti *F. vulgaris*,
2. kvalitativnu i kvantitativnu analizu liofilizovanih infuza cvasti (LIC) *F. vulgaris* i *F. ulmaria*,
3. ispitivanje farmakološke aktivnosti LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, i pojedinih izolovanih metabolita cvasti *F. vulgaris*,
4. komparaciju hemijskog (HPLC) i farmakološkog profila LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, kao i vrednosti parametara opšteg i specifičnog kvaliteta biljnih droga *Filipendulae ulmariae flos* i *Filipendulae vulgaris flos*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Biljni materijal

Cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* su sakupljene na prirodnim staništima na teritoriji Republike Srbije po sunčanom vremenu. Prof. dr Branislava Lakušić (Katedra za botaniku, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet) je identifikovala biljni materijal pomoću ključa za određivanje Flore Republike Srbije (volumen IV). Herbarski primerci su deponovani u Herbarijumima Univerziteta u Beogradu (Tabela 3.1.).

Tabela 3.1. Biljni materijal.

Vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja	Stanište	Kolektorski broj
<i>F. ulmaria</i>	Zlatibor jul 2014. god.	livada	42083BEOU
	Kopaonik jul 2016. god.	livada	3872HFF
<i>F. vulgaris</i>	selo Loćika (centralna Srbija) maj 2013. i maj 2014. god.	livada	3713HFF

BEOU, Herbarijum Instituta za botaniku i Botaničke bašte „Jevremovac”, Univerzitet u Beogradu; HFF, Herbarijum Katedre za botaniku, Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet.

3.2. Preliminarna makroskopska, mikroskopska i hemijska analiza cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

U cilju preliminarne procene sličnosti i opravdanosti uporedne analize ispitivanih biljnih droga (cvast *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; cvast *F. vulgaris* Loćika 2013. god.) izvršena je njihova makroskopska, mikroskopska i hemijska analiza prema monografiji *Spiraeae flos* Nemačkog kodeksa lekova i propisu Evropske farmakopeje

za određivanje sadržaja tanina (DAC/NRF-Kommission, 2013; EDQM, 2013). Dobijeni rezultati su upoređeni.

Početni korak analize biljnih droga je bio ispitivanje njihovih organoleptičkih osobina i mikroskopsko posmatranje prašenih droga u rastvoru hloralhidrata, pri čemu je utvrđivano prisustvo karakterističnih elemenata (DAC/NRF-Kommission, 2013).

TLC analiza je izvršena hromatografijom na tankom sloju silikagela, korišćenjem rastvora salicilne kiseline (poredbeni rastvor) i gvožđe(III)-hlorid reagensa (sredstvo za derivatizaciju). Mobilnu fazu je predstavljala smeša rastvarača (toluol/aceton/mravlja kiselina, 60/39/1 v/v/v). Položaj i boja zona na hromatogramima su posmatrani na dnevnoj svetlosti nakon derivatizacije (DAC/NRF-Kommission, 2013).

Ukupni pepeo je određen žarenjem na temperaturi tamnocrvenog usijanja za 1 g usitnjenog materijala, dok je gubitak sušenjem određen na temperaturi 100–105 °C za 1 g usitnjene droge (DAC/NRF-Kommission, 2013).

Sadržaj ukupnih flavonoida u osušenoj drogi (izraženo kao hiperozid) je određen spektrofotometrijskom metodom uz korišćenje $AlCl_3$ kao sredstva za derivatizaciju. Apsorbancija nastalih helatnih kompleksa flavonoida i jona aluminijuma je merena na 465 nm (DAC/NRF-Kommission, 2013).

Sadržaj tanina u osušenoj drogi (izraženo kao pirogalol) je određen spektrofotometrijskom metodom u kombinaciji sa adsorpcijom tanina na kožni prah, prateći propis Evropske farmakopeje (br. poglavlja: 2.8.14.). Apsorbancija je merena na 760 nm (EDQM, 2013).

3.3. Pripremanje ekstrakata

Biljni materijal je osušen u hladu na sobnoj temperaturi, usitnjen i preliven kipućom vodom (1:20, m/v). Ekstrakcija je vršena tokom narednih 30 minuta uz povremeno mešanje. LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* su dobijeni sledstvenim filtriranjem, hlađenjem i sušenjem zamrzavanjem pripremljenih ekstrakata. Upotrebljeni biljni materijal, prinos ekstrakcije i cilj korišćenja liofilizata u farmakološkim ispitivanjima su dati u Tabeli 3.2.

Tabela 3.2. Prinos liofilizovanih infuza cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i njihovo korišćenje u farmakološkim ispitivanjima.

Vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja	Prinos (% ^a , m/m)	Ispitivanja
<i>F. ulmaria</i>	Zlatibor, jul 2014. god.	28,14%	- antioksidantna aktivnost ^a - antihiperlgezijska aktivnost - antiedematozna aktivnost - akutna toksičnost - citotoksična aktivnost
	Kopaonik, jul 2016. god.	23,80%	- antioksidantna aktivnost ^b - inhibicija sinteze eikozanoida - gastroprotektivna aktivnost
<i>F. vulgaris</i>	selo Loćika (centralna Srbija) maj 2014. god.	31,22%	- antioksidantna aktivnost ^b - inhibicija sinteze eikozanoida - antihiperlgezijska aktivnost - antiedematozna aktivnost - gastroprotektivna aktivnost - akutna toksičnost - citotoksična aktivnost

^a DPPH test, FRAP test, 2-dezoksiriboza test; ^b DPPH test, FRAP test, 2-dezoksiriboza test, određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa u humanom serumu.

3.4. Izolovanje sekundarnih metabolita iz cvasti *F. vulgaris*

3.4.1. Materijali i instrumenti

U postupku izolovanja korišćeni su sledeći adsorbensi za stubnu hromatografiju: silikagel (0,063–0,200 mm, Merck, Germany), oktadecilsilika gel (Sigma-Aldrich, USA) i Sefadeks LH-20 (GE Healthcare Bio-Science, Sweden). Finalno prečišćavanje vršeno je na pločama sa tankim slojem celuloze (Merck, Germany), kertridžima za ekstrakciju na čvrstoj fazi (Bakerbond SPE, C18 Polar+ 1000 mg/6 mL, J.T.Baker, Netherlands) ili pomoću Agilent 1260 tečnog hromatografa opremljenog automatskim

frakcionim kolektorom 1364C i semipreparativnom Zorbax SB-C18 kolonom (9,4 × 250 mm, dijametar čestica 5 μm).

3.4.2. Dobijanje frakcija korišćenih u procesu izolovanja

Pripremanje frakcija A1 i A2

Osušena i usitnjena cvast *F. vulgaris* (178 g, Loćika, 2013. god.) je podvrgnuta postupku bimaceracije na sobnoj temperaturi, sukcesivnom primenom rastvarača rastuće polarosti: *n*-heksana (48 + 24 h), dihlormetana (48 + 24 h) i metanola (48 + 24 h). Odnos mase biljne droge i zapremine upotrebljenih ekstrakcionih sredstava je bio konstantan (1:10). Dobijeni tečni ekstrakti su profiltrirani i upareni pomoću rotacionog vakuum uparivača. Suvi metanolni ekstrakt (56 g, prinos: 31,46%) je zatim podeljen. Veći deo (47 g) je suspendovan u vodi i ekstrahovan etilacetatom u levku za odvajanje. Nakon uklanjanja organskog rastvarača pod sniženim pritiskom, dobijena je etilacetatna frakcija bogata flavonoidnim sastojcima (A1, 4,7 g, prinos: 10%). Manji deo suvog metanolnog ekstrakta (9 g) je suspendovan u vodi i ekstrahovan etrom u levku za odvajanje. Uparavanje ekstrakcionog sredstva je rezultovalo dobijanjem 0,332 g frakcije A2 (prinos: 3,7%).

Pripremanje frakcije A3 i A4

Frakcija A3 je prethodno dobijena (Ćebović i Maksimović, 2012). Osušena i usitnjena cvast *F. vulgaris* (100 g, Zlatibor, 2008. god.) je obezmašćena u aparaturi po Soksletu korišćenjem petroletra i hloroforma. U narednom koraku, biljni materijal je podvrgnut postupku perkolacije pomoću metanola. Nakon filtriranja i uklanjanja organskog rastvarača, dobijen je suvi metanolni ekstrakt (40 g) koji je sledstveno suspendovan u etilacetatu (500 mL) i ostavljen da se meša tokom noći na magnetnoj mešalici. Frakcija A3 (35 g, prinos: 35%) je pripremljena odvajanjem, ispiranjem i sušenjem dela metanolnog ekstrakta koji se nije rastvorio u etilacetatu.

Osam g frakcije A3 je razdvojeno hromatografijom na stubu silikagela (6 × 38 cm) korišćenjem sistema rastvarača rastuće polarosti (CH₂Cl₂/MeOH/H₂O/CH₃COOH, 90/10/0,4/0,1→70/30/1,2/0,3 v/v/v). Prikupljeno je 40 frakcija (100 mL). Frakcije 21–36 (A4, 2,6 g) su spojene na osnovu sličnosti sastava (utvrđeno pomoću HPLC-DAD tehnike).

3.4.3. Postupak izolovanja sekundarnih metabolita

Razdvajanje na stubu sefadeska (I)

Smeša frakcije A1 (700 mg) i A4 (650 mg) je hromatografisana na stubu Sefadexa LH-20 (3 × 52 cm) koristeći apsolutni etanol za eluiranje. Prikupljeno je ukupno 16 frakcija (B1–B16 × 50 mL) čiji je kvalitativni sastav analiziran pomoću HPLC-DAD tehnike.

Prečišćavanje frakcije B3 (145,4 mg) vakuum tečnom hromatografijom na stubu oktadecilsilika gela (1,5 × 26 cm, mobilna faza: 20% acetonitril) rezultovalo je izolovanjem 9,3 mg jedinjenja **1** (gaulterin).

Nakon separacije frakcije B10 (40,2 mg) semipreparativnom HPLC (mobilna faza: 30% acetonitril, protok mobilne faze: 3,3 mL/min), dobijeno je 5,3 mg jedinjenja **2** (kemferol 4'-*O*-glukozid).

Jedinjenje **3** (spireozid) je precipitiralo tokom stajanja B12–B14 u frižideru na +4 °C (150,1 mg). Supernatant je dekantovan, uparen do suvog ostatka (20,8 mg) i razdvojen na tankom sloju celuloze u sistemu rastvarača CH₃COOH:H₂O (30:70). Jedinjenje **4** (astragalin 2''-*O*-galat, 4,2 mg) je izdvojeno na hromatogramu u vidu zone sa R_f vrednošću 0,67.

Dodatne količine spireozida, potrebne za ispitivanje farmakološke aktivnosti, dobijene su ponavljanjem opisanog postupka uz male izmene. Tom prilikom detektovana je frakcija (56,1 mg) bogata jedinjenjem **5** (astragalin), pa je u cilju njegovog izolovanja u čistom stanju izvršena separacija pomenute frakcije hromatografijom na stubu oktadecilsilika gela (1,5 × 24 cm) pod sniženim pritiskom. Eluiranje je sprovedeno izokratski 30% acetonitriлом. Dobijeno je 11,2 mg astragalina.

Razdvajanje na stubu sefadeksa (II)

Smeša frakcije A1 (1,6 g) i A4 (0,65 g) je razdvojena na stubu Sefadeksa LH-20 (3 × 52 cm). Eluiranje je vršeno smešom etanola i metanola (80/20→0/100 v/v), smešom metanola, acetona i vode (80/14/6 v/v/v) i konačno 70% acetonom. Prikupljeno je 40 frakcija (C1–C40 × 50 mL). Tok razdvajanja je praćen pomoću HPLC-DAD.

Zbog značajne sličnosti sastava, frakcije B9 i C10 su spojene i razdvojene na stubu oktadecilsilika gela (1,5 × 26 cm). Kretanje mobilne faze (30% acetonitril) je olakšano vakuumom. Ovim postupkom je izdvojeno 10,6 mg smeše jedinjenja **6** (hiperozid) i jedinjenja **7** (izokvercitrin).

Spojene frakcije C14–C15 (39,5 mg) su prečišćene na pločama sa celulozom u 30% CH₃COOH. Nakon razvijanja hromatograma, zona sa R_f vrednošću 0,57 je sastrugana, ekstrahovana i ekstrakciono sredstvo upareno, tako da je dobijeno 17,8 mg smeše jedinjenja **8** (hiperozid 2''-O-galat) i jedinjenja **9** (izokvercitrin 2''-O-galat).

Iz dela spojenih frakcija C31–C32, pomoću semipreparativne HPLC (mobilna faza: 20% acetonitril, protok: 3,3 mL/min), izdvojeno je 6,1 mg jedinjenja **10** (telimagrandin II). Dodatna količina ovog tanina, potrebna za izvođenje *in vivo* eksperimenata, dobijena je iz frakcija C29–C30 i C33–C34 (ukupno 262,9 mg) uzastopnim prečišćavanjem vakuum hromatografijom na stubu oktadecilsilika gela (1,5 × 26 cm). Mobilnu fazu su činili acetonitril i voda (20:80 v/v). Ovim postupkom je takođe dobijena frakcija (19,4 mg) bogata jedinjenjem **11** (telimagrandin I). Njenim dodatnim prečišćavanjem, korišćenjem semipreparativne HPLC uz gradijentno eluiranje (10–39% acetonitrila (0–9 min), protok mobilne faze: 3,3 mL/min), dobijeno je 8 mg telimagrandina I.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi

Razdvajanje frakcije A2 (0,332 g) na stubu Sefadeksa LH-20 (1,5 × 36 cm) pomoću metanola, pri čemu je prikupljeno 7 frakcija (D1–D7 × 10 mL), je prethodilo ekstrakciji na čvrstoj fazi.

Frakcija D3 je uparena, suspendovana u vodi i naneta na prethodno kondicionirani kertridž za ekstrakciju na čvrstoj fazi. Nakon eluiranja 40% metanolom, izdvojeno je jedinjenje **12** (metilgalat).

Frakcija D4 je takođe uparena, suspendovana u vodi i naneta na kertridž za ekstrakciju na čvrstoj fazi. Eluat prikupljen tokom korišćenja vode kao mobilne faze sadržao je jedinjenje **13** (galna kiselina, 12,2 mg). Dodatna količina jedinjenja **12** dobijena je tokom sledstvenog eluiranja metanolom. Ukupna masa metilgalata dobijena iz frakcija D3 i D4 je bila 22,7 mg.

3.5. Utvrđivanje strukture sekundarnih metabolita cvasti *F. vulgaris*

Sa ciljem da se identifikuju izolovana jedinjenja snimljeni su njihovi UV, MS i NMR spektri.

Ultraljubičasti i maseni spektri izolovanih jedinjenja su dobijeni LC-PDA-MS analizom koristeći Agilent 1260 tečni hromatograf. Razdvajanje je vršeno na reverzno-faznoj analitičkoj koloni (Zorbax SB-C18, 4,6 × 250 mm, dijametar čestica 5 µm) primenom programa eluiranja predstavljenih u Tabeli 3.3., pri temperaturi kolone 25 °C. Mobilnu fazu su činili acetonitril i 0,1% HCOOH.

Tabela 3.3. Programi eluiranja.

Program A ^a			Program B ^b			Program C ^c		
t	MeCN	p	t	MeCN	p	t	MeCN	p
0	10	0,8	0	10	0,8	0	10	0,8
30	90	0,8	5	20	0,8	25	25	0,8
			20	20	0,8	30	25	0,8
			30	70	0,8	35	10	0,8

t, vreme (min); MeCN, acetonitril (% v/v); p, protok (mL/min); ^a korišćen za jedinjenja: **2, 4**; ^b korišćen za jedinjenja: **5, 8, 9, 10, 12, 13**; ^c korišćen za jedinjenja: **1, 3, 6, 7, 11**.

Maseni spektri su snimljeni jednostrukim kvadrupol masenim detektorom (Agilent 6130) pri opsegu masa 100–1000 *m/z*. Elektrosprej jonizacija u negativnom režimu pod atmosferskim pritiskom se odvijala u sledećim uslovima: protok gasa za sušenje 9 L/min (N₂), pritisak raspršivača 40 psig, temperatura gasa za sušenje 350 °C, napon kapilare 3500 V i napon fragmentora 100, 200 i/ili 250 V. U navedenim uslovima

dolazi do raspada izolovanih jedinjenja i pojave signala kvazimolekulskog i drugih fragmentnih jona značajnih za strukturalna određivanja.

Ultraljubičasti spektri (oblast 190–640 nm) su dobijeni pomoću G4212B PDA detektora.

NMR spektri (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz; COSY; HSQC; HMBC) su snimljeni na Bruker AscendTM 400 instrumentu. Svi uzorci su, neposredno pre analize, rastvoreni u deuterisanom metanolu (MeOH- d_4). Hemijska pomeranja (δ) su izražena u ppm, a konstanta sprezanja (J) u Hz. Tetrametilsilan je korišćen kao interni standard ($\delta = 0$ ppm).

3.6. Analiza hemijskog sastava LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* visokoefikasnom tečnom hromatografijom

LIC *F. vulgaris* (Ločika, maj 2014. god.) i *F. ulmaria* (Zlatibor, jul 2014. god.; Kopaonik, jul 2016. god.) su analizirani HPLC-DAD i HPLC-PDA metodom.

Standardne supstance

Astragalin, izokvercitrin, mikvelianin, rutin i elagna kiselina su komercijalni proizvod firme Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Salicilna kiselina, galna kiselina i hiperozid su nabavljeni od firme Roth (Karlsruhe, Germany). Spireozid je dobijen iz vrste *Anthemis triumfetti* (L.) DC. (Pavlović i sar., 2006). Ostala jedinjenja korišćena u kvantitativnoj analizi izolovana su iz cvasti *F. vulgaris* (Rezultati i diskusija 4.2.).

Priprema uzoraka za analizu

Ispitivani liofilizati su pre injektovanja rastvoreni u destilovanoj vodi (koncentracija 2,5 i/ili 5 mg/mL) i profiltrirani kroz membranske filtre 0,45 μm (Econofilter, Agilent Technologies, Germany).

Identifikacija sastojaka LIC

Identifikacija sekundarnih metabolita u analiziranim uzorcima je izvršena poređenjem retencionih vremena i UV spektara nepoznatih jedinjenja i standarda, odnosno nepoznatih jedinjenja i izolovanih jedinjenja čija je struktura prethodno utvrđena.

Određivanje sadržaja HPLC-DAD metodom

HPLC analiza je izvršena pomoću Agilent 1100 tečnog hromatografa opremljenog manuelnim injektorom, binarnom pumpom i detektorom sa nizom dioda (DAD). Razdvajanje je vršeno na koloni Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 × 250 mm, dijametar čestica 5 µm) na temperaturi kolone 25 °C. Zapremina injektovanja je iznosila 20 µL. Binarna mobilna faza se sastojala iz faze A₁ (0,03% H₃PO₄) i faze B₁ (faza A₁ : acetonitril = 10 : 90 v/v). Korišćena su dva programa eluiranja (Tabela 3.4): program eluiranja 1 za kvantifikaciju spireozida (**3**), astragalina (**5**) i salicilne kiseline; i program eluiranja 2 prilikom određivanja sadržaja hiperozida (**6**), izokvercitrina (**7**), galne kiseline (**13**) i elagne kiseline.

Tabela 3.4. Programi eluiranja.

Program eluiranja 1			Program eluiranja 2		
vreme (min)	faza B ₁ (% v/v)	protok (mL/min)	vreme (min)	faza B ₁ (% v/v)	protok (mL/min)
0	10	0,8	0	10	0,8
5	25	0,8	5	15	0,8
15	25	0,8	15	20	1,7
20	30	0,8	19	24	1,2
25	50	0,8	25	54	0,8
30	70	0,8	28	70	0,8
35	10	0,8	30	10	0,8
38	10	0,8	32	10	0,8

Kalibracione krive su pripremljene injektovanjem rastvora standarda ili izolovanih jedinjenja različitih koncentracija:

Analiza je izvršena na talasnoj dužini 210 nm u slučaju galne kiseline (koncentracioni opseg 0,008–0,131 mg/mL; $y = 202385x - 293,76$; $R^2 = 0,9992$) i salicilne kiseline (0,002–0,066 mg/mL; $y = 318761x + 84,572$; $R^2 = 0,9999$); i na 350 nm u slučaju hiperozida (0,006–0,090 mg/mL; $y = 23450x - 20,696$; $R^2 = 0,9993$), astragalina (0,009–0,140 mg/mL; $y = 39970x$; $R^2 = 0,9999$), izokvercitrina (0,01–0,66 mg/mL; $y = 19482x - 10,686$; $R^2 = 1$), spireozida (0,015–0,24 mg/mL; $y = 13213x + 45,692$; $R^2 = 0,9979$) i elagne kiseline (0,008–0,130 mg/mL; $y = 14063x + 62,467$; $R^2 = 0,999$).

Određivanje sadržaja HPLC-PDA metodom

Sadržaj je određen korišćenjem tečnog hromatografa Agilent 1260 opremljenog automatskim injektorom, kvaternom pumpom i PDA detektorom. Separacija je postignuta na Zorbax SB-C18 koloni (4,6 × 250 mm, dijametar čestica 5 μm) pri temperaturi kolone 25 °C. Mobilnu fazu su činili faza A₂ (0,1% HCOOH) i faza B₂ (acetonitril). Prilikom određivanja sadržaja gaulterina (**1**), kemferol 4'-*O*-β-D-glukozida (**2**), hiperozid 2''-*O*-galata (**8**), izokvercitrin 2''-*O*-galata (**9**), telimagrandina II (**10**), telimagrandina I (**11**), metilgalata (**12**), rutina i mikvelianina, eluiranje je sprovedeno prema programu eluiranja 3 (Tabela 3.5.), dok je za kvantifikaciju sadržaja astragalin 2''-*O*-galata (**4**) korišćen program eluiranja 4 (Tabela 3.5.).

Tabela 3.5. Programi eluiranja.

Program eluiranja 3			Program eluiranja 4		
vreme (min)	faza B ₂ (% v/v)	protok (mL/min)	vreme (min)	faza B ₂ (% v/v)	protok (mL/min)
0	10	0,8	0	10	0,8
25	25	0,8	45	25	0,8
30	25	0,8			
35	10	0,8			

Kalibracione krive su pripremljene injektovanjem različitih zapremina osnovnog rastvora jedinjenja (standarda ili izolovanih sekundarnih metabolita).

Apsorbancija je merena na 210 nm prilikom određivanja sadržaja gaulterina (opseg injektovane mase jedinjenja 0,48–9,6 µg, $y = 1470,6x + 283,1$, $R^2 = 0,9994$); na 270 nm prilikom kvantifikacije telimagrandina I (0,85–21,25 µg, $y = 1485,5x - 512,23$, $R^2 = 0,9995$) i telimagrandina II (0,58–11,6 µg, $y = 1697x - 97,92$, $R^2 = 0,9999$); dok je sadržaj smeše hiperozid 2''-O-galata i izokvercitrin 2''-O-galata (0,44–13,2 µg, $y = 750,42x + 139,19$, $R^2 = 0,9975$), kemferol 4'-O-β-D-glukozida (0,35–8,75 µg, $y = 827,83x + 85,585$, $R^2 = 0,9995$), rutina (0,16–9,6 µg, $y = 878,78x + 157,45$, $R^2 = 0,9984$) mikvelianina (0,5–15 µg, $y = 870,49x + 7,2115$, $R^2 = 1$) i astragalin 2''-O-galata (1–15 µg, $y = 459,95x + 44,949$, $R^2 = 0,999$) određen merenjem apsorbancije jedinjenja na 350 nm.

Statistička analiza

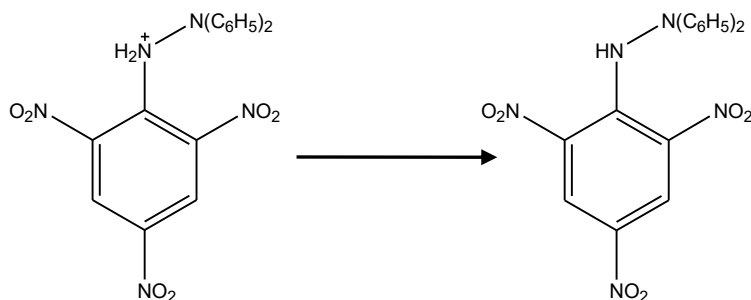
Statistička obrada podataka je vršena u programu SPSS (verzija 20.0) primenom jednofaktorske ANOVA-e i *post hoc* Tukey testa. Postojanje statistički značajne razlike srednjih vrednosti sadržaja sastojaka LIC je prihvaćeno za kriterijum $p < 0,05$.

3.7. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Antioksidantni kapacitet LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i izolovanog flavonoida (spireozida) je procenjen *in vitro* ispitivanjem njihove sposobnosti da neutrališu DPPH i OH• radikal, i redukuju kompleks feri-jona (Fe^{3+}) i 2,4,6-tripiridil-*s*-triazina. U cilju potpunijeg sagledavanja antioksidantnog potencijala takođe je testirana njihova sposobnost da *in vitro* umanje oksidativni stres u humanom serumu indukovan dodatkom egzogene prooksidantne supstance. Eksperimenti u kojima se koristi biološki materijal, poput humanog seruma, omogućuju bolji uvid u realni protektivni kapacitet testiranih ekstrakata/supstanci, jer se na taj način određuje njihova sposobnost da zaštite biološki relevantne molekule (npr. proteine). Rezultati ovih analiza mogu biti značajni za objašnjenje mehanizama koji se nalaze u osnovi farmakoloških efekata cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria*. Aktivnosti ispitivanih biljnih izolata su upoređene sa aktivnošću kontrolnih supstanci (askorbinska kiselina, kvercetin, Trolox – hidrosolubilni ekvivalent vitamina E).

3.7.1. Test neutralisanja DPPH radikala

Zasniva se na spektrofotometrijskom praćenju promene boje do koje dolazi kada ispitivani uzorci redukuju stabilni ljubičasti 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal do žuto obojenog proizvoda (DPPH-H) (Slika 3.1.) (Cuendet i sar., 1997).



Slika 3.1. Redukcija DPPH radikala pod uticajem antioksidanasa (Popović, 2013).

Intenzitet neutralizacije DPPH radikala (I) je dobijen korišćenjem izraza:

$$I(\%) = (A_k - A_a) / A_k \times 100, \text{ gde je}$$

A_k – apsorbancija kontrole,

A_a – apsorbancija analize.

Rezultati su izraženi kao IC_{50} vrednost tj. koncentracija ekstrakta/jedinjenja kojom se neutrališe 50% DPPH radikala.

Postupak (Kukić i sar., 2006) je predstavljen u Tabeli 3.6.

Tabela 3.6. Postupak izvođenja testa neutralisanja DPPH radikala.^a

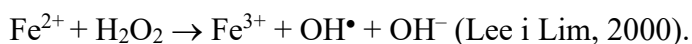
	Analiza	Kontrola
LIC/spireozid ^b	100 μ L	-
Metanol	do 2 mL	2 mL
DPPH (0,5 mM)	0,5 mL	0,5 mL

^a Nakon dodavanja DPPH reagensa, uzorci su snažno promućkani i inkubirani tokom trideset minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Zatim je merena njihova apsorbancija na 517 nm u odnosu na slepu probu (metanol).

^b Rastvori različitih koncentracija liofilizovanih infuza cvasti (LIC) ili spireozida.

3.7.2. Test neutralisanja OH• radikala (2-dezoksiriboza test)

Hidroksilni (OH•) radikal je najreaktivniji radikal *in vivo* i verovatno je finalni medijator većine tkivnih oštećenja koja nastaju pod uticajem slobodnih radikala. Lako stupa u reakcije sa gotovo svim molekulima, kao što su npr. ugljeni hidrati, aminokiseline, lipidi i nukleotidi (Pham-Huy i sar., 2008; Young i Woodside, 2001). Test neutralisanja OH• radikala se zasniva na degradaciji 2-dezoksiriboze do koje dolazi pod njegovim uticajem. Proizvodi raspadanja reaguju sa tiobarbiturnom kiselinom pri čemu se formiraju ljubičasti kompleksi sa maksimumom apsorbcije na 532 nm. Intenzitet nastale boje je obrnuto srazmeran sposobnosti uzoraka da neutrališu OH• radikal koji nastaje u Fentonovoj reakciji u prisustvu askorbata:



Intenzitet neutralizacije OH• radikala (I) je dobijen primenom formule:

$I(\%) = (\text{Ak} - \text{Aa}) / \text{Ak} \times 100$, gde je

Ak – apsorbancija kontrole,

Aa – apsorbancija analize.

Rezultat je izražen kao IC₅₀ vrednost tj. koncentracija ekstrakta/jedinjenja koja redukuje nivo nastalog OH• radikala za 50%.

Postupak: Uzorci, pripremljeni na način prikazan u Tabeli 3.7., su inkubirani tokom jednog sata na 37 °C. Nakon toga su im dodati 1 mL 2,8% rastvora trihlorsirćetne kiseline i 1 mL 1% rastvora tiobarbiturne kiseline u 0,05M NaOH. U sledećem koraku je vršeno zagrevanje tokom 15 min na 100 °C. Uzorci su ohlađeni i njihova apsorbancija je odmah merena na 532 nm (u odnosu na slepu probu) (Kukić i sar., 2006).

Tabela 3.7. Priprema uzoraka za 2-dezoksiriboza test (Kukić-Marković, 2013).

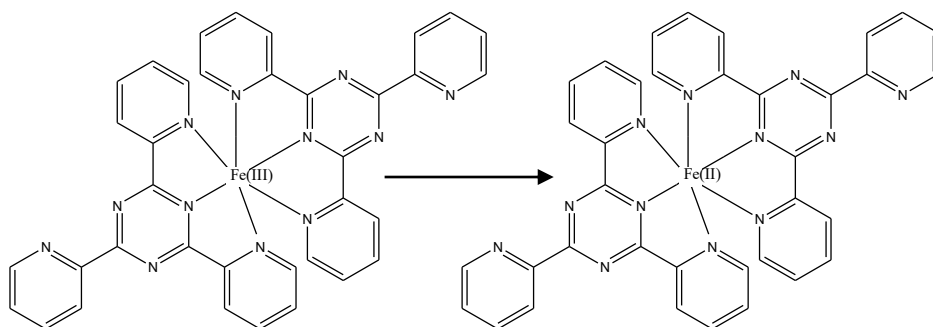
	Analiza	Kontrola	Slepa proba
FeCl ₃ (0,004 M)	100 µL	100 µL	-
EDTA (0,004 M)	100 µL	100 µL	-
2-Dezoksiriboza (0,05 M)	200 µL	200 µL	200 µL
LIC/spireozid ^a	10 µL	-	-
Metanol	-	10 µL	10 µL
L-Askorbinska kiselina (0,004 M)	100 µL	100 µL	-
H ₂ O ₂ (1,5%)	20 µL	20 µL	-
Fosfatni pufer (pH = 7,4; I = 0,1)	do 4 mL	do 4 mL	do 4 mL

^a Rastvori različitih koncentracija liofilizovanih infuza cvasti (LIC) ili spireozida.

3.7.3. Ukupna antioksidantna aktivnost (FRAP test)

Redukciona sposobnost ispitivanih preparata *F. ulmaria* i *F. vulgaris* i njihovog kvantitativno dominantnog flavonolnog heterozida (spireozida) procenjena je FRAP (eng. *Ferric Reducing Antioxidant Power*) testom koji se zasniva na promeni boje: Fe³⁺-2,4,6-tripiridil-*s*-triazin (Fe³⁺-TPTZ) kompleks se redukuje do plavo obojenog Fe²⁺-TPTZ kompleksa (Slika 3.2.) (Luximon-Ramma i sar., 2002; Prior i sar., 2005; Szöllősi i Szöllősi Istvánné Varga, 2002). Rezultat je izražen kao FRAP vrednost (mmol Fe²⁺/g ispitivanog LIC/spireozida) koja predstavlja broj mmol Fe²⁺ jona koji ima istu redukcionu sposobnost kao 1 g ispitivanog ekstrakta ili jedinjenja.

Postupak: Uzorci, pripremljeni na način prikazan u Tabeli 3.8., su inkubirani tokom pet minuta na sobnoj temperaturi, a zatim je merena njihova apsorbanacija na 593 nm. FRAP vrednost je dobijena korišćenjem kalibracione krive zavisnosti apsorbanacije od koncentracije gvožđe(II)-sulfata (100–1000 µM) (Kukić i sar., 2006).



Slika 3.2. Fe^{3+} -TPTZ + redukcionno sredstvo \rightarrow Fe^{2+} -TPTZ (intenzivno plavo obojen kompleks) (Prior i sar., 2005).

Tabela 3.8. FRAP test.

	Analiza	Standardni rastvor	Slepa proba
LIC/spireozid ^a	150 μL	-	-
Rastvor Fe(II) -sulfata ^b	-	150 μL	-
Rastvarač ($\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$)	-	-	150 μL
FRAP reagens ^c	4,5 mL	4,5 mL	4,5 mL

^a Vodeni rastvor liofilizovanog infuza cvasti (LIC) ili metanolni rastvor spireozida.

^b Rastvor Fe(II) -sulfata (100–1000 μM).

^c FRAP reagens se izrađuje mešanjem 25 mL acetatnog pufera (300 mM, pH 3,6), 2,5 mL TPTZ rastvora (10 mM TPTZ u 40 mmol/L HCl) i 2,5 mL vodenog rastvora FeCl_3 (20 mM).

3.7.4. Određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu


Antioksidantna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i kvantitativno dominantnog flavonoida ovih ekstrakata (spireozida) je procenjena *in vitro* u humanom serumu nakon indukovanja oksidativnog stresa egzogenim oksidansom *tert*-butilhidroperoksidom (TBH). U ispitivanju je korišćen serumski pul dobijen spajanjem i mešanjem seruma zdravih dobrovoljaca. Čuvan je na -20 °C, najduže tokom dve nedelje. Šema oglednog protokola je predstavljena u Tabeli 3.9. Svi uzorci su postavljeni u triplicatu. Testirani preparati i jedinjenja (LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, spireozid, hidrosolubilni ekvivalent vitamina E – Trolox) su dispergovani u pogodnom solvensu (vodi, metanolu ili etanolu). Dvadeset pet µL pripremljenih rastvora rastućih koncentracija (200–3200 µg/mL) je dodato u 450 µL humanog seruma i intenzivno promešano. Uzorci su dalje inkubirani na 37 °C tokom jednog sata na vodenom kupatilu. Naredni korak je podrazumevao aplikovanje 25 µL 0,5 mM rastvora TBH, a zatim je nastavljena inkubacija još sat vremena. Odmah po završetku ovog koraka, spektrofotometrijski su određeni parametri oksidativno-stresnog statusa (totalni antioksidativni status, TAS; totalni oksidativni status, TOS; prooksidativno-antioksidativni balans, PAB) pomoću ELISA čitača (ELISA Microplatereader with processor LKB 5060-006, LKB Vertriebs GmbH, Austria) i izračunat je parametar antioksidativni indeks (AI). Vrednosti parametara su dobijene korišćenjem prethodno konstruisanih kalibracionih krivih (TAS, $y = -0,00052x - 0,0198$; TOS, $y = 0,0083x + 0,022$; PAB, $y = 0,015x - 0,657$). Rezultati su izraženi u procentima u odnosu na kontrolne uzorke, primenom formule:

TAS/PAB/TOS/AI (%) = (Srednja vrednost parametra analiziranih uzoraka iste koncentracije preparata ili jedinjenja / srednja vrednost parametra kontrolnih uzorka) × 100.

Statistička obrada je vršena u programu SPSS (verzija 20.0) primenom jednofaktorske ANOVA-e i *post hoc* Tukey testa. Postojanje statistički značajne razlike između vrednosti parametra ispitivanih uzoraka i vrednosti istog parametra kontrolnih uzoraka je prihvaćeno za kriterijum $p < 0,05$.

Tabela 3.9. Priprema uzoraka prilikom određivanja parametara oksidativno-stresnog statusa u humanom serumu.

Uzorak	450 μ L	25 μ L	25 μ L
Analizirani uzorci	Serum	3,2 mg/mL LIC ^a /S ^b	TBH ^c
		1,6 mg/mL LIC ^a /S ^b	
		0,8 mg/mL LIC ^a /S ^b	
		0,4 mg/mL LIC ^a /S ^b	
		0,2 mg/mL LIC ^a /S ^b	
Referentni uzorci	Serum	3,2 mg/mL Trolox-a ^d	TBH ^c
		1,6 mg/mL Trolox-a ^d	
		0,8 mg/mL Trolox-a ^d	
		0,4 mg/mL Trolox-a ^d	
		0,2 mg/mL Trolox-a ^d	
Kontrolni uzorci	Serum	Rastvarač	TBH ^c


 spektrofotometrijsko određivanje parametara oksidativno-stresnog statusa

^a Rastvor liofilizovanog infuza cvasti (LIC) *F. vulgaris* ili *F. ulmaria*.

^b Rastvor spireozida.

^c Rastvor *tert*-butilhidroperoksida (0,5 mM).

^d Rastvor Trolox-a (hidrosolubilnog ekvivalenta vitamina E).

Totalni antioksidativni status (TAS)

Određivanje totalnog antioksidativnog statusa ili kapaciteta se zasniva na osobini 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS) da menja boju u zavisnosti od svog oksidacionog stanja (Erel, 2004). ABTS⁺ katjon je intenzivno plavozelene (smaragdne) boje u kiseljoj sredini (acetatni pufer, pH=3,6) u prisustvu vodonik-peroksida, dok je redukovani molekulski oblik bezbojan. Po dodatku reagensa koji sadrži ABTS⁺ katjon u serum, dolazi do smanjenja intenziteta boje srazmernog količini ukupnih antioksidanasa prisutnih u uzorku. Rezultati su izraženi kao broj mmol Trolox ekvivalenata/L, na osnovu standardne krive koja opisuje zavisnost merene apsorbancije od koncentracije Troloxa. Postupak određivanja TAS je prikazan u Tabeli 3.10.

Tabela 3.10. Postupak određivanja totalnog antioksidativnog statusa (Baralić, 2012).^a

	Analiza	Standardi	Slepa proba
Serum	12,5 µL	-	-
Reagens 1 ^b	200 µL	200 µL	200 µL
Reagens 2 ^c	37,5 µL	37,5 µL	37,5 µL
Rastvor standarda ^d	-	12,5 µL	-
Dejonizovana voda	-	-	12,5 µL

^a Nakon što su dodati svi reagensi, vršena je inkubacija tokom 10 min na sobnoj temperaturi i merena apsorbancija ($\lambda = 660$ nm).

^b Acetatni pufer (0,4 mol/L; pH = 5,8). Stabilan je šest meseci na +4 °C.

^c Rastvor ABTS. Stabilan je šest meseci na +4 °C. Dobijen je rastvaranjem 0,549 g ABTS u 100 mL smeše (30 mL acetatnog pufera (30 mmol/L, pH = 3,6) + 70 mL rastvora vodonik-peroksida (2 mmol/L)) i sledstvenim inkubiranjem tokom jednog sata na sobnoj temperaturi, pri čemu je formiran plavozeleni ABTS⁺ katjon.

^d Rastvor Trolox-a (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilhroman-2-karboksilne kiseline – hidrosolubilnog ekvivalenta vitamina E). Supstanca je rastvorena u fosfatnom puferu (30 mmol/L, pH = 7,4) tako da koncentracija bude u opsegu 0,125–2 mmol/L.

Totalni oksidativni status (TOS)

Određivanje totalnog oksidativnog statusa ili potencijala vrši se u cilju procene količina ukupnih prisutnih oksidacionih molekula (vodonik-peroksida i lipidnih hidroperoksida) u serumu. U osnovi ovog ispitivanja nalazi se molekulom glicerola olakšana konverzija fero jona (Fe^{2+} -*orto*-dianizidnog kompleksa) u feri jon (Fe^{3+}), do koje dolazi pod uticajem oksidanasa. Nastali feri jon gradi narandžasti kompleks sa ksilenol-oranžom u kiseloj sredini. Intenzitet dobijene boje se meri spektrofotometrijski na 560 nm i srazmeran je količini ukupnih oksidanasa u serumu. Rezultat se izražava u $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{L}$, na osnovu standardne krive vodonik-peroksida ($c(\text{H}_2\text{O}_2) = 10\text{--}200$ $\mu\text{mol/L}$) (Erel, 2005). Postupak određivanja TOS je prikazan u Tabeli 3.11.

Tabela 3.11. Postupak određivanja totalnog oksidativnog statusa (Baralić, 2012).^a

	Analiza	Standard	Slepa proba
TOS 1 ^b	450 µL	450 µL	450 µL
TOS 2 ^c	22 µL	22 µL	-
Serum	70 µL	-	-
Dejonizovana voda	-	-	70 µL
Standard	-	70 µL	-

^a Uzorci, pripremljeni na način prikazan u tabeli, inkubirani su tokom tri minuta i odmah zatim je merena njihova apsorbancija na 560 nm.

^b TOS 1. Pripremljen je rastvaranjem 114 mg ksilenol-oranža i 8,18 g NaCl u 900 mL sumporne kiseline ($c = 25$ mM) i dodavanjem 100 mL glicerola. pH Vrednost je podešena tako da iznosi 1,75.

^c TOS 2. 1,96 g Feroamonijumsulfata i 3,17 g *o*-dianizidin dihidrohlorida je rastvoreno u 1000 mL H₂SO₄ ($c = 25$ mM).

Prooksidativno-antioksidativni balans (PAB)

Koncentracija vodonik-peroksida u antioksidativnom okruženju je određena zahvaljujući osobini 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) da menja boju u zavisnosti od svog oksidacionog stanja: redukovani molekularni oblik je bezbojan, dok je katjon plavo obojen. Po dodatku rastvora TMB⁺ katjona serumu, plava boja je intenzivnija što je koncentracija oksidanasa veća. Rezultati predstavljaju koncentraciju vodonik-peroksida (%) u uzorku. Dobijeni su pomoću standardne krive konstruisane korišćenjem rastvora sa različitim odnosom mokraćne kiseline i vodonik-peroksida (udeo vodonik-peroksida 0–100%). Ove dve supstance su izabrane kao predstavnici antioksidanasa odnosno oksidanasa, jer ne reaguju međusobno i stupaju nezavisno u reakciju sa hromogenom. U prisustvu enzima peroksidaze, vodonik-peroksid oksiduje TMB do plavo obojenog katjona. Nasuprot tome, reakcija mokraćne kiseline i TMB⁺ katjona, tokom koje dolazi do obezbojavanja, nije enzimski katalizovana (Alamdari i sar., 2007). Postupak određivanja PAB (Baralić, 2012) je prikazan u Tabeli 3.12.

Tabela 3.12. Postupak određivanja prooksidativno-antioksidativnog balansa.^a

	analiza	standard	slepa proba
Serum	10 µL	-	-
Standardni rastvor ^b	-	10 µL	-
Destilovana voda	-	-	10 µL
Radni rastvor ^c	180 µL	180 µL	180 µL
HCl (2 mol/L)	40 µL	40 µL	40 µL

^a Nakon dodavanja HCl, boja uzoraka je promenjena iz plave u žutu. Spektrofotometrijsko merenje je vršeno na 450 nm.

^b Standardni rastvor. U eksperimentu su korišćene različite koncentracije standardnog rastvora izrađene mešanjem 1 mmol/L vodonik-peroksida i 6 mmol/L mokraćne kiseline u sledećim odnosima: 0:100, 25:75, 50:50, 75:25 i 100:1.

^c Radni rastvor. Pripremljen je neposredno pred upotrebu šestominutnim mešanjem (u mraku na sobnoj temperaturi) rastvora dobijenog spajanjem 1 mL rastvora TMB⁺ katjona i 10 mL TMB II rastvora.

Rastvor TMB⁺ katjona. Smeša 50 mL acetatnog pufera (0,05M, pH = 4,5), 1 mL TMB I rastvora (TMB/DMSO) i 175 µL rastvora hloramina T (100 mmol/L) je inkubirana jedan sat na tamnom mestu pri temperaturi 37 °C uz stalno mešanje. Nakon toga je dodat enzim peroksidaza (25U). Čuvan je na -20 °C.

TMB II rastvor. 200 µL TMB I rastvora je rastvoreno u 10 mL acetatnog pufera (0,05M, pH = 5,6). Čuvan je na 4 °C, ne duže od dva dana.

TMB I rastvor. 60 mg TMB je rastvoreno u 10 mL dimetilsulfoksida. Čuvan je na -20 °C.

Antioksidativni indeks (AI)

Vrednosti AI su dobijene deljenjem vrednosti TAS određenog uzorka sa vrednošću TOS dobijenom za isti uzorak. Veće vrednosti AI indikuju bolju antioksidativnu zaštitu.

3.8. Ispitivanje uticaja na biosintezu eikozanoida

Sposobnost LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris*, kao i pojedinih izolovanih jedinjenja cvasti *F. vulgaris*, da utiču na produkciju eikozanoida ispitana je *ex vivo* koristeći humane trombocite neposredno nakon isteka njihovog roka za humanu upotrebu (Beara i sar., 2015; Lesjak i sar., 2013). Praćen je efekat ispitivanih ekstrakata/jedinjenja na sintezu:

- prostaglandina E₂ (PGE₂),
- tromboksana B₂ (TXB₂),
- i 12-hidroksieikozatetraenske kiseline (12-HETE).

Formiranje navedenih medijatora je inicirano dodatkom kalcijumove jonofore. Njihova koncentracija je određena LC-MS/MS tehnikom. Inhibicija produkcije eikozanoida, I, je dobijena primenom izraza:

$$I(\%) = (\text{Pk}-\text{Pa})/\text{Pk} \times 100, \text{ gde je}$$

Pk – površina pika praćenog metabolita u kontrolnoj reakciji/površina pika internog standarda (prostaglandina B₂),

Pa – površina pika praćenog metabolita u analizi/površina pika internog standarda (prostaglandina B₂).

Rezultati, dobijeni analizom u Origin softveru (verzija 8), su izraženi kao IC₅₀, odnosno koncentracija LIC/jedinjenja koja smanjuje nastanak praćenog eikozanoida za 50%. Dati su kao srednja vrednost tri merenja ± standardna devijacija. Podaci su statistički analizirani korišćenjem SPSS softvera (verzija 20.0), primenom jednofaktorske ANOVA-e i *post hoc* Tukey testa. Postojanje statistički značajne razlike srednjih vrednosti IC₅₀ je prihvaćeno za kriterijum $p < 0,05$.

Postupak (Beara i sar., 2015; Lesjak i sar., 2013): Humani trombociti (2 mL) su izloženi delovanju rastvora ekstrakta/jedinjenja u dimetilsulfoksidu (0,1 mL) i rastvora kalcijumove jonofore A23187 (0,1 mL; $c = 125 \mu\text{mol/L}$) tokom 2 minuta na 37 °C uz blago mešanje. U sledećem koraku, uzorcima je dodan vodeni rastvor CaCl₂ (0,3 mL; $c = 16,7 \text{ mmol/L}$) i nastavljena je inkubacija tokom 5 min na 37 °C. Inicirana reakcija je zaustavljena podešavanjem pH vrednosti na 3 pomoću 1% mravlje kiseline. Nakon toga, uzorcima je dodano 50 μL rastvora internog standarda prostaglandina B₂ ($c = 6 \mu\text{g/mL}$).

Sledstvena petnaestominutna ekstrakcija je izvršena koristeći 0,8 mL smeše hloroforma i metanola (1:1) uz intenzivno mešanje. Uzorci su zatim centrifugirani (7012 × g; 15 min, 4 °C), sloj organskih rastvarača je odvojen, uparen do suva i rastvoren u 0,5 mL metanola. Dobijeni rastvori su analizirani LC-MS/MS tehnikom u modu „multiple reactions monitoring” i negativnoj jonizaciji. Uslovi analize su bili podešeni na sledeći način:

- za TXB₂ (napon fragmentora: 120V; signal jona prekursora: m/z 369; energija kolizije: 15V; signal fragmentnog jona m/z 169; retenciono vreme: 0,23 min),
- za PGE₂ (napon fragmentora: 120V; signal jona prekursora: m/z 351; energija kolizije: 15V; signal fragmentnog jona m/z 271; retenciono vreme: 0,24 min),
- za PGB₂ (napon fragmentora: 120V; signal jona prekursora: m/z 333; energija kolizije: 13V; signal fragmentnog jona m/z 315; retenciono vreme: 0,31 min)
- i za 12-HETE (napon fragmentora: 120V; signal jona prekursora: m/z 319; energija kolizije: 7V; signal fragmentnog jona m/z 301; retenciono vreme: 0,96 min).

3.9. *In vivo* farmakološka ispitivanja

3.9.1. Eksperimentalne životinje

U oglecima su korišćeni mužjaci *Wistar* pacova (180–220 g) i *Swiss Webster* miševa (20–30 g) nabavljeni na Odeljenju za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja, Instituta za medicinska istraživanja, Vojnomedicinske akademije, Beograd. Pacovi su korišćeni za procenu antihiperlgezijske, antiedematozne i gastroprotektivne aktivnosti, dok su miševi korišćeni za ispitivanje akutne toksičnosti. Životinje su, po dopremanju u prostorije Vivarijuma Farmaceutskog fakulteta, smeštene u kaveze od pleksiglasa sa žičanim poklopcem i dato im je dovoljno vremena za adaptaciju na nove uslove sredine. U kavez je smeštano 5–6 pacova, odnosno 5–6 miševa. Sterilisana strugotina je korišćena kao prostirka. Hrana (specijalni briketi, Vetzavod, Subotica) i pijaća voda su bili dostupni *ad libitum*, osim u periodu pred eksperiment i tokom eksperimenata. Životinje su čuvane u standardnim laboratorijskim uslovima (vlažnost vazuha: 60%; ambijentalna temperatura: 20–25 °C; ciklus svetlost/mrak: 12/12 h). Zdravstveno stanje životinja je kontrolisano svakodnevno. Bihevioralni eksperimenti su

sprovedeni u slepom maniru uvek u isto vreme, između 8:00 i 16:00 h, da bi se izbegle diurnalne varijacije. Životinje su u eksperimentima korišćene samo jednom. Nakon završetka ogleada, životinje su žrtvovane u komori sa rastućom koncentracijom CO₂, a nakon toga su odložene na propisan način do finalnog otpremanja koje sprovodi Javno komunalno preduzeće „Veterina Beograd”. Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (Uprava za veterinu) Republike Srbije i Etički komitet Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta su odobrili ispitivanja na životinjama (br. dozvole: 323-07-1253/2018-05). Ogledi su sprovedeni poštujući etičke principe Pravilnika za rad sa eksperimentalnim životinjama Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta, Vodič za čuvanje i upotrebu laboratorijskih životinja američkog Nacionalnog instituta zdravlja (eng. *National institute of health guide for the care and use of laboratory animals*, 2011) i Direktive 2010/63/EU Evropskog parlamenta i Saveta Evrope.

3.9.2. Ispitivanje antihiperalgzijske i antiedematozne aktivnosti

Antihiperalgzijska i antiedematozna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* je ispitana u eksperimentalnom modelu inflamacije šape pacova indukovane karageninom.

Indukcija inflamacije i primenjeni tretmani

Inflamacija zadnje desne šape pacova je izazvana intraplantarnom (*i.pl.*) injekcijom karagenina (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) (0,1 mL/šapi; 1% m/v; dispergovan u fiziološkom rastvoru) (Morris, 2003; Stepanović-Petrović i sar., 2012). Karageninska inflamacija karakteriše se crvenilom, edemom i bolnom preosetljivošću (hiperalgezijom) (Morris, 2003; Stepanović-Petrović i sar., 2012; Vivancos i sar., 2004). Opisani model je iskorišćen za testiranje antihiperalgzijske i antiedematozne aktivnosti LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*. Acetilsalicilna kiselina (Bayer Bitterfeld GmbH, Germany) je bila referentna supstanca.

Životinje, kojima su prethodno uskraćeni hrana i voda, su tretirane suspenzijom LIC ili acetilsalicilne kiseline u destilovanoj vodi (u zapremini od 2 mL/kg, *p.o.*). LIC su aplikovani oralnom sondom 30 min pre injektovanja karagenina, dok je acetilsalicilna kiselina primenjena oralno 30 min nakon injektovanja karagenina. Šematski prikaz oglednog dizajna je predstavljen u Tabeli 3.13.

Tabela 3.13. Ogledni dizajn ispitivanja antihiperalgezijske i antiedematozne aktivnosti.

Animalni model	Grupe	Tretman
Model akutne inflamacije šape pacova	Kontrola 1	Vehikulum (peroralno) + 1% rastvor karagenina (100 µL, supkutano u šapu)
		LIC <i>F. vulgaris</i>
Inflamatorni somatski bol i otok su izazvani intraplantarnom injekcijom karagenina.	Test grupe 1–4	(peroralno, 100–300 mg/kg) + 1% rastvor karagenina (100 µL, supkutano u šapu)
		LIC <i>F. ulmaria</i>
Razvoj mehaničke hiperalgezije je praćen upotrebom električnog <i>Von Frey</i> aparata, dok je razvoj edema praćen pletizmometrom.	Test grupe 5–8	(peroralno, 100–300 mg/kg) + 1% rastvor karagenina (100 µL, supkutano u šapu)
	Kontrola 2 (referentni lek)	Acetilsalicilna kiselina (peroralno, 400 mg/kg) + 1% rastvor karagenina (100 µL, supkutano u šapu)

LIC, liofilizovani infuz cvasti.

Procena antihiperalgezijske aktivnosti

Nakon injektovanja karagenina, razvoj mehaničke hiperalgezije i antihiperalgezijski efekat LIC ili acetilsalicilne kiseline bili su procenjeni merenjem praga povlačenja šape (eng. *paw withdrawal threshold* – PWT) pomoću električnog *Von Frey* anesteziometra (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) (Vivancos i sar., 2004). Pacovi su smešteni u transparentne, plastične kutije, na površini metalne rešetke. Dozvoljeno im je da se aklimatizuju 30 min pre početka eksperimenta. Mehanički stimulus je primenjen pomoću plastičnog, semi-fleksibilnog filameta: vrh filameta je aplikovan pod pravim uglom na plantarnu površinu zadnje desne šape sa postepenim povećanjem pritiska. Sila (u gramima) neophodna da izazove brzo povlačenje šape je automatski beležena na digitalnom ekranu. Prosečna vrednost četiri merenja PWT je korišćena prilikom daljeg računanja.

Bazalne PWT vrednosti su merene pre tretmana (karagenin + vehikulum ili karagenin + LIC/acetilsalicilna kiselina). Vrednosti PWT nakon tretmana su merene u sedam vremenskih tačaka, tokom perioda od 300 min nakon injektovanja karagenina. Rezultati su izraženi kao razlika (df) između bazalnih i post-tretmanskih PWT koristeći sledeću formulu (Vivancos i sar., 2004):

df = bazalna PWT pre indukcije inflamacije (g) - PWT nakon indukcije inflamacije (g).

Antihiperalgezijska aktivnost (%AH) je dobijena primenom sledeće formule (Stepanović-Petrović i sar., 2012):

%AH = [(srednja vrednost df kontrolne grupe - df pojedinačne životinje u test grupi) / (srednja vrednost df kontrolne grupe)] × 100.

Ukoliko je df vrednost dobijena za pojedinačnu životinju u test grupi veća od srednje vrednosti u kontrolnoj grupi, AH (%) je dodeljena vrednost 0.

Procena antiedematozne aktivnosti

Antiedematozna aktivnost je procenjena pomoću pletizmometra (UgoBasile, Comerio, Italy), određivanjem povećanja zapremine šape nakon injektovanja karagenina (Stepanović-Petrović i sar., 2012). Uređaj za merenje čine dva povezana vertikalno postavljena cilindra, ispunjena vodenim rastvorom elektrolita i sredstva za kvašenje. Nakon uranjanja šape pacova do tibio-tarzalnog zgloba u veći cilindar, zapremina istisnute tečnosti (jednaka zapremini šape) se meri i direktno očitava na digitalnom displeju. Bazalni volumen šape je meren pre tretmana (karagenin + vehikulum ili karagenin + LIC/acetilsalicilna kiselina). Zapremina šape nakon tretmana je merena u sedam vremenskih tačaka, tokom perioda od 300 minuta nakon injektovanja karagenina. Rezultati su izraženi kao razlika (dV) između zapremine šape nakon tretmana i bazalne zapremine šape, primenom sledeće formule:

dV = zapremina inflamirane šape (mL) nakon tretmana - bazalni volumen šape (mL).

Merenje je ponovljeno dva puta u svakoj vremenskoj tački i prosečna vrednost dV svake životinje je korišćena u daljem računanju.

Procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) je izračunat primenom sledeće formule (Stepanović-Petrović i sar., 2012):

%AE = [(srednja vrednost dV kontrolne grupe - dV pojedinačne životinje u test grupi) / (srednja vrednost dV kontrolne grupe)] × 100.

Ukoliko je dV vrednost pojedinačne životinje u test grupi bila veća od prosečne dV vrednosti u kontrolnoj grupi, AE (%) je dodeljena vrednost 0.

Statistička obrada rezultata

Program Pharm PCS (Pharmacological Calculation System) (Micro-Computer Specialists, Philadelphia, PA, USA) je korišćen za farmakološka izračunavanja. ED₅₀ vrednosti (doze koje ostvaruju 50 %AH odnosno %AE) sa 95% intervalom poverenja su dobijene linearnom regresijom iz odgovarajuće krive odnosa doze i efekta u vreme postizanja maksimalnog efekta (izražene kao %AH, odnosno %AE) (Tallarida i Murray, 1986).

Statistička analiza je vršena u programu SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Richmond, California, USA). Rezultati ispitivanja antihiperalgzijske i antiedematozne aktivnosti su predstavljeni kao srednje vrednosti u grupi ± SEM (standardna greška). Razlika između srednjih vrednosti odgovarajućih grupa je testirana primenom dvofaktorske ANOVA-e sa ponovljenim merenjima i Tukey HSD *post hoc* testa. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

3.9.3. Ispitivanje akutne toksičnosti

Četiri sata pre početka eksperimenta, životinjama su bili uskraćeni hrana i voda. Toksičnost, nakon jednokratne peroralne primene velikih doza LIC (*F. vulgaris* 2000 mg/kg, *F. ulmaria* 2000 mg/kg, u zapremini od 10 mL/kg), je preliminarno ispitana u miševa. Šematski prikaz oglednog dizajna je predstavljen u Tabeli 3.14. Nakon aplikacije ekstrakata, praćeni su znaci koji mogu ukazati na promenjeno zdravstveno stanje (npr. piloerekcija, letargija, vokalizacija, osetljivost na zvuk i dodir, smanjena ili povećana pokretljivost, tremor, agresija, iscedak iz nosa ili oka i dr.) i mortalitet. Posmatranje je vršeno u kontinuitetu prvih 30 min nakon davanja LIC, periodično

tokom prvog dana, a zatim ujutru i uveče narednih 14 dana. Sve vreme trajanja eksperimenta, hrana i voda su bili dostupni *ad libitum*.

Tabela 3.14. Ogledni dizajn ispitivanja akutne toksičnosti.

Ogled	Grupe	Tretman
<p>Nakon aplikovanja ispitivanih ekstrakata, životinje su posmatrane u cilju otkrivanja eventualnih znakova toksičnosti. Praćeni su položaj tela i repa, nakostrešenost dlake, sekrecija iz nosa i oka, unošenje hrane i vode, ponašanje, vokalizacija i mortalitet.</p>	Kontrola	Vehikulum (voda, 10 mL/kg, peroralno)
	Test grupa 1	LIC <i>F. vulgaris</i> (2000 mg/kg, peroralno)
	Test grupa 2	LIC <i>F. ulmaria</i> (2000 mg/kg, peroralno)

3.9.4. Ispitivanje gastroprotektivnog delovanja

Sposobnost ekstrakata cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i izolovanih metabolita cvasti *F. vulgaris* da zaštite želudačnu sluzokožu ispitana je u modelu akutnog ulkusa/gastritisa pacova izazvanog apsolutnim etanolom. Ispitivanje je sprovedeno na mužjacima *Wistar* pacova (6–8 nedelja starosti, prosečna masa 220 g). Nakon dopremanja u laboratoriju, životinjama je dozvoljeno da se aklimatizuju tokom perioda od dve nedelje. Dvadeset sati pre početka eksperimenta, pacovima je uskraćena hrana, dok su tokom tog perioda imali slobodan pristup pijaćoj vodi. Gastrične lezije su indukovane apsolutnim etanolom (5 mL/kg, *p.o.*). Testirani LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (100–300 mg/kg, *p.o.*) i izolovana jedinjenja spireozid (50 mg/kg, *p.o.*) i telimagrandin II (40 mg/kg, *p.o.*) su aplikovani jedan sat pre izazivanja lezija, u zapremini od 1 mL/kg (Tabela 3.15.). Životinje u kontrolnim grupama su tretirane ranitidinom (20 mg/kg, *p.o.*; Zdravlje Actavis, Srbija) ili vehikulumom (voda, 1 mL/kg, *p.o.*).

Tabela 3.15. Ogledni dizajn ispitivanja gastroprotektivne aktivnosti.

Animalni model	Grupe	Tretman
Model akutnog gastritisa/ulkusa želuca Oštećenje sluzokože želuca izazvano je peroralnom aplikacijom apsolutnog etanola. Intenzitet nastalih lezija izražen je kao gastrični skor prema Adamijevom modifikovanom sistemu nakon makroskopske analize sluzokože.	Kontrolna grupa	Vehikulim (<i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)
	Ogledne grupe 1–3	LIC <i>F. vulgaris</i> (100–300 mg/kg, <i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)
	Ogledne grupe 4–6	LIC <i>F. ulmaria</i> (100–300 mg/kg, <i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)
	Ogledna grupa 7	Spireozid (50 mg/kg, <i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)
	Ogledna grupa 8	Telimagrandin II (40 mg/kg, <i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)
	Kontrolna grupa koja prima lek	Ranitidin (20 mg/kg, <i>p.o.</i>) + apsolutni etanol (5 mL/kg, <i>p.o.</i>)

LIC, liofilizovani infuz cvasti.

Jedan sat nakon aplikovanja apsolutnog etanola, životinje su žrtvovane u komori sa rastućom koncentracijom ugljen-dioksida. Zatim je iz njih uklonjen želudac, otvoren duž veće krivine i ispran fiziološkim rastvorom. Lezije su posmatrane pomoću lupe (3×) na osvetljenom postolju. Intenzitet oštećenja sluzokože je izražen kao skor gastričnog oštećenja (eng. *Gastric Damage Score*, GDS) i bodovan prema modifikovanoj Adamijevoj skali (Tabela 3.16.).

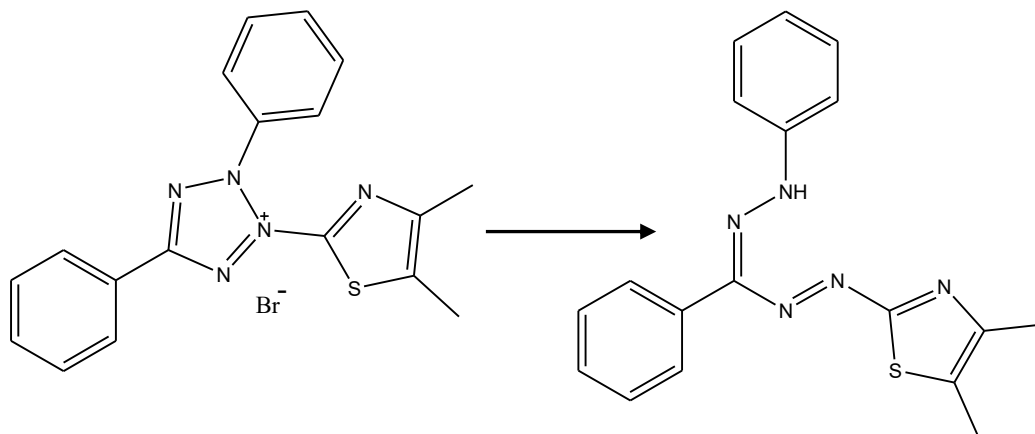
Statistička značajnost razlike (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$) između srednjih vrednosti GDS oglednih i kontrolnih grupa je testirana primenom Mann-Whitney *U*-testa u SPSS softveru, verzija 20.0 (Đorđević i sar., 2012).

Tabela 3.16. Modifikovana Adamijeva skala za ocenjivanje intenziteta gastričnih lezija (Đorđević i sar., 2012).

Skor	Stepen oštećenja
0	nema uočljivih lezija
0,5	blaga hiperemija ili ≤ 5 petehija
1	≤ 5 erozija ≤ 5 mm u dužini
1,5	≤ 5 erozija ≤ 5 mm u dužini i puno petehija
2	6–10 erozija ≤ 5 mm u dužini
2,5	1–5 erozija > 5 mm u dužini
3	> 5 –10 erozija > 5 mm u dužini
3,5	> 10 erozija > 5 mm u dužini
4	1–3 erozije ≤ 5 mm u dužini i 0,5–1 mm u širini
4,5	4–5 erozija ≤ 5 mm u dužini i 0,5–1 mm u širini
5	1–3 erozije > 5 mm u dužini i 0,5–1 mm u širini
6	4–5 lezija kategorije 5
7	≥ 6 lezija kategorije 5
8	kompletna lezija sluzokože sa hemoragijom

3.10. Ispitivanje citotoksične aktivnosti

Citotoksičnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, kao i jedinjenja cvasti *F. vulgaris* (spireozida, hiperozida, galne kiseline), ispitana je MTT testom (eng. *Microculture Tetrazolium Test*) – modifikovanom metodom po Mosmanu (Ohno i Abe, 1991; Pavlović, 2015). U eksperimentu su korišćene tumorske ćelijske linije grlića materice (HeLa), kolona (LS) i pluća (A549) i zdrave ćelije – fetalni fibroblasti pluća (MRC-5). Test je zasnovan na redukciji žute hidrosolubilne soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromida do plavoljubičastog liposolubilnog formazana pod uticajem mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze (Slika 3.3.). Intenzitet nastale plavoljubičaste boje je meren spektrofotometrijski na 570 nm i srazmeran je broju živih, metabolički aktivnih ćelija u eksponencijalnoj fazi rasta u ćelijskoj kulturi. Rezultati su izraženi kao IC₅₀ koncentracija – koncentracija testiranih preparata/jedinjenja koja smanjuje vijabilnost ćelija za 50% (Pavlović, 2015).



Slika 3.3. Redukcija MTT reagensa do plavoljubičastog formazana (Popović, 2013).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

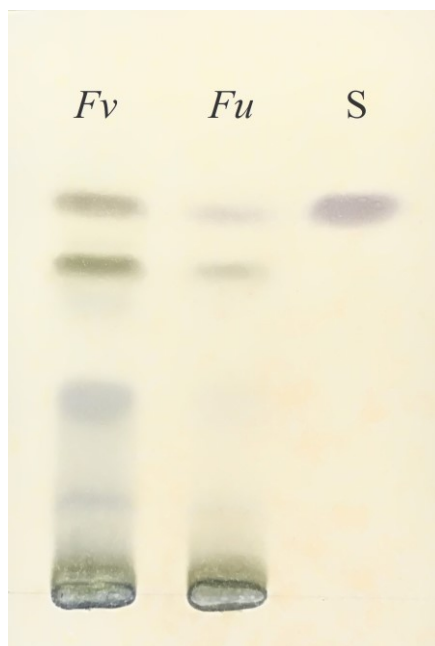
4.1. Rezultati preliminarne makroskopske, mikroskopske i hemijske analize cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

Organoleptičkom analizom je utvrđeno da ispitivane biljne droge poseduju blag slatkast miris, koji podseća na metilsalicilat. Ukusa su gorkog i adstringentnog. Cvast *F. ulmaria* karakteriše se sferičnim, žućkastobelim cvetnim pupoljcima, brojnim pojedinačnim petalama krem ili bele boje i mnoštvom fragmenata prašnika. Cvast *F. vulgaris* čine nešto krupniji cvetni pupoljci, takođe loptastog oblika i žućkasto bele boje (mada se mogu primetiti i pupoljci beloružičaste boje), a uočava se i puno belih do krem kruničnih listića i fragmenata prašnika.

U pulverizovanim biljnim drogama (cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria*) su uočeni sledeći fragmenti: delovi epidermisa kruničnih i čašičnih listića sa anomocitnim stomama, jednoćelijski 50–150 µm dugi trihomi zadebljalih zidova, antere sa fibrozim slojevima, mnogobrojna polenova zrna glatke egzine i loptastog oblika prečnika 16–20 µm.

Nakon razvijanja hromatograma, sledstvenog sušenja i derivatizacije Fe(III)-hloridom, zone na pločama su posmatrane na dnevnoj svetlosti. U skladu sa monografijom *Spiraeae flos* Nemačkog kodeksa lekova, na drugoj trećini hromatograma ispitivanih preparata uočena je zona ljubičaste boje koja po položaju ($R_f = 0,65$) i boji odgovara zoni na hromatogramu poredbenog rastvora salicilne kiseline. Neposredno ispod ove zone, javile su se oblasti zelenožute boje ($R_f = 0,55$). Na prvoj trećini hromatograma uočene su dve zone ($R_f = 0,33$ i $R_f = 0,15$) tamnoplave boje. TLC profili ispitivanih biljnih droga su slični u značajnoj meri (Slika 4.1.).

Ukupni pepeo, gubitak sušenjem, sadržaji flavonoida i tanina su dati u Tabeli 4.1. Dobijeni parametri, osim sadržaja flavonoida u cvasti *F. ulmaria*, su bili u skladu sa zahtevima navedenim u monografiji *Spiraeae flos* Nemačkog kodeksa lekova. Ukupni pepeo, kao i sadržaji flavonoida i tanina su bili viši u cvasti *F. vulgaris* u odnosu na cvast *F. ulmaria*, dok je gubitak sušenjem bio niži.



Slika 4.1. TLC hromatogram preparata cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.
Fv – *Filipendula vulgaris*, *Fu* – *Filipendula ulmaria*, S – salicilna kiselina.

Tabela 4.1. Parametri opšteg i specifičnog kvaliteta cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

	%	
	cvast <i>F. ulmaria</i>	cvast <i>F. vulgaris</i>
Ukupni pepeo	5,29 ± 0,12	6,15 ± 0,10
Gubitak sušenjem	7,77 ± 0,10	7,38 ± 0,05
Sadržaj flavonoida	1,67	2,58
Sadržaj tanina	8,68	9,08

Rezultati ispitivanja kvaliteta su pokazali značajnu sličnost ispitivanih biljnih droga i opravdali sprovođenje dalje uporedne hemijske i farmakološke analize.

4.2. Određivanje strukture sekundarnih metabolita izolovanih iz cvasti *F. vulgaris*

Primenom različitih hromatografskih tehnika razdvajanja (Materijali i metode, sekcija 3.4.) iz cvasti *F. vulgaris* je izolovano 13 jedinjenja: jedan fenolni heterozid (jedinjenje **1**), osam flavonoidnih heterozida (jedinjenja **2–5**, smeša jedinjenja **6 i 7**, smeša jedinjenja **8 i 9**), dva tanina (jedinjenja **10, 11**), jedan derivat fenolkarboksilne kiseline (jedinjenje **12**) i jedna fenolkarboksilna kiselina (jedinjenje **13**) (Slike 4.2.–4.14.).

Strukture izolovanih metabolita su utvrđene poređenjem dobijenih UV, MS, ^1H i ^{13}C NMR spektralnih podataka sa literaturnim podacima i izračunatim molekulskim masama.

Jedinjenje **1** identifikovano je kao gaulterin (metilsalicilat β -primeverozid, metilsalicilat 2-*O*- β -D-ksilozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid) (Cong i sar., 2015; Moon i sar., 1996; Wang i sar., 2011), **2** kao kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid (Lim i sar., 2004; Scheer i Wichtl, 1987), **3** kao spireozid (kvercetin 4'-*O*- β -D-glukozid) (Bukreeva i Shukhobodskii, 1987; Fossen i sar., 1998; Lim i sar., 2004; Pavlović, 2008), **4** kao kemferol 3-*O*-(2''-*O*-galoil- β -D-glukozid) (astragalin 2''-*O*-galat) (Isobe i sar., 1980; Ochir i sar., 2013), **5** kao astragalin (kemferol 3-*O*- β -D-glukozid) (Han i sar., 2004; Lee i sar., 2007; J. H. Lee i sar., 2004; Slimestad i sar., 1995), smeša **6 i 7** (~ 1:3 m/m, na osnovu integracije ^1H NMR spektra i HPLC-UV hromatograma) kao smeša hiperozida (kvercetin 3-*O*- β -D-galaktozida) i izokvercitrina (kvercetin 3-*O*- β -D-glukozida) (Cota i sar., 2012; He i sar., 2010; Lee i sar., 2007; Wen i sar., 2017; Wu i sar., 2012; Zdunić, 2012), smeša **8 i 9** (~ 1:2 m/m, na osnovu integracije ^1H NMR spektra i HPLC-UV hromatograma) kao smeša hiperozid 2''-*O*-galata (kvecetin 3-*O*-(2''-*O*-galoil- β -D-galaktozida) i izokvercitrin 2''-*O*-galata (kvecetin 3-*O*-(2''-*O*-galoil- β -D-glukozida) (Isobe i sar., 1979; Kawakami i sar., 2011; Kim i sar., 1998; Ochir i sar., 2013; Pakulski i Budzianowski, 1996; Yazaki i sar., 1989), **10** kao telimagrandin II (eugenin, 1,2,3-trigaloil-4,6-heksahidroksidifenoil- β -D-glukozid) (Chen i sar., 2014; Feldman i Sahasrabudhe, 1999; Lee i sar., 2005; Wilkins i Bohm, 1976), **11** kao telimagrandin I (Chen i sar., 2014; Fecka, 2009; Hatano i sar., 1988; Wilkins i

Bohm, 1976), **12** kao metilgalat (Cheng i sar., 2009; Gudej, 2003; Şöhretoğlu i sar., 2009) i **13** kao galna kiselina (Chandramohan Reddy i sar., 2010; Cheng i sar., 2009; Faried i sar., 2007; Shen i sar., 2013). Sva navedena jedinjenja su ranije identifikovana u *F. vulgaris* (Baczek i sar., 2012; Olennikov i Kruglova, 2013; Pukalskienė i sar., 2015), sa izuzetkom jedinjenja **1**, **4**, **9** i **12**.

4.2.1. Spektri flavonoidnih heterozida

Jedinjenja **2–9** su identifikovana kao flavonoidni heterozidi (glikozidi kvercetina i kemferola) na osnovu snimljenih UV, MS i NMR spektara.

Ultraljubičasti spektri dobijeni LC-PDA analizom su karakteristični za flavonolne heterozide. U saglasnosti su sa literaturnim podacima prema kojima ovaj tip sekundarnih metabolita daje dve apsorbcione trake: traku I u oblasti 352–385 nm (osim kada je hidroksilna grupa u položaju 3 supstituisana, pa je traka hipsohromno pomerena ka oblasti 328–357 nm) i traku II u oblasti 250–270 nm. Dodatno, ukoliko je prsten B supstituisan hidroksilnim grupama u položaju 3' i 4', na traci II se uočavaju dva maksimuma ili maksimum i „rame” (jedinjenja **3**, **6–9**), dok traka II glikozida sa hidroksilnom grupom u položaju 4' poseduje jedan maksimum (jedinjenja **2**, **4** i **5**) (Mabry i sar., 1970).

Masa molekula je izračunata zahvaljujući signalima kvazimolekulskih jona [M-H]⁻ koji su se javili u masenim spektrima snimljenim pri naponu fragmentora 100 V. Nakon povećanja napona fragmentora (250 V) primećeni su signali koji potiču od aglikonskog dela molekula.

U ¹H NMR spektrima izolovanih flavonoidnih heterozida signali aromatičnih protona uočeni su u oblasti 6–8,2 ppm. Signali protona prstena B heterozida kvercetina (jedinjenje **3**, smeša jedinjenja **6** i **7**, smeša jedinjenja **8** i **9**) javili su se u obliku singleta ili dubleta sa daljinskom konstantom sprežanja 2,1 Hz (H-2'), kao dublet (J ~ 8,5 Hz) ili dvostruki dublet (J = 8,5, 2,1 Hz) (H-6'), odnosno u obliku dubleta sa vicinalnom konstantom sprežanja ~ 8,5 Hz (H-5'). Heterozidi kemferola (jedinjenja **2**, **4**, **5**), za razliku od heterozida kvercetina, u prstenu B poseduju po dva hemijski ekvivalentna protona, pa se kod ovih jedinjenja mogu uočiti dva dubleta sa vicinalnom konstantom sprežanja ~ 8–9 Hz koja potiču od H-2',6' i H-3',5'. Signali protona H-8 i H-6 javili su

se kao singleti ili dubleti sa daljinskom konstantom sprezanja ~ 2 Hz. Anomerni protoni šećera (H-1'') dali su dublet u oblasti sa hemijskim pomeranjem 4,9–5,25 ppm ($J = 5,4$ – $7,8$ Hz), dok su se ostali signali protona šećera nalazili u oblasti 3–4 ppm (jedinjenja **2**, **3**, **5**, smeša jedinjenja **6** i **7**). Međutim, u slučaju jedinjenja **4** i smeše jedinjenja **8** i **9**, signali protona H-1'' (d, $J \sim 8$ Hz) i H-2'' (t, $J \sim 9$ Hz) su se nalazili na većim hemijskim pomeranjima u odnosu na odgovarajuće signale flavonoida čije hidroksilne grupe u položaju 2'' nisu acilovane. Dodatno, ^1H NMR spektre jedinjenja **4** i smeše jedinjenja **8** i **9** karakterisalo je prisustvo singleta ($\delta = 7,12$ ppm) koji potiče od protona galne kiseline (estarskom vezom povezana sa C-2'' šećera).

Signali ugljenika aglikonskog dela molekula izolovanih flavonoida nalazili su se u oblasti 178,13–93,08 ppm, dok su se signali glikona javili u oblasti 104,04–60,56 ppm ^{13}C spektara.

Identitet glikozidnih jedinica utvrđen je poređenjem snimljenih ^{13}C spektara i odgovarajućih literaturnih podataka.

Položaj vezivanja glikozidnih jedinica utvrđen je na osnovu značajnih korelacija u HMBC spektrima. U slučaju jedinjenja **4** i smeše jedinjenja **8** i **9**, mesto vezivanja galne kiseline za šećernu komponentu flavonoidnih molekula utvrđeno je korišćenjem HMBC i COSY spektara. Pojava da su signali C-1'' i C-3'' u acilovanim jedinjenjima (jedinjenje **4**, smeša jedinjenja **8** i **9**) pomereni ka višem magnetnom polju u odnosu na signale odgovarajućih atoma u neacilovanim analogima (jedinjenje **5**, smeša jedinjenja **6** i **7**) u saglasnosti je sa literaturnim podacima (Pakulski i Budzianowski, 1996).

4.2.2. Spektri elagnih tanina

Jedinjenja **10** i **11** su identifikovana kao elagni tanini na osnovu snimljenih UV, MS i NMR spektara.

UV spektri dobijeni LC-PDA analizom poseduju dva maksimuma čiji je položaj u skladu sa literaturnim podacima. Naime, UV spektre elagnih tanina koji u svojoj strukturi sadrže esterifikovanu galnu kiselinu karakterišu dva maksimuma, u oblastima ~ 210 – 220 nm i ~ 270 – 280 nm (Jourdes i sar., 2012).

MS spektri (napon fragmentora 100 V) su omogućili utvrđivanje molekulske mase na osnovu signala kvazimolekuskog jona $[M-H]^-$.

Aromatični protoni jedinjenja **10** i **11** dali su signale (singlete) u oblasti 6,46–7,05 ppm u 1H NMR spektrima. Signali protona centralno postavljene glukoze uočeni su na relativno visokim hemijskim pomeranjima (3,83–6,11 ppm), što je očekivano s obzirom da su hidroksilne grupe šećerne komponente acilovane.

Signali (^{13}C) koji potiču od fenolkarboksilnih kiselina koje ulaze u sastav izolovanih elagnih tanina su uočeni u oblasti 168,39–106,85 ppm, dok su signali glikonskog dela ovih molekula detektovani u oblasti 95,73–62,33 ppm.

COSY, HSQC i HMBC spektri su u skladu sa utvrđenim strukturama.

4.2.3. Spektri fenolnog heterozida, fenolkarboksilne kiseline i njenog derivata

Na osnovu snimljenih UV, MS i NMR spektara, jedinjenje **1** je identifikovano kao fenolni heterozid, jedinjenje **13** kao fenolkarboksilna kiselina, dok je utvrđeno da struktura jedinjenja **12** odgovara derivatu fenolkarboksilne kiseline.

UV spektri su pokazali dva maksimuma apsorpcije. Prema literaturnim podacima, derivati benzoeve kiseline daju apsorbcione maksimume u oblasti 200–290 nm (Robbins, 2003).

MS spektri (napon fragmentora 100 V) su omogućili utvrđivanje molekulske mase izolovanih metabolita na osnovu signala kvazimolekuskog jona $[M-H]^-$. Pri naponu fragmentora 250 V, uočeni su signali fragmentih jona poreklom od aglikonskog dela molekula (jedinjenje **1**) ili signali nastali cepanjem molekula (jedinjenja **12** i **13**).

Protonski spektri jedinjenja **12** i **13** su najjednostavniji među odgovarajućim spektrima izolovanih sekundarnih metabolita cvasti *F. vulgaris*. Jedinjenje **12** dalo je dva singleta: jedan u aromatičnom regionu na hemijskom pomeranju 7,04 ppm i jedan poreklom od protona metil grupe na hemijskom pomeranju 3,81 ppm. U slučaju fenolkarboksilne kiseline **13** uočen je jedan signal ($\delta = 7,06$ ppm). 1H NMR spektar fenolnog heterozida **1** karakterisali su signali aromatičnih protona ($\delta = 7,12$ – $7,76$ ppm), anomernih protona ($\delta = 4,87$ i $4,33$ ppm), neanomernih protona šećerne komponente ($\delta = 3,10$ – $4,13$ ppm) i protona metil grupe ($\delta = 3,89$ ppm) koji su dali singlet. Položaji

vezivanja saharidnog dela molekula i metil grupe za aglikon utvrđeni su na osnovu karakterističnih korelacija u HMBC spektru.

Aromatični ugljenikovi atomi i ugljenik karbonilne grupe jedinjenja **1** dali su signale u oblasti 167,13–117,83 ppm ^{13}C spektra. Signali glikona su se javili u saharidnoj oblasti ($\delta = 104,09\text{--}65,49$ ppm), dok je na najnižem hemijskom pomeranju uočen signal ugljenikovog atoma (C-8) metil grupe ($\delta = 51,39$ ppm). Slično, u spektru derivata fenolkarboksilne kiseline **12** su uočeni signali poreklom od ugljenika metil grupe ($\delta = 50,86$ ppm), aromatičnih (145,10–108,66 ppm) i karbonilnog ($\delta = 167,63$ ppm) ugljenika. Uzevši u obzir izostanak signala metil grupe, ^{13}C NMR spektar jedinjenja **13** je pokazao veliku sličnost sa odgovarajućim spektrom jedinjenja **12**.

4.2.4. Spektralni podaci izolovanih jedinjenja

Jedinjenje 1 (gaulterin, metilsalicilat β -primeverozid, metilsalicilat 2-O- β -D-ksilozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid)

UV λ_{max} : 232, 286 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 491,1 $[\text{M}+\text{HCOOH}-\text{H}]^-$.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 151 Y_0^- , 445,10 $[\text{M}-\text{H}]^-$, 891,1 $[2\text{M}-\text{H}]^-$.

^1H NMR (400 MHz, MeOD): δ 7,76 (1H, *dd*, $J = 7,8, 1,4$ Hz, H-6), 7,60–7,53 (1H, *m*, H-4), 7,45 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz, H-3), 7,12 (1H, *t*, $J = 7,5$ Hz, H-5), 4,33 (1H, *d*, $J = 7,4$ Hz, H-1''), 4,13 (1H, *d*, $J = 11,6$ Hz, H-6' β), 3,89 (3H, *s*, H-8), 3,84 (1H, *dd*, $J = 11,5, 5,3$ Hz, H-5'' β), 3,78 (1H, *dd*, $J = 11,7, 6,4$ Hz, H-6' α), 3,70–3,10 (8H, H-2'–H-5', H-2''–H-4'', H-5'' α).

^{13}C NMR (101 MHz, CD_3OD): δ 167,13 (C-7), 157,23 (C-2), 133,96 (C-4), 130,63 (C-6), 122,3 (C-5), 120,94 (C-1), 117,83 (C-3), 104,09 (C-1''), 102,54 (C-1'), 76,31 (C-3''), 76,24 (C-5'), 76,05 (C-3'), 73,58 (C-2''), 73,55 (C-2'), 69,93 (C-4'), 69,8 (C-4''), 68,49 (C-6'), 65,49 (C-5''), 51,39 (C-8).

Jedinjenje 2 (kemferol 4'-O-β-D-glukozid)

UV λ_{\max} : 266, 320, 364 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 447,1 [M-H]⁻, 895,1 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 284 [Y_o-H]⁻, 447 [M-H]⁻, 895,1 [2M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 8,18 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-2' i H-6'), 7,22 (2H, *d*, *J* = 8,4 Hz, H-3' i H-5'), 6,40 (1H, *s*, H-8), 6,18 (1H, *s*, H-6), 5,03 (1H, *d*, *J* = 5,4 Hz, H-1''), 3,92 (1H, *d*, *J* = 12,0 Hz, H-6'' α), 3,72 (1H, *dd*, *J* = 12,0, 5,5 Hz, H-6'' β), 3,38–3,54 (4H, H-2''–H-5'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 176,10 (C-4), 164,69 (C-7), 161,16 (C-5), 158,81 (C-4'), 156,99 (C-9), 145,75 (C-2), 136,34 (C-3), 128,98 (C-2', C-6'), 125,22 (C-1'), 116,07 (C-3', C-5'), 103,15 (C-10), 100,49 (C-1''), 98,08 (C-6), 93,20 (C-8), 76,89 (C-5''), 76,62 (C-3''), 73,50 (C-2''), 70,00 (C-4''), 61,15 (C-6'').

Jedinjenje 3 (spireozid, kvercetin 4'-O-β-D-glukozid)

UV λ_{\max} : 252, 268 (sh), 366 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 463 [M-H]⁻, 927,1 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 301,1 Y_o⁻, 463 [M-H]⁻, 927,1 [2M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,75 (1H, *s*, H-2'), 7,69 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-6'), 7,28 (1H, *d*, *J* = 8,7 Hz, H-5'), 6,37 (1H, *s*, H-8), 6,18 (1H, *s*, H-6), 4,92 (1H, *d*, *J* = 6,9 Hz, H-1''), 3,94 (1H, *d*, *J* = 12,0 Hz, H-6'' α), 3,74 (1H, *dd*, *J* = 12,0, 5,2 Hz, H-6'' β), 3,59–3,40 (4H, *m*, H-2''–H-5'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 176,06 (C-4), 164,35 (C-7), 161,12 (C-5), 156,87 (C-9), 146,70 (C-2), 146,51 (C-3'), 145,48 (C-4'), 136,54 (C-3), 126,25 (C-1'), 119,88 (C-6'), 116,30 (C-5'), 115,14 (C-2'), 103,19 (C-10), 102,08 (C-1''), 97,95 (C-6), 93,08 (C-8), 77,01 (C-5''), 76,18 (C-3''), 73,44 (C-2''), 69,95 (C-4''), 61,06 (C-6'').

Jedinjenje 4 (kemferol 3-O-(2''-O-galoil-β-D-glukozid, astragalin 2''-O-galat)

UV λ_{\max} : 268, 296 (sh), 348 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 599,1 [M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 285 Y_o⁻, 599,1 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,95 (2H, *d*, *J* = 8,6 Hz, H-2' i H-6'), 7,12 (2H, *s*, H-2''' i H-6'''), 6,84 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-3' i H-5'), 6,35 (1H, *s*, H-8), 6,17 (1H, *s*, H-6), 5,73 (1H, *d*, *J* = 7,9 Hz, H-1''), 5,10 (1H, *t*, *J* = 8,7 Hz, H-2''), 3,78 (1H, *d*, *J* = 11,8 Hz, H-6''), 3,65 (1H, *t*, *J* = 9,0 Hz, H-3''), 3,58 (1H, *dd*, *J* = 11,6, 5,5 Hz, H-6''), 3,41 (1H, *t*, *J* = 9,3 Hz, H-4'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 177,80 (C-4), 166,28 (C-7'''), 164,32 (C-7), 161,74 (C-5), 160,02 (C-4'), 156,97 (C-9), 156,93 (C-2), 144,94 (C-3''', C-5'''), 138,42 (C-4'''), 133,43 (C-3), 130,69 (C-2', C-6'), 121,39 (C-1'), 120,16 (C-1'''), 114,81 (C-3', C-5'), 109,19 (C-2''', C-6'''), 104,50 (C-10), 99,13 (C-6), 98,34 (C-1''), 93,20 (C-8), 77,35 (C-5''), 74,98 (C-3''), 74,58 (C-2''), 70,28 (C-4''), 61,14 (C-6'').

Jedinjenje 5 (astragalin, kemferol 3-O-β-D-glukozid)

UV λ_{\max} : 266, 348 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 447 [M-H]⁻, 985,1 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 284 [Y_o-H]⁻, 447 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, MeOD): δ 8,05 (2H, *d*, *J* = 8,9 Hz, H-2' i H-6'), 6,88 (2H, *d*, *J* = 8,9 Hz, H-3' i H-5'), 6,39 (1H, *d*, *J* = 1,9 Hz, H-8), 6,20 (1H, *d*, *J* = 2 Hz, H-6), 5,25 (1H, *d*, *J* = 7,3 Hz, H-1''), 3,69 (1H, *dd*, *J* = 11,9, 2,2 Hz, H-6'' α), 3,53 (1H, *dd*, *J* = 11,9, 5,4 Hz, H-6'' β), 3,48–3,18 (4H, H-2''–H-5'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 178,13 (C-4), 164,58 (C-7), 161,67 (C-5), 160,16 (C-4'), 157,72 (C-9), 157,11 (C-2), 134,1 (C-3), 130,88 (C-2', C-6'), 121,41 (C-1'), 114,68 (C-3', C-5'), 104,36 (C-10), 102,77 (C-1''), 98,5 (C-6), 93,37 (C-8), 77,00 (C-5''), 76,66 (C-3''), 74,35 (C-2''), 69,99 (C-4''), 61,27 (C-6'').

Jedinjenje 6 (hiperozid, kvercetin 3-O-β-D-galaktozid)

UV λ_{\max} : 256, 266 (sh), 354 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 463 [M-H]⁻, 927,1 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 300 [Y_o-H]⁻, 463 [M-H]⁻, 927,1 [2M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,84 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-2'), 7,58 (1H, *dd*, *J* = 8,5, 2,1 Hz, H-6'), 6,86 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 6,38 (1H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-8), 6,2 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-6), 5,16 (1H, *d*, *J* = 7,8 Hz, H-1''), 3,65 (1H, *dd*, *J* = 11,1, 6,0 Hz, H-6'' α), 3,87–3,32 (~5H, H-2''–H-5'', H-6'' β).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 178,13 (C-4), 164,65 (C-7), 161,59 (C-5), 157,41 (C-2), 157,03 (C-9), 148,54 (C-4'), 144,4 (C-3'), 134,39 (C-3), 121,55 (C-6'), 121,49 (C-1'), 116,4 (C-5'), 114,68 (C-2'), 104,23 (C-10), 104,04 (C-1''), 98,5 (C-6), 93,32 (C-8), 75,78 (C-5''), 73,71 (C-3''), 71,79 (C-2''), 68,63 (C-4''), 60,56 (C-6'').

Jedinjenje 7 (izokvercitrin, kvercetin 3-O-β-D-glukozid)

UV λ_{\max} : 256, 266 (sh), 354 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 463 [M-H]⁻, 927 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 300 Y_o⁻, 463 [M-H]⁻, 927 [2M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,71 (3H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-2'), 7,58 (3H, *dd*, *J* = 8,5, 2,1 Hz, H-6'), 6,87 (3H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 6,38 (3H, *d*, *J* = 2,1 Hz, H-8), 6,2 (3H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-6), 5,25 (3H, *d*, *J* = 7,5 Hz, H-1''), 3,72 (3H, *dd*, *J* = 11,9, 2,2 Hz, H-6'' α), 3,23 (3H, *ddd*, *J* = 9,5; 5,2; 2,3 Hz, H-3''), 3,87–3,32 (~8H, H-2'', H-4'', H-5'', H-6'' β).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 178,1 (C-4), 164,61 (C-7), 161,64 (C-5), 157,64 (C-2), 157,07 (C-9), 148,45 (C-4'), 144,5 (C-3'), 134,24 (C-3), 121,8 (C-6'), 121,69 (C-1'), 116,19 (C-5'), 114,61 (C-2'), 104,3 (C-10), 102,97 (C-1''), 98,5 (C-6), 93,32 (C-8), 76,98 (C-5''), 76,73 (C-3''), 74,34 (C-2''), 69,84 (C-4''), 61,18 (C-6'').

Jedinjenje 8 (hiperozid 2''-O-galat, kvecetin 3-O-(2''-O-galoil-β-D-galaktozid)

UV λ_{\max} : 258 (sh), 266, 358 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 615 [M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 301 Y_o⁻, 615 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,63 (1H, *s*, H-2'), 7,48 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-6'), 7,12 (*s*, 2H), 6,77 (1H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 6,33 (1H, *s*, H-8), 6,16 (1H, *s*, H-6), 5,65 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-1''), 5,44 (1H, *t*, *J* = 8,9 Hz, H-2''), 3,95–3,33 (~5H, H-3''–H-6'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 177,79 (C-4), 166,76 (C-7'''), 164,30 (C-7), 161,70 (C-5), 156,88 (C-2), 156,69 (C-9), 148,33 (C-4'), 144,91 (C-3''', C-5'''), 144,52 (C-3'), 138,42 (C-4'''), 133,77 (C-3), 121,75 (C-6'), 121,62 (C-1'), 120,22 (C-1'''), 115,77 (C-5'), 114,83 (C-2'), 109,23 (C-2''', C-6'''), 104,44 (C-10), 99,93 (C-1''), 98,33 (C-6), 93,16 (C-8), 76,06 (C-5''), 73,17 (C-3''), 72,06 (C-2''), 69,18 (C-4''), 60,68 (C-6'').

Jedinjenje 9 (izokvercitrin 2''-O-galat, kvecetin 3-O-(2''-O-galoil-β-D-glukoizid)

UV λ_{\max} : 258 (sh), 266, 358 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 615 [M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 250 V): 301 Y_o⁻, 615,1 [M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,56 (2H, *s*, H-2'), 7,52 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-6'), 7,12 (*s*, 4H), 6,82 (2H, *d*, *J* = 8,5 Hz, H-5'), 6,33 (2H, *s*, H-8), 6,16 (2H, *s*, H-6), 5,72 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-1''), 5,13 (2H, *t*, *J* = 8,7 Hz, H-2''), 3,95–3,33 (~10H, H-3''–H-6'').

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 177,72 (C-4), 166,41 (C-7'''), 164,30 (C-7), 161,70 (C-5), 156,90 (C-2), 156,85 (C-9), 148,28 (C-4'), 144,91 (C-3''', C-5'''), 144,56 (C-3'), 138,45 (C-4'''), 133,63 (C-3), 121,97 (C-6'), 121,75 (C-1'), 120,12 (C-1'''), 115,68 (C-5'), 114,75 (C-2'), 109,23 (C-2''', C-6'''), 104,48 (C-10), 99,28 (C-1''), 98,33 (C-6), 93,16 (C-8), 77,30 (C-5''), 75,04 (C-3''), 74,65 (C-2''), 70,20 (C-4''), 61,11 (C-6'').

Jedinjenje 10 (telimagrandin II, eugenin)

UV λ_{\max} : 218, 280 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 468,2 $[M-2H]^{2-}$, 937 $[M-H]^{-}$.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 200 V): 169 $[\text{galna kiselina-H}]^{-}$, 468,2 $[M-2H]^{2-}$, 767 $[M\text{-galna kiselina}]^{-}$, 937,1 $[M-H]^{-}$.

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD): δ 7,05 (2H, *s*, galoil-H), 6,95 (2H, *s*, galoil-H), 6,92 (2H, *s*, galoil-H), 6,62 (1H, *s*, HHDP-H), 6,49 (1H, *s*, HHDP-H), 6,11 (1H, *d*, $J = 8,2$ Hz, H-1), 5,76 (1H, *t*, $J = 9,6$ Hz, H-3), 5,54 (1H, *t*, $J = 8,8$ Hz, H-2), 5,38 (1H, *dd*, $J = 13,4, 6,3$ Hz, H-6), 5,23 (1H, *t*, $J = 9,9$ Hz, H-4), 4,43 (1H, *dd*, $J = 9,4, 6,9$ Hz, H-5), 3,92 (1H, *d*, $J = 13,2$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD): δ 168,17, 167,79, 166,17, 165,51, 164,79 (5 x -COO), 145,19, 145,00, 144,85, 144,49, 143,65, 139,40, 138,91, 138,70, 136,36, 124,84, 124,34, 119,05, 118,92, 118,35, 115,38, 109,23, 109,15, 109,03, 107,22, 106,86, 92,77 (C-1), 72,65 (C-3), 72,22 (C-5), 71,06 (C-2), 69,86 (C-4), 62,33 (C-6).

Jedinjenje 11 (telimagrandin I, anomer α + anomer β)

UV λ_{\max} : anomer α ili β (216, 274 nm); anomer α ili β (218, 274 nm).

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 392 $[M-2H]^{2-}$ (anomer α ili β), 392,1 $[M-2H]^{2-}$ (anomer α ili β), 785 $[M-H]^{-}$ (anomer α/β).

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) (anomer α + anomer β): δ 7,02 (2H, *s*, galoil-H α), 7 (1,2H, *s*, galoil-H β), 6,93 (2H, *s*, galoil-H α), 6,89 (1,2H, *s*, galoil-H β), 6,61 (1,6H, *s*, HHDP-H α , HHDP-H β), 6,5 (1H, *s*, HHDP-H α), 6,46 (1H, *s*, HHDP-H β), 5,83 (1H, *t*, $J = 9,9$ Hz, H-3 α), 5,59 (0,6H, *t*, $J = 9,7$ Hz, H-3 β), 5,49 (1H, *d*, $J = 3,7$ Hz, H-1 α), 5,38–5,27 (1,6H, H-6 α , H-6 β), 5,19 (0,6H, *m*, H-2 β), 5,15–5,11 (1,6H, H-4 α , H-4 β), 5,09 (1H, *dd*, $J = 6,1, 3,9$ Hz, H-2 α), 4,96 (0,6H, *d*, $J = 8$ Hz, H-1 β), 4,64 (1H, *dd*, $J = 10, 6,5$ Hz, H-5 α), 4,21 (0,6H, *dd*, $J = 9,8, 6,6$ Hz, H-5 β), 3,9 (0,6H, *d*, $J = 13,2$ Hz, H-6' β), 3,83 (1H, *d*, $J = 12,3$ Hz, H-6' α).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CD_3OD) (anomer α + anomer β): δ 168,39, 168,28, 167,92, 167,83, 166,55, 166,31, 166,09, 165,72 (4C, COO $^{-}$), 145,01, 144,99, 144,83, 144,8 (4C,

2 x C-3,5 Gal), 144,53, 144,46, 143,48, 143,45 (4C, C-4,4',6,6' HHDP), 138,7, 138,54 (2C, 2 x C-4 Gal), 136,24 (2C, C-5,5' HHDP), 124,96, 124,92, 124,56, 124,5 (2C, C-2,2' HHDP), 119,56, 119,41, 119,22, 119,2 (2C, 2 x C-1 Gal), 115,33, 115,28, 115,09, 115,05 (2C, C-1,1' HHDP), 109,08, 109,03, 108,98 (4C, 2 x C-2,6 Gal), 107,27, 107,23, 106,87, 106,85 (2C, C-3,3' HHDP), 95,73 (C-1 β), 90,4 (C-1 α), 73,43 (C-2 β), 72,94 (C-3 β), 72,21 (C-2 α), 71,36 (C-5 β), 70,61 (C-4 α), 70,59 (C-3 α), 70,29 (C-4 β), 66,2 (C-5 α), 62,89 (C-6 α), 62,81 (C-6 β).

Jedinjenje 12 (metilgalat)

UV λ_{\max} : 218, 274 nm.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 183 [M-H]⁻, 367 [2M-H]⁻.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,04 (2H, *s*, H-2, H-6), 3,81 (3H, *s*, COOCH₃).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 167,63 (COOCH₃), 145,10 (C-3, C-5), 138,36 (C-4), 120,08 (C-1), 108,66 (C-2, C-6), 50,86 (COOCH₃).

Jedinjenje 13 (galna kiselina)

UV λ_{\max} : 216, 272 nm.

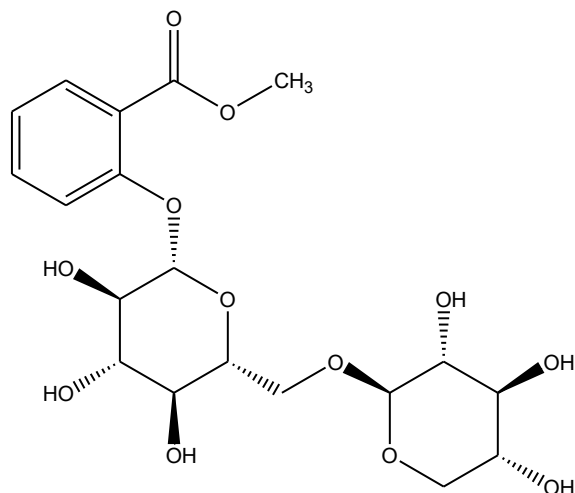
ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 169 [M-H]⁻, 339 [2M-H]⁻.

ESI-MS m/z (negativni mod, napon fragmentora 100 V): 125 [M-CO₂]⁻, 169 [M-H]⁻.

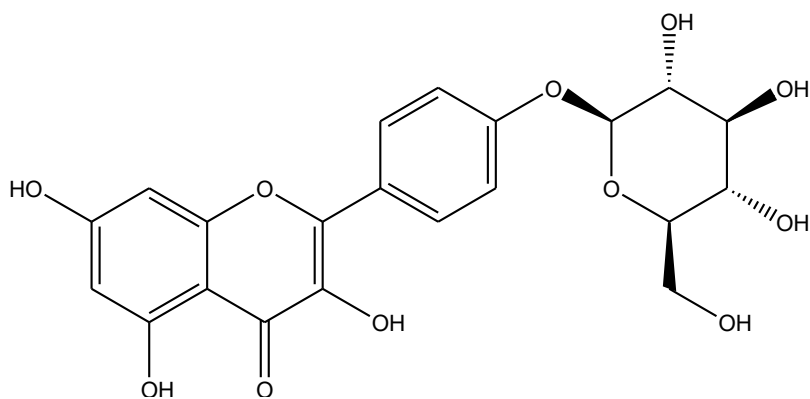
¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7,06 (2H, *s*, H-2, H-6).

¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD): δ 169,07 (COOCH₃), 144,99 (C-3, C-5), 138,16 (C-4), 120,69 (C-1), 108,94 (C-2, C-6).

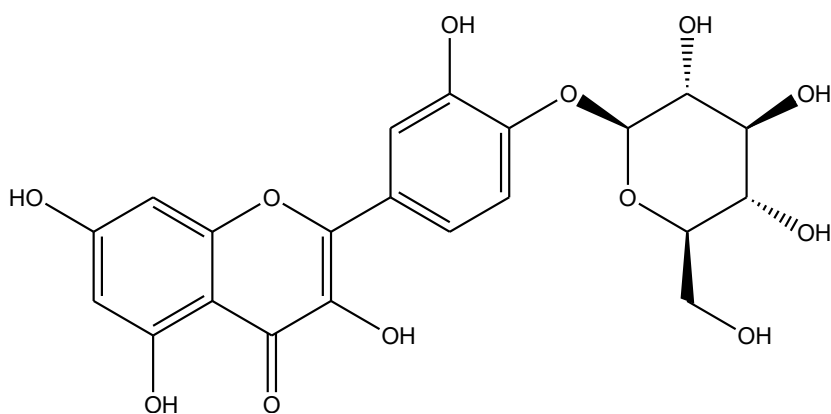
4.2.5. Strukture i NMR spektri izolovanih jedinjenja



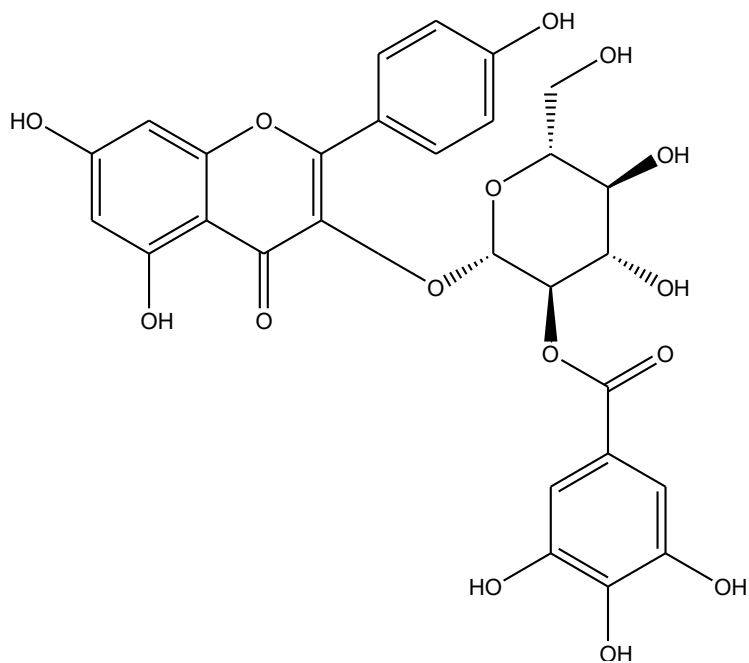
Slika 4.2. Struktura jedinjenja 1 (gaulterin, metilsalicilat β -primeverozid, metilsalicilat 2-*O*- β -D-ksilozil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glukopiranozid)



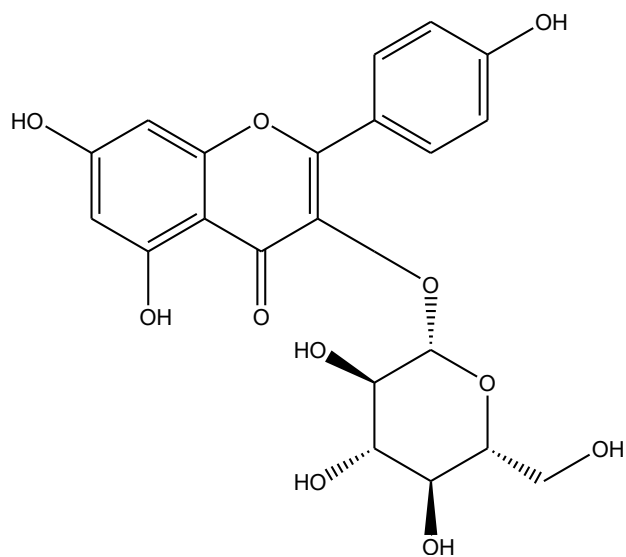
Slika 4.3. Jedinjenje 2 (kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid).



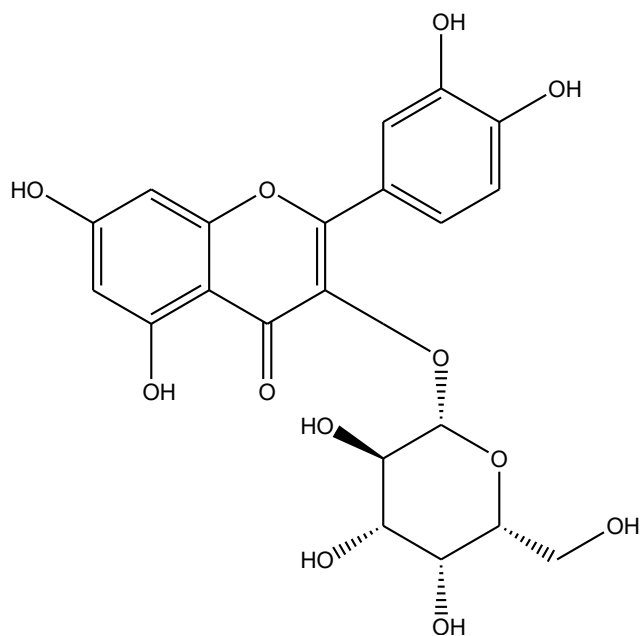
Slika 4.4. Jedinjenje 3 (spireozid, kvercetin 4'-*O*- β -D-glukozid)



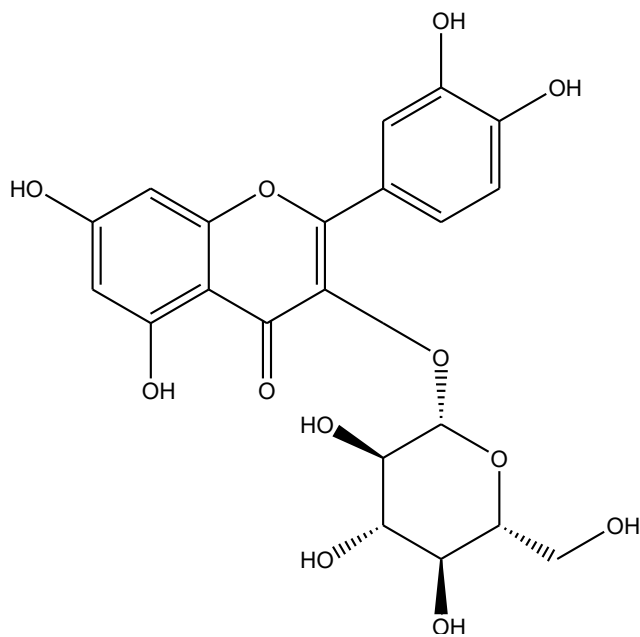
Slika 4.5. Jedinjenje 4 (kemferol 3-*O*-(2''-*O*-galoil- β -D-glukozid),
astragalin 2''-*O*-galat)



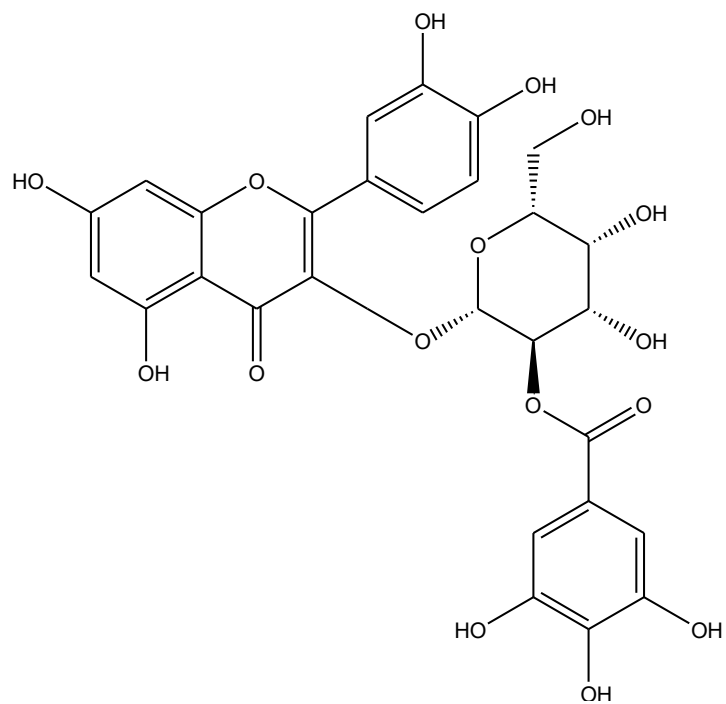
Slika 4.6. Jedinjenje 5 (astragalin, kemferol 3-*O*- β -D-glukozid).



Slika 4.7. Jedinjenje 6 (hiperozid, kvercetin 3-*O*- β -D-galaktozid).

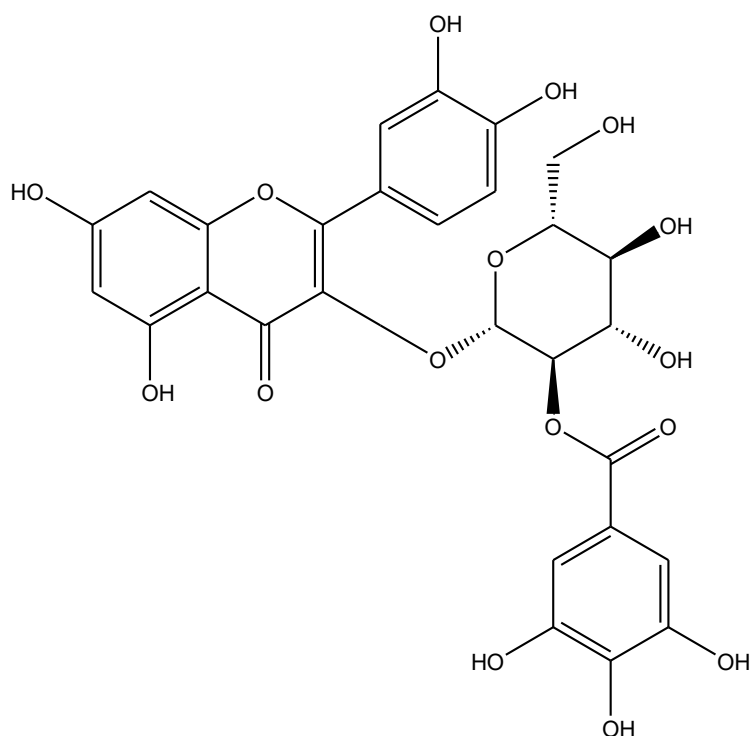


Slika 4.8. Jedinjenje 7 (izokvercitrin, kvercetin 3-*O*- β -D-glukoza).



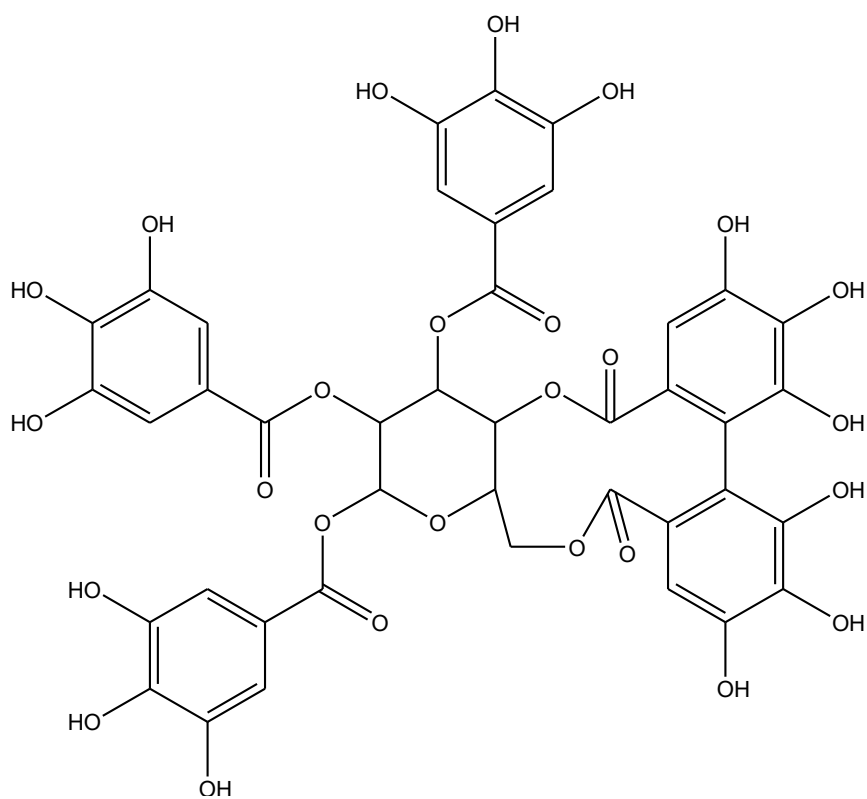
Slika 4.9. Jedinjenje 8

(hiperozid 2''-O-galat, kvecetin 3-O-(2''-O-galoil- β -D-galaktosid).

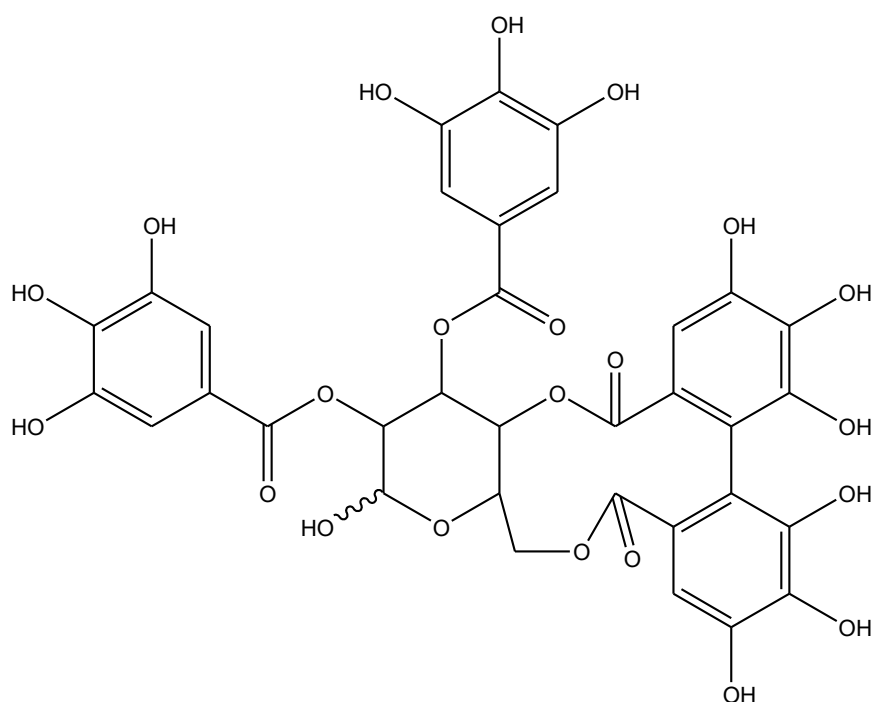


Slika 4.10. Jedinjenje 9

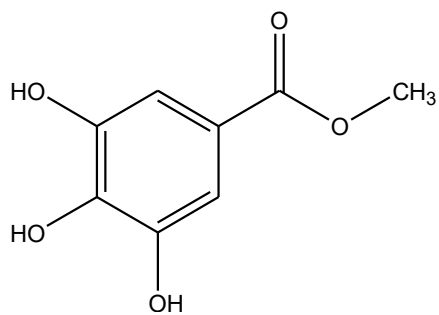
(izokvercitrin 2''-O-galat, kvecetin 3-O-(2''-O-galoil- β -D-glukozid).



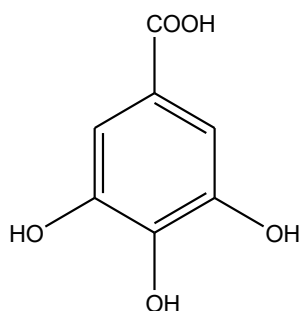
Slika 4.11. Jedinjenje **10** (telimagrandin II, eugenin, 1,2,3-trigaloil-4,6-heksahidroksidifenoil- β -D-glukozid).



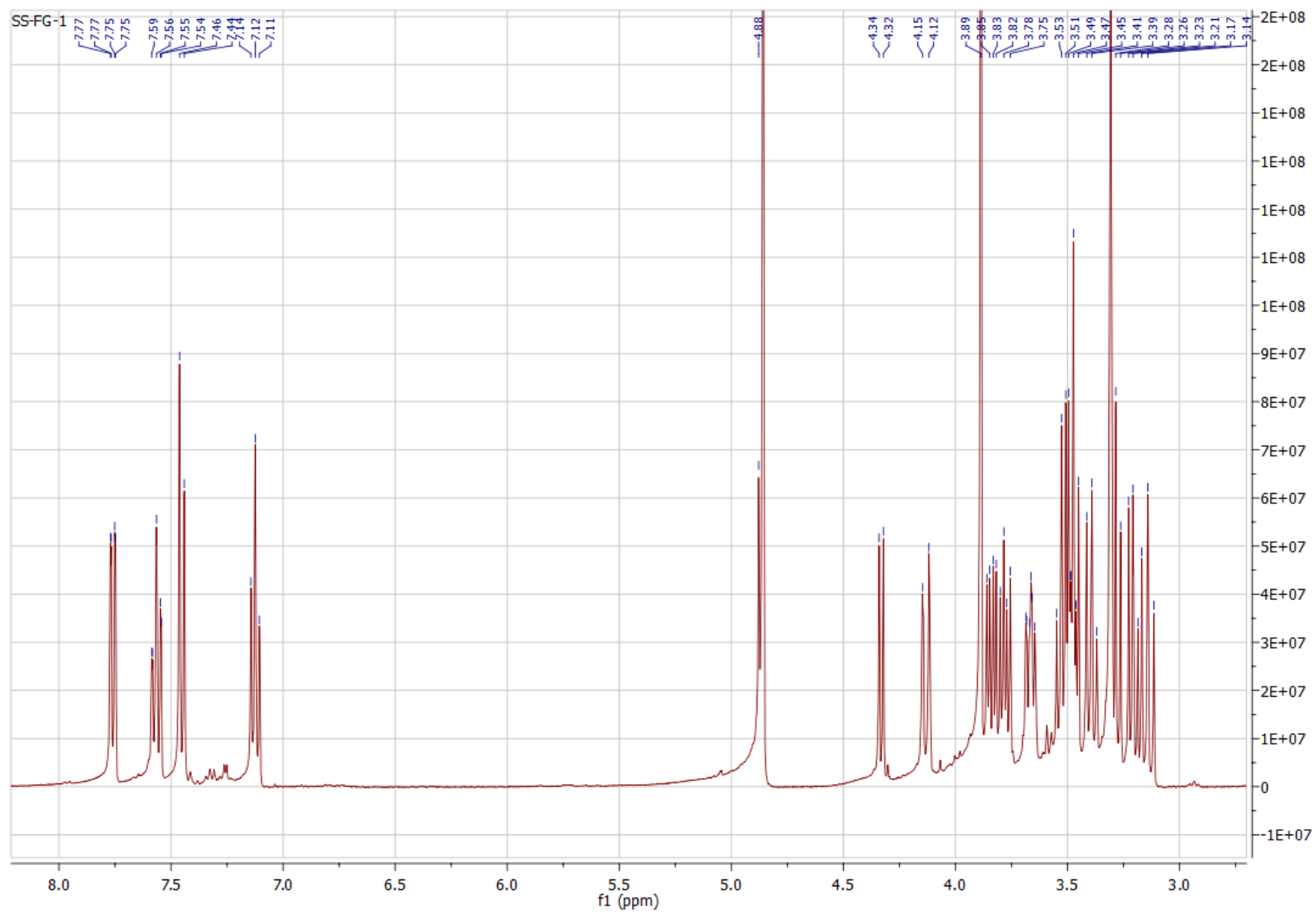
Slika 4.12. Jedinjenje **11** (telimagrandin I).



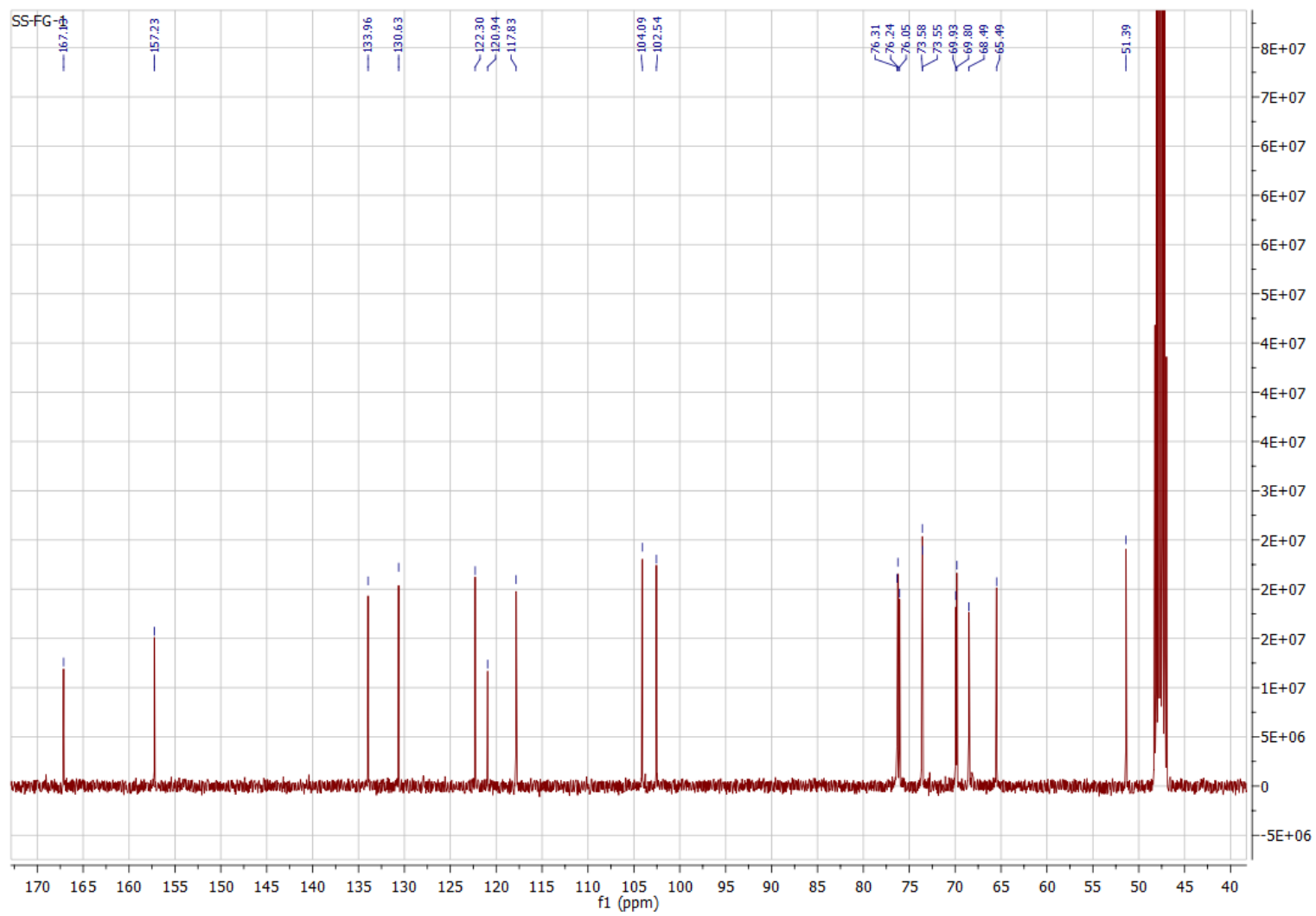
Slika 4.13. Jedinjenje **12** (metilgalat).



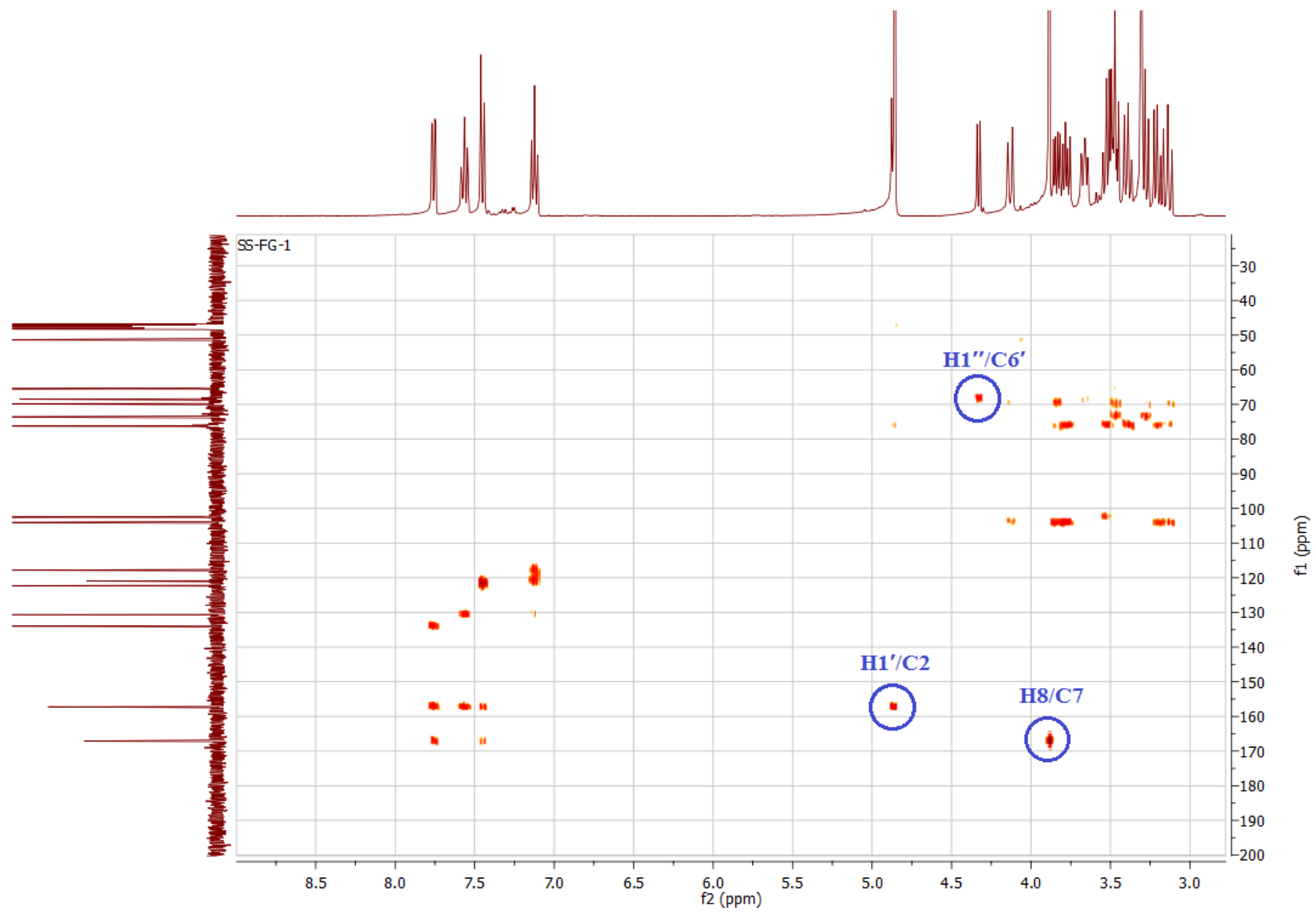
Slika 4.14. Jedinjenje **13** (galna kiselina).



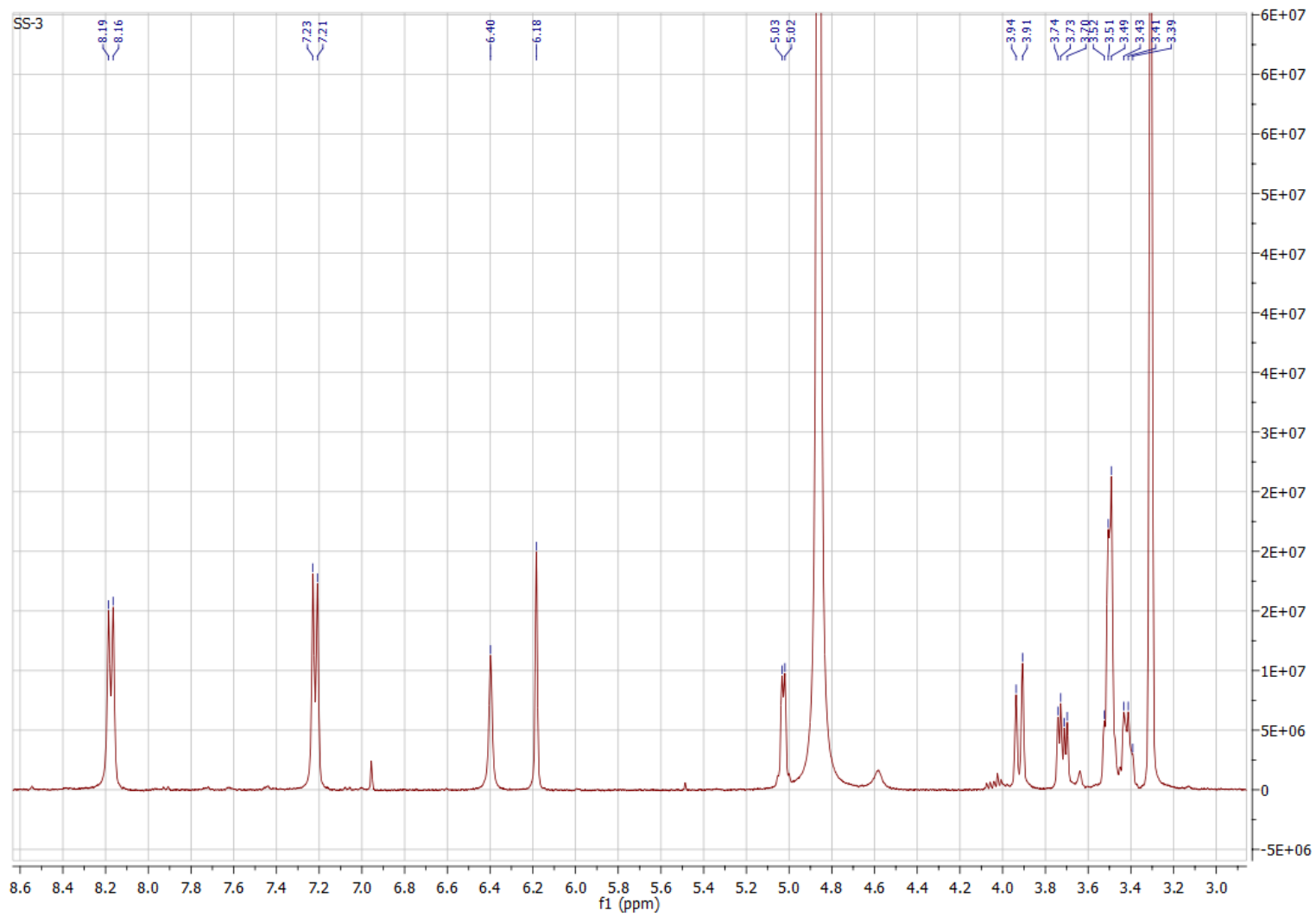
Slika 4.15. ^1H NMR spektar jedinjenja 1.



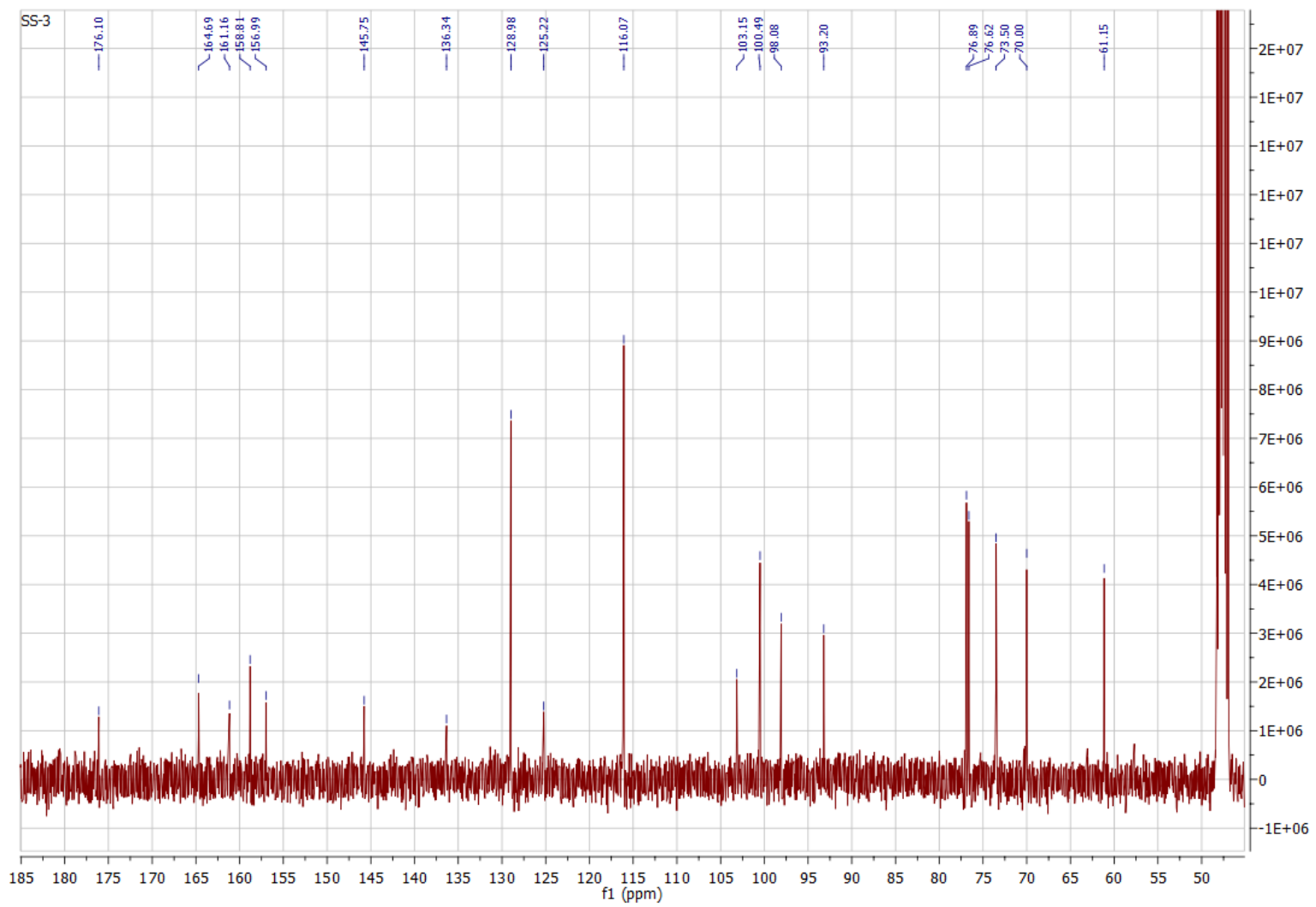
Slika 4.16. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 1.



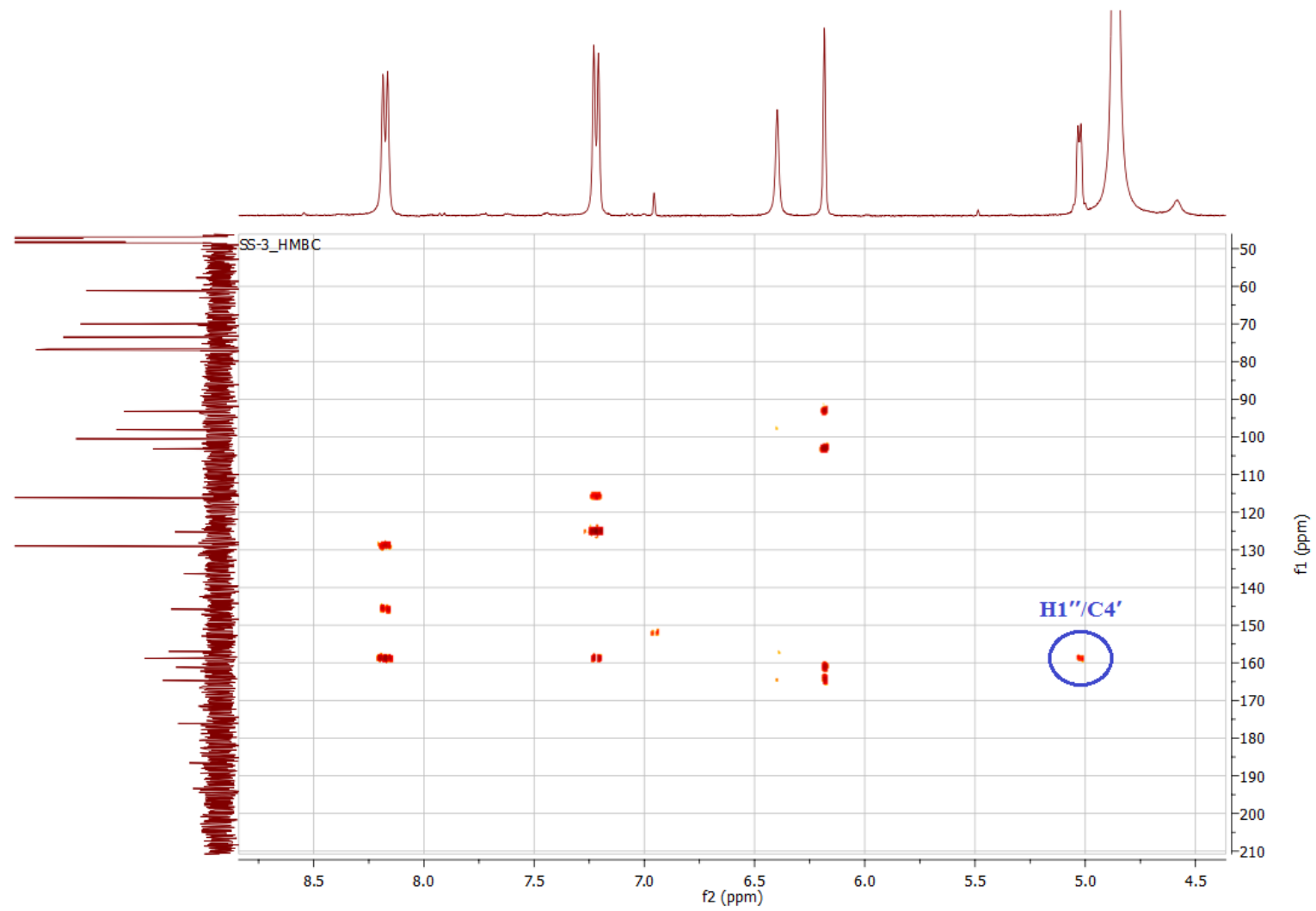
Slika 4.17. HMBC spektar jedinjenja 1.



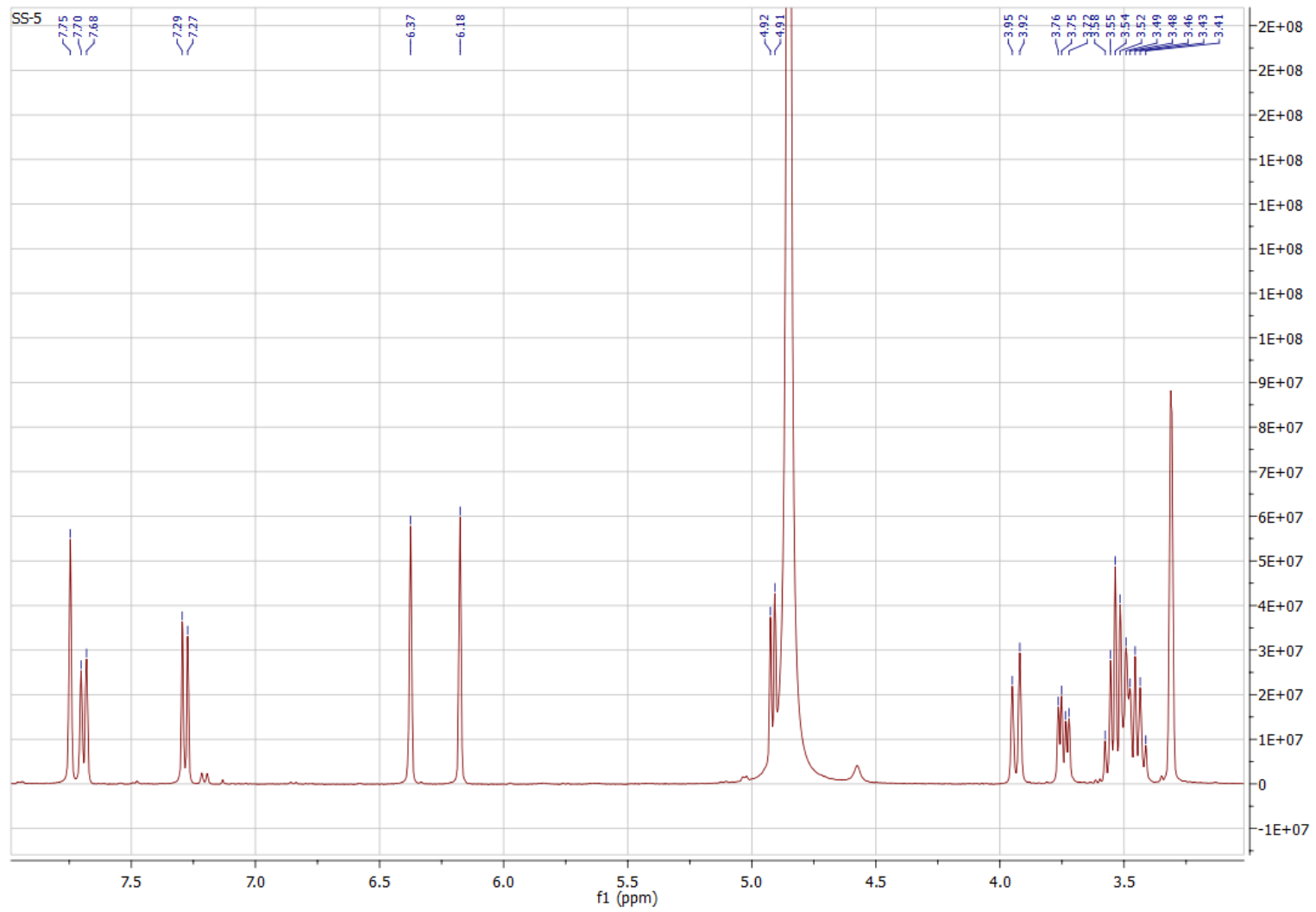
Slika 4.18. ^1H NMR spektar jedinjenja 2.



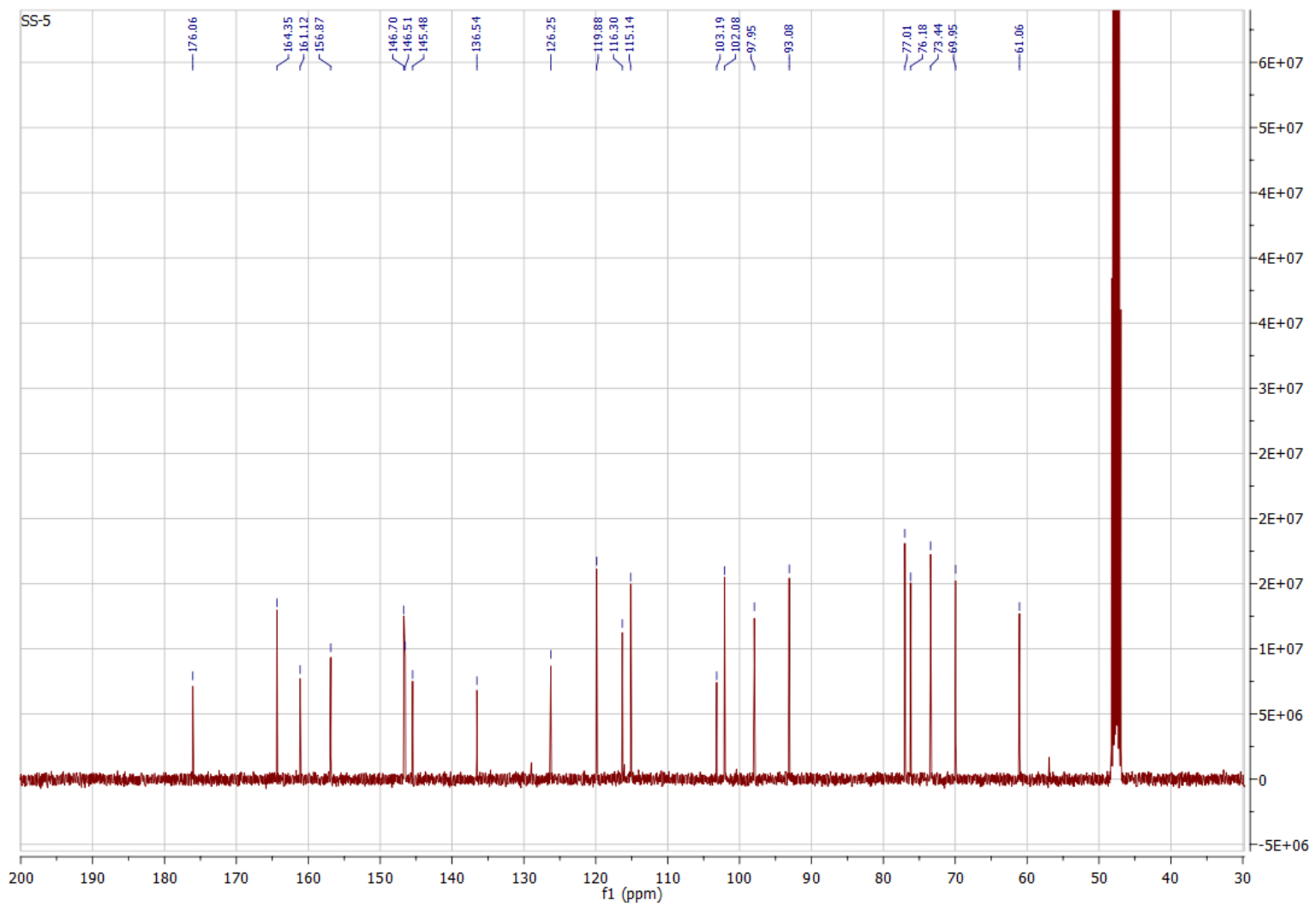
Slika 4.19. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 2.



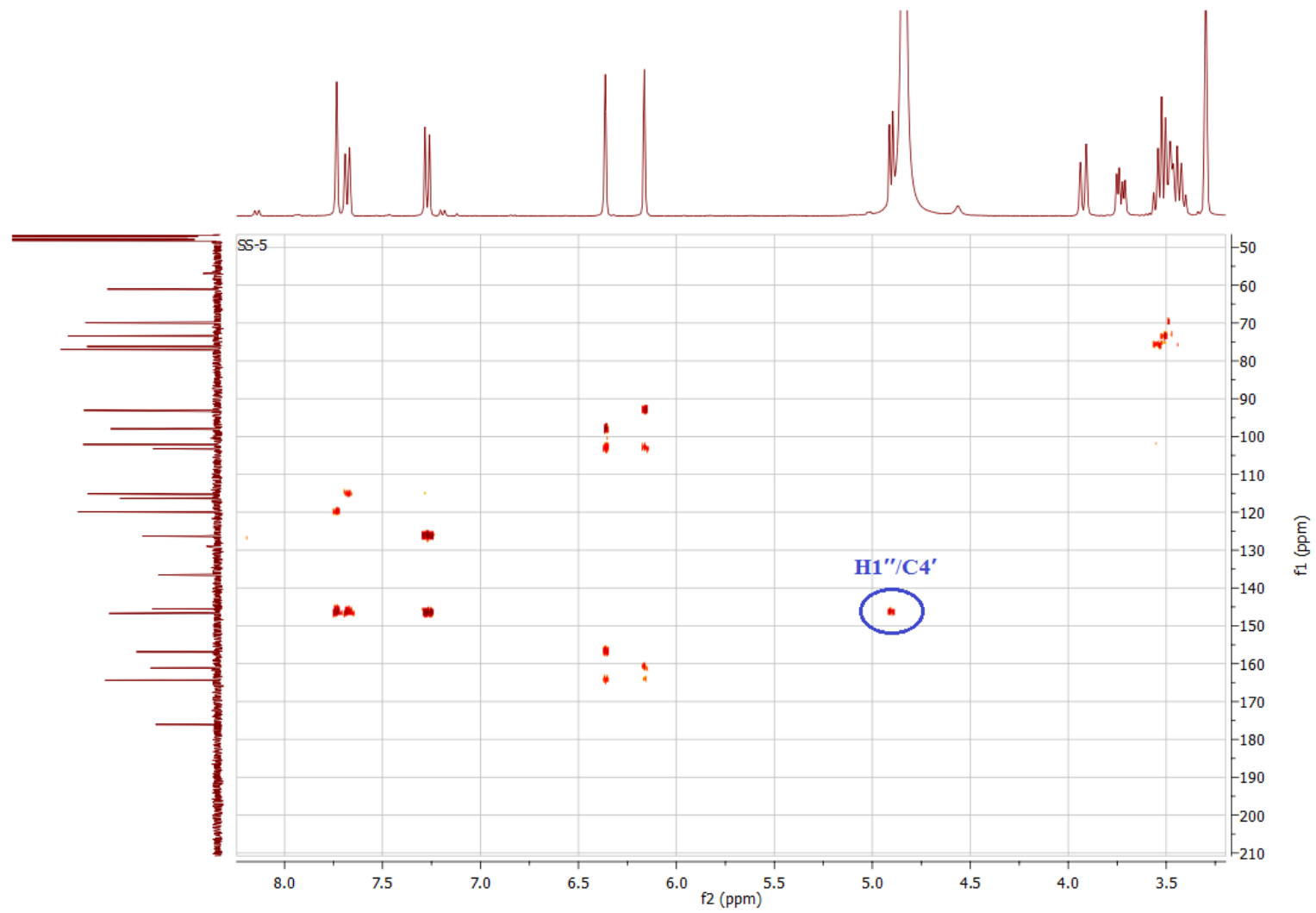
Slika 4.20. HMBC spektar jedinjenja 2.



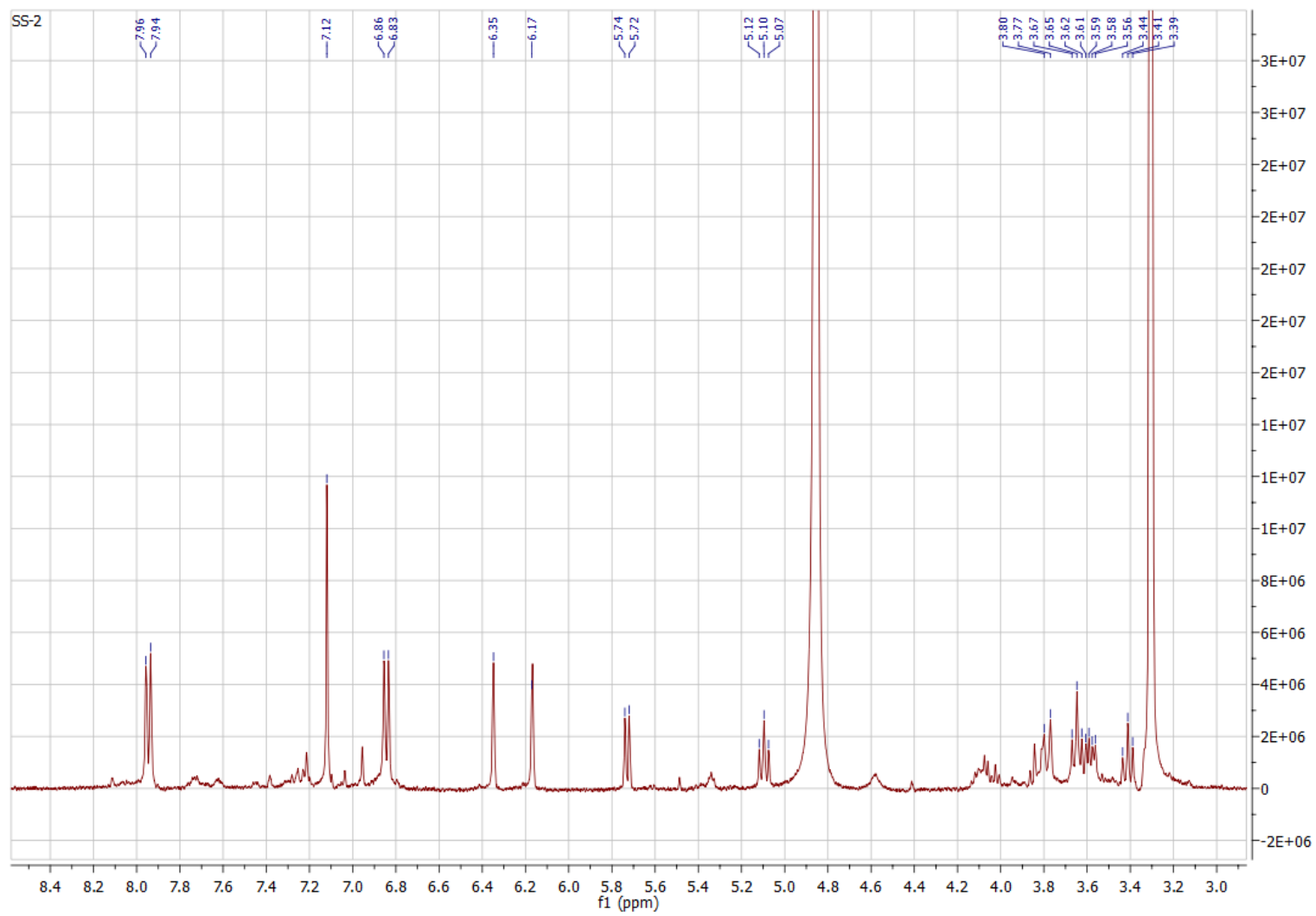
Slika 4.21. ^1H NMR spektar jedinjenja 3.



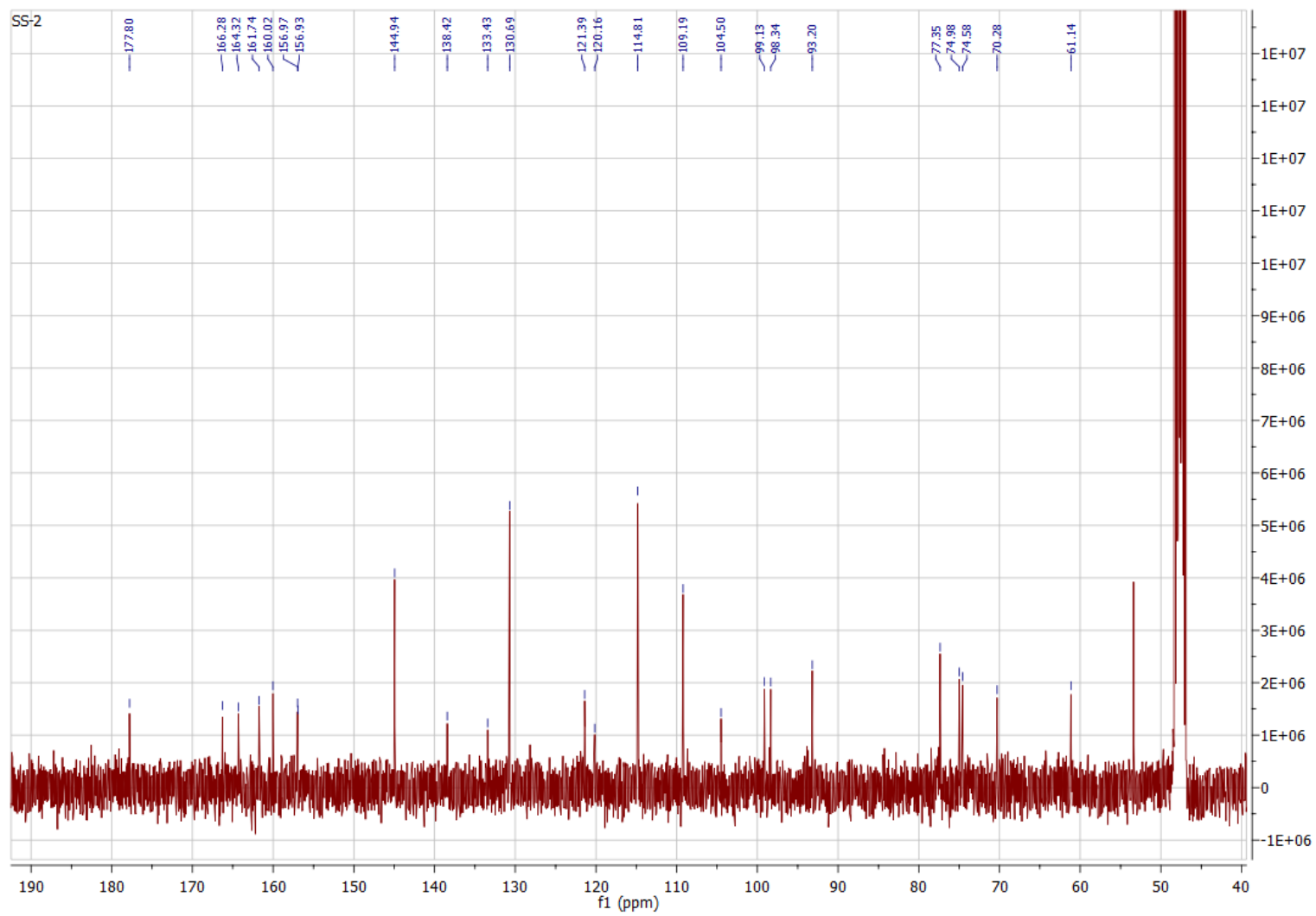
Slika 4.22. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 3.



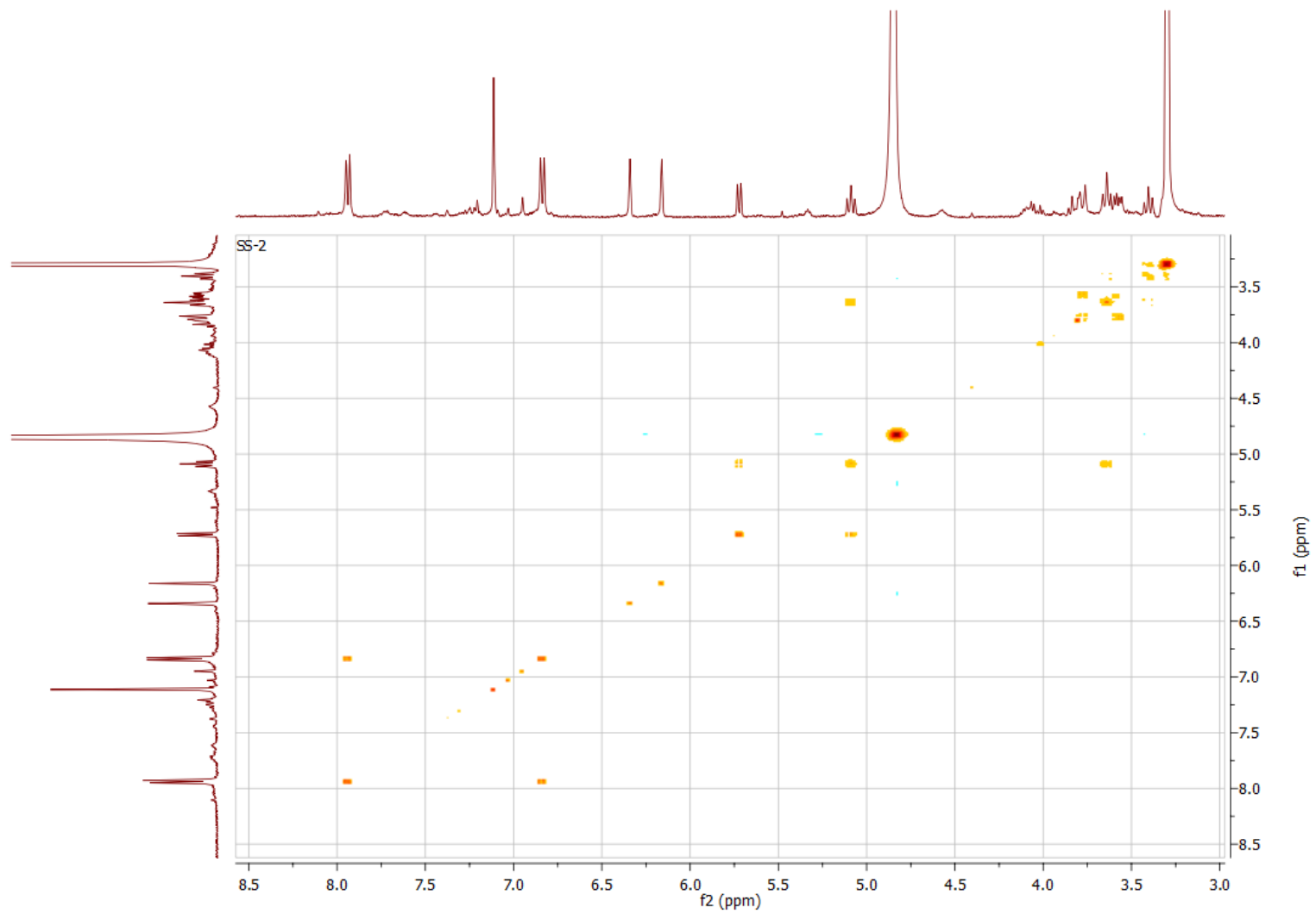
Slika 4.23. HMBC spektar jedinjenja 3.



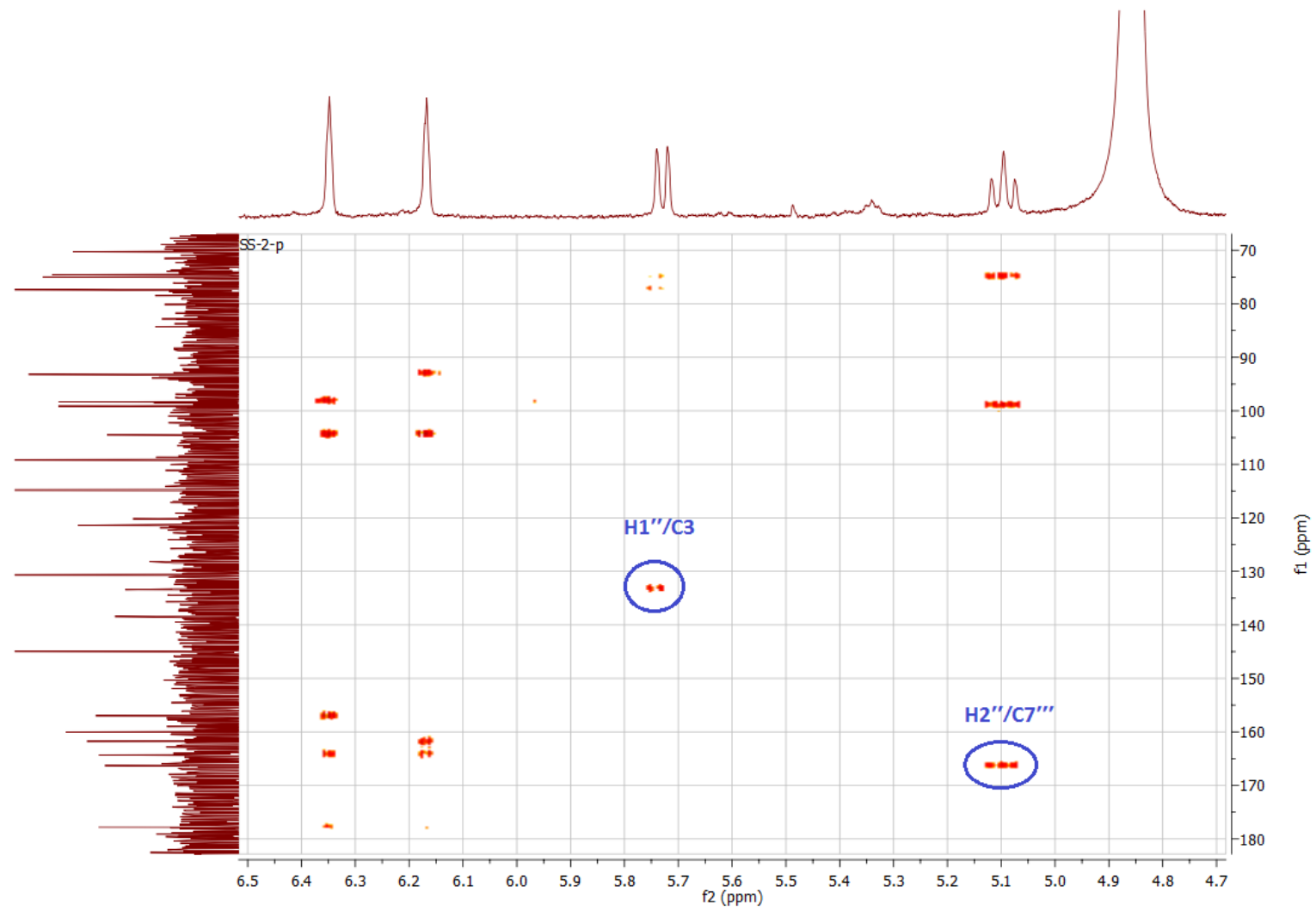
Slika 4.24. ^1H NMR spektar jedinjenja 4.



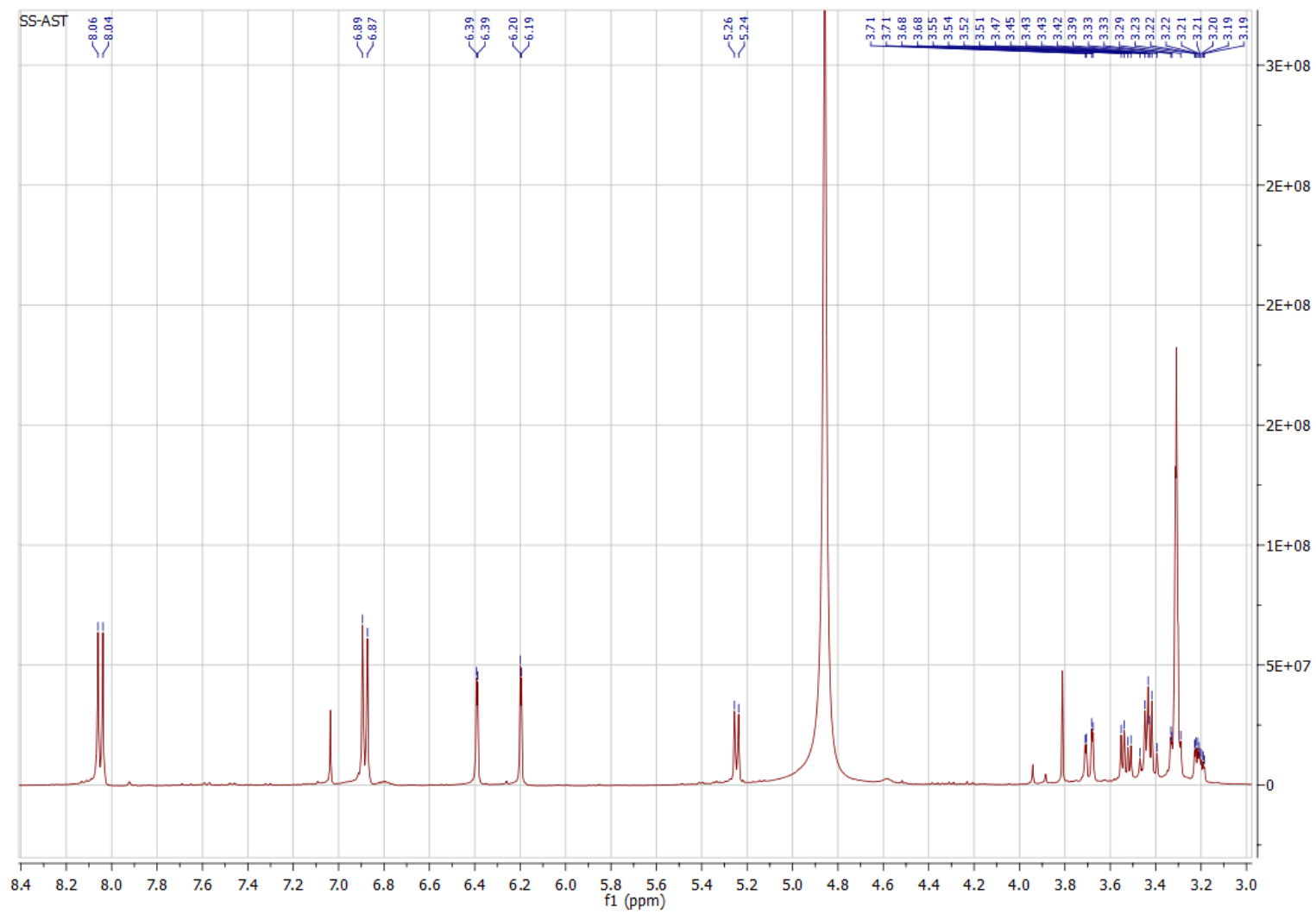
Slika 4.25. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 4.



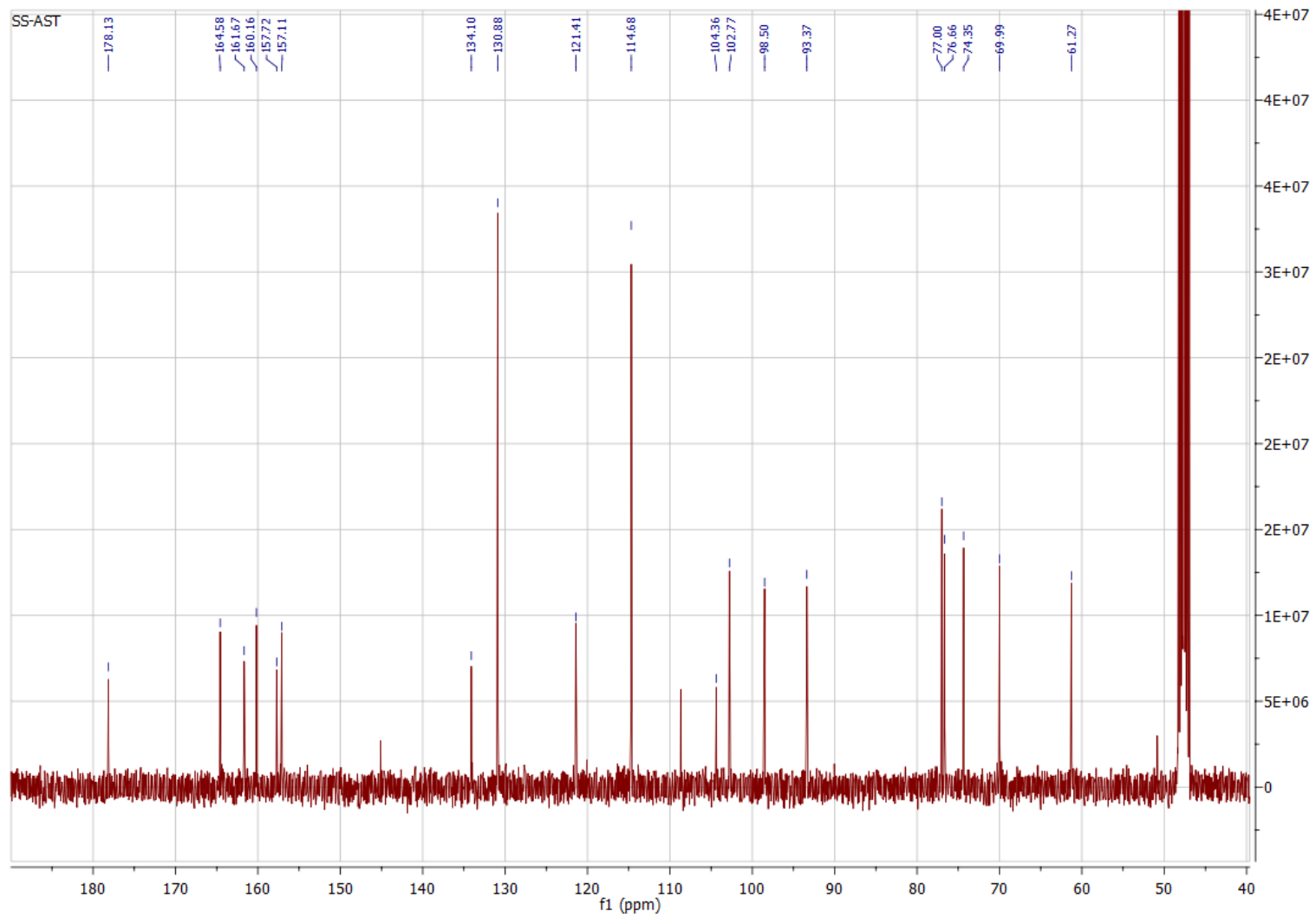
Slika 4.26. COSY spektar jedinjenja 4.



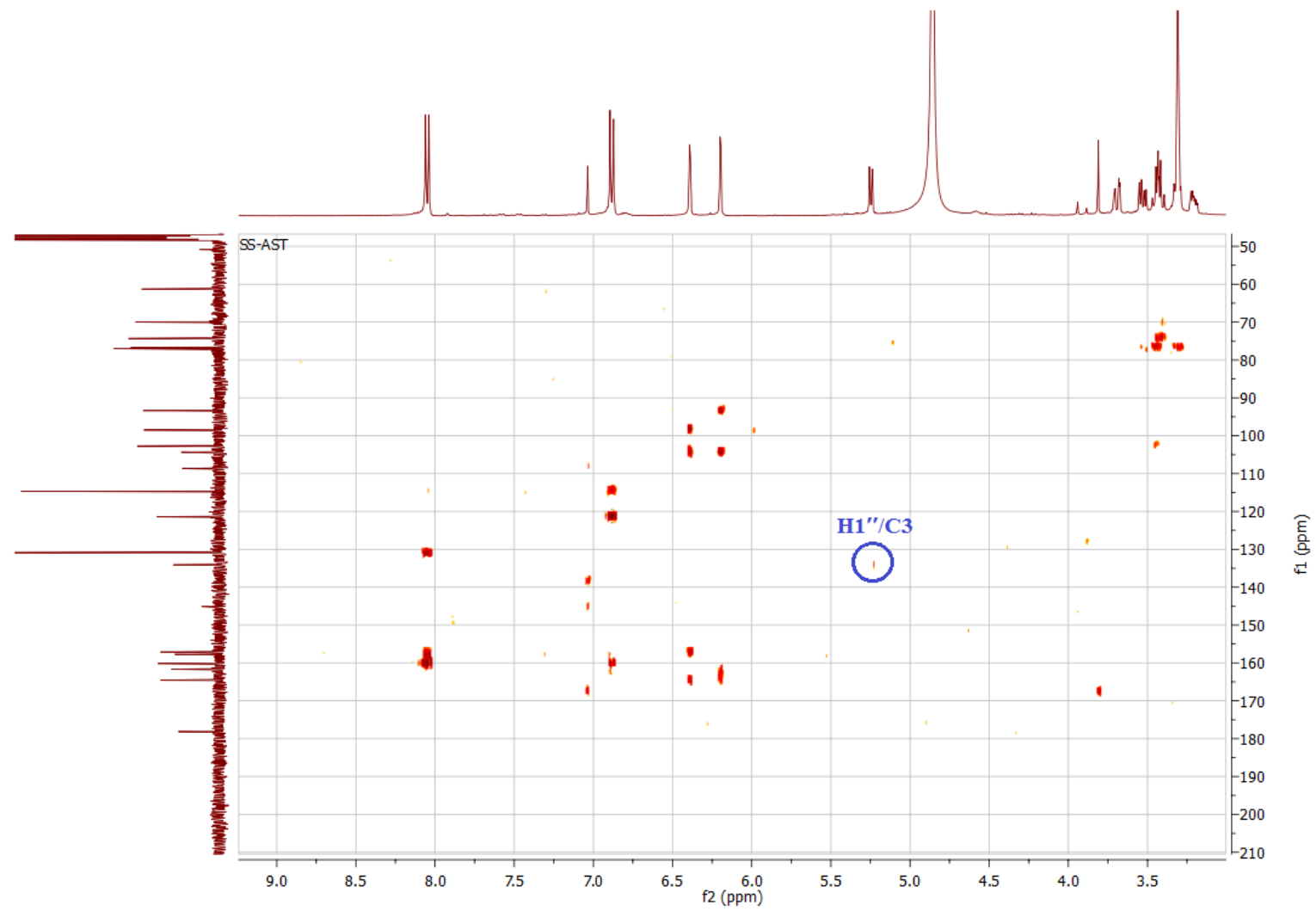
Slika 4.27. HMBC spektar jedinjenja 4.



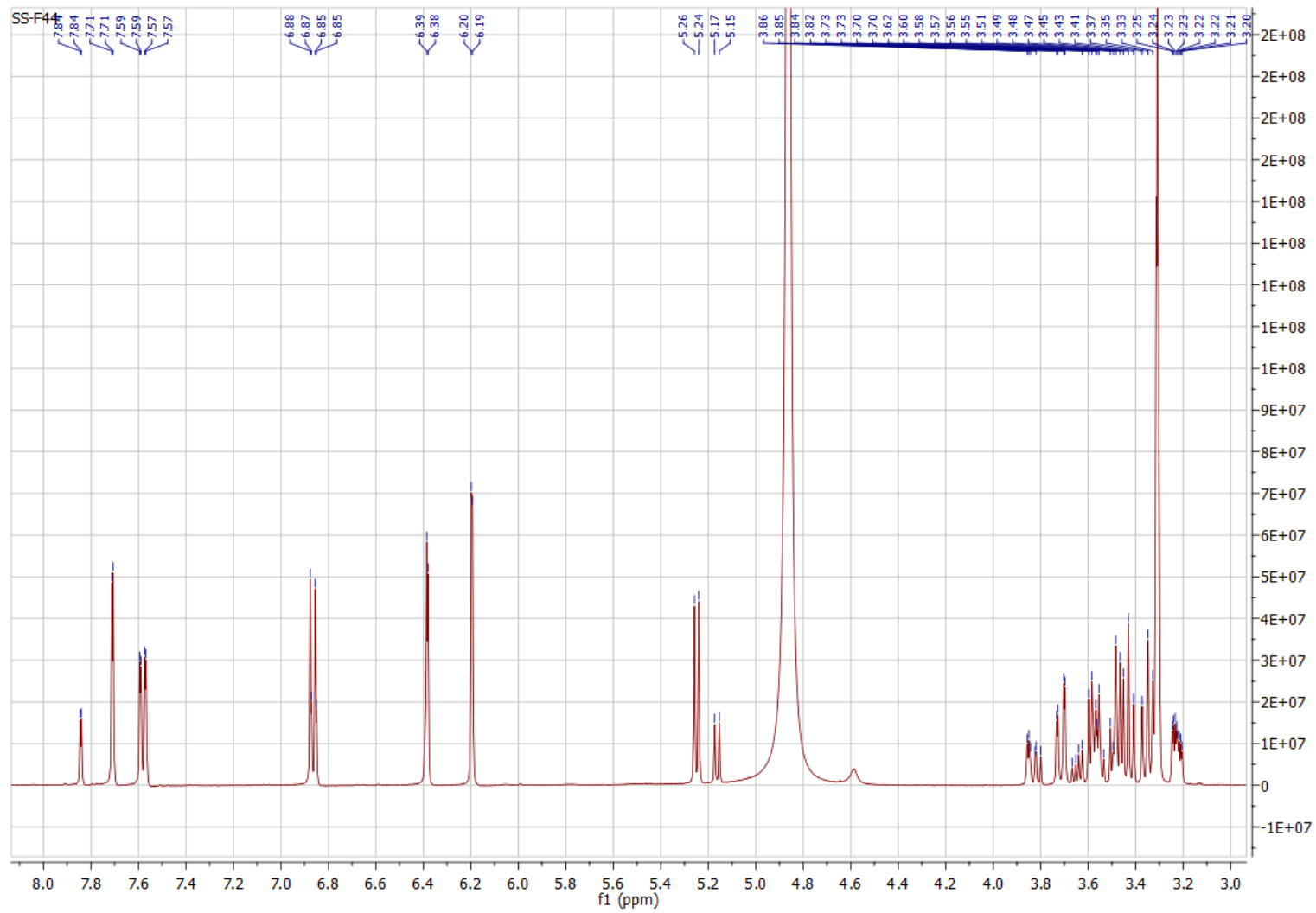
Slika 4.28. ^1H NMR spektar jedinjenja 5.



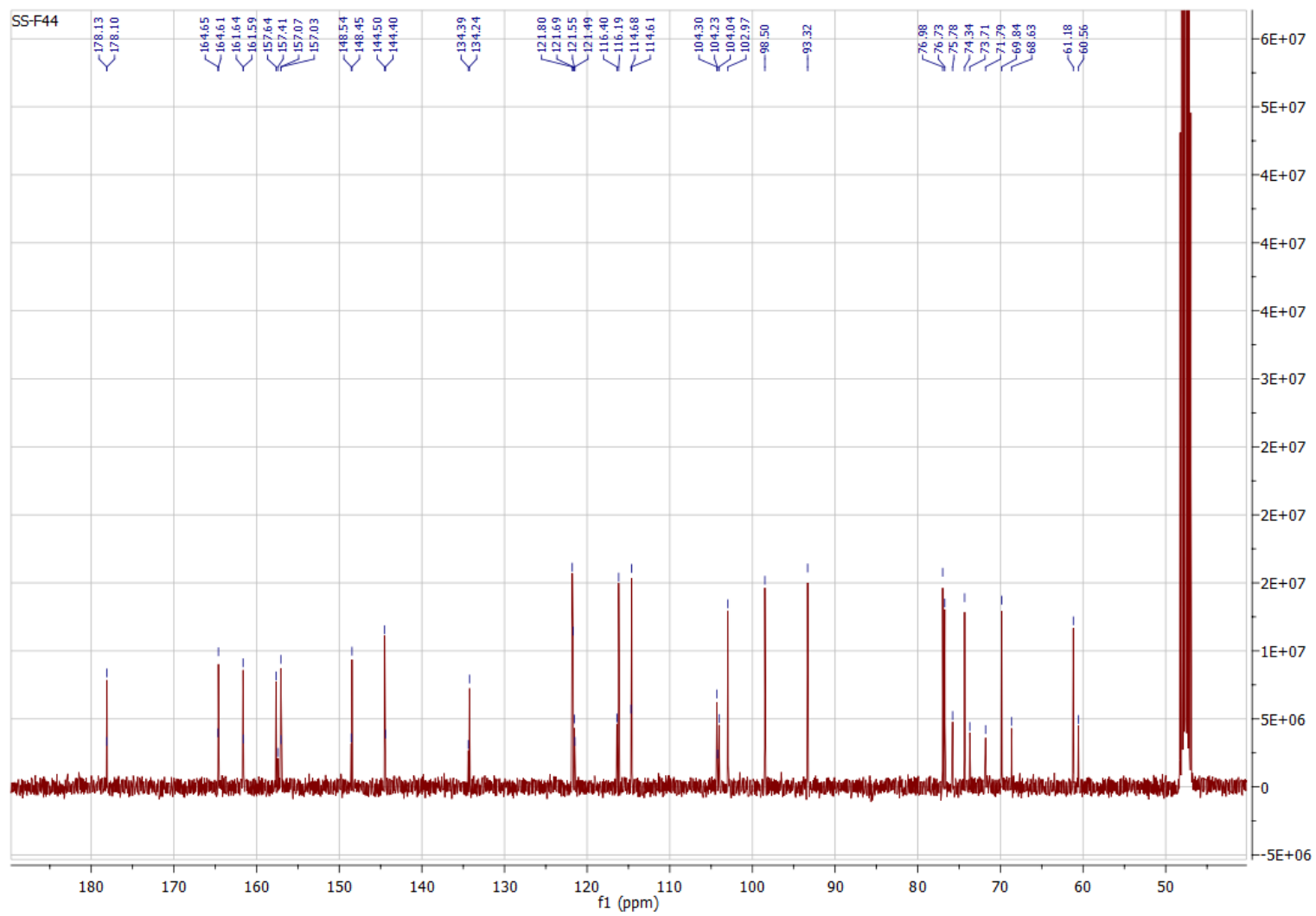
Slika 4.29. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 5.



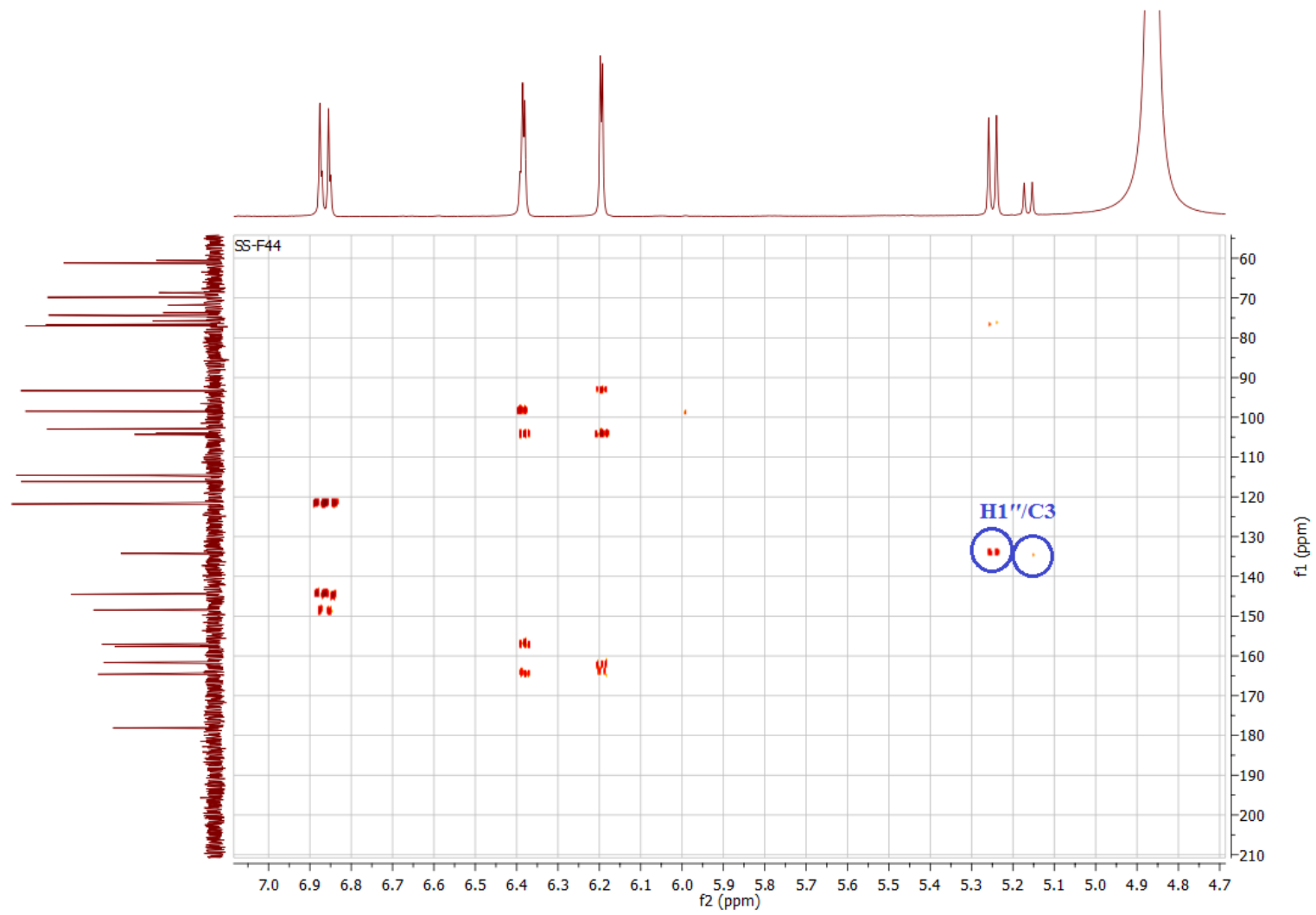
Slika 4.30. HMBC spektar jedinjenja 5.



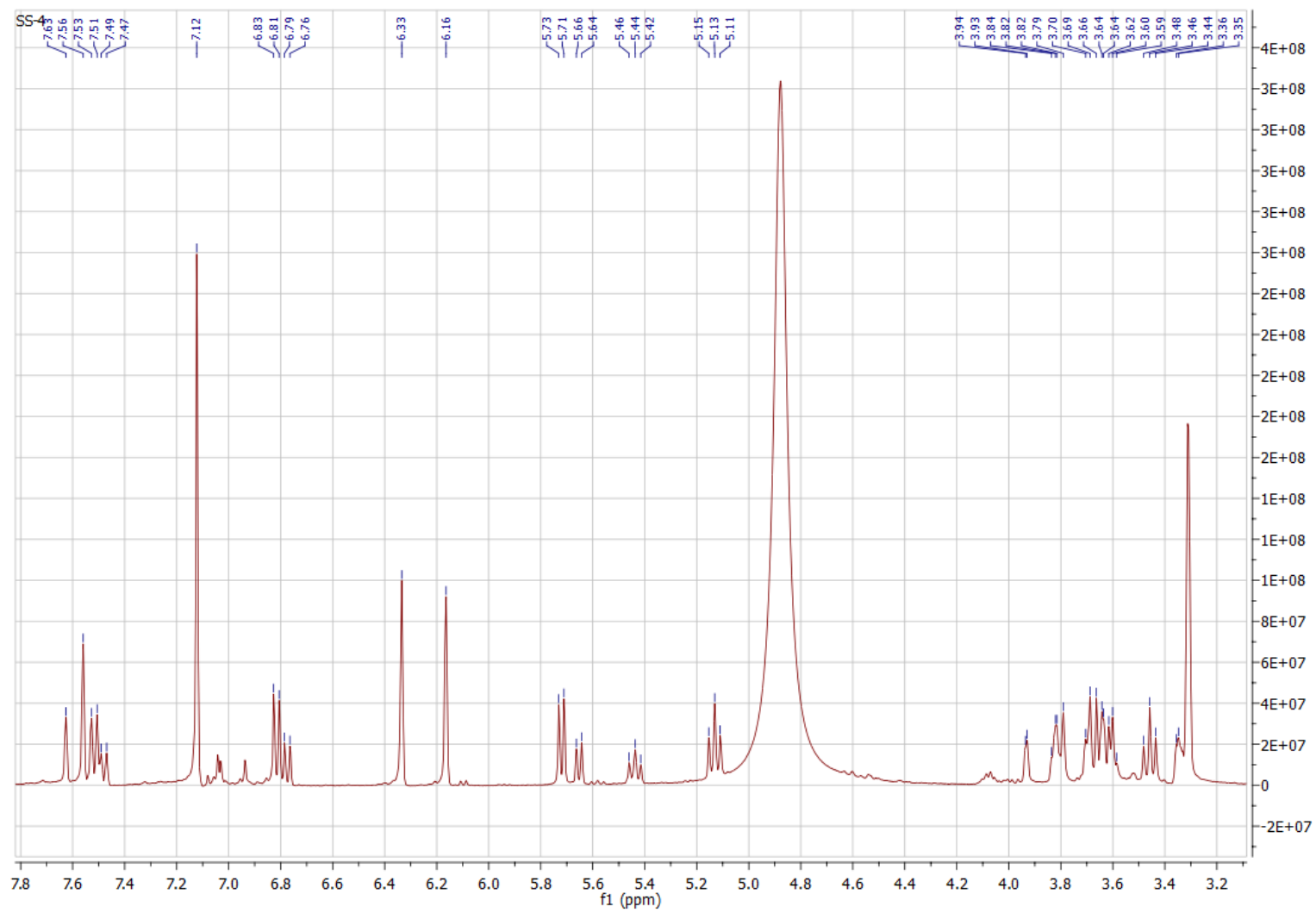
Slika 4.31. ^1H NMR spektar smeše jedinjenja 6 i 7.



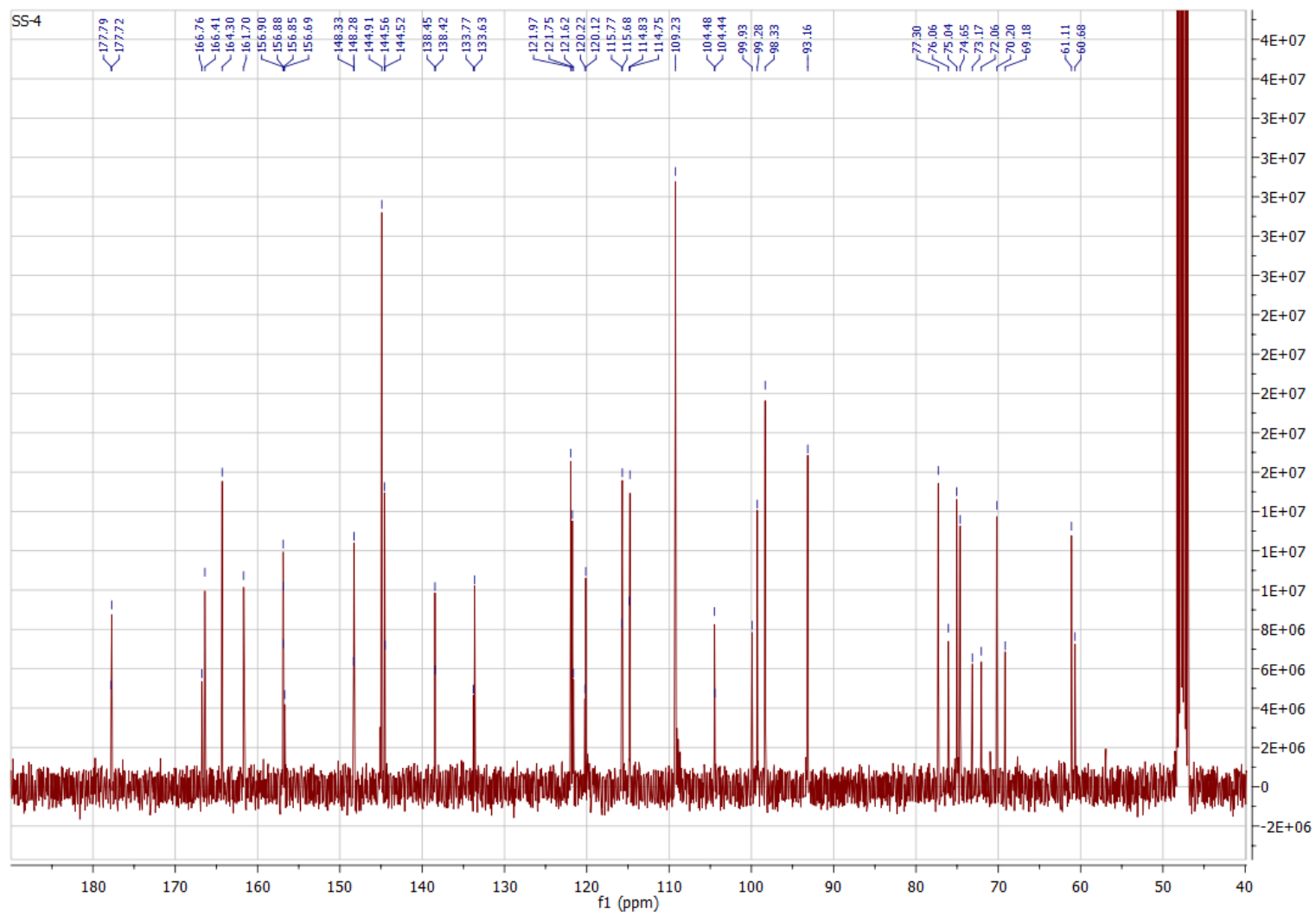
Slika 4.32. ^{13}C NMR spektar smeše jedinjenja 6 i 7.



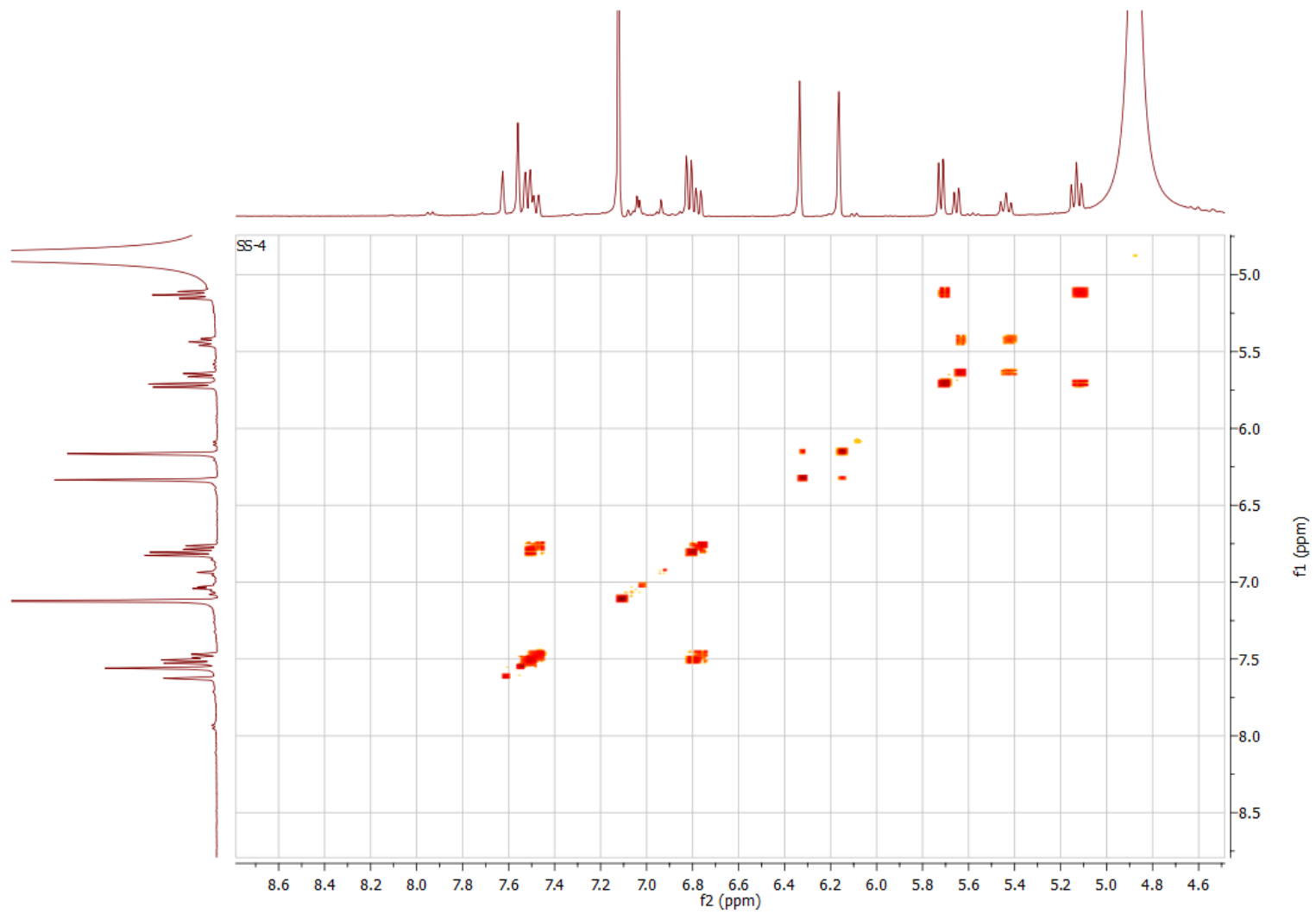
Slika 4.33. HMBC spektar smeše jedinjenja 6 i 7.



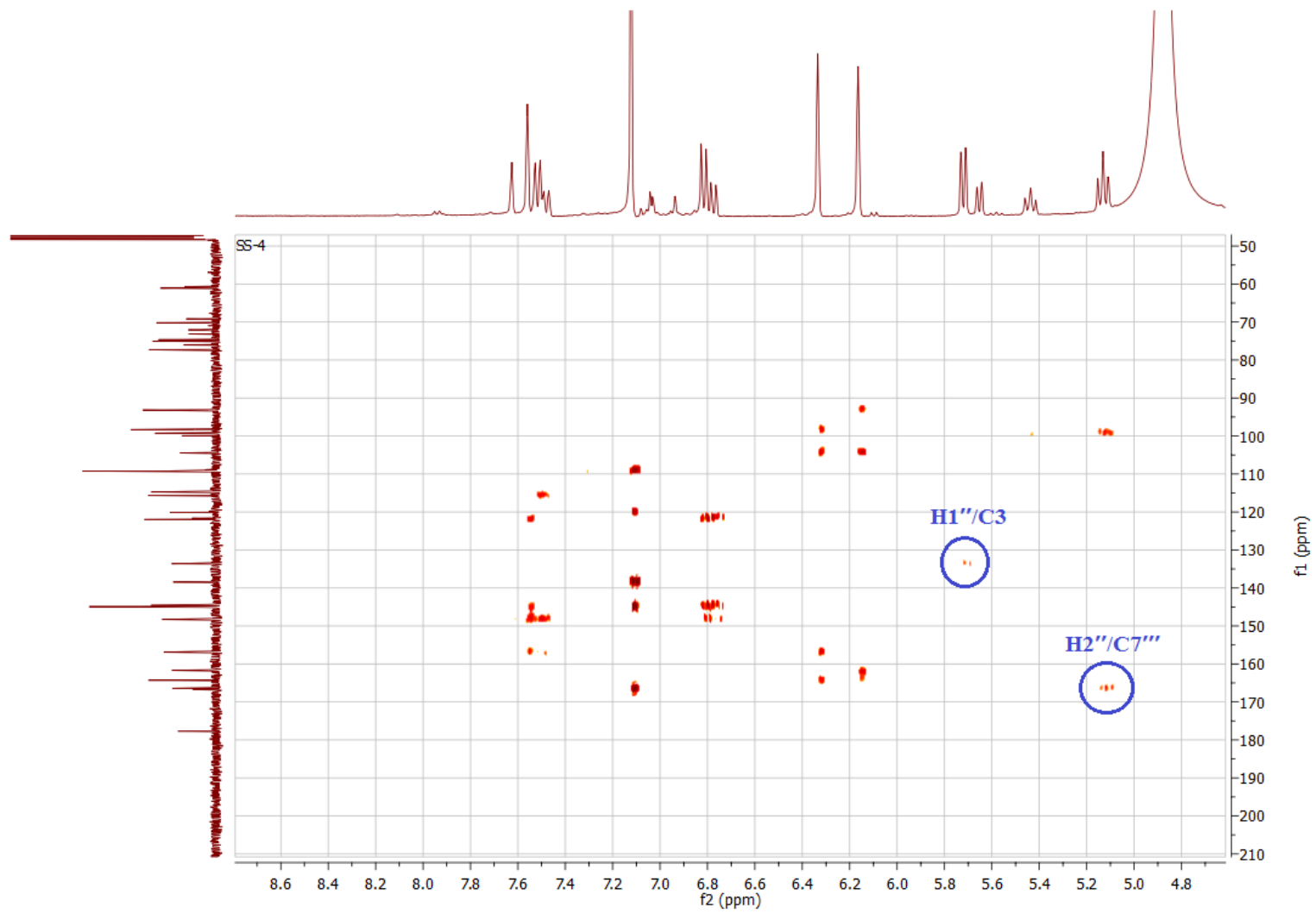
Slika 4.34. ^1H NMR spektar smeše jedinjenja 8 i 9.



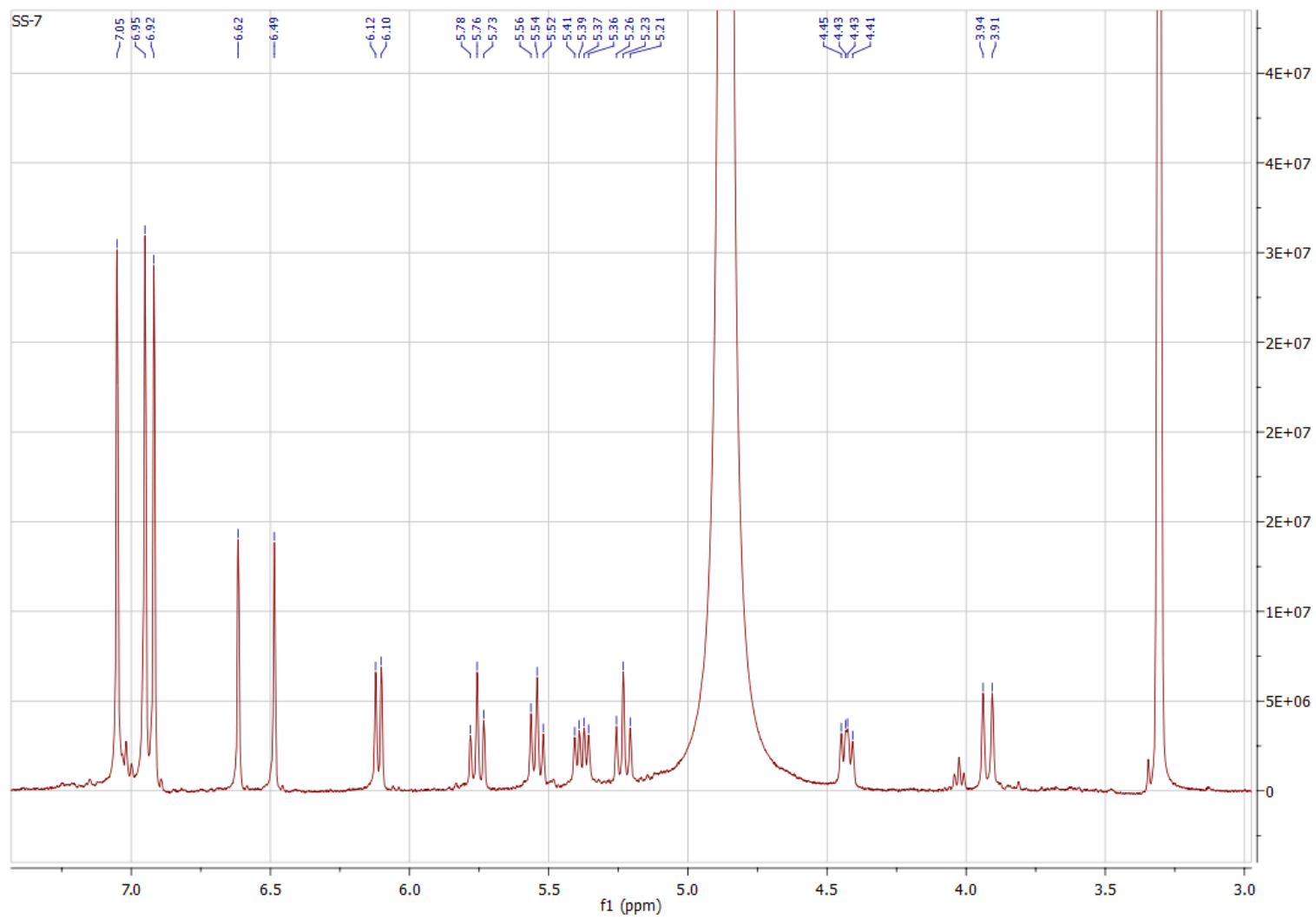
Slika 4.35. ^{13}C NMR spektar smeše jedinjenja 8 i 9.



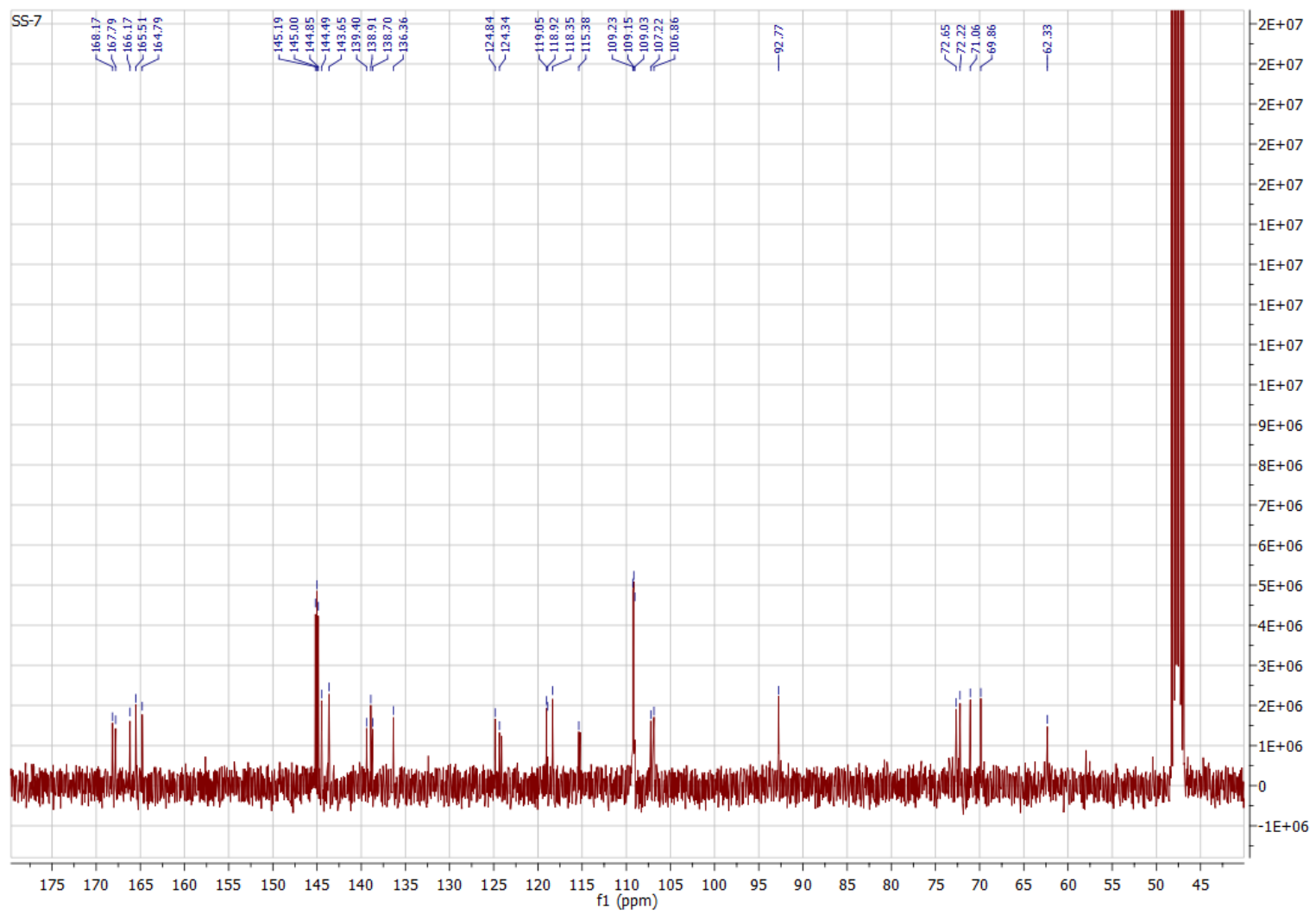
Slika 4.36. COSY spektar smeše jedinjenja 8 i 9.



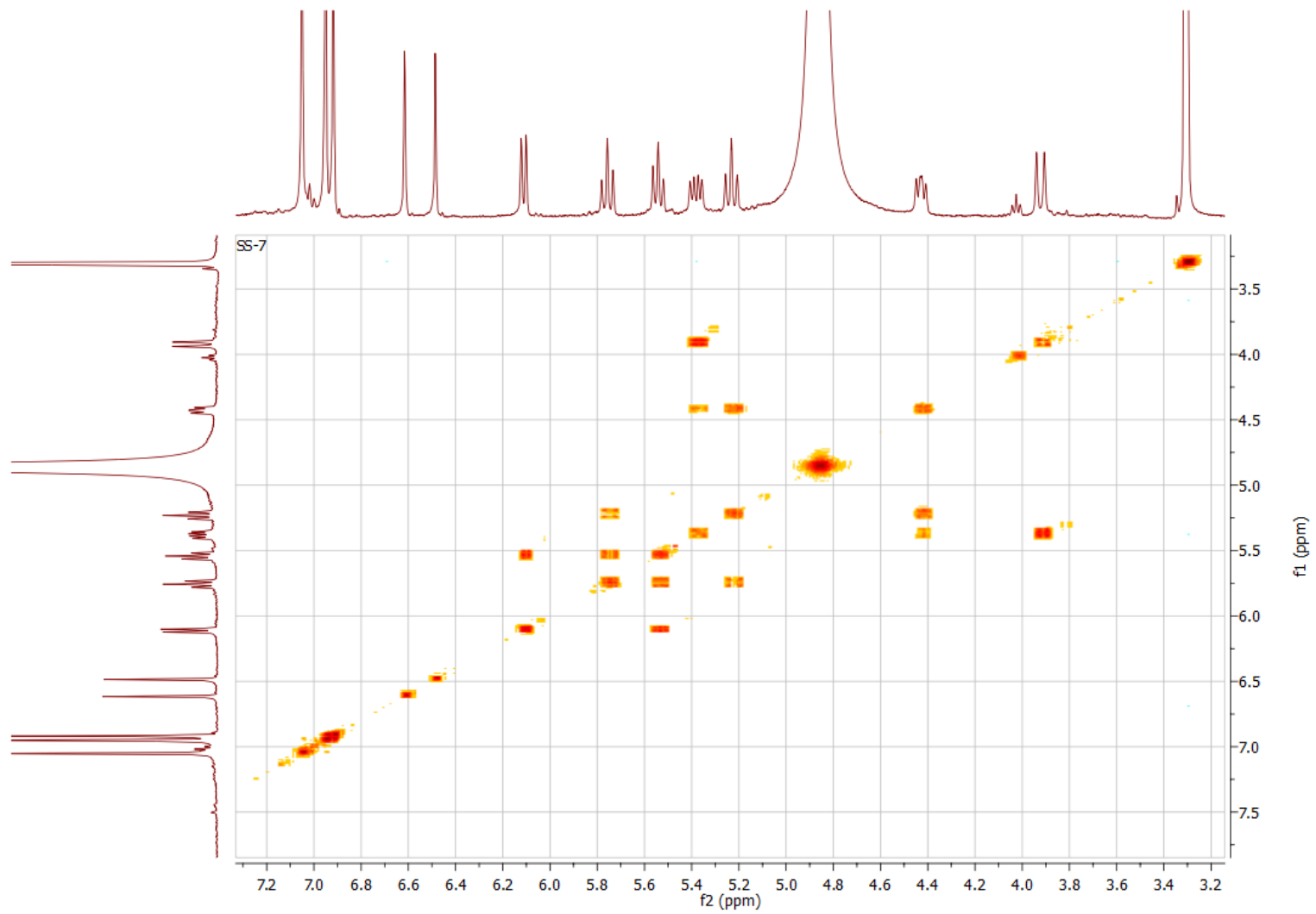
Slika 4.37. HMBC spektar smeše jedinjenja 8 i 9.



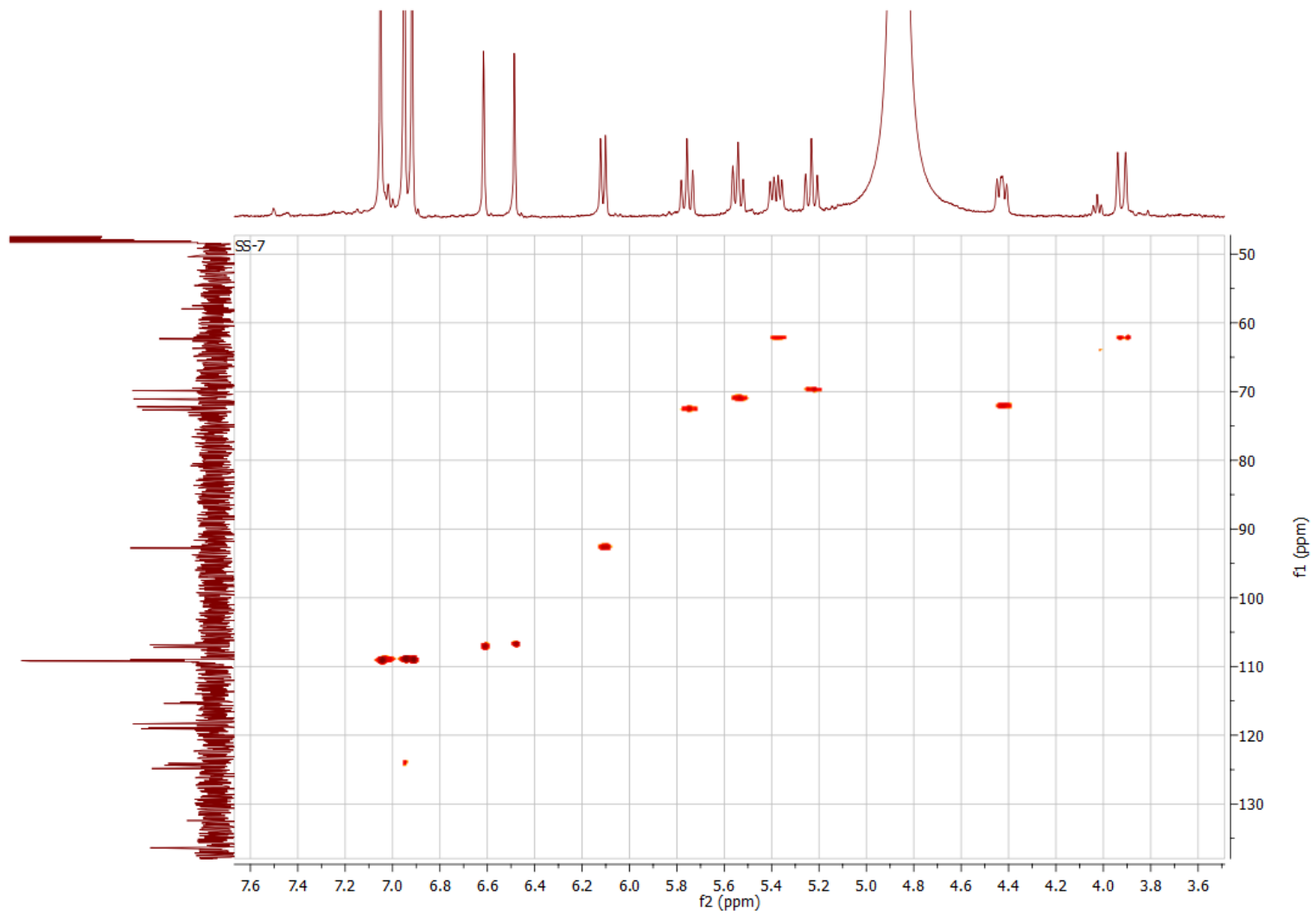
Slika 4.38. ^1H NMR spektar jedinjenja 10.



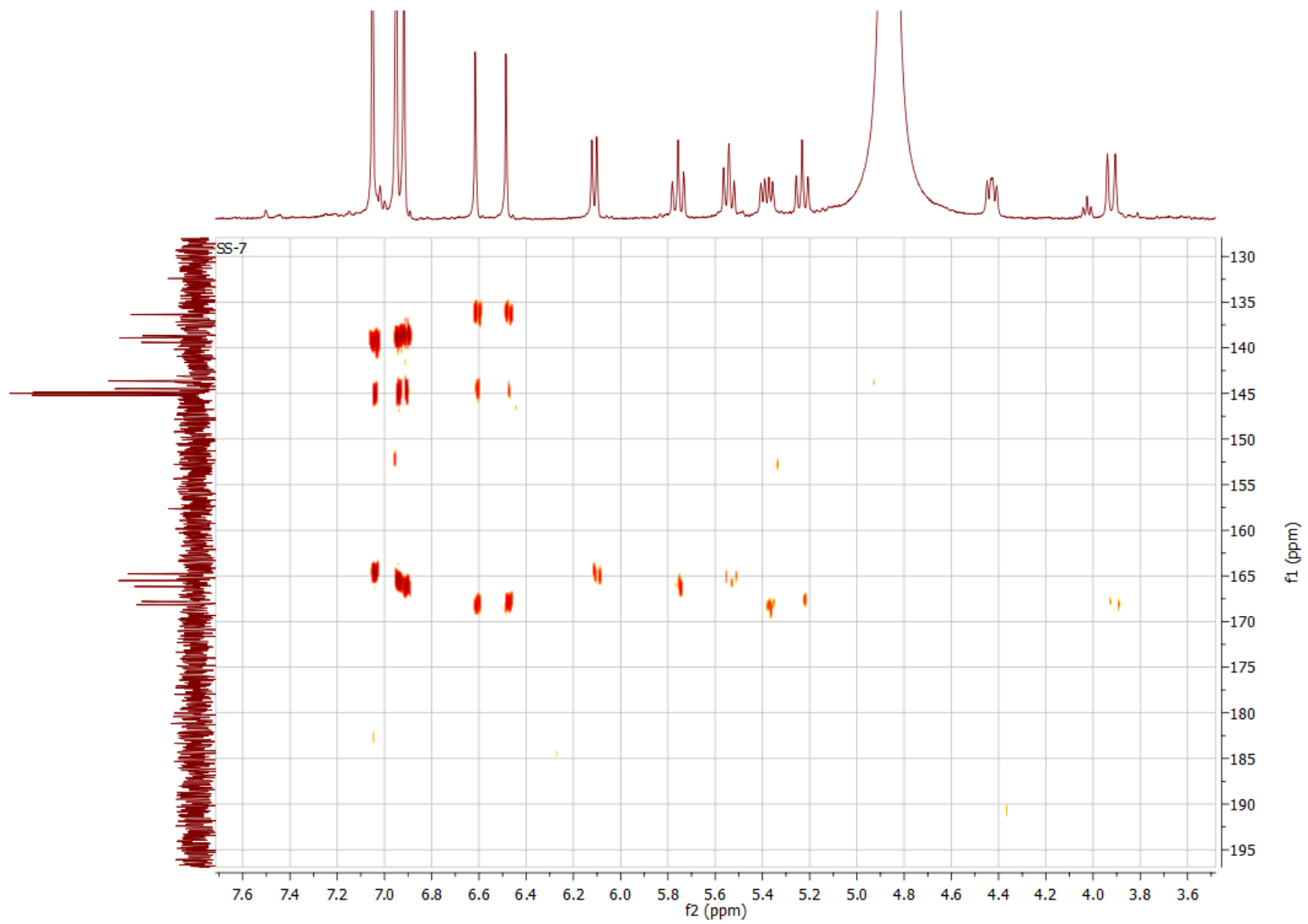
Slika 4.39. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 10.



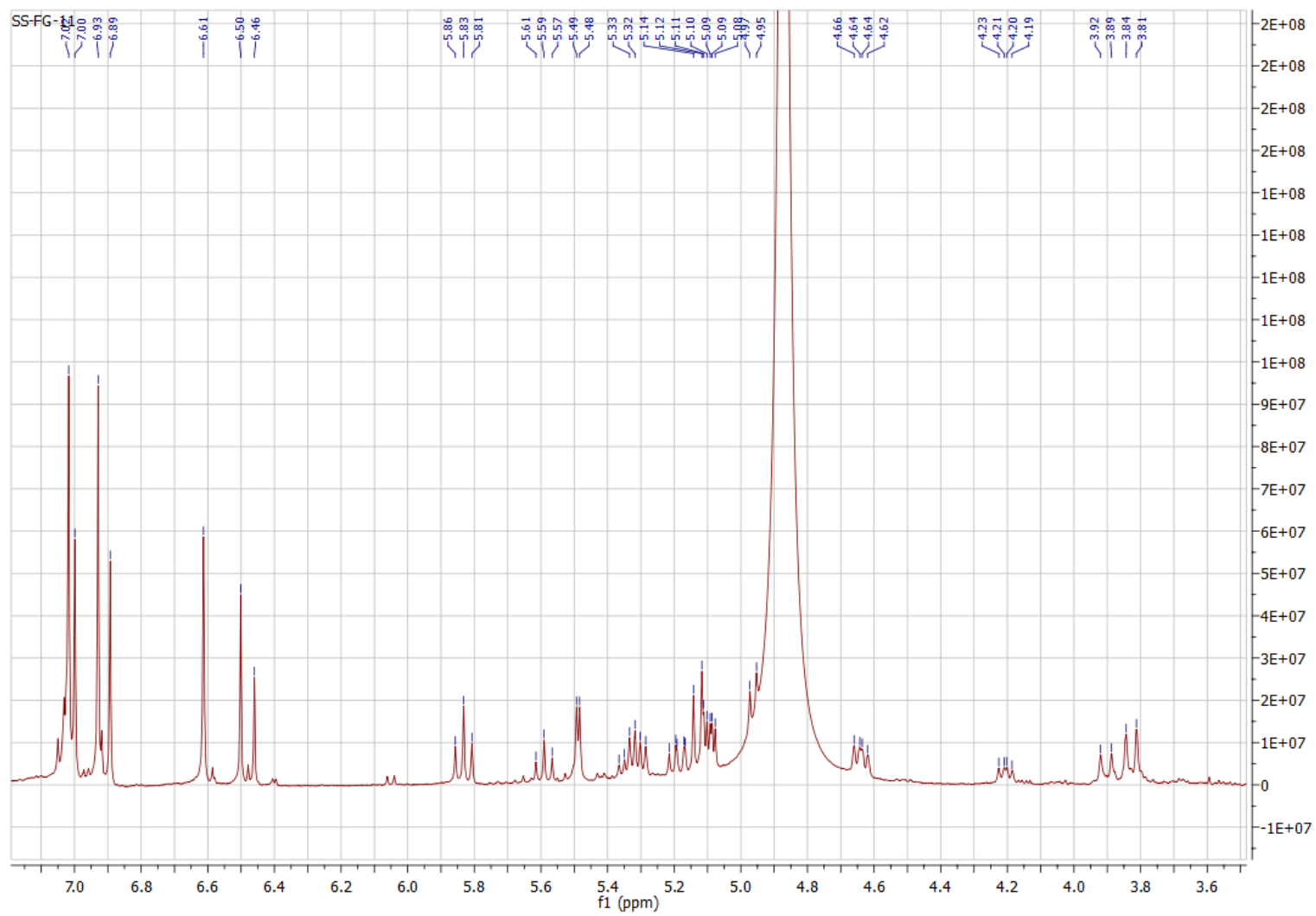
Slika 4.40. COSY spektar jedinjenja 10.



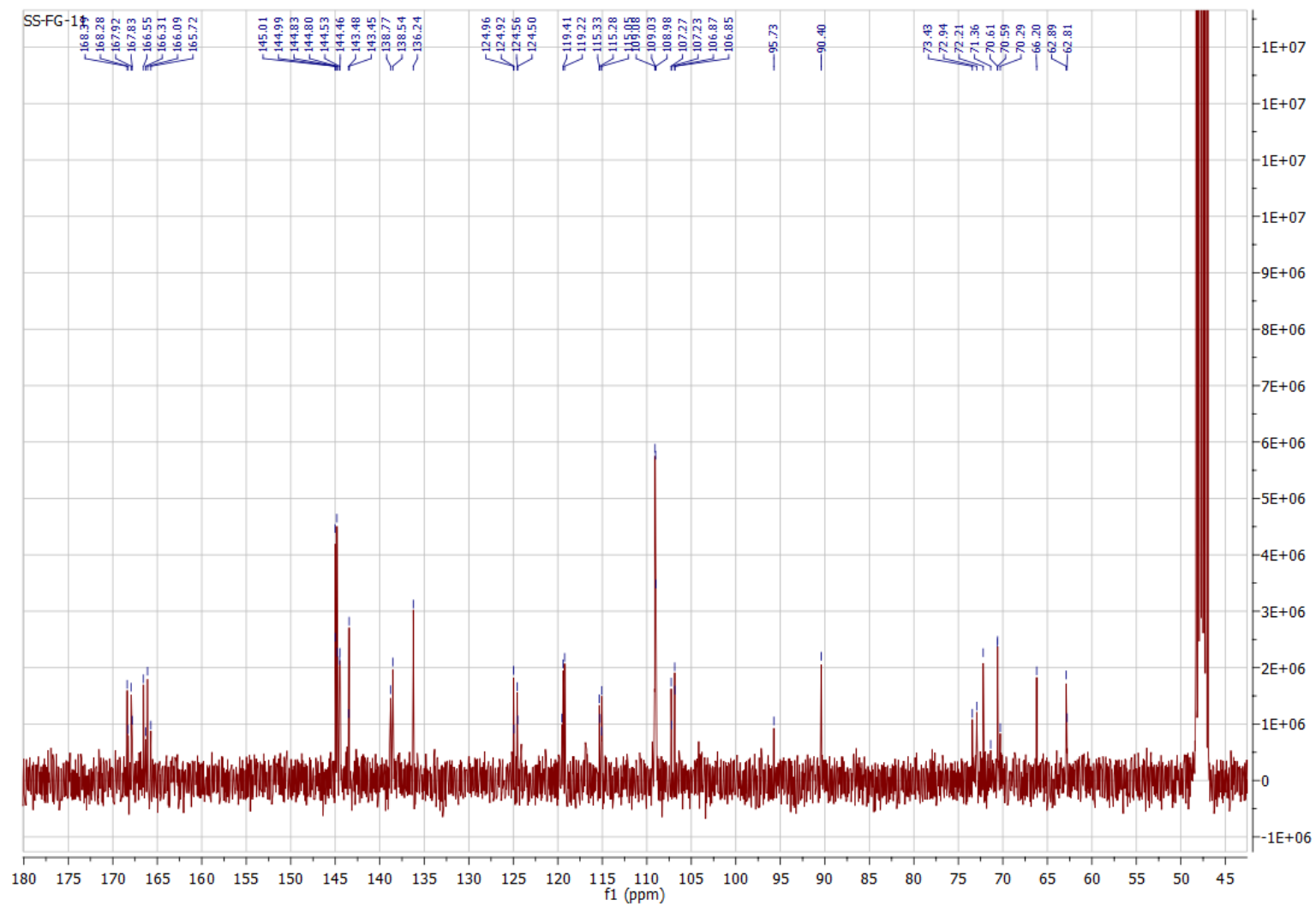
Slika 4.41. HSQC spektar jedinjenja 10.



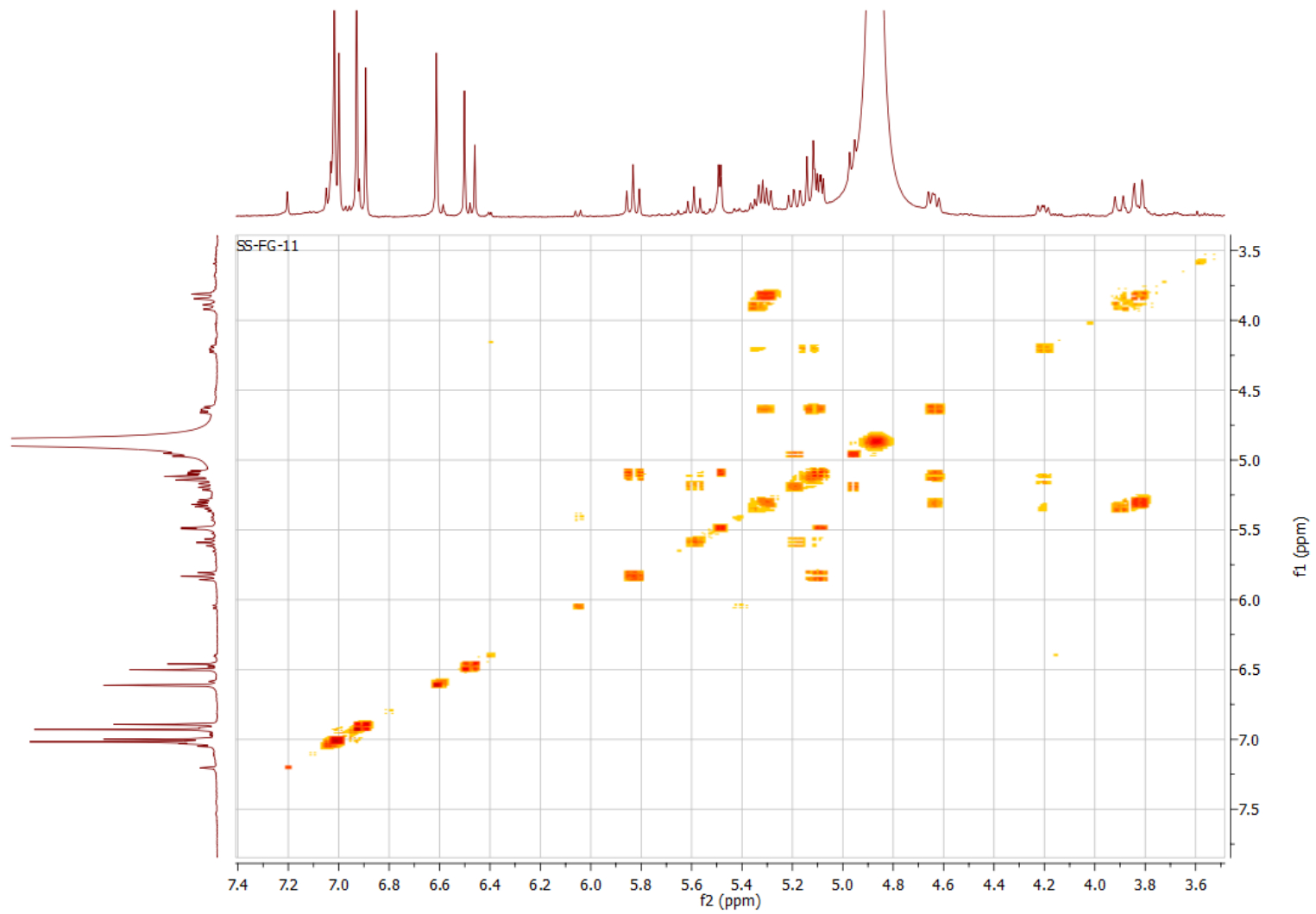
Slika 4.42. HMBC spektar jedinjenja 10.



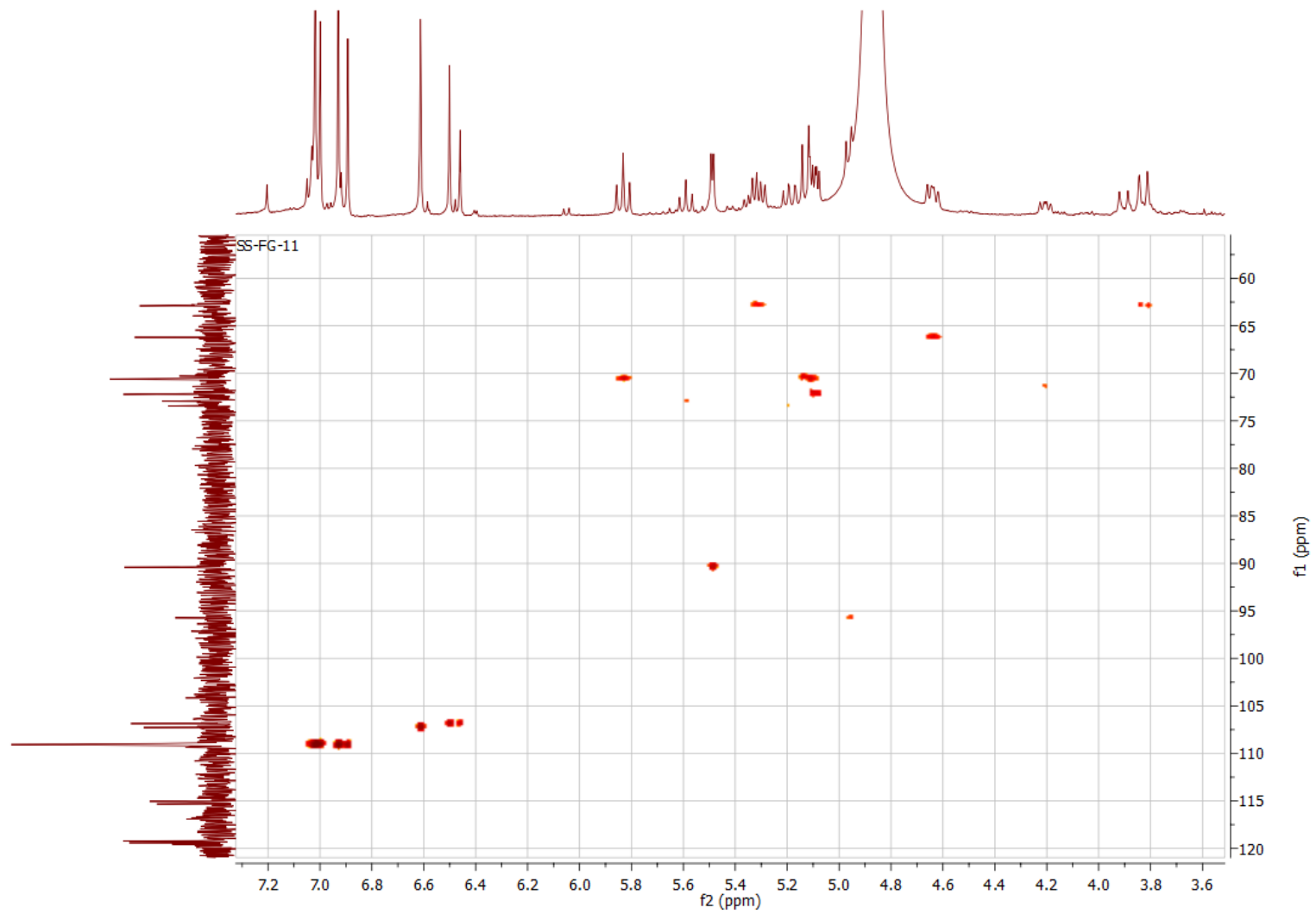
Slika 4.43. ^1H NMR spektar jedinjenja **11** ($\alpha + \beta$ anomer).



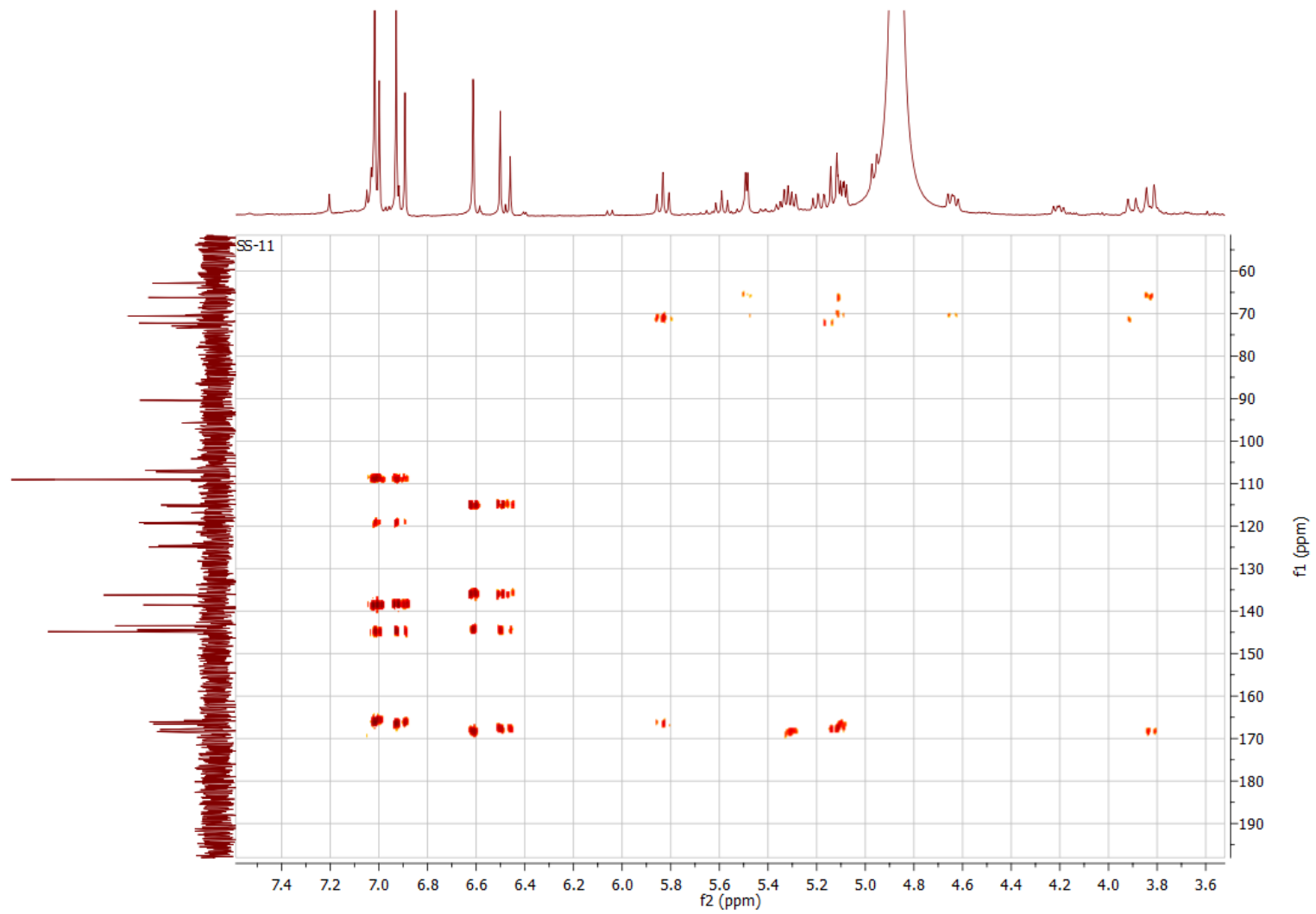
Slika 4.44. ^{13}C NMR spektar jedinjenja **11** ($\alpha + \beta$ anomer).



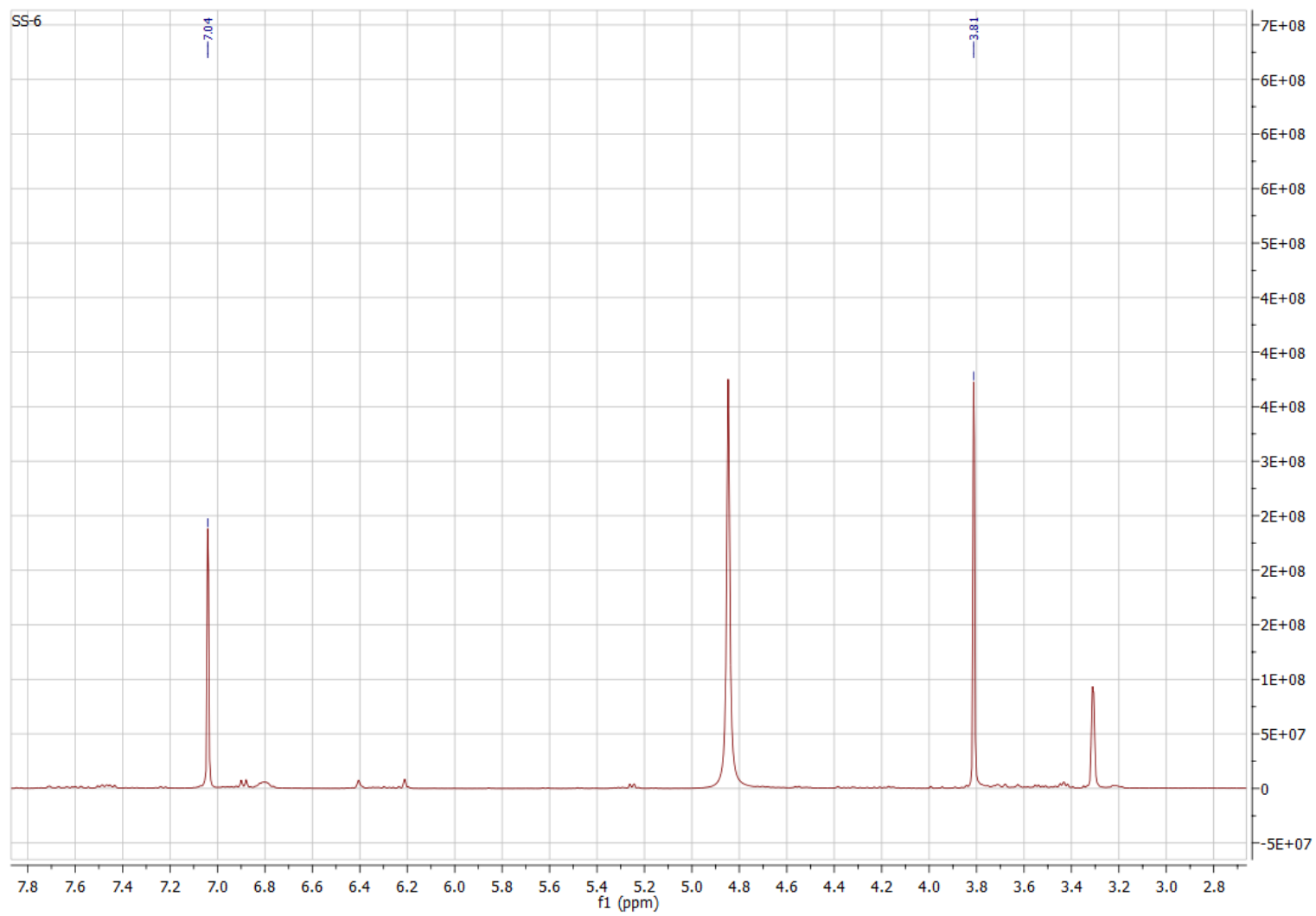
Slika 4.45. COSY spektar jedinjenja **11** ($\alpha + \beta$ anomer).



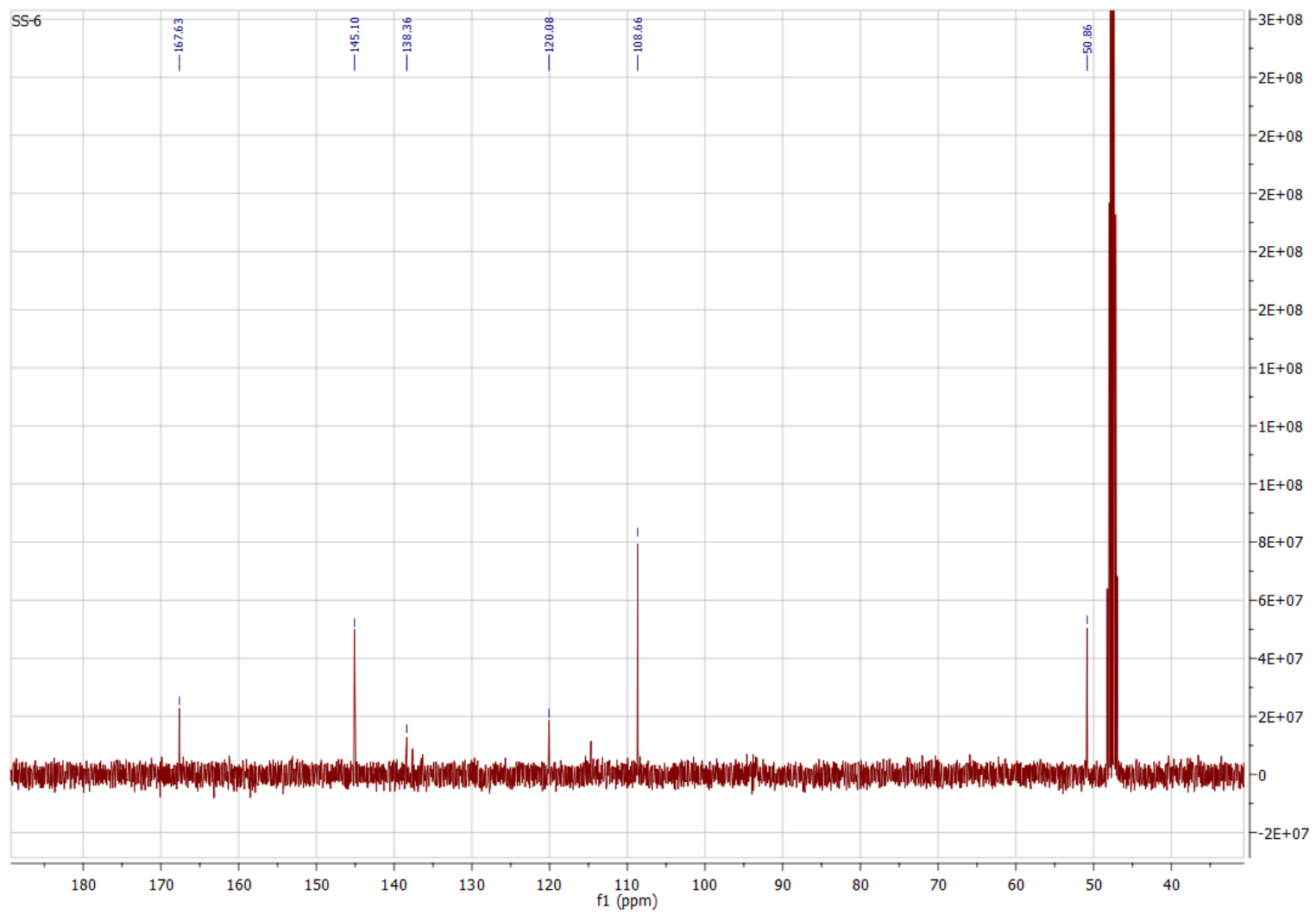
Slika 4.46. HSQC spektar jedinjenja **11** ($\alpha + \beta$ anomer).



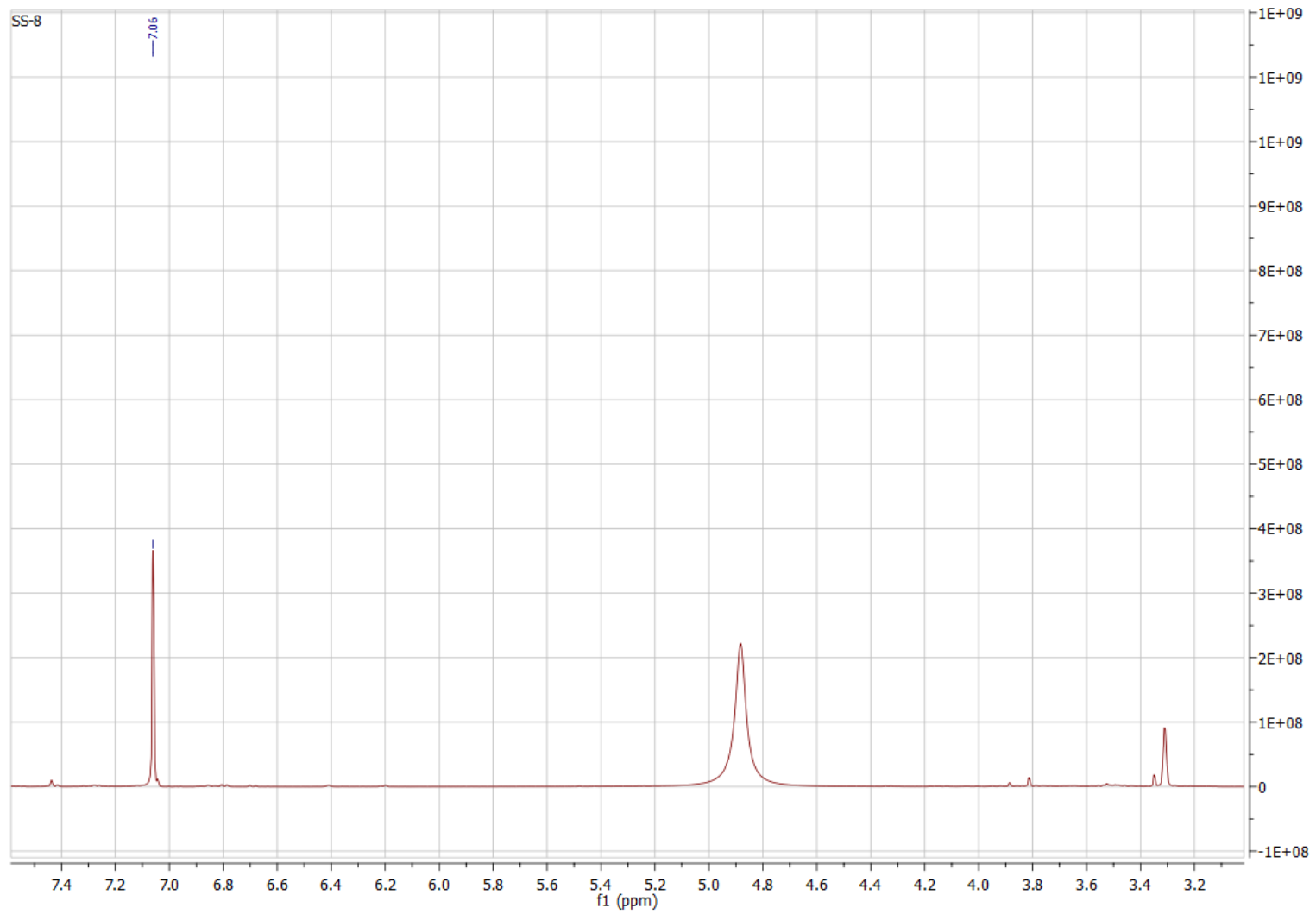
Slika 4.47. HMBC spektar jedinjenja 11 ($\alpha + \beta$ anomer).



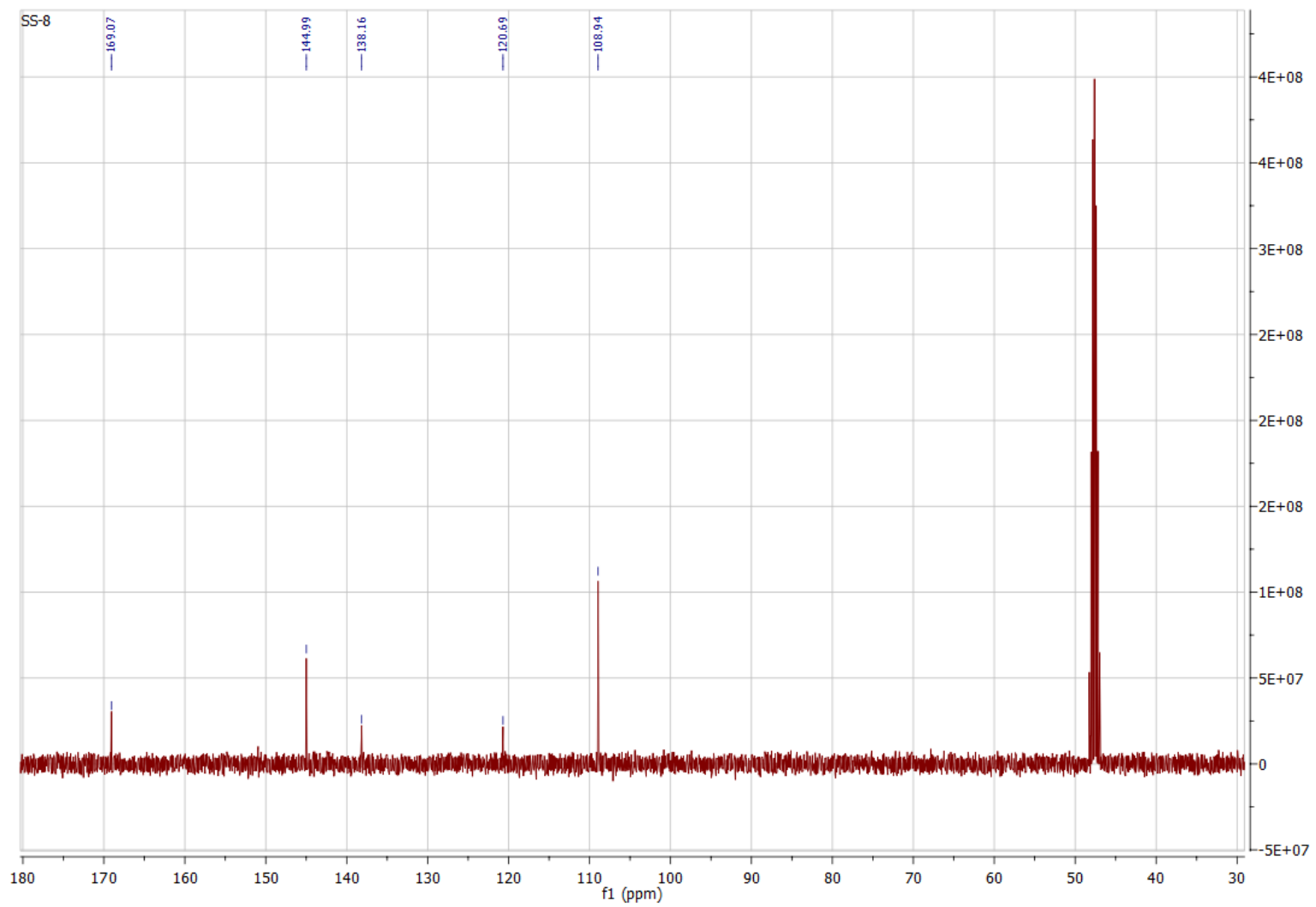
Slika 4.48. ^1H NMR spektar jedinjenja 12.



Slika 4.49. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 12.



Slika 4.50. ^1H NMR spektar jedinjenja 13.



Slika 4.51. ^{13}C NMR spektar jedinjenja 13.

4.3. Rezultati analize hemijskog sastava LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* visokoeffikasnom tečnom hromatografijom

LIC *F. ulmaria* poreklom sa dva lokaliteta (Zlatibor 2014. god; Kopaonik 2016. god.) i LIC *F. vulgaris* poreklom sa jednog lokaliteta (Loćika 2014. god.) analizirani su HPLC-DAD i HPLC-PDA metodom. Utvrđeno je da ispitivani LIC sadrže sastojke polifenolne prirode: flavonoide, fenolkarbonsilne kiseline, tanine i fenolni heterozid. Uočena je sličnost hromatografskih profila ispitivanih ekstrakata i sadržaja identifikovanih sekundarnih metabolita (Tabela 4.2, Slike 4.52.–4.55.), međutim, takođe su primećene izvesne razlike.

Flavonoidi, koji su detektovani u analiziranim uzorcima, pripadaju heterozidima kvercetin ili kemferola. Šećerna komponenta ovih jedinjenja ostvaruje vezu sa aglikonom preko hidroksilne grupe u položaju 3 ili 4'. Glikon je monosaharid (npr. glukoza ili galaktoza), acilovani monosaharid (glukoza ili galaktoza čija je hidroksilna grupa u položaju 2" esterifikovana galnom kiselinom) ili disaharid (rutinoza). U svim ispitivanim ekstraktima kvantitativno dominantni flavonoid je bio spireozid sa sadržajem 55,67 mg/g (LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.), 56,27 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.) i 46,17 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.). Pored ovog metabolita, u LIC *F. vulgaris* su bili prisutni hiperozid, hiperozid 2"-*O*-galat, izokvercitrin, izokvercitrin 2"-*O*-galat, astragalin, astragalin 2"-*O*-galat i kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid. LIC *F. ulmaria* (Zlatibor, 2014. god.) je, pored spireozida, takođe sadržao izokvercitrin, astragalin, kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid i rutin, dok hiperozid i navedeni galoilovani glikozidi nisu detektovani. Spireozid, kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid, mikvelianin (kvercetin 3-*O*- β -D-glukuronid), rutin i heterozid kemferola su identifikovani u LIC *F. ulmaria* (Kopaonik 2016. god.), međutim, nije utvrđeno prisustvo hiperozida, izokvercitrina, astragalina i njihovih 2"-*O*-galoilovanih derivata. Na osnovu dobijenih podataka, može se zaključiti da su ispitivani ekstrakti *F. ulmaria* delimično slični: zajednički flavonoidni sastojci u oba ispitivana uzorka su bili spireozid, kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid i rutin, astragalin i izokvercitrin su detektovani samo u LIC – Zlatibor, 2014. god., dok su mikvelianin i nepotpuno definisan heterozid kemferola identifikovani jedino u LIC – Kopaonik, 2016. god. Najvažnija kvalitativna

razlika u sastavu LIC *F. vulgaris* i LIC *F. ulmaria* ogledala se u tome što su galoilovani flavonoidni heterozidi prisutni samo u ekstraktu *F. vulgaris*.

Najzastupljenija fenolkarboksilna kiselina u svim analiziranim uzorcima je bila galna kiselina: 10,22 mg/g (LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.), 10,96 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.) i 11,15 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.). U manjoj količini u LIC *F. vulgaris* (Loćika, 2014. god.) i *F. ulmaria* (Zlatibor 2014. god) su detektovane elagna i salicilna kiselina. LIC *F. ulmaria* (Kopaonik, 2016. god.) je sadržao salicilnu kiselinu, međutim, prisustvo elagne kiseline nije utvrđeno. Sadržaj gaulterina (metilsalicilat 2-*O*-primeverozida) u analiziranim preparatima se kretao u rasponu 36,65–91,62 mg/g.

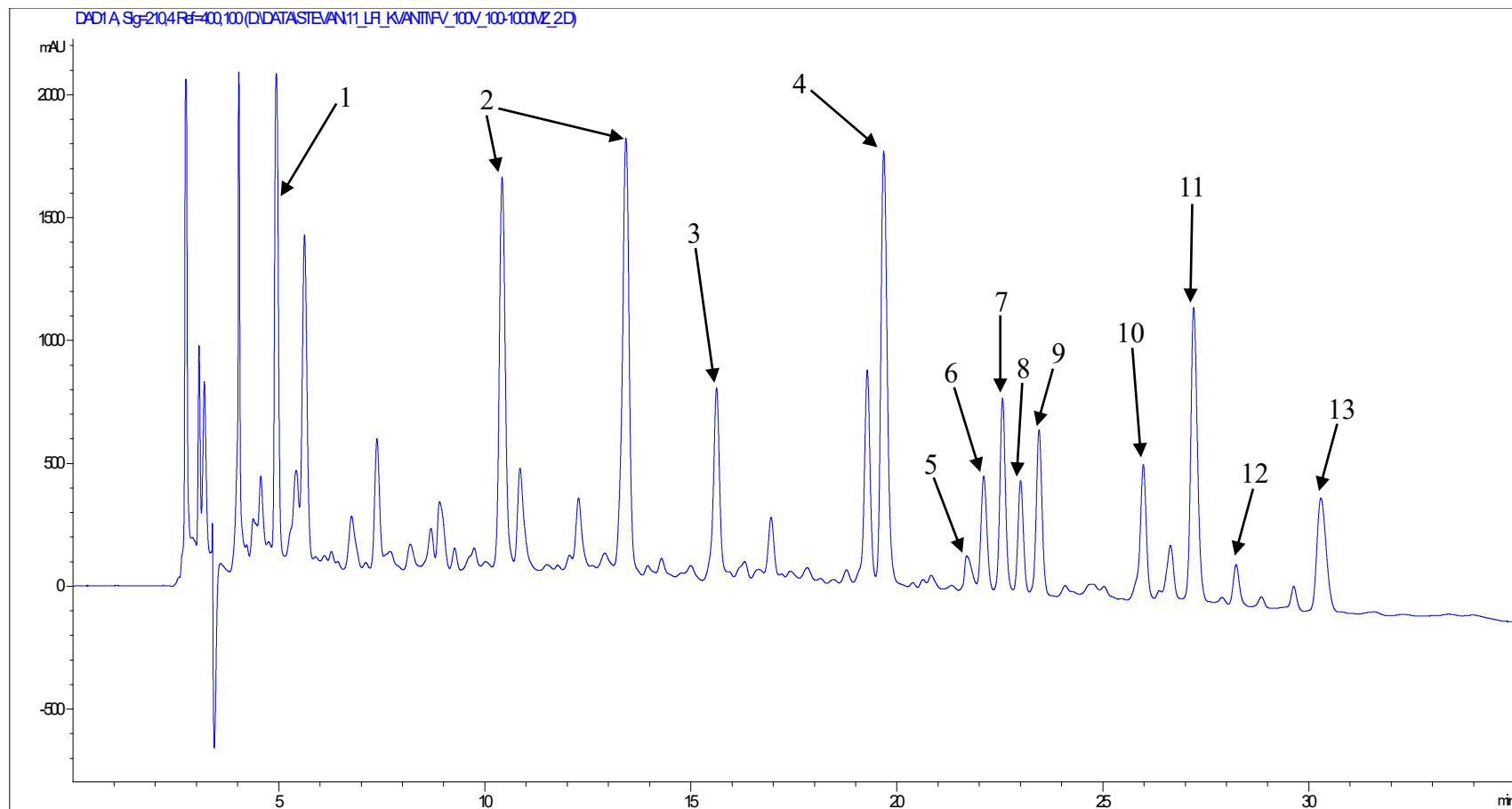
Značajne količine telimagrandina I, elagnog tanina, su određene u sva tri uzorka: 98,86 mg/g (LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.), 124,43 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.) i 157,75 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.). Telimagrandin II je bio manje zastupljen (7,87–40,56 mg/g).

Dobijeni rezultati pokazuju da su analizirani ekstrakti veoma bogati polifenolnim jedinjenjima i u saglasnosti su sa ranijim studijama u kojima su ispitivani sastojci cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris* (Baczek i sar., 2012; ESCOP, 2003; Gniewosz i sar., 2014; Olennikov i Kruglova, 2013; Pukalskienė i sar., 2015). Po prvi put je utvrđeno prisustvo izokvercitrin 2"-*O*-galata i astragalin 2"-*O*-galata u ekstraktima *F. vulgaris*.

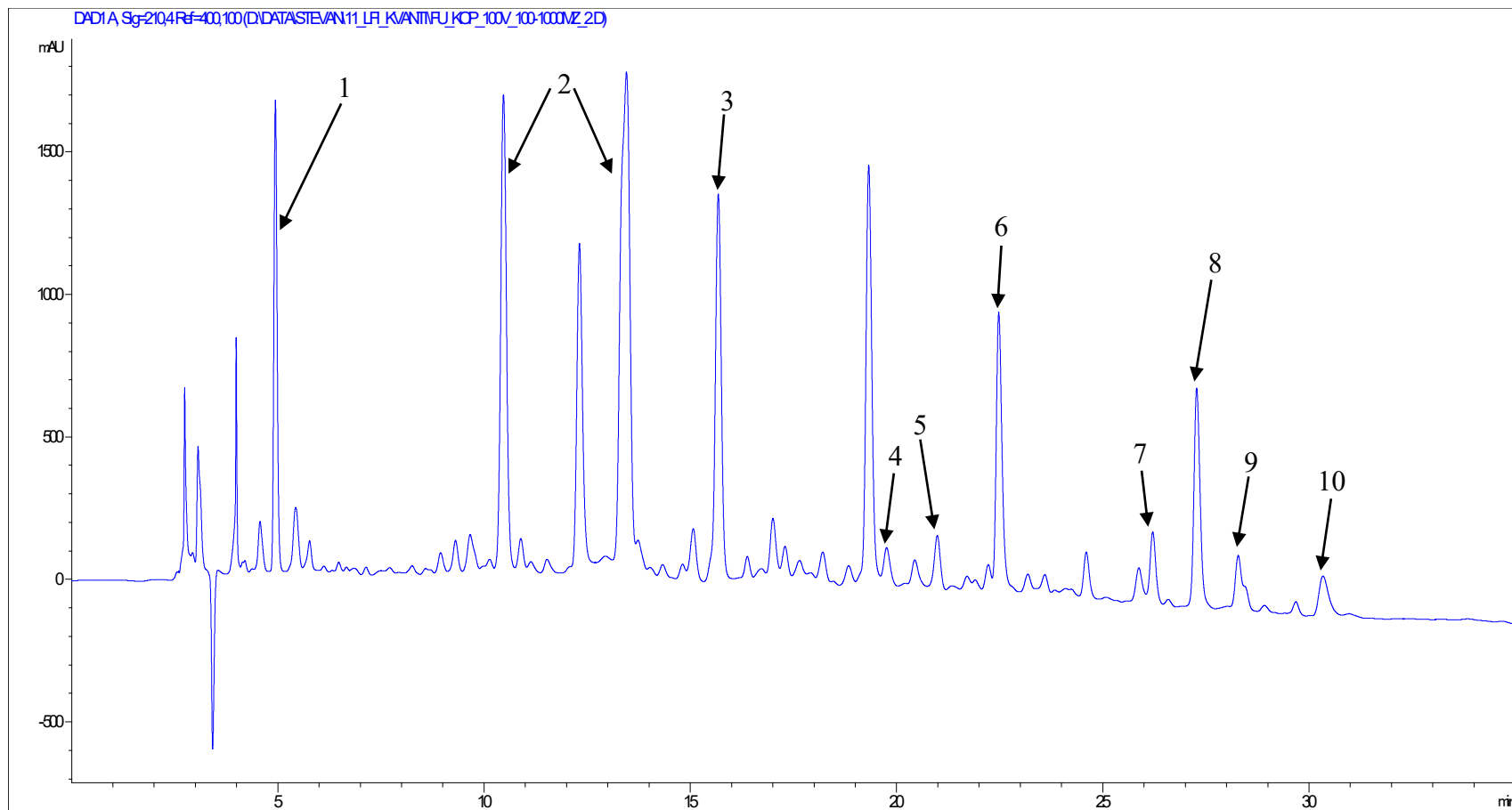
Tabela 4.2. Hemijski sastav liofilizovanih infuza cvasti (LIC) *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

Jedinjenje	Sadržaj (mg/g)		
	LIC <i>F. ulmaria</i>	LIC <i>F. ulmaria</i>	LIC <i>F. vulgaris</i>
	Kopaonik 2016. god.	Zlatibor 2014. god	Loćika 2014. god.
<u>Flavonolni heterozidi</u>			
Spireozid	46,17 ± 1,67 ^x	56,27 ± 1,03 ^y	55,67 ± 1,82 ^y
Hiperozid	nd ^x	nd ^x	5,12 ± 0,17 ^y
Hiperozid 2''-O-galat	nd ^x	nd ^x	7,09 ± 0,15 ^{a, y}
Izokvercitrin	nd ^x	38,44 ± 0,66 ^y	13,24 ± 0,33 ^z
Izokvercitrin 2''-O-galat	nd ^x	nd ^x	11,17 ± 0,27 ^{a, y}
Mikvelianin	45,55 ± 0,12 ^x	nd ^y	nd ^y
Rutin	1,02 ± 0,19 ^x	5,51 ± 0,36 ^y	nd ^z
Astragalin	nd ^x	7,99 ± 0,07 ^y	11,22 ± 0,35 ^z
Astragalin 2''-O-galat	nd ^x	nd ^x	16,10 ± 0,09 ^y
Kemferol 4'-O-β-D-glukozid	11,77 ± 0,17 ^x	14,23 ± 0,18 ^y	7,53 ± 0,11 ^z
Heterozid kemferola	7,37 ± 0,33 ^{b, x}	nd ^y	nd ^y
<u>Fenolkarboksilne kiseline i njihovi derivati</u>			
Galna kiselina	11,15 ± 0,13 ^x	10,96 ± 0,08 ^x	10,22 ± 0,28 ^y
Elagna kiselina	nd ^x	5,35 ± 0,35 ^y	3,8 ± 0,18 ^z
Salicilna kiselina	1,55 ± 0,03 ^x	6,57 ± 0,05 ^y	3,5 ± 0,12 ^z
Gaulterin	91,62 ± 0,47 ^x	60,22 ± 0,30 ^y	36,65 ± 0,14 ^z
<u>Tanini</u>			
Telimagrandin I	157,75 ± 0,05 ^x	124,43 ± 0,28 ^y	98,86 ± 0,88 ^z
Tellimagrandin II	7,87 ± 0,04 ^x	10,78 ± 0,17 ^y	40,56 ± 0,69 ^z

Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD, $n = 3$; nd, jedinjenje nije detektovano; ^a izraženo kao smeša hiperozid 2''-O-galata i izokvercitrin 2''-O-galata (1:2 m/m); ^b izraženo kao astragalin. Srednje vrednosti obeležene različitim slovima (x, y, z) u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

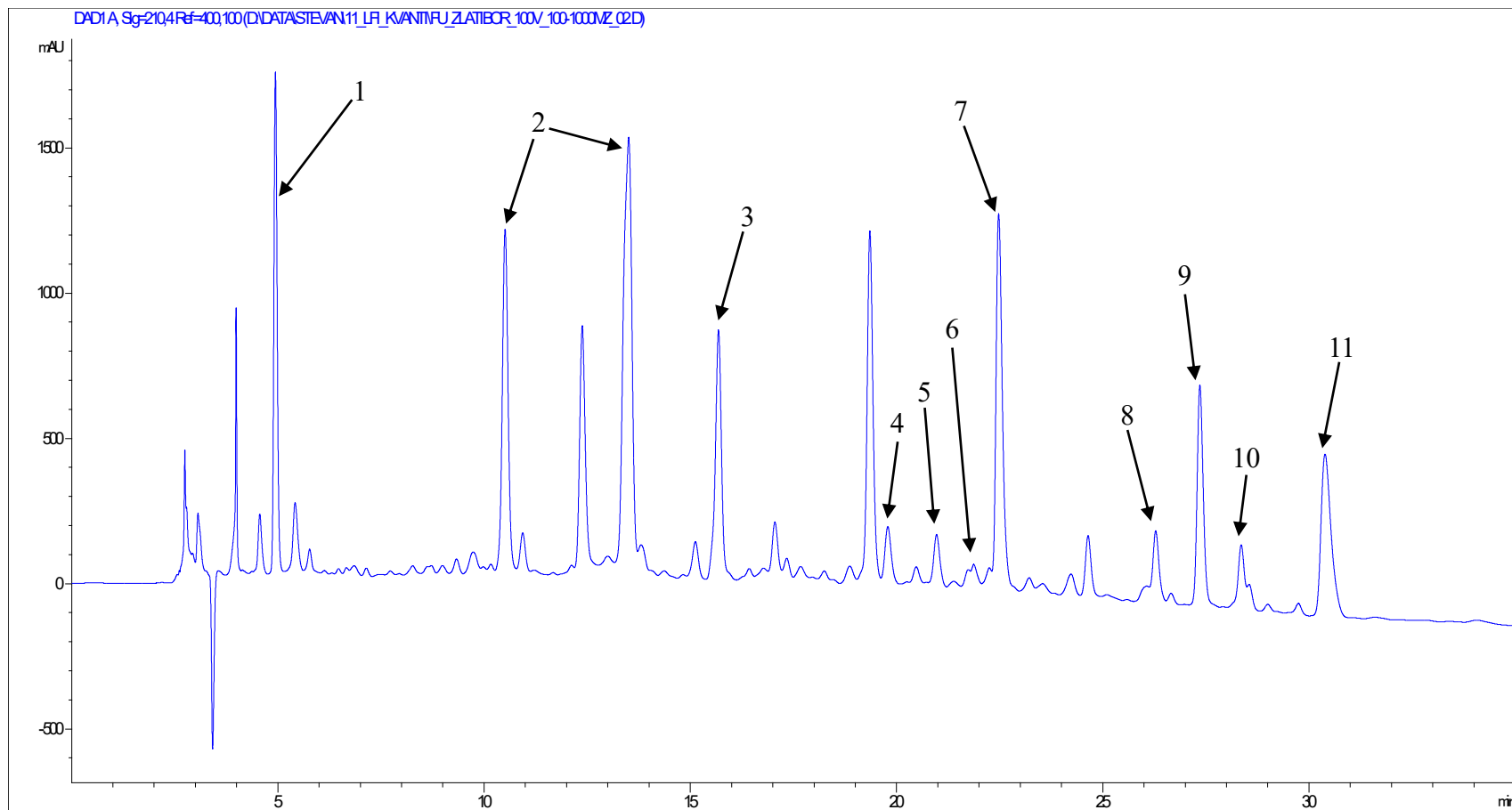


Slika 4.52. HPLC hromatogram liofilizovanog infuza cvasti *F. vulgaris*, Loćika 2014. god. ($\lambda = 210$ nm). 1 – galna kiselina; 2 – telimagrandin I; 3 – gaulterin; 4 – telimagrandin II; 5 – elagna kiselina; 6 – hiperozid; 7 – izokvercitrin; 8 – hiperozid 2''-O-galat; 9 – izokvercitrin 2''-O-galat; 10 – astragalin; 11 – spireozid; 12 – kemferol 4'-O- β -D-glukozid; 13 – salicilna kiselina.



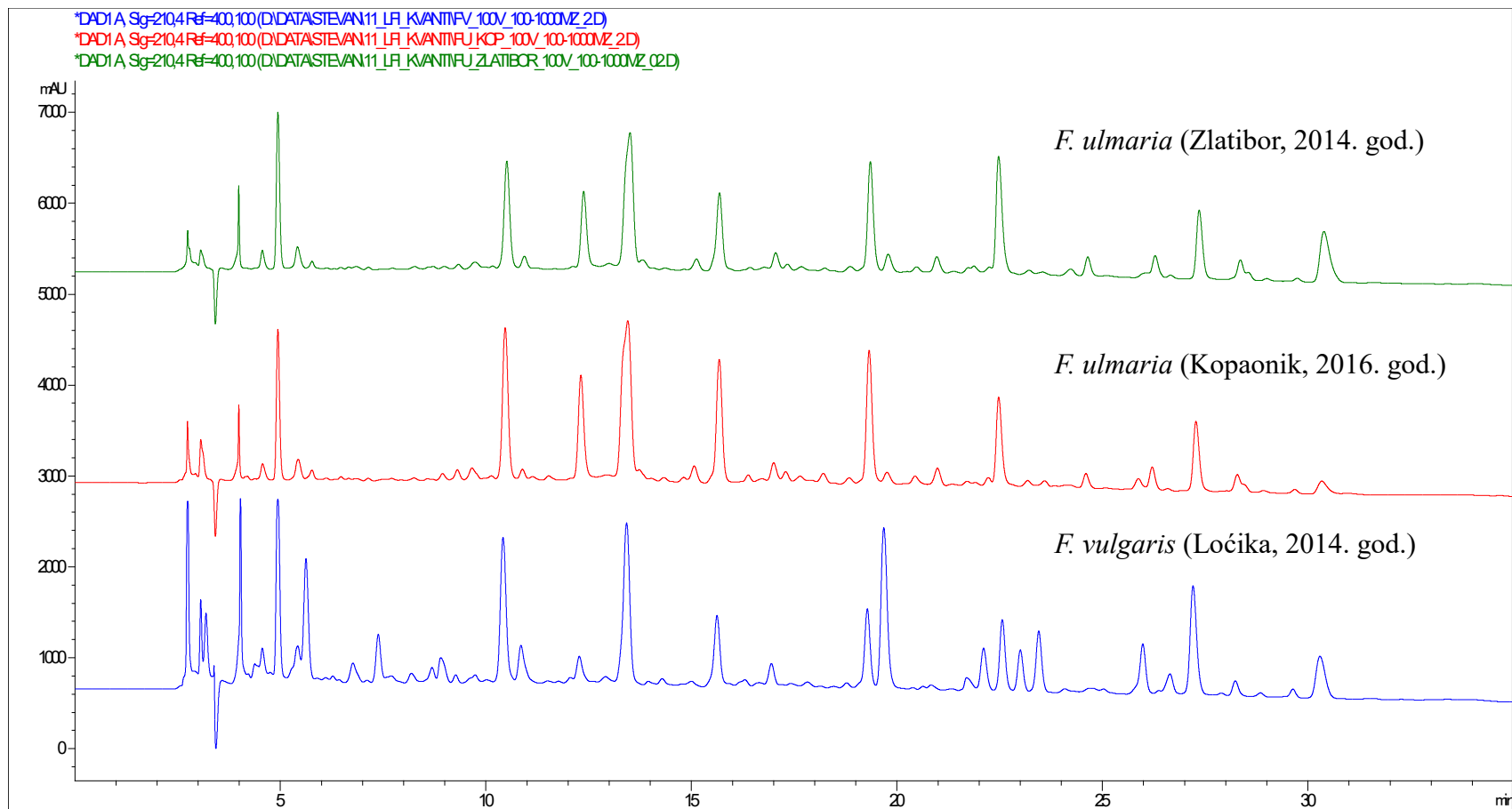
Slika 4.53. HPLC hromatogram liofilizovanog infuza cvasti *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god. ($\lambda = 210$ nm).

1 – galna kiselina; 2 – telimagrandin I; 3 – gaulterin; 4 – telimagrandin II; 5 – rutin; 6 – mikvelianin; 7 – derivat kemferola; 8 – spireozid;
 9 – kemferol 4'-O- β -D-glukozid; 10 – salicilna kiselina.



Slika 4.54. HPLC hromatogram liofilizovanog infuza cvasti *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god. ($\lambda = 210$ nm).

1 – galna kiselina; 2 – telimagrandin I; 3 – gaulterin; 4 – telimagrandin II; 5 – rutin; 6 – elagna kiselina; 7 – izokvercitrin;
 8 – astragalin; 9 – spireozid; 10 – kemferol 4'-*O*- β -D-glukozid; 11 – salicilna kiselina.



Slika 4.55. HPLC hromatogrami liofilizovanih infuza cvasti *F. ulmaria* (Zlatibor, 2014. god.; Kopaonik, 2016. god.)
 i *F. vulgaris* (Loćika, 2014. god.) ($\lambda = 210 \text{ nm}$).

4.4. Antioksidantna svojstva

4.4.1. DPPH, 2-dezoksiriboza i FRAP test

LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i njihov kvantitativno dominantni flavonolni heterozid spireozid ispoljili su značajnu antioksidantnu aktivnost uporedivu sa aktivnošću kontrolnih supstanci (Tabela 4.3.).

Ispitivani biljni izolati su koncentraciono-zavisno neutralisali DPPH radikal. IC₅₀ vrednosti testiranih ekstrakata kretale su se u rasponu 8,45–10,20 µg/mL, dok je odgovarajuća vrednost spireozida (19,54 µg/mL) bila veća. Ovakav rezultat se može objasniti strukturnim karakteristikama spireozida. Naime, poznato je da visoki anti-DPPH efekat ispoljavaju flavonoidi koji poseduju *o*-dihidroksilni sistem, dvostruku vezu (C₂=C₃) i okso grupu u položaju C₄, i da se glikozilovanjem ili metilovanjem najčešće snižava aktivnost (Burda i Oleszek, 2001; Yokozawa i sar., 1998). S obzirom da je kateholna grupa u prstenu B spireozida glukozilovana, može se pretpostaviti da je ovo razlog umanjena antioksidantnog efekta ovog jedinjenja u DPPH testu. Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa prethodnim ispitivanjima u kojima je pokazano da spireozid ispoljava antiradikalisku aktivnost, odnosno redukuje nivo superoksidnog anjona, DPPH i OH• radikala (Gao i sar., 2010; Miliauskas i sar., 2004; Ramos i sar., 2006; Suh i sar., 1999).

FRAP vrednosti, pokazatelj redukcione sposobnosti ispitivanih uzoraka, bile su u rasponu 4,46–7,72 mmol Fe²⁺/g za preparate *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, odnosno iznosila je 15,02 mmol Fe²⁺/g spireozida. Testirani flavonoid je ispoljio jaču aktivnost od ekstrakata i standardnog jedinjenja – askorbinske kiseline (FRAP vrednost = 13,29 mmol Fe²⁺/g).

LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* nisu dostigli 50% neutralizacije OH• radikala u 2-dezoksiriboza testu. Spireozid je bio aktivan (IC₅₀ = 5,1 µg/mL), međutim, manje od standardne supstance (kvercetin, IC₅₀ = 3,1 µg/mL).

Tabela 4.3. Antioksidantna aktivnost liofilizovanih infuza cvasti (LIC) i spireozida.

	DPPH IC ₅₀ ^a (µg/mL)	OH• IC ₅₀ ^b (µg/mL)	FRAP vrednost ^a (mmol Fe ²⁺ /g)
<i>F. vulgaris</i> LIC (Loćika, 2014. god.)	9,10 ± 0,09	ne	7,72 ± 0,04
<i>F. ulmaria</i> LIC (Zlatibor, 2014. god.)	10,20 ± 0,26	ne	6,76 ± 0,32
<i>F. ulmaria</i> LIC (Kopaonik, 2016. god.)	8,45 ± 0,06	ne	4,46 ± 0,1
Spireozid	19,54 ± 0,23	5,1	15,02 ± 0,64
L-askorbinska kiselina	4,09 ^c	nt	13,29 ± 0,26
Kvercetin	nt	3,1 ^c	nt

nt, nije testiran; ne, nije efektivan – IC₅₀ > 16,67 µg/mL; ^a izraženo kao srednja vrednost ± SD ($n = 3$); ^b podatak dobijen iz tri nezavisna eksperimenta; ^c Kukić i sar., 2006.

Pokazana dobra anti-DPPH i Fe³⁺-redukujuća svojstva LIC su u saglasnosti sa prethodno publikovanim studijama u kojima su ispitivani drugačiji tipovi ekstrakata vrsta roda *Filipendula*. Naime, metanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je efikasno smanjio koncentraciju DPPH radikala (IC₅₀ = 8,25 µg/mL) i ispoljio značajnu redukciju sposobnost u FRAP testu (FRAP vrednost = 7,20 mmol Fe²⁺/mg), dok je dekokt cvasti *F. ulmaria* značajno neutralisao DPPH (IC₅₀ = 10,43 µg/mL) i ABTS^{•+} radikal (IC₅₀ = 5,74 µg/mL) (Maksimović i sar., 2007; Olenikov i sar., 2016). Izloženi rezultati predstavljaju prvo ispitivanje antioksidantne sposobnosti preparata (infuza) relevantnog sa aspekta tradicionalne primene.

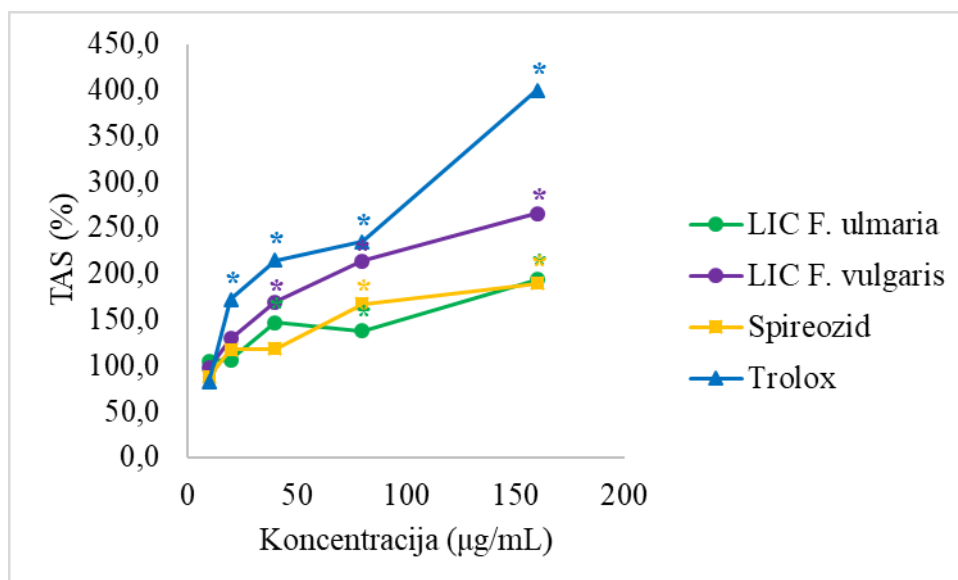
Flavonoidi i tanini su dobri antioksidansi koji svoj efekat ostvaruju direktnim neutralisanjem slobodnih radikala, aktivacijom antioksidantnih enzima, heliranjem jona prelaznih metala, inhibiranjem oksidaza, povećanjem nivoa mokraćne kiseline (Koleckar i sar., 2008; Procházková i sar., 2011). Dobijeni rezultati sugerišu da spireozid participira u ukupnom antioksidantnom efektu LIC. Uzimajući u obzir sprovedenu HPLC analizu (Tabela 4.2.) može se pretpostaviti da je značajan antioksidantni kapacitet posledica prisustva različitih polifenolnih jedinjenja. Ovu hipotezu podržavaju eksperimentalni dokazi antioksidantne aktivnosti mnogih sastojaka LIC. Astragalin, hiperozid, izokvercitrin, astragalin 2''-O-galat, hiperozid 2''-O-galat, izokvercitrin 2''-O-galat, mikvelianin, telimagrandin I, telimagrandin II, galna kiselina i elagna kiselina (Bi i sar., 2016; Calis i sar., 1999; Chen i sar., 2014; Fukuda i sar., 2003;

Gao i sar., 2010; Kato i sar., 2016; B.-H. Kim i sar., 2013; M. H. Kim i sar., 2013; Miliuskas i sar., 2004; Miyajima i sar., 2004; Nazemiyeh i sar., 2010; Wang i sar., 2005; Yoshimura i sar., 2008; Zheleva-Dimitrova i sar., 2012) mogu da neutrališu DPPH radikal. Redukcione osobine mikvelianina, izokvercitrina, hiperozida i hiperozid 2''-O-galata potvrđene su u FRAP testu (Bi i sar., 2016; Zheleva-Dimitrova i sar., 2012). Mikvelianin, izokvercitrin i hiperozid su takođe pokazali sposobnost redukcije nivoa OH• i ABTS•+ radikala (Marzouk i sar., 2006; Zheleva-Dimitrova i sar., 2012). Astragalin 2''-O-galat i izokvercitrin 2''-O-galat su ispoljili aktivnost u ORAC testu, kao i sposobnost da redukuju Cu²⁺ do Cu¹⁺ jona (Luyen i sar., 2014b). Smeša hiperozida i izokvercitrina, kao i smeša njihovih derivata (2''-O-galata), sprečila je narušavanje endotel-zavisne relaksacije izolovane aorte pacova indukovano slobodnim radikalima (Akdemir i sar., 2001). Na osnovu navedenih podataka, čini se vrlo verovatnim da je aktivnost LIC posledica sinergističkog delovanja više različitih polifenolnih sastojaka.

4.4.2. Uticaj na parametre oksidativno-stresnog statusa u humanom serumu

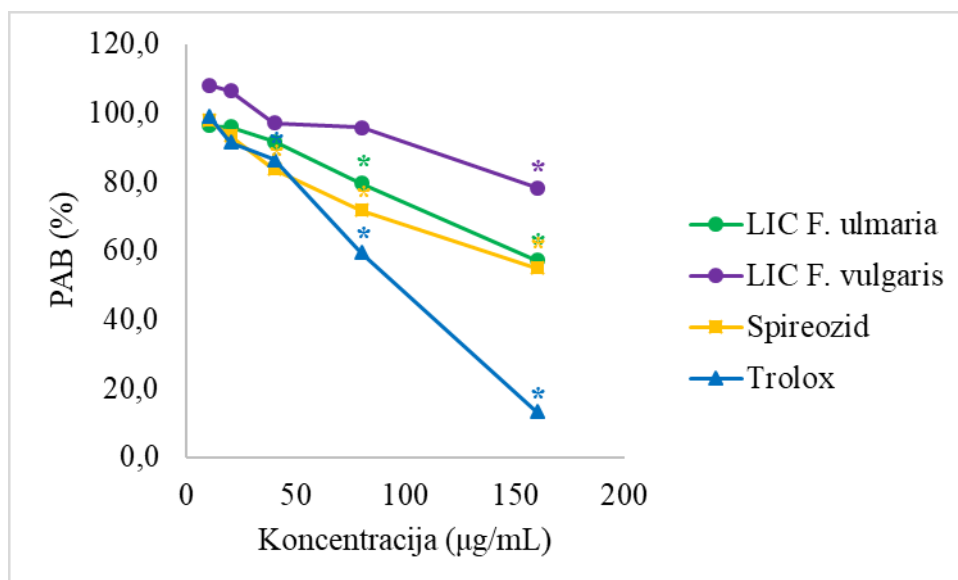
Antioksidantna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, flavonolnog heterozida spireozida i hidrosolubilnog analoga vitamina E (referentna supstanca, zaštićeni naziv: Trolox) ispitana je *in vitro* u humanom serumu nakon indukovanja oksidativnog stresa *tert*-butilhidroperoksidom (TBH). Testirani ekstrakti i jedinjenja su primenjeni u koncentracionom opsegu 10–160 µg/mL. Protektivna sposobnost uzoraka je procenjena praćenjem njihovog uticaja na vrednosti parametara totalnog antioksidativnog statusa (TAS), prooksidativno-antioksidativnog balansa (PAB), totalnog oksidativnog statusa (TOS) i antioksidativnog indeksa (AI).

Vrednosti TAS analiziranih uzoraka su bile srazmerne aplikovanoj koncentraciji ekstrakata/supstanci, tj. pokazana je koncentraciona-zavisnost antioksidantnog efekta. Statistički značajno ($p < 0,05$) povećanje ovog parametra uočeno je za LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (40–160 µg/mL), spireozid (80–160 µg/mL) i Trolox (20–160 µg/mL). Pri najvećoj testiranoj koncentraciji (160 µg/mL), kada su i vrednosti TAS bila najveće, antioksidantni efekat referentne supstance (400%) je bio najizraženiji, LIC *F. vulgaris* je delovo manje potentno (266%), dok su LIC *F. ulmaria* (194%) i spireozid (190%) ispoljili najslabiju aktivnost. Zavisnost vrednosti TAS (%) od koncentracije primenjenog preparata/jedinjenja je prikazana na Slici 4.56.



Slika 4.56. Zavisnost vrednosti totalnog antioksidativnog statusa, TAS (%), od koncentracije primenjenog ekstrakta/jedinjenja. Vrednost TAS (%) dobijena je primenom formule: $TAS (\%) = (\text{srednja vrednost TAS analiziranih uzoraka iste koncentracije preparata ili jedinjenja} / \text{srednja vrednost TAS kontrolnih uzoraka}) \times 100$. LIC, liofilizovani infuz cvasti. Vrednosti TAS (%) statistički značajno različite od odgovarajuće vrednosti kontrolne grupe ($p < 0,05$) su na grafiku označene simbolom *.

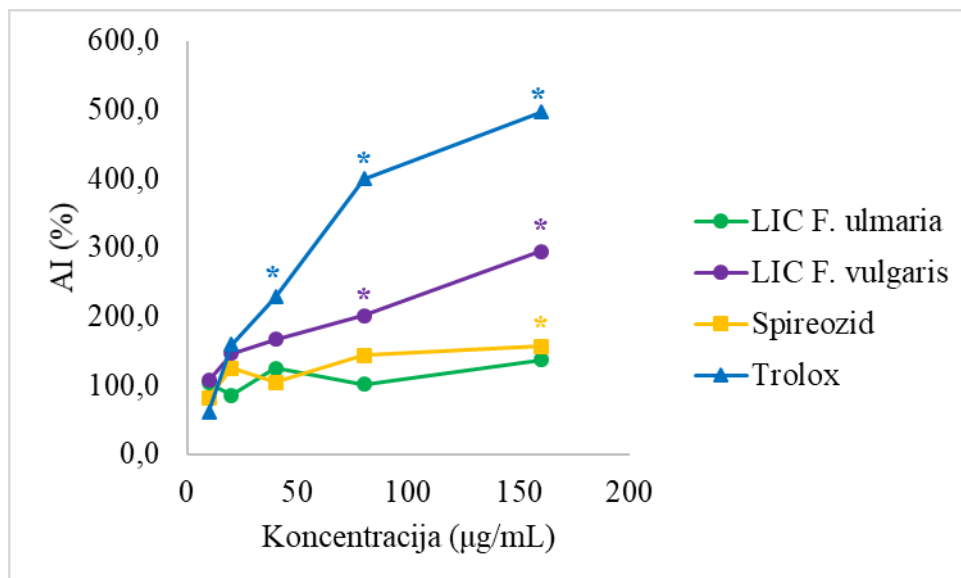
Ispitivani uzorci su uticali na vrednosti parametra prooksidativno-antioksidativni balans (PAB) (Slika 4.57.). Ekstrakti su ispoljili statistički značajnu aktivnost ($p < 0,05$) samo u većim koncentracijama (LIC *F. ulmaria*, 80–160 µg/mL; LIC *F. vulgaris*, 160 µg/mL), dok su Trolox i spireozid delovali u širem koncentracionom opsegu (40–160 µg/mL). Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji (160 µg/mL), efekat Trolox-a je bio najizraženiji (13%), aktivnost spireozida (55%) i LIC *F. ulmaria* (57%) je bila slabija, dok je LIC *F. vulgaris* (78%) delovao najmanje potentno.



Slika 4.57. Zavisnost vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa, PAB (%), od koncentracije primenjenog ekstrakta/jedinjenja. Vrednost PAB (%) dobijena je primenom formule: $PAB (\%) = (\text{srednja vrednost PAB analiziranih uzoraka iste koncentracije preparata ili jedinjenja} / \text{srednja vrednost PAB kontrolnih uzoraka}) \times 100$. LIC, liofilizovani infuz cvasti. Vrednosti PAB (%) statistički značajno različite od odgovarajuće vrednosti kontrolne grupe ($p < 0,05$) su na grafiku označene simbolom *.

Ekstrakti testiranih *Filipendula* vrsta nisu ispoljili statistički značajan efekat na vrednosti parametra TOS (%), iako je primećen trend blagog porasta vrednosti ovog parametra sa porastom koncentracije LIC. Spireozid (80–160 µg/mL) je značajno ($p < 0,05$) povećao vrednosti TOS (117–121%), što je u saglasnosti sa osobinom flavonoida da u većim koncentracijama mogu delovati prooksidantno (Procházková i sar., 2011). Jedino je Trolox (80 µg/mL) statistički značajno smanjio vrednost TOS (59%).

Vrednosti AI Trolox-a (40–160 µg/mL), LIC *F. vulgaris* (80–160 µg/mL) i spireozida (160 µg/mL) su se značajno razlikovale od vrednosti AI kontrolne grupe. Nasuprot tome, LIC *F. ulmaria* u testiranom koncentracionom opsegu (10–160 µg/mL) nije statistički značajno delovao na vrednosti AI, iako je primećen trend porasta ovog parametra sa povećanjem koncentracije ekstrakta (Slika 4.58.). Najizraženiji efekat je postignut dodatkom Trolox-a, LIC *F. vulgaris* je bio manje aktivan od korišćenog standarda, dok je spireozid ispoljio najslabiji uticaj na vrednosti AI.



Slika 4.58. Zavisnost vrednosti antioksidativnog indeksa, AI (%), od koncentracije primenjenog ekstrakta/jedinjenja. Vrednost AI (%) dobijena je primenom formule: $AI (\%) = (\text{srednja vrednost AI analiziranih uzoraka iste koncentracije preparata ili jedinjenja} / \text{srednja vrednost AI kontrolnih uzoraka}) \times 100$. LIC, liofilizovani infuz cvasti. Vrednosti AI (%) statistički značajno različite od odgovarajuće vrednosti kontrolne grupe ($p < 0,05$) su na grafiku označene simbolom *.

Ispitivani LIC i spireozid su povećali antioksidantni kapacitet humanog seruma što se manifestovalo povećanjem vrednosti TAS i AI, odnosno smanjenjem vrednosti PAB. Na osnovu predstavljenih rezultata, može se zaključiti da, pored spireozida i drugi sastojci doprinose ukupnoj aktivnosti ekstrakata. Porast vrednosti TOS nakon aplikacije ispitivanih preparata i flavonoida je ukazao na njihov prooksidatni potencijal, koji je u slučaju najviših koncentracija spireozida bio i statistički značajan. Ovaj podatak navodi na zaključak da je primenjena koncentracija važna determinanta kvaliteta ispoljenog efekta. Donošenje konačnog zaključka o *in vitro* antioksidantnoj aktivnosti spireozida i LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* u humanom serumu zahteva dodatna istraživanja.

4.4.3. Antioksidantni potencijal cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris*

Reaktivna kiseonična i azotna jedinjenja obuhvataju slobodne radikale sa nesparenim valentnim elektronima (superoksid, $O_2^{\bullet-}$; azot oksid NO^{\bullet} ; azot-dioksid NO_2^{\bullet} , hidroksil, OH^{\bullet} ; peroksil ROO^{\bullet} , lipidni peroksil LOO^{\bullet}) i oksidanse (hidrogenperoksid, H_2O_2 ; ozon, O_3 ; kiseonik, O_2 ; hipohlorastu kiselinu, $HOCl$; azotastu kiselinu, HNO_2 ; peroksinitrit, $ONOO^-$; azot(III)-oksid, N_2O_3 ; lipidni peroksid, $LOOH$). U humanom organizmu imaju dvojaku ulogu: mogu biti korisna u izvesnim procesima (npr. imunskom odgovoru), međutim, takođe mogu ispoljiti toksične efekte. Formiraju se kao sporedni produkti u metaboličkim procesima ili nastaju pod uticajem egzogenih faktora (dim cigarete, radijacija, lekovi). Njihova potencijalna štetnost ograničena je endogenim sistemima antioksidantne zaštite i egzogeno unetim antioksidansima. Međutim, pri povećanoj produkciji reaktivnih jedinjenja odbrambeni mehanizmi mogu biti nedovoljni da ih neutrališu i dolazi do pojave oksidativnog stresa. Slobodni radikali i oksidansi mogu oštetiti lipide, reagovati sa proteinima pri čemu dolazi do promene njihove strukture ili gubitka enzimske aktivnosti, izazvati promene na molekulima dezoksiribonukleinskih kiselina (npr. mutacije) (Pham-Huy i sar., 2008). Tokom inflamatornih procesa, fagocitne ćelije (npr. neutrofili, monociti, makrofazi, eozinofili) generišu reaktivna kiseonična jedinjenja koje mogu oštetiti tkivo direktnim dejstvom na ćelijske strukture ili indirektnim uticajem na ravnotežu proteaza/antiproteaza u intersticijalnom prostoru. Takođe iniciraju i/ili amplifikuju inflamatorni odgovor stimulacijom ekspresije proinflamatornih citokina i adhezivnih molekula. U osnovi ovih efekata se nalazi aktivacija transkripcionih faktora (npr. $NF-\kappa B$) (Conner i Grisham, 1996). Reaktivna kiseonična i azotna jedinjenja imaju ulogu u patogenezi mnogih oboljenja (npr. kardiovaskularnih, neurodegenerativnih, autoimunskih i reumatskih) (Carocho i Ferreira, 2013; Pham-Huy i sar., 2008).

Povećan unos povrća i voća povezuje se sa smanjenjem rizika za javljanje hroničnih bolesti u čijem nastanku učestvuje oksidativni stres. Pozitivni efekti konzumacije navedenih namirnica se pripisuju prisutnim antioksidantnim supstancama (Zhang i sar., 2015). Imajući u vidu ove podatke, jedan od pristupa koji se može predložiti za umanjeње posledica oksidativnog stresa jeste i suplementacija egzogenim antioksidansima.

Ispitivani ekstrakti i spireozid poseduju značajan *in vitro* antioksidantni potencijal koji u budućnosti treba podrobnije ispitati. Dobijeni rezultati, saglasno prethodnim studijama, ukazuju da je primenjena koncentracija preparata/jedinjenja jedan od ključnih faktora koji određuje prirodu efekta. Naime, uočeno je da LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i spireozid u određenim koncentracijama deluju antioksidantno, dok u većim koncentracijama mogu ispoljiti čak i prooksidantno delovanje. Antioksidantni kapacitet testiranih ekstrakata je samo delom posledica prisustva spireozida. Ukupnoj aktivnosti doprinose i drugi sastojci koji verovatno pripadaju grupi polifenolnih jedinjenja (npr. flavonoidima, taninima, fenolkarboksilnim kiselinama). Dobra sposobnost ispitivanih izolata da neutrališu slobodne radikale, zaštite komponente seruma od oksidacije i redukuju kompleks jona gvožđa opravdavaju nastavak ispitivanja i sprovođenje *in vivo* eksperimenata. Oglledi na životinjama pružili bi odgovor na pitanje da li farmakokinetička sudbina sastojaka ekstrakata utiče na *in vitro* demonstriranu aktivnost i da li sastojci štite relevantne biomolekule od oksidacije. Predstavljeni rezultati su relevantni za objašnjenje aktivnosti LIC u animalnim modelima korišćenim za ispitivanje antihiperalgezijskih i gastroprotektivnih svojstava (Materijali i metode, sekcije 3.9.2 i 3.9.4.), jer je pokazano da antioksidansi mogu da moduliraju zapaljenjski proces izazvan intraplantarnom primenom karagenina i preveniraju nastanak gastričnog ulkusa indukovano peroralnom aplikacijom etanola (Đorđević i sar., 2012; Morris, 2003; Wang i sar., 2004).

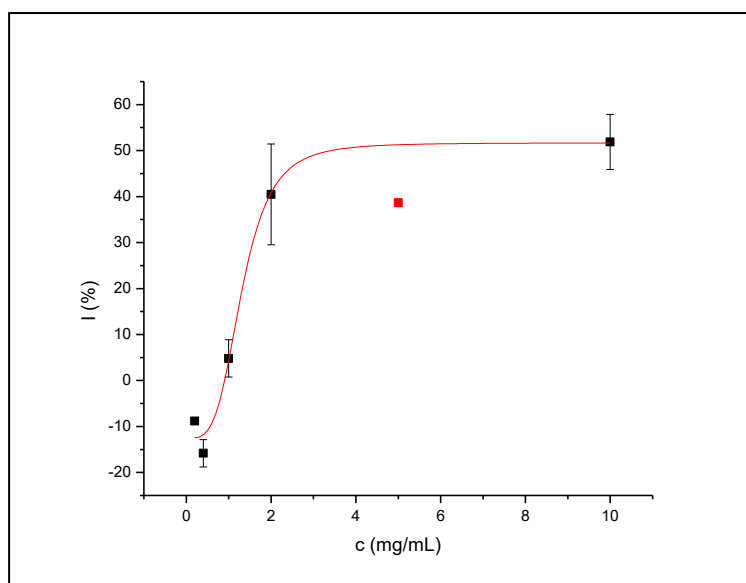
4.5. Inhibicija biosinteze eikozanoida

Hipoteza da je antiinflamatorni efekat cvasti ispitivanih vrsta roda *Filipendula* posledica smanjene produkcije eikozanoida je testirana korišćenjem stimulisanih humanih trombocita (*ex vivo* model sistem). Nakon izlaganja trombocita LIC ili izolovanim jedinjenjima *F. vulgaris*, merena je koncentracija nastalih eikozanoida (PGE₂, TXB₂ i 12-HETE). Većina analiziranih uzoraka je smanjila nivo praćenih medijatora u primenjenim koncentracijama (0,25–10 mg/mL LIC; 0,4–200 µg/mL kemferol 4'-*O*-β-D-glukoziida, astragalin 2''-*O*-galata i smeše izokvercitrin 2''-*O*-galata i hiperozid 2''-*O*-galata; 2–160 µg/mL spireozida) (Slike 4.59.–4.67., Tabela 4.4.).

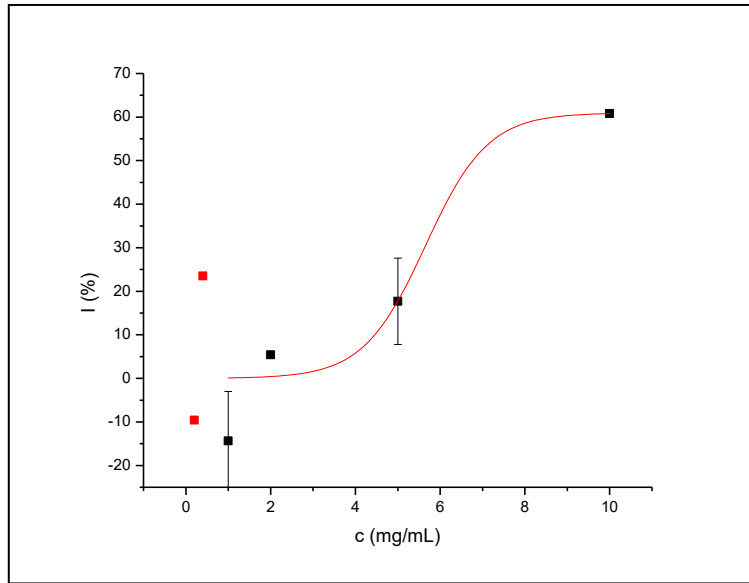
Dobijene IC₅₀ vrednosti su bile u opsegu 0,961–4,401 mg/mL i 3,415–6,768 mg/mL za LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, redom, i bile su veće od odgovarajućih vrednosti kontrolnih supstanci (acetilsalicilne kiseline i kvercetina). LIC *F. vulgaris* je efektivnije inhibirao produkciju svih praćenih medijatora u poređenju sa LIC *F. ulmaria*. Ispitivani ekstrakti su najpotentnije redukovali sintezu 12-HETE, slabiju aktivnost su ispoljili prilikom supresije formiranja PGE₂, dok je samo LIC *F. vulgaris* smanjio nivo generisanog TXB₂ za više od 50%.

Kapacitet izolovanih flavonoida da utiču na nivo eikozanoida je značajno varirao. Testirana jedinjenja nisu dostigla 50% supresije formiranja TXB₂. U pogledu inhibicije produkcije PGE₂, astragalin 2''-*O*-galat je bio najefektivniji među ispitivanim sastojcima (IC₅₀ = 141,1 µg/mL). Smeša hiperozid 2''-*O*-galata i izokvercitrin 2''-*O*-galata (1:2 m/m) i spireozid su snizili nivo PGE₂ za više od 50%, ali efekat nije bio koncentraciono-zavisan. Spireozid je vrlo potentno inhibirao produkciju 12-HETE (IC₅₀ = 4,69 µg/mL), uporedivo sa kvercetinom (IC₅₀ = 7,44 µg/mL). Astragalin 2''-*O*-galat i smeša hiperozid 2''-*O*-galata i izokvercitrin 2''-*O*-galata su bili manje aktivni sa IC₅₀ vrednostima 90,21 i 121,8 µg/mL, redom. Čini se da glukozilovanje hidroksilne grupe na položaju 4' ne umanjuje potencijal jedinjenja da inhibiraju produkciju 12-HETE. Nasuprot tome, verovatno je da prisustvo galoilovanih glikozil grupa na poziciji 3 aglikona i/ili odsustvo hidroksilne grupe u položaju 3' ne utiču povoljno na očuvanje aktivnosti. Kemferol 4'-*O*-β-D-glukoziid nije uticao na sintezu praćenih medijatora u testiranom koncentracionom opsegu.

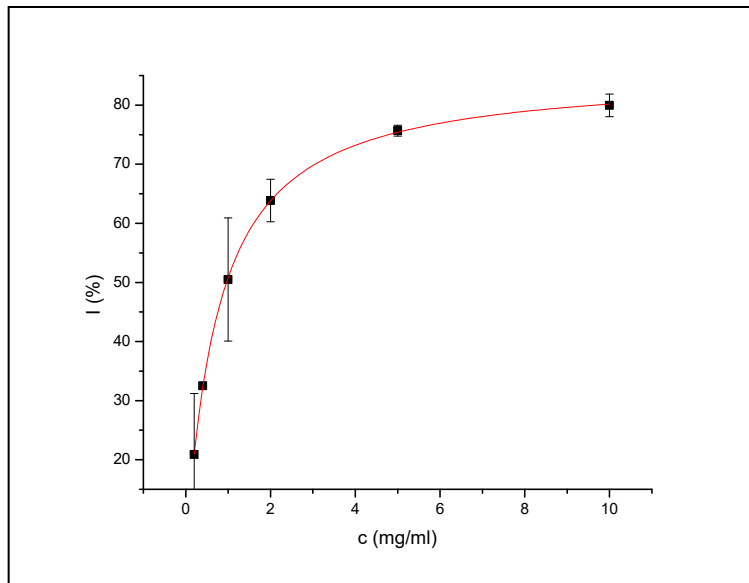
Smanjena produkcija PGE₂ verovatno je posledica inhibicije enzima (fosfolipaze A₂, ciklooksigenaze-1 i/ili PGE sintaze) uključenih u njegovu biosintezu. Pretpostavka da su testirana jedinjenja mogla da deluju nekim od pobrojanih mehanizama osnažena je zapažanjima iz prethodnih studija u kojima su flavonoidi suprimirali formiranje eikozanoida blokirajući različite etape njihove biosinteze. Tako su npr. kvercetin, ginketin i bilobetin inhibirali fosfolipazu A₂. Flavoni i flavonoli (galangin, apigenin, luteolin, kemferol, kvercetin), prenilovani flavonoidi i biflavonoidi su različitom potentnošću snizili aktivnost COX-1 (Kim i sar., 2004). Heterozidi kvercetina (kvercetin 4'-O- α -L-ramnopiranozil-3-O- β -D-alopiranozid, izokvercitrin) i kemferola (kemferol 7-O- β -6'-acetilglukopiranozid, kemferol 7-O- β -glukopiranozil-3-O- β -glukopiranozid, kemferol 3-O- α -L-ramnopiranozil-(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozid, astragalin) su takođe prijavljeni kao inhibitori COX-1, što je od značaja s obzirom da su navedena jedinjenja strukturno slična ispitivanim flavonoidima – poseduju isti aglikon (Dongmo i sar., 2007; Francis i sar., 2004; Li i sar., 2008; Vanisree i sar., 2008; Vared i sar., 2007). Rutin, izokvercitrin, hiperozid i kvercitrin su inhibirali 12-LOX dobijenu iz pluća pacova (Schneider i Bucar, 2005). Ovaj podatak podržava uočenu aktivnost spireozida (potentan inhibitor formiranja 12-HETE), jer su svi navedeni sekundarni metaboliti heterozidi kvercetina koji se razlikuju po mestu vezivanja šećerne komponente i/ili njenoj prirodi.



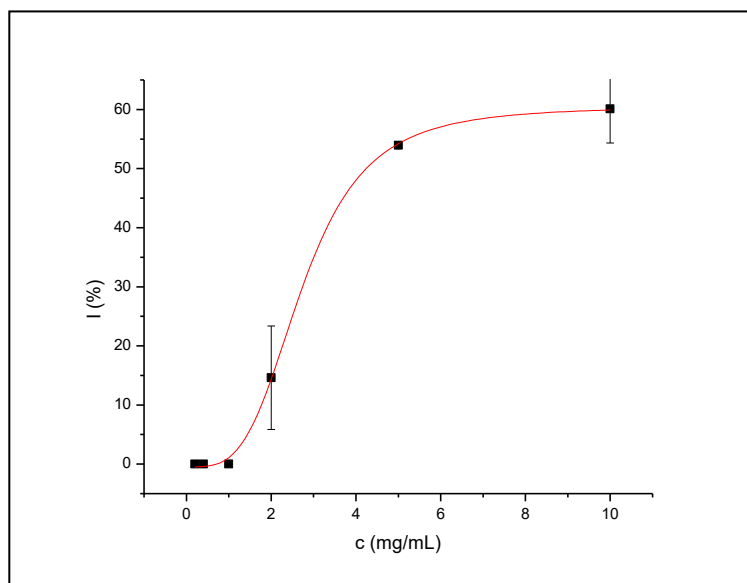
Slika 4.59. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE od koncentracije LIC *F. ulmaria*.



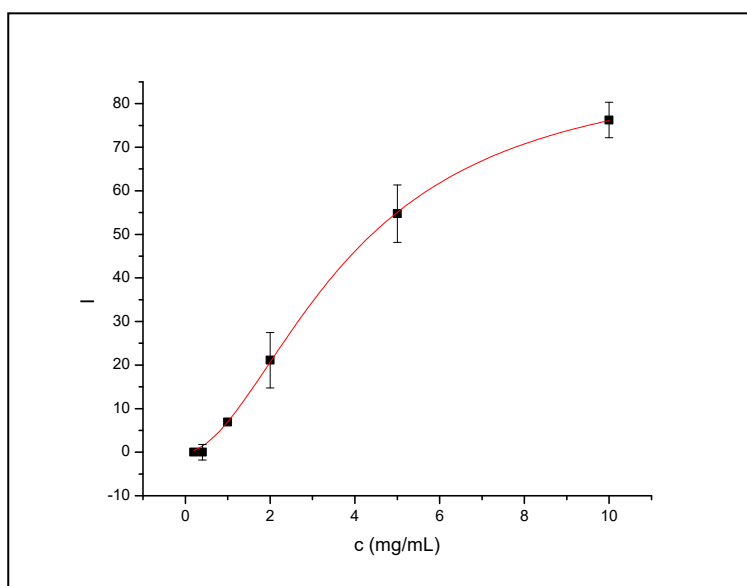
Slika 4.60. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ od koncentracije LIC *F. ulmaria*.



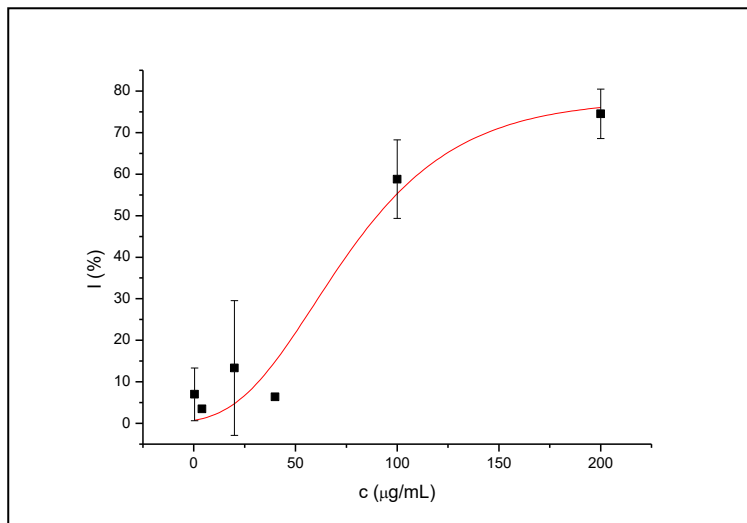
Slika 4.61. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE od koncentracije LIC *F. vulgaris*.



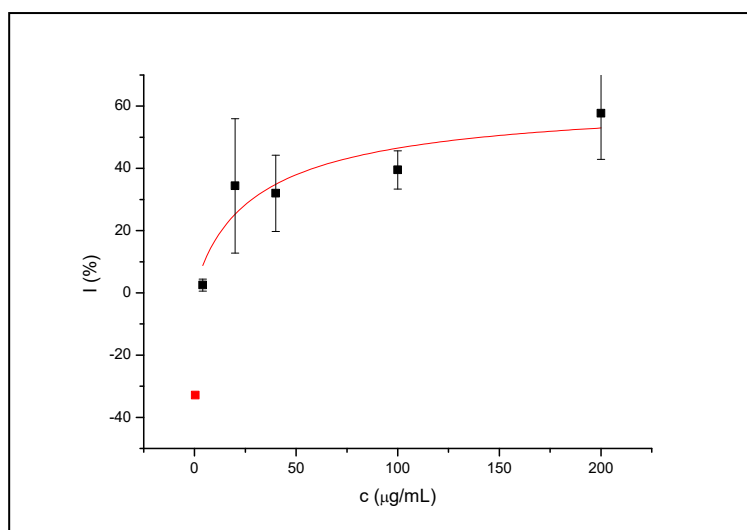
Slika 4.62. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ od koncentracije LIC *F. vulgaris*.



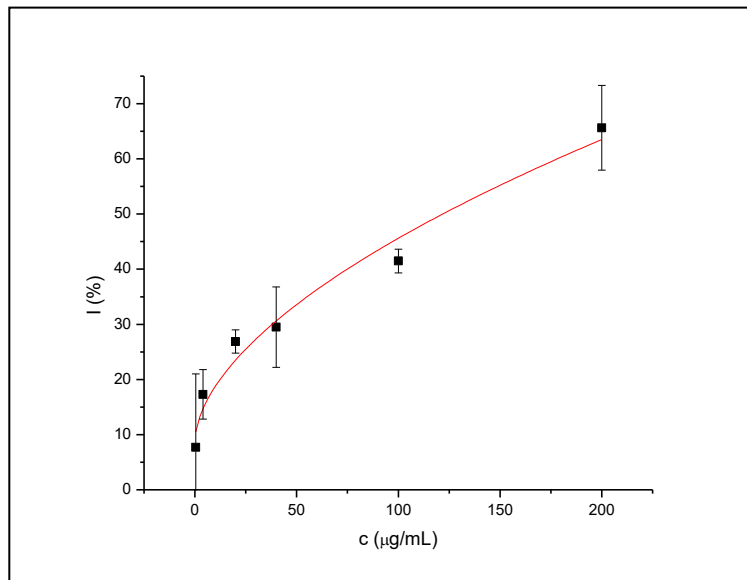
Slika 4.63. Zavisnost inhibicije produkcije TXB₂ od koncentracije LIC *F. vulgaris*.



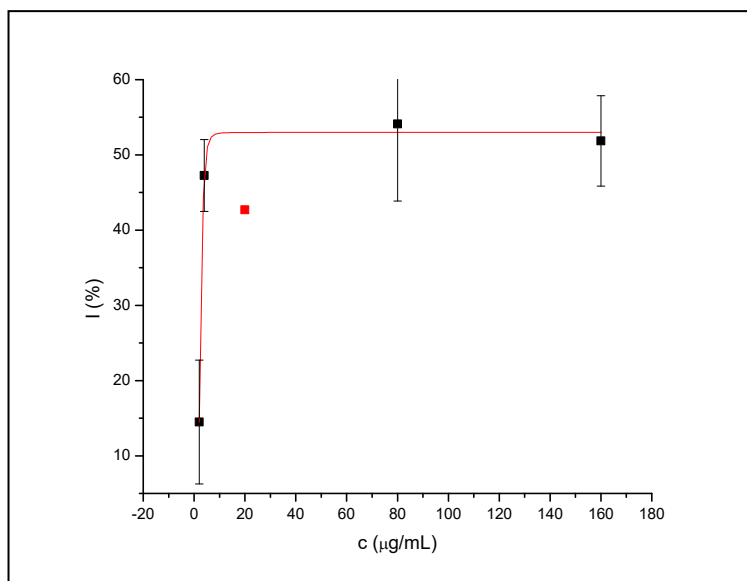
Slika 4.64. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE od koncentracije astragalina 2''-*O*-galata.



Slika 4.65. Zavisnost inhibicije produkcije PGE₂ od koncentracije astragalina 2''-*O*-galata.



Slika 4.66. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE od koncentracije smeše hiperozid 2''-O-galata i izokvercitrin 2''-O-galata (1:2, m/m).



Slika 4.67. Zavisnost inhibicije produkcije 12-HETE od koncentracije spirozida.

Tabela 4.4. Sposobnost liofilizovanih infuza cvasti (LIC) i jedinjenja izolovanih iz cvasti *F. vulgaris* da inhibiraju produkciju eikozanoida.

	12-HETE	PGE ₂	TXB ₂
	IC ₅₀ (µg/mL)		
LIC			
<i>F. vulgaris</i> LIC	961 ± 83 ^a	4241 ± 67 ^a	4401 ± 62 ^a
<i>F. ulmaria</i> LIC	3415 ± 294 ^b	6768 ± 108 ^b	ne
Izolovana jedinjenja <i>F. vulgaris</i>			
Kemferol 4'- <i>O</i> -β-D-glukozid	na	na	na
Spireozid	4,69 ± 0,4 ^c	nkz	ne
Astragalin 2''- <i>O</i> -galat	90,21 ± 7,76 ^c	141,1 ± 2,24 ^c	ne
Smeša hiperozid 2''- <i>O</i> -galata i izokvercitrin 2''- <i>O</i> -galata (1:2 m/m)	121,8 ± 10,47 ^c	nkz	ne
Kontrolne supstance (Lesjak i sar., 2013)			
Acetilsalicilna kiselina	na	5,58 ± 0,53 ^c	4,98 ± 0,06 ^b
Kvercetin	7,44 ± 0,65 ^c	12,75 ± 0,26 ^c	53,69 ± 2,47 ^b

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD ($n = 3$); nt, nije testiran; na, nije aktivan; ne, nije efektivan – nije dostigao 50 % inhibicije; nkz, inhibicija veća od 50%, ali nije koncentraciono-zavisna. Srednje vrednosti IC₅₀ obeležene različitim slovima u superskriptu se statistički značajno razlikuju ($p < 0,05$).

Povećana produkcija eikozanoida je sastavni deo inflamatornog procesa, pa supresija njihove biosinteze predstavlja klinički značajan terapijski pristup. Inhibicija sinteze prostaglandina je mehanizam dejstva nesteroidnih antiinflamatornih lekova (NSAIL), najšire korišćenih lekova protiv bola i otoka nastalih usled inflamacije.

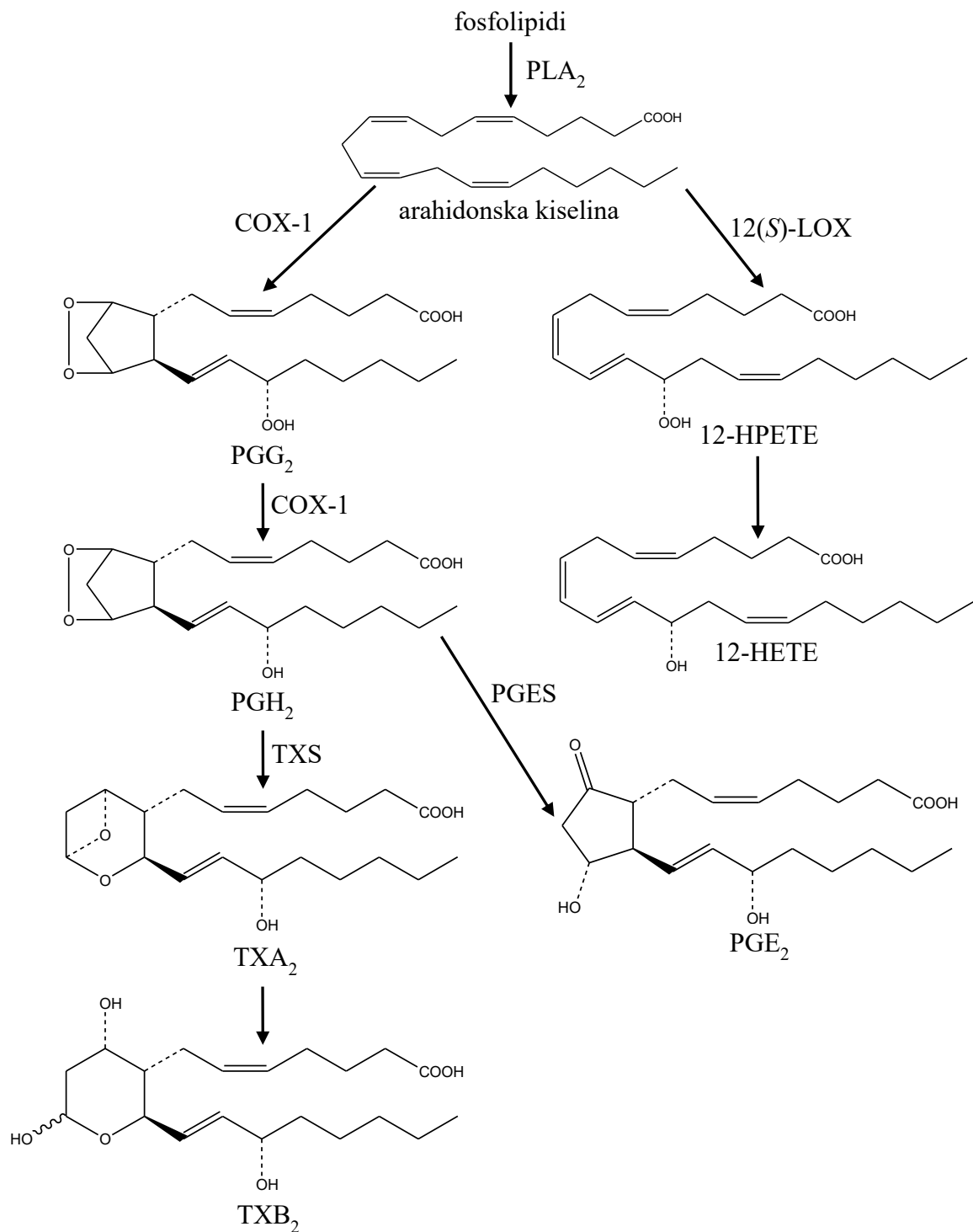
Eikozanoidi se u organizmu formiraju enzimski katalizovanim transformacijama polinezasićene arahidonske kiseline. U prvom koraku, kao posledica stimulacije ćelije, dolazi do oslobađanja arahidonske kiseline iz fosfolipida ćelijske membrane pod uticajem fosfolipaze A₂ ili zahvaljujući združenoj aktivnosti fosfolipaze C i diacilglicerol lipaze. Slobodni arahidonat se zatim može uključiti u nekoliko različitih metaboličkih puteva, najčešće u ciklooksigenazni ili lipooksigenazni metabolički put. Inicijalna reakcija ciklooksigenaznog metaboličkog puta je oksidacija slobodne polinezasićene masne kiseline (uvođenje dva molekula kiseonika) pri čemu nastaju endoperoksidi PGG₂ i PGH₂. Ovi veoma nestabilni produkti se pod dejstvom enzima sintaza ili izomeraza dalje brzo prevode u tromboksan (TXA₂) i prostaglandine (PGE₂,

PGI₂, PGD₂, PGF_{2α}). Brzom neenzimskom spontanom transformacijom fiziološki aktivnog TXA₂ nastaje njegov neaktivni metabolit TXB₂. Ključni enzim ovog metaboličkog puta koji katalizuje prvu reakciju prisutan je u organizmu u dve izoforme, kao ciklooksigenaza-1 (COX-1) ili ciklooksigenaza-2 (COX-2). Smatra se da je COX-1 konstitutivan enzim čija je uloga dominantno vezana za adekvatno odvijanje fizioloških procesa i održavanje homeostaze organizma. COX-2 je, nasuprot tome, inducibilni enzim koji ima važnu ulogu u inflamatornim procesima. Ipak, ovakvo viđenje stvari je pojednostavljeno, jer COX-1 može imati značaj u zapaljenjskim reakcijama, baš kao što i COX-2 može biti značajan za održavanje homeostaze. Npr., pokazano je da su u kičmenoj moždini u bazalnim uslovima prisutne obe izoforme enzima (COX-1 i COX-2) i da obe reaguju na periferne bolne stimulse produkcijom prostaglandina koji sledstveno dovode do hiperalgezije i alodinije (Rang i sar., 2012; Smyth i sar., 2011).

Lipooksigenaze (LOX) su enzimi koji katalizuju početni korak lipooksigenaznog metaboličkog puta tj. prevođenje polinezasićenih masnih kiselina u odgovarajuće nestabilne hidroperoksi derivate. U zavisnosti od toga na koji ugljenikov atom je uvedena hidroperoksi grupa, dele se na 5(*S*)-LOX, 12(*S*)-LOX, 12(*R*)-LOX, 15(*S*)-LOX-1 i 15(*S*)-LOX-2. Nastali produkti su dominantno *S* konfiguracije, osim u slučaju kada se metabolička transformacija odvija pod dejstvom epidermalne 12(*R*)-LOX, kada nastaju hidroperoksidi *R* konfiguracije. Dalja transformacija do odgovarajućih hidroksiderivata se može odvijati enzimski ili spontano (Rang i sar., 2012; Smyth i sar., 2011).

Koji će eikozanoidi nastati zavisi od tipa ćelije odnosno prisutnih enzima. Tako npr. trombociti dominantno sintetišu TXA₂, PGI₂ je glavni produkt endotelnih ćelija, dok makrofazi, neutrofili i mastociti sintetišu više različitih prostaglandina. Takođe, trombociti sadrže samo 12(*S*)-LOX, dok npr. leukociti sadrže i 12(*S*)-LOX i 5(*S*)-LOX (Rang i sar., 2012; Smyth i sar., 2011).

Biosintetski putevi eikozanoida, značajni za razumevanje izloženih rezultata, su predstavljeni na Slici 4.68. (Rang i sar., 2012; Simin i sar., 2013; Smyth i sar., 2011).



Slika 4.68. Biosinteza eikozanoida.

PLA₂, fosfolipaza A₂; COX-1, ciklooksigenaza-1; TXS, tromboksan sintaza;

PGES, prostaglandin E₂ sintaza; 12(S)-LOX, 12(S)-lipooksigenaza.

Eikozanodi imaju mnogobrojne funkcije u humanom organizmu. PGE₂ smanjuje sekreciju hlorovodonične kiseline i stimuliše produkciju mukusa u želucu. Ovaj medijator takođe dovodi do kontrakcije glatkih mišića uterusa, što je važno za otpočinjanje porođaja, a ovo dejstvo stoji i u osnovi nastanka bola kod dismenoreje. Sa aspekta istraživanja tradicionalne primene *Filipendula* vrsta, relevantna su njegova vazodilatatorna, hiperalgezijska i pirogena svojstva. Tokom akutnog inflamatornog procesa, lokalno tkivo i krvni sudovi generišu PGI₂ i PGE₂. U hroničnom zapaljenju monociti/makrofazi oslobađaju PGE₂. PGE₂ je moćni vazodilatator prekapilarnih arteriola koji deluje sinergistički sa drugim medijatorima (npr. histaminom i bradikininom) i povećava dotok krvi u oblast zahvaćenu zapaljenjem. Takođe, potencira povećanje permeabilnosti postkapilarnih venula do kog dolazi pod uticajem nekih endogenih supstanci (npr. histamina i bradikina) i na taj način dopinosi nastanku edema. Utvrđeno je da PGE₂ vrši senzitivizaciju aferentnih C vlakana na delovanje drugih supstanci (npr. serotonina), a na nivou kičmene moždine vrši facilitaciju prenosa bolnih signala prema višim nervnim centrima. Ova pojava je od posebnog značaja, jer se smatra da je analgetska efikasnost NSAID posledica njihove sposobnosti da smanje povećanu osetljivost nociceptora tokom inflamacije i smanjenja facilitacije bola u centralnom nervnom sistemu. PGE₂, sintetisan u hipotalamusu, je finalni posrednik pirogenog efekta citokina. Opisani mehanizmi doprinose razvoju lokalnih znakova i simptoma akutne inflamacije (otoka, crvenila, toplote i bola), kao i nastanku pireksije (Rang i sar., 2012; Smyth i sar., 2011).

Iako se smatra da je 12-HETE važna u procesu agregacija trombocita, njena fiziološka funkcija još uvek nije u potpunosti razjašnjena. 12-HETE je identifikovana kao hemotaksin neutrofila. Dodatno, značaj ovog eikozanoida u različitim stanjima (npr. kanceru i hipertenziji) je sve više prepoznat (Porro i sar., 2014).

Tromboksan A₂ (TXA₂) deluje kao vazokonstriktor i stimulator agregacije trombocita (Rang i sar., 2012). Efekat ispitivanih uzoraka na biosintezu TXA₂ praćen je indirektno, merenjem koncentracije njegovog inaktivnog metabolita TXB₂. Direktno određivanje TXA₂ nije pogodno, jer se ovaj prostanoid brzo i spontano konvertuje u TXB₂ (Rang i sar., 2012).

Uzevši u obzir navedene činjenice i prezentovane rezultate, može se pretpostaviti da testirana jedinjenja doprinose ispoljavanju antiinflamatornih svojstava cvasti ispitivanih *Filipendula* vrsta. U tom pogledu, otkriće da spireozid, astragalin 2"-*O*-galat i smeša flavonoida (izokvercitrin 2"-*O*-galata i hiperozid 2"-*O*-galata) smanjuju sintezu PGE₂ značajno je za objašnjenje tradicionalne primene za ublažavanje inflamatornih i bolnih stanja. Izrazita sposobnost spireozida da suprimira produkciju 12-HETE predstavlja potencijal koji zahteva detaljnije istraživanje u budućnosti. Mala efektivnost LIC i izolovanih flavonoida u inhibiciji formiranja TXB₂ indikuje da ispitivani uzorci ne moduliraju efekte posredovane TXA₂. *In vivo* studije su neophodne da bi se utvrdilo da li farmakokinetička sudbina testiranih flavonoida i ekstrakata utiče na demonstriranu aktivnost.

LIC su se karakterisali visokim sadržajem polifenola (Tabela 4.2.) i izrazitim antioksidantnim svojstvima (Tabela 4.3.). Stoga bi njihov mehanizam dejstva barem delom mogao biti baziran na neutralizaciji slobodnih radikala, značajnih medijatora u biosintetskim putevima eikozanoida (Schneider i sar., 2007). Izolovana jedinjenja možda deluju u sličnom maniru, usled generalno dobre antiradikalske aktivnosti polifenola (Lesjak i sar., 2013).

Astragalin, izokvercitrin, galna, elagna i salicilna kiselina, koji su takođe prisutni u LIC (Tabela 4.2.), su inhibirali jedan od ključnih enzima odgovornih za generisanje prostaglandina – ciklooksigenazu-1 (Chandramohan Reddy i sar., 2010; Grosser i sar., 2011; Li i sar., 2008; Vanisree i sar., 2008; Vareed i sar., 2007; Zhang i sar., 2004). Pored testiranih jedinjenja, navedeni flavonoidi i fenolkarboksilne kiseline mogli bi da doprinesu kapacitetu LIC da utiču na produkciju PGE₂. Čini se da više različitih sastojaka participira u antiinflamatornom efektu ispitivanih preparata.

U prethodnim *in vitro* studijama, sprovedenim na izolovanim ciklooksigenazama (COX-1 i COX-2) ili mikrozomima semenih vezikula goveda, nekoliko različitih ekstrakata *F. ulmaria* je inhibiralo biosintezu PGE₂ (ESCOP, 2003; Katanić i sar., 2016). Efekat *F. vulgaris* na formiranje PGE₂, 12-HETE i TXA₂ do danas nije ispitan. Analgetička i antiedematozna svojstva određenih preparata *F. ulmaria* su pokazana u studijama na životinjama (Katanić i sar., 2016), međutim, njihovi mehanizmi delovanja i aktivni sastojci još uvek nisu precizno definisani. Nedostaju podaci koji se tiču

tradicionalno korišćenog preparata (infuza). Izloženi eksperiment je sproveden na intaktnim ćelijama, što omogućuje bolje predviđanje *in vivo* aktivnosti u poređenju sa testovima u kojima su korišćeni izolovani enzimi ili subcelularne strukture. U prezentovanoj studiji je dokumentovana antiinflamatorna aktivnost infuza cvasti – preparata relevantnog za zabeleženu etnomedicinsku primenu (HMPC, 2011b). Dodatno, prvi put je pokazano da flavonoidi prisutni u LIC predstavljaju aktivne principe koji mogu da suprimiraju produkciju eikozanoida.

4.6. Antihiperalgezijski i antiedematozni efekat

LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (100–300 mg/kg, *p.o.*) su ispoljili značajnu i dozno-zavisnu antihiperalgezijsku aktivnost u modelu inflamatorne hiperalgezije indukovane karageninom (Slika 4.69., A i B). Maksimalni efekat je uočen 60 min nakon indukcije inflamacije i bio je u rasponu 38,3–59,9% (LIC *F. vulgaris*) i 31,8–63,7% (LIC *F. ulmaria*) (manji grafici na Slici 4.69., A i B). Odgovarajuće $ED_{50} \pm SEM$ vrednosti LIC (sa 95% intervalom poverenja), dobijene u trenutku maksimalnog efekta, bile su $172,2 \pm 6,2$ mg/kg (147,4–201,3 mg/kg) i $164,8 \pm 15,4$ mg/kg (110,3–246,3 mg/kg) za *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, redom. Acetilsalicilna kiselina (400 mg/kg, *p.o.*) je proizvela maksimalno antihiperalgezijsko dejstvo (61,8%) 90 min nakon izazivanja inflamacije (Slika 4.69., A i B).

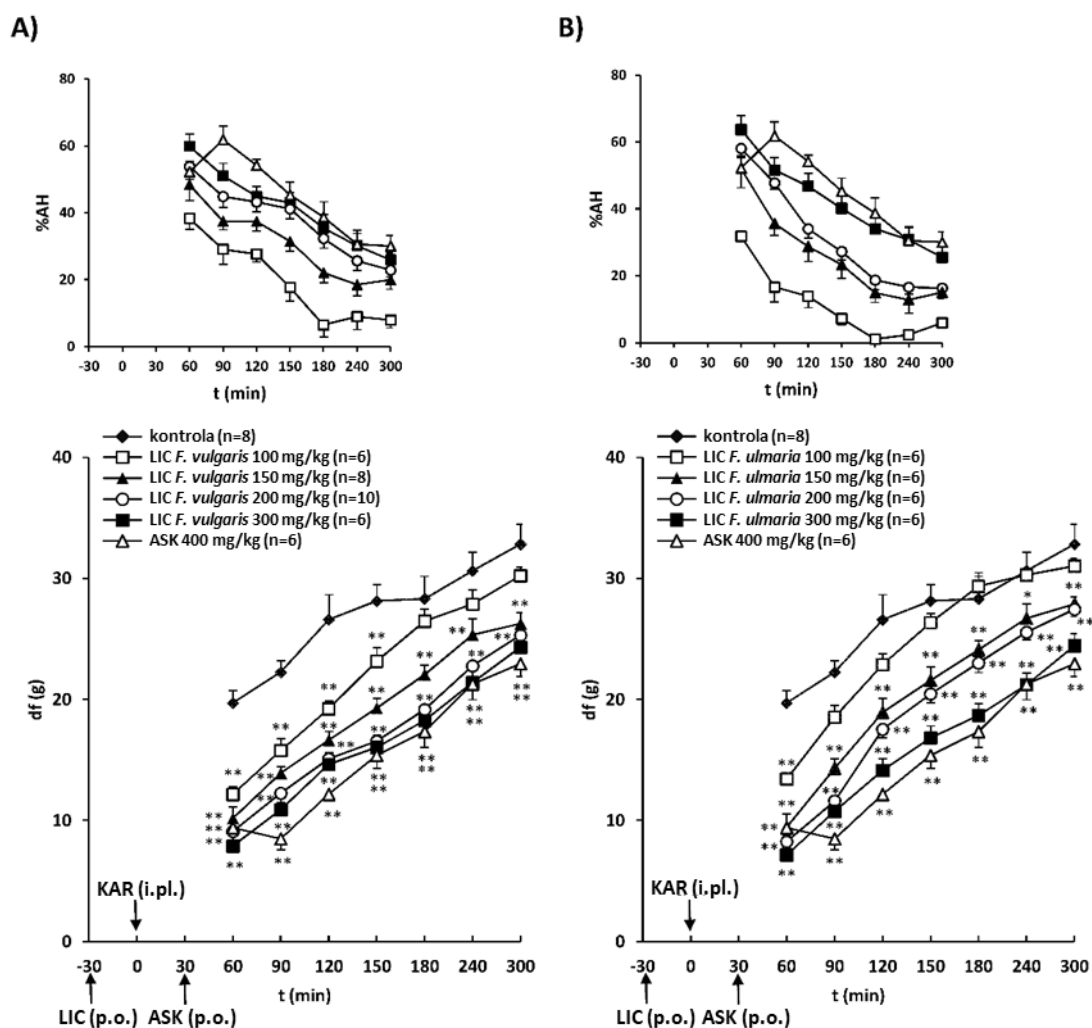
S obzirom da detaljni podaci o tradicionalnoj upotrebi cvasti *F. vulgaris* nedostaju, eksperimentalni *in vivo* tretman je osmišljen vodeći se doznim režimom za cvast *F. ulmaria* koji je definisala Evropske agencija za lekove: preporučena dnevna doza je 2,5–6 g cvasti (za pripremanje čaja za internu primenu), podeljeno u 1–3 pojedinačne doze (HMPC, 2011b). Doza za pacova (PD) koja odgovara tradicionalnoj dozi za humanu primenu (HD) je dobijena korišćenjem izraza: $PD = HD \times 37/6$ (Reagan-Shaw i sar., 2008) i iznosila je 72,30–173,53 mg/kg (LIC *F. ulmaria*) i 80,22–192,52 mg/kg (LIC *F. vulgaris*), uz pretpostavku da je prosečna telesna masa odraslog čoveka 60 kg i uzevši da je prinos ekstrakcije iznosio 28,14% (LIC *F. ulmaria*) i 31,22% (LIC *F. vulgaris*) m/m. Dobijeni rezultati podržavaju zabeleženu etnomedicinsku primenu *F. ulmaria* i *F. vulgaris* za ublažavanje bola, jer su ispitani

LIC ispoljili značajan dozno-zavisni antihiperlgezijski efekat u dozama koje odgovaraju tradicionalno korišćenim dozama za humanu primenu.

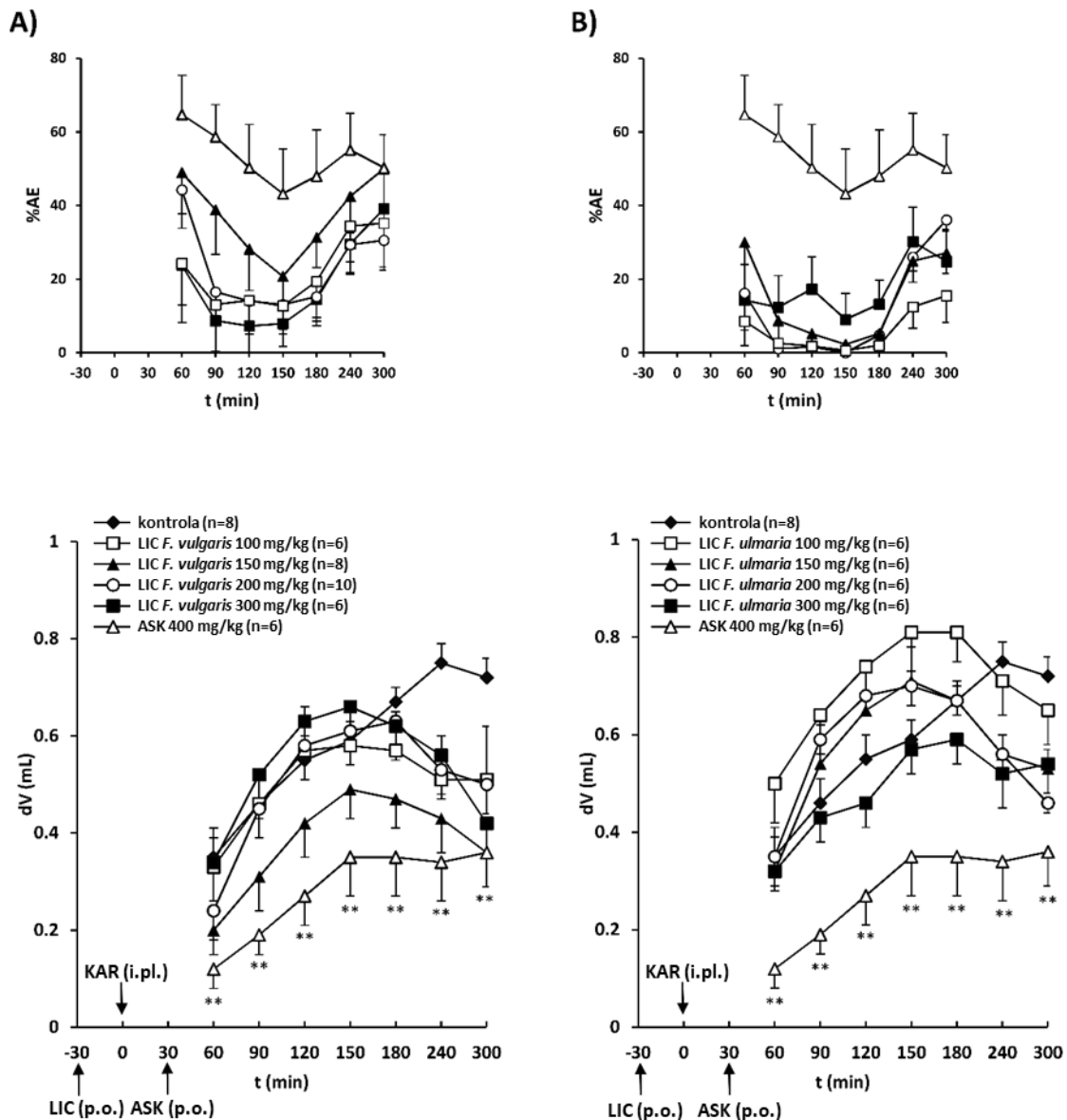
LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (100–300 mg/kg, *p.o.*) nisu proizveli značajan antiedematozni efekat (Slika 4.70., A i B). Prilikom dodatnog ispitivanja većih doza LIC *F. vulgaris* (600 mg/kg, *p.o.*, n = 3) takođe nije uočena sposobnost redukcije otoka šape pacova izazvanog karageninom. Acetilsalicilna kiselina (400 mg/kg; *p.o.*) je proizvela maksimalno dejstvo (64,8%) 60 min nakon indukcije inflamacije (Slika 4.70., A i B).

Ispitivani preparati u testiranim dozama, koje odgovaraju tradicionalno korišćenim dozama za humanu primenu, nisu ispoljili značajnu antiedematoznu aktivnost u korišćenom modelu inflamacije. Na osnovu dobijenih rezultata, može se pretpostaviti da je korist primene cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* kod inflamatornih oboljenja dominantno vezana za njihovu sposobnost da umanje bol.

U ranijim studijama je demonstrirana analgetska efikasnost nekoliko jedinjenja prisutnih u ispitivanim LIC. Naime, galna kiselina (30 mg/kg, Trevisan i sar., 2014), astragalin (150–600 mg/kg, Wang i sar., 2014), elagna kiselina (0,1–100 mg/kg, Rogerio i sar., 2006), gaulterin (200 mg/kg, Zhang i sar., 2006), smeša hiperozid 2''-O-galata i izokvercitrin 2''-O-galata (100 mg/kg, Küpeli i sar., 2007), kao i smeša hiperozida i izokvercitrina (97,31 mg/kg (2:1, m/m), Erdemoglu i sar., 2008; 100 mg/kg, Küpeli i sar., 2007) su ispoljili antinociceptivni efekat nakon oralne primene u animalnim modelima hemijski indukovano bola. Treba naglasiti da su doze navedenih jedinjenja, sa izuzetkom doze elagne kiseline, za koje je pokazano da poseduju analgetska svojstva značajno veće od njihovog unosa putem LIC. Ove činjenice navode na zaključak da sastojci LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* stupaju u sinergističku interakciju i na taj način proizvode antihiperlgeziju (Williamson, 2001).



Slika 4.69. Efekat liofilizovanih infuza cvasti (LIC) *F. vulgaris* (A) i *F. ulmaria* (B) na hiperalgeiju izazvanu karageninom (KAR), izražen kao razlika u gramima (df) između bazalnog praga povlačenja šape i praga povlačenja šape nakon indukcije inflamacije (veći grafici) ili kao procenat antihiperalgezijske aktivnosti (%AH) (manji grafici). Legenda se odnosi na oba grafika. LIC su primenjeni *p.o.* 30 min pre injekcije karagenina, dok je acetilsalicilna kiselina (ASK) aplikovana *p.o.* 30 min nakon indukcije inflamacije (označeno strelicama). Svaka tačka na graficima predstavlja srednju vrednost \pm SEM df (g) ili AH(%). Statistička značajnost (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Tukey HSD test) je određena komparacijom sa krivom kontrolne grupe. *i.pl.* = intraplantarno; *p.o.* = oralno.



Slika 4.70. Efekat liofilizovanih infuza cvasti (LIC) *F. vulgaris* (A) i *F. ulmaria* (B) na edem šape izazvan karageninom (KAR), izražen kao razlika (dV) u mililitrima između zapremine šape nakon i pre injektovanja karagenina (veći grafici) ili kao procenat antiedematozne aktivnosti (%AE) (manji grafici). Legenda se odnosi na oba grafika. LIC su primenjeni *p.o.* 30 min pre injektovanja karagenina, dok je acetilsalicilna kiselina (ASK) aplikovana *p.o.* 30 min nakon indukcije inflamacije (označeno strelicama). Svaka tačka na graficima predstavlja srednju vrednost \pm SEM dV (mL) ili %AE. Statistička značajnost (** $p < 0,01$; dvofaktorska ANOVA sa ponovljenim merenjima, Tukey HSD test) je određena komparacijom sa krivom kontrolne grupe. *i.pl.* = intraplantarno; *p.o.* = oralno.

Inflamatorni odgovor u pacova iniciran karageninom je akutni, visoko reproducibilni i dobro proučeni trifazni proces (Di Rosa i sar., 1971; Morris, 2003). Prva faza (0–1,5 h nakon injekcije karagenina) se karakteriše oslobađanjem histamina i serotonina, druga faza (1,5–2,5 h) je posredovana kininima, dok se treća faza (2,5–6 h) može pripisati delovanju prostaglandina (Di Rosa i sar., 1971). Pored pomenutih medijatora, ulogu imaju komponente sistema komplementa (C5a produkt), reaktivna kiseonična (superoksidni anjon) i azotna jedinjenja, kao i proinflamatorni citokini (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (Morris, 2003; Ting i sar., 2008; Verri i sar., 2006; Wang i sar., 2004). Neutrofili migriraju u inflamirano tkivo, oslobađaju PGE₂ i biogene amine, te na taj način dovode do senzitivizacije nociceptora i razvoja inflamatorne mehaničke hiperalgezije (Cunha i sar., 2008; Verri i sar., 2006).

S obzirom da su ispitivani LIC delovali antihiperalgezijski tokom celog eksperimentalnog perioda, može se pretpostaviti da su njihovi sastojci modulirali efekte više različitih medijatora zapaljenja. U tom pogledu, već je opisano da izokvercitrin i galna kiselina redukuju oslobađanje histamina (Kim i sar., 2006; Shimoda i sar., 2008). Inhibicija ciklooksigenaza je pokazana za galnu kiselinu i salicilnu kiselinu (Chandramohan Reddy i sar., 2010; Grosser i sar., 2011), dok su astragalin, hiperozid, galna kiselina i elagna kiselina suprimirali indukciju ciklooksigenaze-2 (El-Shitany i sar., 2014; Hsiang i sar., 2013; H. H. Kim i sar., 2013; Kim i Kim, 2011). Dodatno, hiperozid, izokvercitrin i astragalin su smanjili produkciju PGE₂ (Hammer i sar., 2007; Lee i sar., 2011; S. Lee i sar., 2004). Korišćenjem humanih trombocita (Sekcija 4.5.), kao *ex vivo* model sistema, takođe je pokazano da astragalin 2''-*O*-galat koncentraciono-zavisno suprimira produkciju PGE₂, dok spireozid i smeša hiperozid 2''-*O*-galata i izokvercitrin 2''-*O*-galata (1:2, m/m) redukuju nivo pomenutog prostaglandina, ali ne koncentraciono-zavisno (Tabela 4.4.). U prethodnim istraživanjima je pokazano da neki sastojci LIC (elagna kiselina, galna kiselina, hiperozid, astragalin, gaulterin, astragalin 2''-*O*-galat, hiperozid 2''-*O*-galat, izokvercitrin 2''-*O*-galat) smanjuju nivo proinflamatornih citokina (TNF- α , IL-1 β , IL-6) (El-Shitany i sar., 2014; B. H. Kim i sar., 2007; H. H. Kim i sar., 2013; Kim i sar., 2006, 2011; Lee i sar., 2011, 2014; Luyen i sar., 2014a; Yoon i sar., 2013; Zhang i sar., 2011). Inhibitorni uticaj fenolnih sastojaka (galne kiseline, hiperozida, izokvercitrina, spireozida, astragalin 2''-*O*-galata, hiperozid 2''-*O*-galata, izokvercitrin 2''-*O*-galata, telimagrandina I, telimagrandina II,

mikvelianina) cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* na generisanje superoksidnog anjona i/ili njihova sposobnost da ga neutrališu takođe su opisani (B.-H. Kim i sar., 2013, 2007; H. Kim i sar., 2013; M. H. Kim i sar., 2013; Y. Kim i sar., 2000; Kroes i sar., 1992; Liu i sar., 2005; Marzouk i sar., 2006; Soberón i sar., 2010; Suh i sar., 1999). Dodatno, izokvercitrin i astragalin su suprimirali hemotaktičku migraciju neutrofila (Vongsak i sar., 2013), dok je izokvercitrin 2''-O-galat inhibirao klasični put aktivacije komplementa (Park i sar., 1999). Navedeni podaci ukazuju da sastojci LIC mogu ostvariti svoju aktivnost velikim brojem različitih mehanizama koji su relevantni za korišćeni animalni model akutne inflamacije.

Izostanak antiedematozne efikasnosti LIC nije bio očekivan s obzirom da je pregled literature sugerisao da nekoliko različitih sastojaka ispitivanih *Filipendula* vrsta (galna kiselina, elagna kiselina, astragalin i smeša hiperozida i izokvercitrina) može umanjiti karageninom-indukovani otok (Erdemoglu i sar., 2008; Hammer i sar., 2007; Kim i sar., 2006; Lee i sar., 2011; Rogerio i sar., 2006; Trevisan i sar., 2014; Wang i sar., 2014). Potrebna su dodatna istraživanja da bi se utvrdio uzrok ove pojave.

Saznanje da LIC smanjuju hiperalgeziju usled lokalne periferne inflamacije je u saglasnosti sa Monografijom *Filipendulae ulmariae flos* Evropske agencije za lekove u kojoj je navedeno da se čaj (infuz) cvasti suručice koristi za ublažavanje bola u zglobovima slabijeg intenziteta (HMPC, 2011b), kao i sa zabeleženom tradicionalnom primenom cvasti *F. vulgaris*.

4.7. Akutna oralna toksičnost

Bezbednosni profil ispitivanih preparata je preliminarno procenjen dvonedeljnim praćenjem pojave znakova toksičnosti, nakon jednokratne peroralne primene velikih doza LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* (2000 mg/kg) u miševa. U eksperimentu je korišćeno ukupno šest životinja, od kojih su dve pripadale kontrolnoj grupi, a četiri test grupama. Prilikom inicijalnog posmatranja, jedan miš tretiran LIC *F. vulgaris* je ispoljio znake blage sedacije tokom prvih dva sata posle aplikovanja ekstrakta. Kod ostalih životinja nisu primećene promene u ponašanju, znakovi toksičnosti, niti je zabeležen letalni ishod. Na osnovu iznetih podataka se može pretpostaviti da je srednja letalna doza (LD₅₀) testiranih LIC u miševa nakon peroralne primene veća od 2000 mg/kg.

Dobijeni rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima u kojima je pokazano da su preparati *F. ulmaria* relativno bezbedni za primenu. LD₅₀ intraperitonealno primenjenog 5% vodenog rastvora polučvrstog etanolnog ekstrakta *F. ulmaria* iznosila je 1770 mg/kg. Isti rastvor, primenjen intravenski u kunića, karakterisala je niža LD₅₀ (75,7 mg/kg). Slični rezultati su dobijeni za dekokt (1:20) *F. ulmaria*: LD₅₀ iznosile su 535 mg/kg (*i.p.*, mužjaci miša), 1050 mg/kg (*i.p.*, ženke miša) i 141,5 mg/kg (*i.v.*, kunići). Toksikološka ispitivanja na pacovima i kunićima su pokazala da preparati cvasti *F. ulmaria* ne utiču na funkciju jetre (ESCOP, 2003). U eksperimentu na larvama mušice *Drosophila melanogaster* je pokazano da metanolni ekstrakti korena i nadzemnog dela *F. vulgaris* i korena *F. ulmaria* ne deluju genotoksično, dok je ekstrakt nadzemnog dela *F. ulmaria*, zavisno od koncentracije, ispoljio slabu genotoksičnu aktivnost (Matić i sar., 2015).

Predstavljeni rezultati i dugotrajna tradicionalna primena bez prijavljenih neželjenih efekata (HMPC, 2011b, 2011c) sugerišu da ispitivane vrste poseduju povoljan bezbednosni profil.

4.8. Gastroprotektivna aktivnost

Gastroprotektivni efekat svih testiranih doza ($p < 0,05$) LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, sa izuzetkom najmanje doze LIC *F. vulgaris* (100 mg/kg), je demonstriran u animalnom modelu gastričnog ulkusa izazvanog etanolom (Tabela 4.5.). Prosečan skor gastričnog oštećenja (eng. *Gastric Damage Score*, GDS) u grupama pacova tretiranih LIC *F. vulgaris* ili *F. ulmaria* kretao se u opsegu 3,4–4 i 1,4–2,9, redom. Iako su vrednosti GDS bile najniže u grupama životinja koje su primile najveće doze ispitivanih ekstrakata (300 mg/kg), odnos doze i efekta nije bio statistički značajan. Step en ozbiljnosti formiranih lezija takođe je smanjen nakon oralne primene izolovanih jedinjenja, spireozida (50 mg/kg, GDS 3,6, $p < 0,05$) i telimagrandina II (40 mg/kg, GDS 3,7, $p < 0,05$). Ranitidin je zaštitio gastričnu mukozu (GDS 2,5, $p < 0,01$). Najintenzivnija oštećenja želudačne sluzokože (GDS 6) su nastala u kontrolnoj grupi životinja (tretirane vehikulom tj. vodom).

Prema raspoloživim literaturnim podacima, predstavljeni rezultati su prvi eksperimentalni dokaz kapaciteta *F. vulgaris* da prevenira oštećenje želudačne sluzokože indukovano etanolom. Utvrđena aktivnost LIC *F. ulmaria* je u saglasnosti sa prethodnim studijama u kojima su ispitivani različiti preparati ove biljne vrste. Naime, pokazano je da su dekolti cvasti *F. ulmaria* efikasni u različitim animalnim modelima gastričnog ulkusa (ESCOP, 2003).

Demonstrirano protektivno dejstvo izolovanog tanina telimagrandina II je podržano činjenicom da su molekuli sa relativnom strukturnom sličnošću, pri aplikaciji u sličnim dozama (pedunkulagin, 50 mg/kg, *i.g.*; korilagin, 30 mg/kg, *p.o.*), ispoljili aktivnost u miševa tretiranih apsolutnim alkoholom (de Jesus i sar., 2012; Khennouf i sar., 2003; Klein-Júnior i sar., 2017). Efektivnost spireozida je u skladu sa prethodno primećenom osobinom nekih flavonoidnih heterozida da preveniraju oštećenja želudačne sluzokože (de Lira Mota i sar., 2009).

Tabela 4.5. Prosečan skor gastričnog oštećenja (GDS) u grupama životinja tretiranim liofilizovanim infuzima cvasti, izolovanim jedinjenjima, referentnim lekom ili vehikulumom.

		GDS
Liofilizovani infuzi cvasti		
<i>F. vulgaris</i>	100 mg/kg	3,92 ± 2,5
	200 mg/kg	4 ± 1,76*
	300 mg/kg	3,42 ± 2,11*
<i>F. ulmaria</i>	100 mg/kg	2,6 ± 2,38*
	200 mg/kg	2,9 ± 1,95*
	300 mg/kg	1,4 ± 2,01*
Izolovana jedinjenja <i>F. vulgaris</i>		
	Telimagrandin II 40 mg/kg	3,67 ± 2,04*
	Spireozid 50 mg/kg	3,58 ± 2,2*
Referentni lek		
	Ranitidin 20 mg/kg	2,5 ± 1,87**
Kontrola		
	Vehikulum (voda) ^a	6 ± 1,26

Podaci su predstavljeni kao srednja vrednost ± SD ($n = 5-6$); statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu grupu (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$); ^a primenjen u istoj zapremini kao testirani uzorci (1 mL/kg).

Ranije je pokazano da, osim testiranih jedinjenja, i drugi peroralno primenjeni metaboliti LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* smanjuju oštećenje sluzokože želuca eksperimentalnih životinja indukovano različitim agensima (Tabela 4.6.). Može se uočiti da su ispitivane doze najčešće značajno veće od količina jedinjenja unetih putem LIC. Ipak, doprinos pomenutih sastojaka ukupnom efektu testiranih ekstrakata je verovatan ukoliko se pretpostavi postojanje sinergističke interakcije, jer se time smanjuju njihove efikasne doze.

Tabela 4.6. Gastroprotektivni efekat oralno primenjenih jedinjenja*F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

Jedinjenje	Eksperimentalni model	Efekat	Literatura
Elagna kiselina	Gastrični ulkus indukovan 75% etanolom (10 mL/kg) u pacova	Elagna kiselina (3, 10, 30 mg/kg) je smanjila površinu oštećenja gastrične sluzokože (59, 79 i 70%, redom).	Beserra i sar., 2011
Galna kiselina	Gastrični ulkus indukovan 95% etanolom (5 mL/kg) u pacova	Galna kiselina (25 i 50 mg/kg) je redukovala površinu gastrične sluzokože zahvaćenu ulcerativnim promenama (52,5 i 60, 5%).	Abdelwahab, 2013
Izokvercitrin	Gastrični ulkus indukovan apsolutnim etanolom (1 mL/životinji) u pacova	Izokvercitrin (990 mg/kg) je smanjio ulkusni indeks (59,1%). Ulkusni indeks: zbir dužina (mm) indukovanih lezija gastrične sluzokože.	Yesilada i sar., 2014
Astragalin	Gastrični ulkus indukovan etanolom u razblaženoj HCl (60%/0,3 M; 0,2 mL/životinji) u miševa	Astragalin (30 mg/kg) je redukovao ukupnu površinu gastričnih lezija (67,6%).	Klein-Júnior i sar., 2013
Mikvelianin	Gastrični ulkus indukovan indometacinom (40 mg/kg) u pacova	Mikvelianin (3 mg/kg) je redukovao erozivne lezije gastrične sluzokože (mm) za 34%.	Yan i sar., 2011

Slobodni radikali su uključeni u nastanak oštećenja sluzokože prouzrokovanog nekrotizirajućim agensom etanolom (Đorđević i sar., 2012), pa izražena antioksidantna aktivnost testiranih LIC i izolovanih jedinjenja (Rezultati i diskusija; Tabela 4.3.) (Chen i sar., 2014) verovatno doprinosi očuvanju integriteta gastrične sluzokože. Dodatno, kapacitet telimagrandina II i izokvercitrin 2''-O-galata da *in vitro* inhibiraju histidin dekarboksilazu takođe može biti odgovoran za smanjenje formiranja lezija (Nitta i sar., 2009, 2013).

Dosadašnja ispitivanja gastroprotektivnih svojstava flavonoida i tanina su pokazala da zaštitni efekti ovih jedinjenja mogu biti ostvareni različitim mehanizmima. Flavonoidi ispoljavaju dejstvo zahvaljujući: antisekretornom (smanjenje oslobađanja histamina iz gastričnih ćelija, inhibicija protonske pumpe), citoprotektivnom (povećanje količine prostaglandina, stimulisanje produkcije mukusa, povećanje protoka krvi u želudačnoj mukozii), antioksidantnom (neutralisanje slobodnih radikala, heliranje jona prelaznih metala, inhibicija oksidacionih enzima, redukcija lipidne peroksidacije, povećanje kapaciteta proteinskih i neproteinskih antioksidanasa) i anti-*Helicobacter pylori* efektu (de Lira Mota i sar., 2009). Tanini, kao adstringentni molekuli, reaguju sa proteinima sluzokože i na taj način formiraju barijeru koja štiti tkivo od delovanja agresivnih hemijskih i mehaničkih faktora. Oni takođe mogu stimulisati regeneraciju tkiva, inhibirati sekreciju hlorovodonične kiseline, delovati antioksidantno i ispoljiti anti-*Helicobacter pylori* aktivnost (Borrelli i Izzo, 2000; de Jesus i sar., 2012).

Na osnovu predstavljenih rezultata, pozitivan učinak primene LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* se delom može povezati sa spireozidom i telimagrandinom II. Uprkos tome što ispitivani preparati sadrže salicilate (salicilnu kiselinu, gaulterin) koji su agresivni prema sluzokoži želuca, jedinjenja LIC sumirano deluju zaštitno. Istovremeno prisutne analgetske i gastroprotektivne osobine (Rezultati i diskusija; sekcija 4.5., sekcija 4.6.) čine farmakološki profil ispitivanih preparata jedinstvenim, imajući u vidu da su najčešća neželjena dejstva NASAIL upravo dejstva na nivou gastrointestinalnog trakta.

4.9. Citotoksična aktivnost

U cilju procene terapijskog potencijala cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris* ispitana je njihova *in vitro* citotoksična aktivnost kolorimetrijskim MTT testom. Dobijeni rezultati su pokazali da ekstrakti pomenutih biljnih droga smanjuju vijabilnost ćelija tumora grlića materice (HeLa), kolona (LS) i pluća (A549), dok u istom koncentracionom opsegu ne utiču na preživljavanje zdravih ćelija – fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) (Tabela 4.7.). IC₅₀ vrednosti su bile slične i kretale su se u rasponu 45,82–54,17 µg/mL (LIC *F. vulgaris*) i 41,73–59,44 µg/mL (LIC *F. ulmaria*). Aktivnosti testiranih jedinjenja su se međusobno znatno razlikovale (Tabela 4.7.): IC₅₀ vrednosti spireozida su prevazilazile 200 µg/mL, dok su galna kiselina i hiperozid bili znatno efektivniji. Ispitivani sekundarni metaboliti nisu uticali na preživljavanje zdravih ćelija. Galna kiselina je ispoljila jaču aktivnost nego ispitivani ekstrakti (IC₅₀ = 3,91–17,76 µg/mL), naročito prema ćelijskoj liniji HeLa. Flavonoid hiperozid je delovao citotoksično, međutim, dobijene vrednosti ukazuju na slabije dejstvo od ispitivanih LIC (IC₅₀ = 83,95–97,35 µg/mL). Aktivnost kontrolne supstance (cisplatin, IC₅₀ = 0,63–3,58 µg/mL) je bila izraženija od aktivnosti testiranih biljnih izolata (Kolundžija i sar., 2014).

Tabela 4.7. Koncentracija jedinjenja/liofilizovanog infuza cvasti (LIC), IC₅₀, koja je dovela do 50% inhibicije preživljavanja ćelijskih linija HeLa, LS, A549 i MRC-5 nakon 72 h inkubacije.

	IC ₅₀ (µg/mL)			
	HeLa	LS	A549	MRC-5
Spireozid	>200	>200	>200	>200
LIC <i>F. vulgaris</i>	45,82 ± 1,89	51,22 ± 0,77	54,17 ± 2,31	>200
LIC <i>F. ulmaria</i>	42,26 ± 0,37	41,73 ± 1,65	59,44 ± 1,73	>200
Galna kiselina	3,91 ± 0,15	11,48 ± 0,91	17,76 ± 1,42	>200
Hiperozid	83,95 ± 2,44	88,26 ± 1,48	97,35 ± 2,56	>200
Cisplatin	0,63 ± 0,06 ^a	1,66 ± 0,31 ^a	3,58 ± 0,66 ^a	4,26 ± 0,46 ^a

IC₅₀ vrednosti testiranih izolata predstavljaju srednju vrednost ± SD (n = 2). ^a Kolundžija i sar., 2014.

Dobijeni rezultati su u saglasnosti sa zapažanjima iz prethodnih studija (Tabela 4.8.). Naime, pokazano je da preparati *F. ulmaria in vitro* deluju citotoksično ili antiproliferativno na C26 ćelije kolorektalnog karcinoma miša (Mărgăoan i sar., 2016), B16 ćelije melanoma miša (Calliste i sar., 2001), humanu tumorsku ćelijsku liniju pluća NCI-H460 (Lima i sar., 2014) i humane Raji ćelije limfoblastoma (Spiridonov i sar., 2005), dok u životinja antagonizuju kancerogeno dejstvo radioaktivnog zračenja, etilnitrozouree, 7,12-dimetilbenz[a]antracena i suprimiraju rast transplantiranih tumora (sarkoma-180 i „Lewis” karcinoma) (Bespalov i sar., 2017a, 2017b; ESCOP, 2003). Vodenoetanolni ekstrakt cvasti *F. vulgaris* je delovao citotoksično na humane Raji ćelije limfoblastoma (Spiridonov i sar., 2005).

Tabela 4.8. Citotoksični i antiproliferativni efekat preparata cvasti *F. ulmaria* (*Fu*) ili *F. vulgaris* (*Fv*).

Testirani preparat/i	<i>In vitro</i> ćelijska kultura/ <i>in vivo</i> model	Delovanje	Literatura
Frakcije dobijene sukcesivnom perkolacijom vrhova u cvetu <i>Fu</i> , rastvaračima rastuće polarnosti	Ćelije melanoma miša (B16)	Hloroformska frakcije (0,1 mg/mL) je inhibirala >75% proliferaciju ćelija melanoma, etilacetatna frakcija (0,1 mg/mL) >50% , dok su heksanska, metanolna i vodena frakcija u istoj koncentraciji ispoljile slabu antiproliferativnu aktivnost.	Calliste i sar., 2001
Vodenoetanolni ekstrakt cvasti <i>Fu</i>	Humane Raji ćelije limfoblastoma	U koncentraciji 10 µg/mL ekstrakt je delimično (47%) suprimirao rast ćelija, dok je u većoj koncentraciji (50 i 200 µg/mL) supresija bila potpuna (100%).	Spiridonov i sar., 2005
Dekokt cvasti <i>Fu</i>	Humana tumorska ćelijska linija pluća NCI-H460	U koncentraciji 70 µg/mL ekstrakt je ostvario 50% inhibicije rasta.	Lima i sar., 2014

Testirani preparat/i	<i>In vitro</i> ćelijska kultura/ <i>in vivo</i> model	Delovanje	Literatura
Vodometanolni ekstrakt polena <i>Fu</i>	C26 ćelije kolorektalnog karcinoma miša	Antiproliferativni efekat, postignut pri koncentraciji ekstrakta 1 mg/mL, iznosio je približno 60–70% inhibicije.	Märgäoan i sar., 2016
Dekokt cvasti <i>Fu</i>	Karcinogeneza indukovana jonizujućim zračenjem u pacova	Dekokt cvasti (dnevna doza odgovarala 1 g osušene cvasti/kg), dat umesto pijaće vode, smanjio je incidencu nastanka malignih tumora 1,5 puta nakon 16 meseci primene.	Bespalov i sar., 2017a
	Neurokarcinogeneza indukovana transplacentalnom izloženošću etilnitrozourei u pacova	Dekot cvasti (dnevna doza odgovarala 1 g osušene cvasti/kg), dat umesto pijaće vode, smanjio je broj životinja kod kojih su se javili tumori (1,2 puta) i incidencu javljanja CNS tumora. Učestalost renalnih tumora i tumora perifernog nervnog sistema nije redukovana.	Bespalov i sar., 2017b
Dekokt cvasti <i>Fu</i>	Karcinogeneza indukovana aplikacijom 7,12-dimetilbenz[a]antracena u miševa	Lokalna aplikacija dekokta je smanjila incidencu (39%) nastanka karcinoma skvamoznih ćelija cerviksa i vagine.	ES COP, 2003
	Transplantirani tumori (sarkom-180 i „Lewis” karcinom) u miševa	Oralno primenjen dekokt je suprimirao rast transplantiranih tumora.	
Vodenoetanolni ekstrakt cvasti <i>Fv</i>	Humane Raji ćelije limfoblastoma	U koncentraciji 10, 50 i 200 µg/mL ekstrakt je suprimirao rast ćelija 15, 62 i 100%, redom.	Spiridonov i sar., 2005

Iako se u prezentovanom eksperimentu spireozid može smatrati neaktivnim, u ranijim istraživanjima je ispoljio aktivnost protiv humanih ćelijskih linija karcinoma kolona (HCT116) (Park i sar., 2014), oralnog skvamoznog karcinoma (SCC-9) (Browning i sar., 2005) i inhibirao rast ćelija mijeloma miša (sp2/0-Ag14) (Furusawa i

sar., 2006). Ova nekonzistentnost je verovatno posledica različitih osobina tumorskih ćelija koje su korišćene u ispitivanjima. Pokazana aktivnost galne kiseline je u saglasnosti sa rezultatima drugih autora, prema kojima je navedeno jedinjenje delovalo protiv humanih ćelija glioma, nazofaringealnog karcinoma, karcinoma grlića materice, karcinoma pluća, kolorektalnog i renalnog adenokarcinoma. Opisani efekti su posredovani različitim mehanizmima kao što su supresija proliferacije ćelija, invazije i angiogeneze (Loizzo i sar., 2009; Lu i sar., 2010; Pang i sar., 2017; Zhao i Hu, 2013). Prethodno prijavljeno inhibitorno dejstvo hiperozida na ćelije kancera pluća i kolorektalnog kancera je posledica njegove apoptotske aktivnosti (Lü, 2016; Zhang i sar., 2017).

Sastojci LIC, koji nisu ispitani u prezentovanom eksperimentu, verovatno doprinose ukupnom delovanju ekstrakata. U tom pogledu, ranije je pokazano da telimagrandin I deluje citotoksično na humane ćelijske linije karcinoma dojke (MCF-7, MDA-MB-231) (Al-Sayed i sar., 2012; Le i sar., 2014), jetre (Hep G2) (Al-Sayed i sar., 2012), prostate (LNCaP) (M. H. Kim i sar., 2013) i grlića materice (HeLa) (Le i sar., 2014); astragalin 2''-*O*-galat na humane ćelijske linije leukemije (HL-60) (Kakumu i sar., 2014); kemferol 4'-*O*-glukozid na humane ćelijske linije karcinoma kolona (HCT116) (Yim i sar., 2015); elagna kiselina na humane ćelijske linije karcinoma kolona (Caco-2), dojke (MCF-7, Hs 578T) i prostate (DU 145) (Losso i sar., 2004); mikvelianin na humane ćelijske linije karcinoma jetre (HepG2), dojke (MCF-7) (Ahmed i sar., 2016) i leukemije (HL-60, Jurkat) (Smolarz i sar., 2008). Telimagrandin II je ispoljio citotoksični efekat protiv humanih ćelijskih linija kancera dojke (MCF7, MDA-MB-231) (Le i sar., 2014), prostate (LNCaP) (M. H. Kim i sar., 2013), grlića materice (HeLa) (Le i sar., 2014) i melanoma (RPMI-7951) (Kashiwada i sar., 1992), dok nije bio aktivan protiv humanih ćelijskih linija karcinoma pluća (A549), ileocekalnog adenokarcinoma (HCT-8), epidermoidnog karcinoma nazofarinksa (KB) i rabdomiosarkoma (TE-671) (Kashiwada i sar., 1992). Telimagrandin II je suprimirao invazivnost ćelija fibrosarkoma HT1080 i inhibirao matriksne metaloproteinaze-2/-9 (Tanimura i sar., 2005). Nakon intraperitonealne primene u dozi od 5 mg/kg, telimagrandin II je ispoljio aktivnost protiv intraperitonealno inokulisanih ćelija sarkoma-180 u miševa (Miyamoto i sar., 1987).

Predstavljeni rezultati ukazuju da su cvasti *F. ulmaria* i *F. vulgaris* biljne sirovine sa citotoksičnim potencijalom koji treba dodatno istražiti i da galna kiselina učestvuje u utvrđenoj aktivnosti LIC *in vitro*. Preparati *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, kao i testirana jedinjenja, nisu uticali na preživljavanje zdravih ćelija što indikuje da poseduju dobar bezbednosni profil. Ovo zapažanje je u skladu sa podatkom da do sada nisu prijavljeni neželjeni efekti tradicionalne primene biljnih lekovitih proizvoda na bazi pomenutih vrsta (HMPC, 2011b, 2011c).

5. ZAKLJUČCI

Sprovedena ispitivanja su omogućila ispunjenje postavljenih ciljeva.

1. Preliminarno ispitivanje cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, prema monografiji *Spiraeae flos* Nemačkog kodeksa lekova i opštem propisu za određivanje tanina Evropske farmakopeje, je pokazalo značajnu sličnost pomenutih biljnih droga u pogledu organoleptičkih osobina, mikroskopskih karakteristika praškova, TLC profila, parametara opšteg (gubitak sušenjem, ukupni pepeo) i specifičnog kvaliteta (sadržaj flavonoida i tanina), te je time opravdalo dalju uporednu hemijsku i farmakološku analizu ovih biljnih sirovina.

2. Iz cvasti *F. vulgaris* je primenom tečno-tečne ekstrakcije, stubne hromatografije, preparativne tankoslojne hromatografije i reverzno-fazne visokoeffikasne tečne hromatografije izolovano 13 polifenolnih jedinjenja čija je struktura određena poređenjem literaturnih i snimljenih NMR (^1H i ^{13}C), MS i UV spektralnih podataka. Izolovano je 8 flavonolnih heterozida (kemferol 4'-*O*-glukozid, kvercetin 4'-*O*-glukozid, astragalin, astragalin 2''-*O*-galat, izokvercitrin, izokvercitrin 2''-*O*-galat, hiperozid, hiperozid 2''-*O*-galat), dva elagna tanina (telimagrandin I, telimagrandin II), jedna fenolkarboksilna kiselina (galna kiselina), njen derivat (metilgalat) i jedan fenolni heterozid (gaulterin).

3. Kvalitativna i kvantitativna analiza LIC *F. ulmaria* i *F. vulgaris* je izvršena visokoeffikasnom tečnom hromatografijom sa UV detekcijom, metodom eksternog standarda. Određen je saržaj 11 flavonoida, dva tanina, tri fenolkarboksilne kiseline i jednog fenolnog heterozida. Spireozid je bio kvantitativno dominantni flavonoid u svim ispitivanim uzorcima (55,67 mg/g LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.; 56,27 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 46,17 mg/g LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.). Pored ovog jedinjenja, takođe su detektovani drugi glikozidi kvercetina i kemferola. Uočena je sličnost flavonoidnih profila, međutim galoilovani heterozidi hiperozida, izokvercitrina i astragalina nisu detektovani u uzorcima *F. ulmaria*, već samo u uzorku *F. vulgaris*. Sadržaj telimagrandina I je bio relativno visok (98,86 mg/g LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014 god.; 124,43 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 157,75 mg/g LIC

F. ulmaria, Kopaonik 2016. god.), dok je telimagranin II bio prisutan u manjoj količini. Galna kiselina (10,22 mg/g LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.; 10,96 mg/g LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.; 11,15 mg/g LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.) je bila najzastupljenija fenolkarboksilna kiselina. Takođe su detektovane elagna i salicilna kiselina. Sadržaj gaulterina iznosio je 36,65 mg/g (LIC *F. vulgaris*, Loćika 2014. god.), 60,22 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Zlatibor 2014. god.) i 91,62 mg/g (LIC *F. ulmaria*, Kopaonik 2016. god.).

4. Antioksidantna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i njihovog kvantitativno dominantnog flavonoida spireozida je procenjena *in vitro* korišćenjem DPPH, FRAP i 2-dezoksiriboza testa, kao i određivanjem parametara oksidativno-stresnog statusa u serumu koji je prethodno izložen delovanju egzogenog oksidansa *tert*-butilhidroperoksida. Testirani preparati su pokazali značajnu sposobnost neutralisanja DPPH radikala ($IC_{50} = 8,45\text{--}10,20 \mu\text{g/mL}$) i redukcije kompleksa feri jona (FRAP vrednost = 4,46–7,72 mmol Fe^{2+}/g), uporedivu sa delovanjem referentne supstance L-askorbinske kiseline. Ispitivani ekstrakti nisu dostigli 50% inhibicije produkcije OH^{\bullet} radikala. Spireozid je ispoljio značajnu aktivnost (DPPH test, $IC_{50} = 19,54 \mu\text{g/mL}$; 2-Dezoksiriboza test, $IC_{50} = 5,1 \mu\text{g/mL}$; FRAP test, FRAP vrednost = 15,02 mmol Fe^{2+}/g). LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i spireozid su pokazali sposobnost da smanje indukovani oksidativni stres u humanom serumu (povećali su vrednosti totalnog antioksidativnog statusa, a smanjili vrednosti prooksidativno-antioksidativnog balansa), međutim, ispoljeni efekat je najčešće bio manje izražen od delovanja dobro poznatog antioksidansa Trolox-a. Nasuprot tome, pri većim koncentracijama LIC i spireozida je došlo do povećanja vrednosti totalnog oksidativnog statusa. Donošenje zaključka o antioksidantnom delovanju biljnih izolata u humanom serumu zahteva dodatna istraživanja.

5. Antiinflamatorna aktivnost i antiagregacioni potencijal preparata *F. vulgaris* i *F. ulmaria* i izolovanih flavonoidnih heterozida su utvrđeni *ex vivo* praćenjem inhibicije produkcije eikozanoida (prostaglandina E_2 , PGE_2 ; 12-hidroksieikozatetraenske kiseline, 12-HETE; tromboksana B_2 , TXB_2) u humanim trombocitima. Aktivnost ekstrakata ($IC_{50} = 0,961\text{--}4,401 \text{ mg/mL}$ LIC *F. vulgaris*, $IC_{50} = 3,415\text{--}6,768 \text{ mg/mL}$ LIC *F. ulmaria*) je bila značajno manja od aktivnosti kontrolnih supstanci (aspirina i kvercetina). Među jedinjenjima, najizraženiju sposobnost inhibicije produkcije PGE_2 je pokazao astragalin

2''-*O*-galat ($IC_{50} = 141,1 \mu\text{g/mL}$), dok je spireozid najpotentnije suprimirao sintezu 12-HETE ($IC_{50} = 4,69 \mu\text{g/mL}$).

6. Antihiperalgezijska i antiedematozna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* ispitana je *in vivo* u modelu inflamacije šape pacova. Oralno primenjeni ekstrakti (100–300 mg/kg) su statistički značajno i dozno-zavisno smanjili bolnu preosetljivost uzrokovanu intraplantarnim injektovanjem karagenina: $ED_{50} \pm SEM$ vrednosti (sa 95% intervalom poverenja) su pri maksimalnom efektu iznosile $172,2 \pm 6,2 \text{ mg/kg}$ (147,4–201,3 mg/kg) za LIC *F. vulgaris* i $164,8 \pm 15,4 \text{ mg/kg}$ (110,3–246,3 mg/kg) za LIC *F. ulmaria*. Testirani biljni izolati su bili efikasni u dozama koje odgovaraju tradicionalno korišćenim dozama za humanu primenu. Nasuprot tome, antiedematozno dejstvo LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* (100–300 mg/kg) nije bilo statistički značajno. Dobijeni rezultati podržavaju zabeleženu etnomedicinsku primenu *F. vulgaris* i *F. ulmaria* za ublažavanje bola.

7. Preliminarnim ispitivanjem akutne toksičnosti u miševa je pokazano da tokom perioda praćenja od dve nedelje, nakon oralne primene velikih doza (2000 mg/kg) LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria*, ne dolazi do promena u ponašanju životinja koje bi indikovale postojanje toksičnosti.

8. Gastroprotektivna aktivnost LIC *F. vulgaris* i *F. ulmaria* je ispitana u modelu gastričnog ulkusa indukovanog aposlutnim etanolom. Oštećenje želudačne sluzokože je izraženo gastričnim skorom (eng. *Gastric Damage Score*, GDS). Pokazano je da su testirani ekstrakti (100–300 mg/kg, *p.o.*) sposobni da smanje nastanak mukoznih lezija (GDS 3,4–4, LIC *F. vulgaris*; GDS 1,4–2,9, LIC *F. ulmaria*). Spireozid (50 mg/kg, *p.o.*, GDS 3,6) i telimagrandin II (40 mg/kg, *p.o.*, GDS 3,7) su takođe ispoljili aktivnost, pa se može zaključiti da su ova jedinjenja barem delom odgovorna za opisani zaštitni efekat LIC.

9. LIC *F. vulgaris* ($IC_{50} = 45,82\text{--}54,17 \mu\text{g/mL}$) i LIC *F. ulmaria* ($IC_{50} = 41,73\text{--}59,44 \mu\text{g/mL}$) su delovali citotoksično na ćelijske linije tumora grlića materice (HeLa), kolona (LS) i pluća (A549). Spireozid u testiranim koncentracijama nije bio aktivan. Hiperozid je delovao slabije od ispitivanih ekstrakata ($IC_{50} = 83,95\text{--}97,35 \mu\text{g/mL}$), dok je galna kiselina ispoljila jače citotoksično delovanje ($IC_{50} = 3,91\text{--}17,76 \mu\text{g/mL}$).

10. Dobijeni rezultati opravdavaju tradicionalno korišćenje cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* kod bolnih stanja i gastričnog ulkusa. Povoljan bezbednosni profil, ustanovljen preliminarnom procenom akutne toksičnosti, takođe podržava zabeleženu etnomedicinsku upotrebu. Dodatno, pokazano citotoksično delovanje otvara nove mogućnosti za primenu, međutim, neophodna su dalja ispitivanja da bi se precizno definisao potencijal cvasti *F. vulgaris* i *F. ulmaria* u ovoj oblasti. Testirani ekstrakti imaju sposobnost neutralizacije slobodnih radikala i inhibicije sinteze eikozanoida, pa se može pretpostaviti da su ovi mehanizmi barem delom u osnovi dokumentovanih farmakoloških efekata. Utvrđeno je da aktivnost ispoljavaju flavonoidi (spireozid, hiperozid, astragalin 2''-*O*-galat, smeša hiperozid 2''-*O*-galata i izokvercitrin 2''-*O*-galata), fenolkarboksilna kiselina (galna kiselina) i tanin (telimagrandin II), što ukazuje da su ova jedinjenja potencijalni markeri specifičnog kvaliteta ispitivanih biljnih droga. Uzevši u obzir sličnost hemijskih i farmakoloških profila testiranih preparata, opravdan je nastavak istraživanja sa ciljem da se proceni mogućnost da biljna droga *Filipendulae flos* dobije status oficinalne biljne droge čiji bi biološki izvor bile dve vrste, *F. ulmaria* i *F. vulgaris*.

6. LITERATURA

- Abdelwahab, S.I., 2013. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: Involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. *Int. Immunopharmacol.* 16, 296–305.
- Abdullin, I.F., Turova, E.N., Gaisina, G.K., Budnikov, G.K., 2002. Use of electrogenerated bromine for estimating the total antioxidant capacity of plant raw materials and plant-based medicinal preparations. *J. Anal. Chem.* 57, 557–560.
- Ahmed, H., Moawad, A., Owis, A., AbouZid, S., Ahmed, O., 2016. Flavonoids of *Calligonum polygonoides* and their cytotoxicity. *Pharm. Biol.* 54, 2119–2126.
- Akdemir, Z.Ş., İrem Tatlı, İ., Saracoğlu, İ., İsmailoğlu, U.B., Şahin-Erdemli, İ., Çalış, İ., 2001. Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry* 56, 189–193.
- Alamdari, D.H., Paletas, K., Pegiou, T., Sarigianni, M., Befani, C., Koliakos, G., 2007. A novel assay for the evaluation of the prooxidant–antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clin. Biochem.* 40, 248–254.
- Al-Sayed, E., Singab, A.-N., Ayoub, N., Martiskainen, O., Sinkkonen, J., Pihlaja, K., 2012. HPLC–PDA–ESI–MS/MS profiling and chemopreventive potential of *Eucalyptus gomphocephala* DC. *Food Chem.* 133, 1017–1024.
- Baczek, K., Cygan, M., Przybyl, J.L., Kosakowska, O., Weglarz, Z., 2012. Seasonal variation of phenolics content in above- and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Herba Pol.* 58, 24–32.
- Ball, P.W., 1968. *Filipendula* Miller, U: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europaea* Vol 2. Roseaceae to Umbelliferae. Cambridge University Press, London, pp. 6–7.
- Baralić, I., 2012. Doktorska disertacija: Uticaj suplementacije astaksantinom na nivo markera oksidativnog stresa i nivo sekretornog IgA u salivi kod mladih fudbalera. Univerzitet u Beogradu, Beograd.

- Barros, L., Alves, C.T., Dueñas, M., Silva, S., Oliveira, R., Carvalho, A.M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Ind. Crops Prod.* 44, 104–110.
- Beara, I., Živković, J., Lesjak, M., Ristić, J., Šavikin, K., Maksimović, Z., Janković, T., 2015. Phenolic profile and anti-inflammatory activity of three *Veronica* species. *Ind. Crops Prod.* 63, 276–280.
- Beserra, A.M.S. e S., Calegari, P.I., Souza, M. do C., dos Santos, R.A.N., Lima, J.C. da S., Silva, R.M., Balogun, S.O., Martins, D.T. de O., 2011. Gastroprotective and ulcer-healing mechanisms of ellagic acid in experimental rats. *J. Agric. Food Chem.* 59, 6957–6965.
- Bespalov, V.G., Alexandrov, V.A., Semenov, A.L., Kovan'ko, E.G., Ivanov, S.D., Vysochina, G.I., Kostikova, V.A., Baranenko, D.A., 2017a. The inhibitory effect of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) on radiation-induced carcinogenesis in rats. *Int. J. Radiat. Biol.* 93, 394–401.
- Bespalov, V.G., Alexandrov, V.A., Vysochina, G.I., Kostikova, V.A., Baranenko, D.A., 2017b. The inhibiting activity of meadowsweet extract on neurocarcinogenesis induced transplacentally in rats by ethylnitrosourea. *J. Neurooncol.* 131, 459–467.
- Bi, W., Shen, J., Gao, Y., He, C., Peng, Y., Xiao, P., 2016. Ku-jin tea (*Acer tataricum* subsp. *ginnala* or *A. tataricum* subsp. *theiferum*), an underestimated functional beverage rich in antioxidant phenolics. *J. Funct. Foods* 24, 75–84.
- Blazics, B., Papp, I., Kéry, Á., 2010. LC–MS qualitative analysis and simultaneous determination of six *Filipendula* salicylates with two standards. *Chromatographia* 71, 61–67.
- Blumenthal, M., Busse, W.R., Goldberg, A., Gruenwald, J., Hall, T., Riggins, C.W., Ristser, R.S., 1998. The complete german Commission E monographs: Therapeutic guide to herbal medicines, 1st edition. American Botanical Council, Austin, Texas.
- Borrelli, F., Izzo, A.A., 2000. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. *Phytother. Res.* 14, 581–591.

- Browning, A.M., Walle, U.K., Walle, T., 2005. Flavonoid glycosides inhibit oral cancer cell proliferation — role of cellular uptake and hydrolysis to the aglycones. *J. Pharm. Pharmacol.* 57, 1037–1041.
- Bukreeva, T.V., Shukhobodskii, B.A., 1987. Structure of the main flavonoid glycoside from the flowers of *Filipendula ulmaria*. *Chem. Nat. Compd.* 23, 631–632.
- Burda, S., Oleszek, W., 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2774–2779.
- Calis, I., Kuruüzüm, A., Demirezer, L.Ö., Sticher, O., Ganci, W., Rüedi, P., 1999. Phenylvaleric acid and flavonoid glycosides from *Polygonum salicifolium*. *J. Nat. Prod.* 62, 1101–1105.
- Calliste, C.-A., Trouillas, P., Allais, D.-P., Simon, A., Duroux, J.-L., 2001. Free radical scavenging activities measured by electron spin resonance spectroscopy and B16 cell antiproliferative behaviors of seven plants. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3321–3327.
- Cappelletti, E.M., Trevisan, R., Caniato, R., 1982. External antirheumatic and antineuralgic herbal remedies in the traditional medicine of north-eastern Italy. *J. Ethnopharmacol.* 6, 161–190.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25.
- Cavero, R.Y., Calvo, M.I., 2015. Medicinal plants used for musculoskeletal disorders in Navarra and their pharmacological validation. *J. Ethnopharmacol.* 168, 255–259.
- Challice, J.S., 1974. Rosaceae chemotaxonomy and the origins of the Pomoideae. *Bot. J. Linn. Soc.* 69, 239–259.
- Chandramohan Reddy, T., Aparoy, P., Kishore Babu, N., Anil Kumar, K., Kumar Kalangi, S., Reddanna, P., 2010. Kinetics and docking studies of a COX-2 inhibitor isolated from *Terminalia bellerica* fruits. *Protein Pept. Lett.* 17, 1251–1257.
- Chen, Y., Wang, J., Ou, Y., Chen, H., Xiao, S., Liu, G., Cao, Y., Huang, Q., 2014. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from Eucalyptus leaves (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9). *J. Funct. Foods* 7, 737–745.

- Cheng, K.-W., Yang, R.-Y., Tsou, S.C.S., Lo, C.S.C., Ho, C.-T., Lee, T.-C., Wang, M., 2009. Analysis of antioxidant activity and antioxidant constituents of Chinese toon. *J. Funct. Foods* 1, 253–259.
- Cong, F., Joshi, K.R., Devkota, H.P., Watanabe, T., Yahara, S., 2015. Dhasingreoside: new flavonoid from the stems and leaves of *Gaultheria fragrantissima*. *Nat. Prod. Res.* 29, 1442–1448.
- Conner, E.M., Grisham, M.B., 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition* 12, 274–277.
- Cota, B.B., Siqueira, E.P., Oliveira, D.M. de, Alves, T.M.A., Sobral, M.E.G., Rabello, A., Zani, C.L., 2012. Chemical constituents and leishmanicidal activity from leaves of *Kielmeyera variabilis*. *Rev. Bras. Farmacogn.* 22, 1253–1258.
- Csedö, K., Monea, M., Sabău, M., Eșianu, S., 1993. The antibiotic activity of *Filipendula ulmaria*. *Planta Med.* 59, A675–A675.
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., Dyatmiko, W., 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv. Chim. Acta* 80, 1144–1152.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Schivo, I.R., Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole, S., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2008. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J. Leukoc. Biol.* 83, 824–832.
- Cwikla, C., Schmidt, K., Matthias, A., Bone, K.M., Lehmann, R., Tiralongo, E., 2010. Investigations into the antibacterial activities of phytotherapeutics against *Helicobacter pylori* and *Campylobacter jejuni*. *Phytother. Res.* 24, 649–656.
- Ćebović, T., Maksimović, Z., 2012. Hepatoprotective effect of *Filipendula hexapetala* gilib. (Rosaceae) in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 26, 1088–1091.
- DAC/NRF-Kommission, 2013. Deutscher Arzneimittel Codex, Neues Rezeptur Formularium. Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH, Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn, Stuttgart.
- de Jesus, N.Z.T., Falcão, H. de S., Gomes, I.F., Leite, T.J. de A., Lima, G.R. de M., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., Silva, M.S. da, Athayde-Filho, P.F. de, Batista,

- L.M., 2012. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3203–3228.
- de Lira Mota, K.S., Dias, G.E.N., Pinto, M.E.F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14, 979–1012.
- Dei Cas, L., Pugni, F., Fico, G., 2015. Tradition of use on medicinal species in Valfurva (Sondrio, Italy). *J. Ethnopharmacol.* 163, 113–134.
- Denev, P., Kratchanova, M., Ciz, M., Lojek, A., Vasicek, O., Blazheva, D., Nedelcheva, P., Vojtek, L., Hyrs, P., 2014. Antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities of herb extracts. *Acta Biochim. Pol.* 61, 359–367.
- Dewick, P., 2009. *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*, 3rd edition. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15–29.
- Dongmo, A.B., Miyamoto, T., Yoshikawa, K., Arihara, S., Lacaille-Dubois, M.-A., 2007. Flavonoids from *Acacia pennata* and their cyclooxygenase (COX-1 and COX-2) inhibitory activities. *Planta Med.* 73, 1202–1207.
- Drummond, E.M., Harbourne, N., Marete, E., Martyn, D., Jacquier, J., O’Riordan, D., Gibney, E.R., 2013. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother. Res.* 27, 588–594.
- Dorđević, S., Tadić, V., Petrović, S., Kukić-Marković, J., Dobrić, S., Milenković, M., Hadžifejzović, N., 2012. Bioactivity assays on *Carlina acaulis* and *C. acanthifolia* root and herb extracts. *Dig. J. Nanomater. Biostructures* 7, 1213–1222.
- EDQM, 2013. *European Pharmacopoeia 8th Edition*. Council of Europe, Strasbourg.
- El-Shitany, N.A., El-Bastawissy, E.A., El-desoky, K., 2014. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa-B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int. Immunopharmacol.* 19, 290–299.

- Erdemoglu, N., Akkol, E.K., Yesilada, E., Calış, I., 2008. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 119, 172–178.
- Erel, O., 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin. Biochem.* 38, 1103–1111.
- Erel, O., 2004. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin. Biochem.* 37, 112–119.
- ESCOP, 2003. ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd ed. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, Georg Thieme Verlag, Thieme New York, Exeter, Stuttgart, New York.
- Faried, A., Kurnia, D., Faried, L.S., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2007. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 30, 605–613.
- Fecka, I., 2009. Qualitative and quantitative determination of hydrolysable tannins and other polyphenols in herbal products from meadowsweet and dog rose. *Phytochem. Anal.* 20, 177–190.
- Feldman, K.S., Sahasrabudhe, K., 1999. Ellagitannin chemistry. Syntheses of tellimagrandin II and a dehydrodigalloyl ether-containing dimeric gallotannin analogue of coriariin A. *J. Org. Chem.* 64, 209–216.
- Fossen, T., Pedersen, A.T., Andersen, Ø.M., 1998. Flavonoids from red onion (*Allium cepa*). *Phytochemistry* 47, 281–285.
- Francis, J.A., Rumbelha, W., Nair, M.G., 2004. Constituents in easter lily flowers with medicinal activity. *Life Sci.* 76, 671–683.
- Fukuda, T., Ito, H., Yoshida, T., 2003. Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia* L.). *Phytochemistry* 63, 795–801.
- Furusawa, M., Tsuchiya, H., Nagayama, M., Tanaka, T., Oyama, M., Ito, T., Iinuma, M., Takeuchi, H., 2006. Cell growth inhibition by membrane-active components in brownish scale of onion. *J. Health Sci.* 52, 578–584.
- Gajić, M., 1972. Rod *Filipendula* L., U: Josifović, M. (Ed.), Flora SR Srbije IV. SANU, Beograd, pp. 12–14.

- Gao, D.-F., Xu, Min, Yang, C.-R., Xu, Mei, Zhang, Y.-J., 2010. Phenolic antioxidants from the leaves of *Camellia papyandra* hu. J. Agric. Food Chem. 58, 8820–8824.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., Kraśniewska, K., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z., 2014. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. Food Control 37, 351–361.
- Grosser, T., Smith, F.M., FitzGerald, G.A., 2011. Anti-inflammatory, antipyretic and analgesic agents; Pharmacotherapy of Gout, U: Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp. 959–1004.
- Guarrera, P.M., Savo, V., 2016. Wild food plants used in traditional vegetable mixtures in Italy. J. Ethnopharmacol. 185, 202–234.
- Gudej, J., 2003. Kaempferol and quercetin glycosides from *Rubus idaeus* L. leaves. Acta Pol. Pharm. - Drug Res. 60, 313–316.
- Halkes, B., Beukelman, C., Kroes, B., van den Berg, A., Labadie, R.P., van Dijk, H., 1997a. In vitro immunomodulatory activity of *Filipendula ulmaria*. Phytother. Res. 11, 518–520.
- Halkes, B., Beukelman, C., Kroes, B., Van den Berg, A., Van Dijk, H., Labadie, R.P., 1997b. A strong complement inhibitor from the flowers of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. Pharm. Pharmacol. Lett. 7, 79–82.
- Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Solco, A.K.S., Dixon, P.M., Delate, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F., 2007. Inhibition of prostaglandin E₂ production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. J. Agric. Food Chem. 55, 7323–7331.
- Han, J.-T., Bang, M.-H., Chun, O.-K., Kim, D.-O., Lee, C.-Y., Baek, N.-I., 2004. Flavonol glycosides from the aerial parts of *Aceriphyllum rossii* and their antioxidant activities. Arch. Pharm. Res. 27, 390–395.
- Hatano, T., Yoshida, T., Shingu, T., Okuda, T., 1988. ¹³C nuclear magnetic resonance spectra of hydrolyzable tannins. II. Tannins forming anomer mixtures. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 36, 2925–2933.

- Hayat, S., Ali, A., Ahmad, A., 2007. Salicylic acid: biosynthesis, metabolism and physiological role in plants, U: Hayat, S., Ahmad, A. (Eds.), *Salicylic Acid – a Plant Hormone*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 1–14.
- He, D., Huang, Y., Ayupbek, A., Gu, D., Yang, Y., Aisa, H.A., Ito, Y., 2010. Separation and purification of flavonoids from black currant leaves by high-speed countercurrent chromatography and preparative HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 33, 615–628.
- HMPC, 2011a. Assessment report on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *herba* and *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *flos*.
- HMPC, 2011b. Community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *flos*.
- HMPC, 2011c. Community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *herba*.
- Hsiang, C.-Y., Hseu, Y.-C., Chang, Y.-C., Kumar, K.J.S., Ho, T.-Y., Yang, H.-L., 2013. *Toona sinensis* and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by *in vivo* bioluminescence imaging. *Food Chem.* 136, 426–434.
- Isobe, T., Fukushige, T., Noda, Y., 1979. A new flavonoid glycoside from *Polygonum nodosum*. *Chem. Lett.* 8, 27–30.
- Isobe, T., Ito, N., Noda, Y., 1980. Minor flavonoids of *Polygonum nodosum*. *Phytochemistry* 19, 1877.
- Jančić, R., Lakušić, B., 2017. *Botanika farmaceutika*, drugo izdanje. LENTO, Beograd.
- Jarić, S., Popović, Z., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., Pavlović, P., 2007. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J. Ethnopharmacol.* 111, 160–175.
- Josifović, M., 1972. *Flora SR Srbije IV*. SANU, Beograd.
- Jourdes, M., Pouységu, L., Quideau, S., Mattivi, F., Truchado, P., Tomás-Barberán, F., 2012. Hydrolyzable tannins: gallotannins, ellagitannins, and ellagic acid, U: *Handbook of analysis of active compounds in functional foods*. CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 435–459.

- Kakumu, A., Ninomiya, M., Efdi, M., Adfa, M., Hayashi, M., Tanaka, K., Koketsu, M., 2014. Phytochemical analysis and antileukemic activity of polyphenolic constituents of *Toona sinensis*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 4286–4290.
- Kashiwada, Y., Nonaka, G., Nishioka, I., Chang, J.-J., Lee, K.-H., 1992. Antitumor agents, 129. Tannins and related compounds as selective cytotoxic agents. *J. Nat. Prod.* 55, 1033–1043.
- Katanić, J., Boroja, T., Mihailović, V., Nikles, S., Pan, S.-P., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mitrović, S., Bauer, R., 2016. *In vitro* and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. *J. Ethnopharmacol.* 193, 627–636.
- Katanić, J., Boroja, T., Stanković, N., Mihailović, V., Mladenović, M., Kreft, S., M. Vrvic, M., 2015a. Bioactivity, stability and phenolic characterization of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. *Food Funct.* 6, 1164–1175.
- Katanić, J., Matić, S., Pferschy-Wenzig, E.-M., Kretschmer, N., Boroja, T., Mihailović, V., Stanković, V., Stanković, N., Mladenović, M., Stanić, S., Mihailović, M., Bauer, R., 2017. *Filipendula ulmaria* extracts attenuate cisplatin-induced liver and kidney oxidative stress in rats: *In vivo* investigation and LC-MS analysis. *Food Chem. Toxicol.* 99, 86–102.
- Katanić, J., Mihailović, V., Matić, S., Stanković, V., Stanković, N., Boroja, T., Mladenović, M., Stanić, S., Kreft, S., Mihailović, M., 2015b. The ameliorating effect of *Filipendula hexapetala* extracts on hepatorenal toxicity of cisplatin. *J. Funct. Foods* 18, 198–212.
- Katanić, J., Mihailović, V., Stanković, N., Boroja, T., Mladenović, M., Solujić, S., Stanković, M., Vrvic, M., 2015c. Dropwort (*Filipendula hexapetala* Gilib.): Potential role as antioxidant and antimicrobial agent. *EXCLI J.* 14, 1–20.
- Kato, K., Ninomiya, M., Tanaka, K., Koketsu, M., 2016. Effects of functional groups and sugar composition of quercetin derivatives on their radical scavenging properties. *J. Nat. Prod.* 79, 1808–1814.
- Kawakami, K., Shibukura, Y., Kanno, T., Furuki, T., Aketa, S., Hirayama, M., 2011. Identification of 2"-galloylated flavonol 3-O-glycosides accumulating in developing leaves of persimmon. *Phytochem. Anal.* 22, 403–410.

- Kazazi, F., Halkes, S.B.A., Ufford, H.Q. van, Beukelman, C.J., Berg, A.V. den, 2009. Inhibition of xanthine oxidase activity by *Filipendula species*. *Planta Med.* 75, PA3.
- Khenouf, S., Benabdallah, H., Gharzouli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T.-H., Yoshida, T., Gharzouli, A., 2003. Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J. Agric. Food Chem.* 51, 1469–1473.
- Kim, B.-H., Choi, J.S., Yi, E.H., Lee, J.-K., Won, C., Ye, S.-K., Kim, M.-H., 2013. Relative antioxidant activities of quercetin and its structurally related substances and their effects on NF- κ B/CRE/AP-1 signaling in murine macrophages. *Mol. Cells* 35, 410–420.
- Kim, B.H., Lee, I.J., Lee, H.-Y., Han, S.-B., Hong, J.T., Ahn, B., Lee, C.-K., Kim, Y., 2007. Quercetin 3-*O*- β -(2''-galloyl)-glucopyranoside inhibits endotoxin LPS-induced IL-6 expression and NF- κ B activation in macrophages. *Cytokine* 39, 207–215.
- Kim, B.-H., Lee, I.J., Lee, H.-Y., Hwang, B.Y., Han, S.-B., Kim, Y., 2007. Distinct inhibitory mechanisms of isoquercitrin gallate and its aglycone on zymosan-induced peroxynitrite production in macrophages. *Nitric Oxide* 17, 134–142.
- Kim, H.H., Kim, D.H., Kim, M.H., Oh, M.H., Kim, S.R., Park, K.J., Lee, M.W., 2013. Flavonoid constituents in the leaves of *Myrica rubra* sieb. et zucc. with anti-inflammatory activity. *Arch. Pharm. Res.* 36, 1533–1540.
- Kim, H.J., Woo, E.-R., Shin, C.-G., Park, H., 1998. A new flavonol glycoside gallate ester from *Acer okamotoanum* and its inhibitory activity against human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) integrase. *J. Nat. Prod.* 61, 145–148.
- Kim, H.P., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., 2004. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.* 96, 229–245.
- Kim, M.H., Ha, S.Y., Oh, M.H., Kim, H.H., Kim, S.R., Lee, M.W., 2013. Antioxidative and anti-proliferative activity on human prostate cancer cells lines of the phenolic compounds from *Corylopsis coreana* Uyeki. *Molecules* 18, 4876–4886.

- Kim, M.-S., Kim, S.-H., 2011. Inhibitory effect of astragaloside on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 34, 2101–2107.
- Kim, S.-H., Jun, C.-D., Suk, K., Choi, B.-J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.-Y., Kim, D.-K., Shin, T.-Y., 2006. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.* 91, 123–131.
- Kim, S.-J., Um, J.-Y., Hong, S.-H., Lee, J.-Y., 2011. Anti-inflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages. *Am. J. Chin. Med.* 39, 171–181.
- Kim, Y., Jang, D.-S., Park, S.-H., Yun, J., Min, B.-K., Min, K.R., Lee, H.-K., 2000. Flavonol glycoside gallate and ferulate esters from *Persicaria lapathifolia* as inhibitors of superoxide production in human monocytes stimulated by unopsonized zymosan. *Planta Med.* 66, 72–74.
- Klein-Júnior, L.C., Santin, J.R., Lemos, M., Silveira, A.C. de O., Rocha, J.A.R., Beber, A.P., Wagner, T.M., Bresolin, T.M.B., Bella-Cruz, A., Cechinel-Filho, V., Faloni de Andrade, S., 2013. Role of gastric mucus secretion, oxinitergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 767–776.
- Klein-Júnior, L.C., Silva, L.M. da, Boeing, T., Somensi, L.B., Beber, A.P., Rocha, J.A.R., Henriques, A.T., Andrade, S.F., Cechinel-Filho, V., 2017. The protective potential of *Phyllanthus niruri* and corilagin on gastric lesions induced in rodents by different harmful agents. *Planta Med.* 83, 30–39.
- Koleckar, V., Kubikova, K., Rehakova, Z., Kuca, K., Jun, D., Jahodar, L., Opletal, L., 2008. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. *Mini Rev. Med. Chem.* 8, 436–447.
- Kolundžija, B., Marković, V., Stanojković, T., Joksović, L., Matić, I., Todorović, N., Nikolić, M., Joksović, M.D., 2014. Novel anthraquinone based chalcone analogues containing an imine fragment: Synthesis, cytotoxicity and anti-angiogenic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 65–71.
- Kroes, B.H., Berg, A.J.J. van den, Ufford, H.C.Q. van, Dijk, H. van, Labadie, R.P., 1992. Anti-Inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* 58, 499–504.

- Kukić, J., Petrović, S., Niketić, M., 2006. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 725–729.
- Kukić-Marković, J., 2013. Doktorska disertacija: Hemijska i farmakološka karakterizacija *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae). Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Küpeli, E., Tatli, I.I., Akdemir, Z.S., Yesilada, E., 2007. Estimation of antinociceptive and anti-inflammatory activity on *Geranium pratense* subsp. *finitimum* and its phenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.* 114, 234–240.
- Le, V., Esposito, D., Grace, M.H., Ha, D., Pham, A., Bortolazzo, A., Bevens, Z., Kim, J., Okuda, R., Komarnytsky, S., Lila, M.A., White, J.B., 2014. Cytotoxic effects of ellagitannins isolated from walnuts in human cancer cells. *Nutr. Cancer* 66, 1304–1314.
- Lee, D.-Y., Lyu, H.-N., Kwak, H.-Y., Jung, L.-K., Lee, Y.-H., Kim, D.-K., Chung, I.-S., Kim, S.-H., Baek, N.-I., 2007. Isolation of flavonoids from the fruits of *Cornus kousa* Burg. *J. Appl. Biol. Chem.* 50, 144–147.
- Lee, H.-B., Kim, E.-K., Park, S.-J., Bang, S., Kim, T.G., Chung, D., 2011. Isolation and anti-inflammatory effect of astragalins synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *J. Sci. Food Agric.* 91, 3315–3321.
- Lee, H.-J., Seong, Y.-H., Bae, K.-H., Kwon, S.-H., Kwak, H.-M., Nho, S.-K., Kim, K.-A., Hur, J.-M., Lee, K.B., Kang, Y.-H., Song, K.-S., 2005. β -Secretase (BACE1) inhibitors from *Sanguisorbae radix*. *Arch. Pharm. Res.* 28, 799–803.
- Lee, J., Kim, S., Namgung, H., Jo, Y.-H., Bao, C., Choi, H.-K., Auh, J.-H., Lee, H.J., 2014. Ellagic acid identified through metabolomic analysis is an active metabolite in strawberry ('Seolhyang') regulating lipopolysaccharide-induced inflammation. *J. Agric. Food Chem.* 62, 3954–3962.
- Lee, J.-C., Lim, K.-T., 2000. Effects of cactus and ginger extracts as dietary antioxidants on reactive oxidant and plasma lipid level. *Food Sci. Biotechnol.*
- Lee, J.H., Ku, C.H., Baek, N., Kim, S.-H., Park, H.W., Kim, D.K., 2004. Phytochemical constituents from *Diodia teres*. *Arch. Pharm. Res.* 27, 40–43.

- Lee, S., Jung, S.H., Lee, Y.S., Yamada, M., Kim, B.-K., Ohuchi, K., Shin, K.H., 2004. Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. Arch. Pharm. Res. 27, 628–632.
- Lee, S., Kang, M., Heo, K.-I., Chen, W.-L., Lee, C., 2009. A palynotaxonomic study of the genus *Filipendula* (Rosaceae). J. Syst. Evol. 47, 115–122.
- Leporatti, M.L., Ivancheva, S., 2003. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. J. Ethnopharmacol. 87, 123–142.
- Lesjak, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Ristić, J.D., Anačkov, G.T., Božin, B.N., Mimica-Dukić, N.M., 2013. Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. LWT - Food Sci. Technol. 53, 530–539.
- Li, X., Liu, Z., Zhang, X., Wang, L., Zheng, Y., Yuan, C., Sun, G., 2008. Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*. Molecules 13, 1530–1537.
- Lim, E.-K., Ashford, D.A., Hou, B., Jackson, R.G., Bowles, D.J., 2004. Arabidopsis glycosyltransferases as biocatalysts in fermentation for regioselective synthesis of diverse quercetin glucosides. Biotechnol. Bioeng. 87, 623–631.
- Lima, M.J., Sousa, D., Lima, R.T., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Vasconcelos, M.H., 2014. Flower extracts of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim inhibit the proliferation of the NCI-H460 tumour cell line. Ind. Crops Prod. 59, 149–153.
- Liu, G., Wang, W., Masuoka, N., Isobe, T., Yamashita, K., Manabe, M., Kodama, H., 2005. Effect of three flavonoids isolated from Japanese *Polygonum* species on superoxide generation in human neutrophils. Planta Med. 71, 933–937.
- Loizzo, M.R., Said, A., Tundis, R., Hawas, U.W., Rashed, K., Menichini, Federica, Frega, N.G., Menichini, Francesco, 2009. Antioxidant and antiproliferative activity of *Diospyros lotus* L. extract and isolated compounds. Plant Foods Hum. Nutr. 64, 264.
- Losso, J.N., Bansode, R.R., Trappey, A., Bawadi, H.A., Truax, R., 2004. *In vitro* anti-proliferative activities of ellagic acid. J. Nutr. Biochem. 15, 672–678.

- Lü, P., 2016. Inhibitory effects of hyperoside on lung cancer by inducing apoptosis and suppressing inflammatory response via caspase-3 and NF- κ B signaling pathway. *Biomed. Pharmacother.* 82, 216–225.
- Lu, Y., Jiang, F., Jiang, H., Wu, K., Zheng, X., Cai, Y., Katakowski, M., Chopp, M., To, S.-S.T., 2010. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 641, 102–107.
- Luximon-Ramma, A., Bahorun, T., Soobrattee, M.A., Aruoma, O.I., 2002. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J. Agric. Food Chem.* 50, 5042–5047.
- Luyen, B.T.T., Tai, B.H., Thao, N.P., Eun, K.J., Cha, J.Y., Xin, M.J., Lee, Y.M., Kim, Y.H., 2014a. Anti-inflammatory components of *Euphorbia humifusa* Willd. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 24, 1895–1900.
- Luyen, B.T.T., Tai, B.H., Thao, N.P., Lee, S.H., Jang, H.D., Lee, Y.M., Kim, Y.H., 2014b. Evaluation of the anti-osteoporosis and antioxidant activities of phenolic compounds from *Euphorbia maculata*. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 57, 573–579.
- Mabry, T., Markham, K., Thomas, M., 1970. The systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Maksimović, Z., Petrović, S., Pavlović, M., Kovačević, N., Kukić, J., 2007. Antioxidant activity of *Filipendula hexapetala* flowers. *Fitoterapia* 78, 265–267.
- Mărgăoan, R., Zăhan, M., Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Erler, S., Bobiș, O., 2016. Antiproliferative activity and apoptotic effects of *Filipendula ulmaria* pollen against C26 mice colon tumour cells. *J. Apic. Sci.* 60, 135–144.
- Marzouk, M.S., Moharram, F.A., Haggag, E.G., Ibrahim, M.T., Badary, O.A., 2006. Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytother. Res.* 20, 200–205.
- Matić, S., Katanić, J., Stanić, S., Mladenović, M., Stanković, N., Mihailović, V., Boroja, T., 2015. *In vitro* and *in vivo* assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of the *Filipendula hexapetala* and *Filipendula ulmaria* methanol extracts. *J. Ethnopharmacol.* 174, 287–292.

- Menković, N., Šavikin, K., Tasić, S., Zdunić, G., Stešević, D., Milosavljević, S., Vincek, D., 2011. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J. Ethnopharmacol.* 133, 97–107.
- Miliauskas, G., Beek, T.A. van, Venskutonis, P.R., Linssen, J.P.H., Waard, P. de, 2004. Antioxidative activity of *Geranium macrorrhizum*. *Eur. Food Res. Technol.* 218, 253–261.
- Miyajima, Y., Kikuzaki, H., Hisamoto, M., Nakatani, N., 2004. Antioxidative polyphenols from berries of *Pimenta dioica*. *BioFactors* 22, 301–303.
- Miyamoto, K., Kishi, N., Koshiura, R., Yoshida, T., Hatano, T., Okuda, T., 1987. Relationship between the structures and the antitumor activities of tannins. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 35, 814–822.
- Moon, J.-H., Watanabe, N., Ijima, Y., Yagi, A., Sakata, K., 1996. *Cis*- and *trans*-linalool 3, 7-oxides and methyl salicylate glycosides and (*Z*)-3-hexenyl β -D-glucopyranoside as aroma precursors from tea leaves for oolong tea. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60, 1815–1819.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse, U: Inflammation protocols, *Methods in molecular biology*. Humana Press, pp. 115–121.
- Nazemiyeh, H., Kazemi, E.M., Zare, K., Jodari, M., Nahar, L., Sarker, S.D., 2010. Free radical scavengers from the aerial parts of *Euphorbia petiolata*. *J. Nat. Med.* 64, 187–190.
- Nitta, Y., Kikuzaki, H., Azuma, T., Ye, Y., Sakaue, M., Higuchi, Y., Komori, H., Ueno, H., 2013. Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituents on recombinant human histidine decarboxylase. *Food Chem.* 138, 1551–1556.
- Nitta, Y., Kikuzaki, H., Ueno, H., 2009. Inhibitory activity of *Pimenta dioica* extracts and constituents on recombinant human histidine decarboxylase. *Food Chem.* 113, 445–449.
- Ochir, S., Yuki, T., Kanazawa, T., Nishizawa, M., Yamagishi, T., 2013. Two galloylated flavonoids as antioxidants in *Rosa gallica* petals. *Chem. Nat. Compd.* 49, 940–942.

- Ohno, M., Abe, T., 1991. Rapid colorimetric assay for the quantification of leukemia inhibitory factor (LIF) and interleukin-6 (IL-6). *J. Immunol. Methods* 145, 199–203.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., 2016. Meadowsweet teas as new functional beverages: Comparative analysis of nutrients, phytochemicals and biological effects of four *Filipendula* species. *Molecules* 22, 16.
- Olennikov, D.N., Kruglova, M.Y., 2013. A new quercetin glycoside and other phenolic compounds from the genus *Filipendula*. *Chem. Nat. Compd.* 49, 610–616.
- Pakulski, G., Budzianowski, J., 1996. Quercetin and kaempferol glycosides of *Dionaea muscipula* from *in vitro* cultures. *Planta Med.* 62, 95–96.
- Pang, J.-H.S., Yen, J.-H., Wu, H.-T., Huang, S.-T., 2017. Gallic acid inhibited matrix invasion and AP-1/ETS-1-Mediated MMP-1 transcription in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1354.
- Papp, I., Simándi, B., Blazics, B., Alberti, Á., Héthelyi, É., Szőke, É., Kéry, Á., 2008. Monitoring volatile and non-volatile salicylates in *Filipendula ulmaria* by different chromatographic techniques. *Chromatographia* 68, 125–129.
- Park, S.-H., Kim, H.J., Yim, S.-H., Kim, A.-R., Tyagi, N., Shen, H., Kim, K.K., Shin, B.A., Jung, D.-W., Williams, D.R., 2014. Delineation of the role of glycosylation in the cytotoxic properties of quercetin using novel assays in living vertebrates. *J. Nat. Prod.* 77, 2389–2396.
- Park, S.-H., Oh, S.R., Jung, K.Y., Lee, I.S., Ahn, K.S., Kim, J.H., Kim, Y.S., Lee, J.J., Lee, H.-K., 1999. Acylated flavonol glycosides with anti-complement activity from *Persicaria lapathifolia*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 47, 1484–1486.
- Pavlović, I., 2015. Doktorska disertacija: Farmakognoksijsko ispitivanje podzemnih organa srpske velestike, *Ferula heuffelii* Griseb. ex Heuffel (Apiaceae). Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Pavlović, M., 2008. Doktorska disertacija: Proučavanje sastojaka *Anthemis triumfetti* (Asteraceae) i poređenje sa drugim vrstama podroda Cota. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Pavlović, M., Kovačević, N., Couladis, M., Tzakou, O., 2006. Phenolic constituents of *Anthemis triumfetti* (L.) DC. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 449–452.

- Pavlović, M., Petrović, S., Ristić, M., Maksimović, Z., Kovačević, N., 2007. Essential oil of *Filipendula hexapetala*. Chem. Nat. Compd. 43, 228–229.
- Pemp, E., Reznicek, G., Krenn, L., 2007. Fast quantification of flavonoids in *Filipendulae ulmariae flos* by HPLC/ESI-MS using a nonporous stationary phase. J. Anal. Chem. 62, 669–673.
- Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. Int. J. Biomed. Sci. IJBS 4, 89–96.
- Piwowarski, J.P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K., 2014. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. J. Ethnopharmacol. 155, 801–809.
- Piwowarski, J.P., Kiss, A.K., Kozłowska-Wojciechowska, M., 2011. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. J. Ethnopharmacol. 137, 937–941.
- Popović, V., 2013. Doktorska disertacija: Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Laserpitium* L. (Apiaceae). Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E., Cavalca, V., 2014. Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: A neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. J. Chromatogr. B, Analysis of Eicosanoids, Amino Acids, Organic Acids and microRNA 964, 26–40.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. J. Agric. Food Chem. 53, 4290–4302.
- Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N., 2011. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. Fitoterapia 82, 513–523.
- Pukalskienė, M., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., 2015. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. J. Funct. Foods 15, 233–242.

- Radulović, N., Mišić, M., Aleksić, J., Đoković, D., Palić, R., Stojanović, G., 2007. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. *Fitoterapia* 78, 565–570.
- Ramos, F.A., Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T., Takeuchi, M., 2006. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 3551–3557.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2012. Rang & Dale's pharmacology, 7th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., Ahmad, N., 2008. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J.* 22, 659–661.
- Rebuelta, M., Vivas, J.M., Diaz, M.P., San Roman, L., 1988. Étude de l'effet diurétique de différentes préparations des sommités fleuries du *Filipendula vulgaris* Moench. *Plantes Médicinales Phythér.* 22, 104–112.
- Robbins, R.J., 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2866–2887.
- Rogério, A.P., Fontanari, C., Melo, M.C.C., Ambrosio, S.R., de Souza, G.E.P., Pereira, P.S., França, S.C., da Costa, F.B., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H., 2006. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1265–1273.
- Scheer, T., Wichtl, M., 1987. On the occurrence of kaempferol-4'-*O*-beta-D-glucopyranoside in *Filipendula ulmaria* and *Allium cepa*. *Planta Med.* 53, 573–574.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., Brash, A.R., 2007. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* 14, 473–488.
- Schneider, I., Bucar, F., 2005. Lipoxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytother. Res.* 19, 263–272.
- Shen, Y., Yang, H., Xia, G., Wang, J., Cai, B., Jia, X., 2013. Isolation of gallic acid and methyl gallate from folium *Toonea sinensis* and validated method for their quantitation using LC-based technologies. *Acta Chromatogr.* 25, 687–701.

- Shilova, I.V., Zhavoronok, T.V., Suslov, N.I., Krasnov, E.A., Novozheeva, T.P., Veremeev, A.V., Nagaev, M.G., Petina, G.V., 2006. Hepatoprotective and antioxidant activity of meadowsweet extract during experimental toxic hepatitis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 142, 216–218.
- Shimoda, K., Kobayashi, T., Akagi, M., Hamada, Hatsuyuki, Hamada, Hiroki, 2008. Synthesis of oligosaccharides of genistein and quercetin as potential anti-inflammatory agents. *Chem. Lett.* 37, 876–877.
- Simin, N., Orcic, D., Cetojevic-Simin, D., Mimica-Dukic, N., Anackov, G., Beara, I., Mitic-Culafic, D., Bozin, B., 2013. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT - Food Sci. Technol.* 54, 139–146.
- Slimestad, R., Andersen, Ø.M., Francis, G.W., Marston, A., Hostettmann, K., 1995. Syringetin 3-*O*-(6"-acetyl)- β -glucopyranoside and other flavonols from needles of norway spruce, *Picea abies*. *Phytochemistry* 40, 1537–1542.
- Smolarz, H.D., Budzianowski, J., Bogucka-Kocka, A., Kocki, J., Mendyk, E., 2008. Flavonoid glucuronides with anti-leukaemic activity from *Polygonum amphibium* L. *Phytochem. Anal.* 19, 506–513.
- Smyth, E., Grosser, T., FitzGerald, G., 2011. Lipid-derived autacoids: Eicosanoids and platelet-activating factor, U: Brunton, L., Chabner, B., Knollmann, B. (Eds.), Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp. 937–958.
- Soberón, J.R., Sgariglia, M.A., Sampietro, D.A., Quiroga, E.N., Vattuone, M.A., 2010. Free radical scavenging activities and inhibition of inflammatory enzymes of phenolics isolated from *Tripodanthus acutifolius*. *J. Ethnopharmacol.* 130, 329–333.
- Şöhretoğlu, D., Sakar, M.K., Sabuncuoğlu, S.A., Özgüneş, H., Sterner, O., 2009. Antioxidant galloylated flavonoids from *Geranium tuberosum* L. subsp. *tuberosum*. *Turk. J. Chem.* 33, 685–692.
- Spiridonov, N.A., Konovalov, D.A., Arkhipov, V.V., 2005. Cytotoxicity of some Russian ethnomedicinal plants and plant compounds. *Phyther. Res.* 19, 428–432.

- Sroka, Z., Cisowski, W., 2005. The anti-ROS activity of various plant extracts. *Adv. Clin. Exp. Med.* 14, 423–433.
- Stepanović-Petrović, R.M., Micov, A.M., Tomić, M.A., Ugrešić, N.D., 2012. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth. Analg.* 115, 1457.
- Stryamets, N., Elbakidze, M., Ceuterick, M., Angelstam, P., Axelsson, R., 2015. From economic survival to recreation: contemporary uses of wild food and medicine in rural Sweden, Ukraine and NW Russia. *J. Ethnobiol. Ethnomedicine* 11, 53.
- Suh, H.J., Lee, J.M., Cho, J.S., Kim, Y.S., Chung, S.H., 1999. Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Res. Int.* 32, 659–664.
- Szöllősi R., Szöllősi Istvánné Varga I., 2002. Total antioxidant power in some species of Labiatae (adaptation of FRAP method). *Acta Biol. Szeged.* 46, 125–127.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J., 2011. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 133, 1051–1076.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J., 2010. Ethnobotanical study on medicinal use of wild and cultivated plants in middle, south and west Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 131, 33–55.
- Tallarida, R.J., Murray, R.B., 1986. *Manual of pharmacologic calculations with computer programs.* Springer Verlag, New York Berlin Heidelberg London Paris Tokyo.
- Tanimura, S., Kadomoto, R., Tanaka, T., Zhang, Y.-J., Kouno, I., Kohno, M., 2005. Suppression of tumor cell invasiveness by hydrolyzable tannins (plant polyphenols) via the inhibition of matrix metalloproteinase-2/-9 activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 330, 1306–1313.
- The Plant List. Version 1.1, 2013.
<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=filipendula>
Datum pristupa: 28.3.2018. god.
- Thieme, H., 1965. Isolation and structural clarification of spiraein, a phenol glycoside from *Filipendula ulmaria*. *Pharmazie* 20, 113–114.

- Ting, E., Guerrero, A.T.G., Cunha, T.M., Verri, W.A., Taylor, S.M., Woodruff, T.M., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2008. Role of complement C5a in mechanical inflammatory hypernociception: potential use of C5a receptor antagonists to control inflammatory pain. *Br. J. Pharmacol.* 153, 1043–1053.
- Tita, I., Mogosanu, G.D., Tita, M.G., 2009. Ethnobotanical inventory of medicinal plants from the South-West of Romania. *Farmacia* 57, 141–156.
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Tonello, R., Hoffmeister, C., Klafke, J.Z., Rosa, F., Pinheiro, K.V., Pinheiro, F.V., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2014. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 387, 679–689.
- Tucakov, J., 1984. Lečenje biljem. Rad, Beograd.
- Tunón, H., Olavsdotter, C., Bohlin, L., 1995. Evaluation of anti-inflammatory activity of some Swedish medicinal plants. Inhibition of prostaglandin biosynthesis and PAF-induced exocytosis. *J. Ethnopharmacol.* 48, 61–76.
- Vanisree, M., Alexander-Lindo, R.L., DeWitt, D.L., Nair, M.G., 2008. Functional food components of *Antigonon leptopus* tea. *Food Chem.* 106, 487–492.
- Vareed, S.K., Schutzki, R.E., Nair, M.G., 2007. Lipid peroxidation, cyclooxygenase enzyme and tumor cell proliferation inhibitory compounds in *Cornus kousa* fruits. *Phytomedicine* 14, 706–709.
- Verri, W.A., Cunha, T.M., Parada, C.A., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacol. Ther.* 112, 116–138.
- Vivancos, G.G., Verri Jr., W.A., Cunha, T.M., Schivo, I.R.S., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 391–399.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B., 2013. Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine—An unexplored lore *in vitro* anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J. Ethnopharmacol.* 149, 750–771.

- Vongsak, B., Gritsanapan, W., Wongkrajang, Y., Jantan, I., 2013. *In vitro* inhibitory effects of *Moringa oleifera* leaf extract and its major components on chemiluminescence and chemotactic activity of phagocytes. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1559–1561.
- Vračarić, B., Bakić, J., Čolić, D., Lintner, V., Micković, M., Rajšić, R., Stevanović, D., Uvalin, M., 1990. *Ishrana u prirodi*, 3. izdanje. Vojnoizdavački i novinski centar, Beograd.
- Wang, C., Zhang, T.-T., Du, G.-H., Zhang, D.-M., 2011. Synthesis and anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of gaultherin and its analogs. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 13, 817–825.
- Wang, K.-J., Zhang, Y.-J., Yang, C.-R., 2005. Antioxidant phenolic compounds from rhizomes of *Polygonum paleaceum*. *J. Ethnopharmacol.* 96, 483–487.
- Wang, Yu, Chen, P., Tang, C., Wang, Yao, Li, Y., Zhang, H., 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J. Ethnopharmacol.* 151, 944–950.
- Wang, Z.-Q., Porreca, F., Cuzzocrea, S., Galen, K., Lightfoot, R., Masini, E., Muscoli, C., Mollace, V., Ndengele, M., Ischiropoulos, H., Salvemini, D., 2004. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 869–878.
- Wen, L., Lin, Y., Lv, R., Yan, H., Yu, J., Zhao, H., Wang, X., Wang, D., 2017. An efficient method for the preparative isolation and purification of flavonoids from leaves of *Crataegus pinnatifida* by HSCCC and Pre-HPLC. *Molecules* 22, 767.
- Wilkins, C.K., Bohm, B.A., 1976. Ellagitannins from *Tellima grandiflora*. *Phytochemistry* 15, 211–214.
- Williamson, E.M., 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8, 401–409.
- Wu, Y.-B., Zheng, L.-J., Wu, J.-G., Chen, T.-Q., Yi, J., Wu, J.-Z., 2012. Antioxidant activities of extract and fractions from *Receptaculum nelumbinis* and related flavonol glycosides. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 7163–7173.
- Yan, X.M., Joo, M.J., Lim, J.C., Whang, W.K., Sim, S.S., Im, C., Kim, H.R., Lee, S.Y., Kim, I.K., Sohn, U.D., 2011. The effect of quercetin-3-β-D-glucuronopyranoside

- on indomethacin-induced gastric damage in rats via induction of mucus secretion and down-regulation of ICAM-1 expression. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1527.
- Yazaki, K., Shida, S., Okuda, T., 1989. Galloylhomobarbutin and related polyphenols from *Pyrola incarnata*. *Phytochemistry* 28, 607–609.
- Yesilada, E., Gürbüz, İ., Toker, G., 2014. Anti-ulcerogenic activity and isolation of the active principles from *Sambucus ebulus* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 153, 478–483.
- Yim S.-H., Lee Y.J., Park K.D., Lee I.-S., Shin B.A., Jung D.-W., Williams D.R., Kim H.J., 2015. Phenolic constituents from the flowers of *Hamamelis japonica* Sieb. et Zucc. *Nat. Prod. Sci.* 21, 162–169.
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* 56, 213–222.
- Yoon, C.-H., Chung, S.-J., Lee, S.-W., Park, Y.-B., Lee, S.-K., Park, M.-C., 2013. Gallic acid, a natural polyphenolic acid, induces apoptosis and inhibits proinflammatory gene expressions in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Joint Bone Spine* 80, 274–279.
- Yoshimura, M., Amakura, Y., Tokuhara, M., Yoshida, T., 2008. Polyphenolic compounds isolated from the leaves of *Myrtus communis*. *J. Nat. Med.* 62, 366–368.
- Young, I.S., Woodside, J.V., 2001. Antioxidants in health and disease. *J. Clin. Pathol.* 54, 176–186.
- Zdunić, G., 2012. Doktorska disertacija: Usporedna hemijska analiza i farmakološki profil ekstrakata odabranih vrsta roda *Hypericum* L. Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Zhang, B., He, X.-L., Ding, Y., Du, G.-H., 2006. Gaultherin, a natural salicylate derivative from *Gaultheria yunnanensis*: Towards a better non-steroidal anti-inflammatory drug. *Eur. J. Pharmacol.* 530, 166–171.
- Zhang, D., Liu, R., Sun, L., Huang, C., Wang, C., Zhang, D.-M., Zhang, T.-T., Du, G.-H., 2011. Anti-inflammatory activity of methyl salicylate glycosides isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder. *Molecules* 16, 3875–3884.

- Zhang, Y., DeWitt, D.L., Murugesan, S., Nair, M.G., 2004. Novel lipid-peroxidation- and cyclooxygenase-inhibitory tannins from *Picrorhiza kurroa* seeds. *Chem. Biodivers.* 1, 426–441.
- Zhang, Y., Dong, H., Zhang, J., Zhang, L., 2017. Inhibitory effect of hyperoside isolated from *Zanthoxylum bungeanum* leaves on SW620 human colorectal cancer cells via induction of the p53 signaling pathway and apoptosis. *Mol. Med. Rep.* 16, 1125–1132.
- Zhang, Y.-J., Gan, R.-Y., Li, S., Zhou, Y., Li, A.-N., Xu, D.-P., Li, H.-B., 2015. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules* 20, 21138–21156.
- Zhao, B., Hu, M., 2013. Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. *Oncol. Lett.* 6, 1749–1755.
- Zheleva-Dimitrova, D., Nedialkov, P., Girreser, U., Kitanov, G., 2012. Benzophenones and flavonoids from *Hypericum maculatum* and their antioxidant activities. *Nat. Prod. Res.* 26, 1576–1583.

**OBJAVLJENI I SAOPŠTENI REZULTATI KOJI ČINE DEO
DOKTORSKE DISERTACIJE**

Radovi publikovani u međunarodnim časopisima

Samardžić, S., Arsenijević, J., Božić, D., Milenković, M., Tešević, V., Maksimović, Z., 2018. Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench. J. Ethnopharmacol. 213, 132–137.

Samardžić, S., Tomić, M., Pecikoza, U., Stepanović-Petrović, R., Maksimović, Z., 2016. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation. J. Ethnopharmacol. 193, 652–656.

BIOGRAFIJA

Stevan S. Samardžić rođen je 20. avgusta 1986. god. u Jagodini. Gimnaziju „Svetozar Marković” u Jagodini završio je kao nosilac diplome „Vuk Karadžić”. Univerzitet u Beogradu – Farmaceutski fakultet upisao je školske 2005/06. god. Tokom studija bio je stipendista Ministarstva prosvete i sporta Republike Srbije (2005–2010). Diplomirao je septembra 2011. god. na Katedri za farmakognoziju sa ocenom 10 na diplomskom ispitu, i prosečnom ocenom tokom studiranja 9,58.

Doktorske akademske studije iz Farmakognozije na Univerzitetu u Beogradu – Farmaceutskom fakultetu upisao je školske 2011/12. god. Od januara 2012. godine zaposlen je na Katedri za farmakognoziju Univerziteta u Beogradu – Farmaceutskog fakulteta kao istraživač-pripravnik na Projektu br. 173021: „Ispitivanje lekovitog potencijala biljaka: morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija”. Autor je i koautor tri rada u časopisima međunarodnog značaja i dva rada u časopisu nacionalnog značaja.

Govori engleski jezik.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Стеван Самарџић

број уписа 15/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„ Упоредно хемијско и фармаколошко испитивање лиофилизованих инфуза
цвасти представника рода *Filipendula* Miller у Србији ”

- 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, 8.6.2018.

Стеван Самарџић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Стеван Самарџић

Број уписа 15/11

Студијски програм Докторске академске студије из фармакогнозије

„ Упоредно хемијско и фармаколошко испитивање
Наслов рада лиофилизованих инфуза цвасти представника рода *Filipendula Miller* у Србији ”

Ментор Проф. др Зоран Максимовић

Потписани Стеван Самарџић

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, 8.6.2018.

Стеван Самарџић

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„ Упоредно хемијско и фармаколошко испитивање лиофилизованих инфуза
цвасти представника рода *Filipendula* Miller у Србији ”

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, _____ 8.6.2018.

Стеван Самаршић

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.



Antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench

Stevan Samardžić^{a,*}, Jelena Arsenijević^a, Dragana Božić^b, Marina Milenković^b, Vele Tešević^c, Zoran Maksimović^a

^a Department of Pharmacognosy, University of Belgrade — Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

^b Department of Microbiology and Immunology, University of Belgrade — Faculty of Pharmacy, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

^c Faculty of Chemistry, University of Belgrade, Studentski trg 12–16, 11158 Belgrade, Serbia



ARTICLE INFO

Keywords:

Filipendula
Meadowsweet
Dropwort
Antioxidant
Anti-inflammatory
Gastroprotective

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) and dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench) are herbaceous perennials employed in folk medicine for their antirheumatic, antipyretic and anti-ulcer properties.

Aim of the study: To assess ethnomedicinal claims through investigation of antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotective effects of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* lyophilized flower infusions (LFIs) as well as the *F. vulgaris* isolated flavonoids spiraeoside, kaempferol 4'-*O*-glucoside, astragalins 2'-*O*-gallate, mixture of hyperoside 2'-*O*-gallate and isoquercitrin 2'-*O*-gallate, and a tannin tellimagrandin II.

Materials and methods: Free radical scavenging activity of the tested samples was determined by examining their ability to neutralize DPPH and OH radicals *in vitro*, whereas reducing properties were assessed in Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay. Anti-inflammatory activity was studied *ex vivo* in human platelets by monitoring the effect on eicosanoid biosynthesis. Gastroprotective action was estimated in animal model of acute gastric injury induced by ethanol.

Results: LFIs and spiraeoside exerted activities comparable to those of positive control in DPPH-radical scavenging and FRAP antioxidant assays, whereas notable hydroxyl radical scavenging ability was demonstrated only for spiraeoside (IC₅₀ = 5.1 μg/mL). Among tested samples, astragalins 2'-*O*-gallate (IC₅₀ = 141.1 μg/mL) and spiraeoside (IC₅₀ = 4.69 μg/mL) the most markedly inhibited production of pro-inflammatory prostaglandin E₂ and 12(S)-hydroxy-(5Z,8Z,10E,14Z)-eicosatetraenoic acid in human platelets, respectively. Examination of LFIs (100–300 mg/kg, p.o.) gastroprotective action in rats revealed their capacity to preserve mucosal integrity. In addition, spiraeoside (50 mg/kg, p.o.) and tellimagrandin II (40 mg/kg, p.o.) showed ulcer preventive ability.

Conclusion: Current study supports documented traditional use of investigated herbs and indicates that flavonoid and tannin components are partially responsible for the demonstrated pharmacological activities.

1. Introduction

Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., syn. *Spiraea ulmaria* L.; Rosaceae) and dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench, syn. *Filipendula hexapetala* Gilib.; Rosaceae) are herbaceous perennial plants which can be found in Europe (Ball, 1968). Their flowers are employed in traditional medicine with reputed beneficial effects in various ailments, such as rheumatism, gout, common cold, fever, infections and peptic ulcer disease (HMPC, 2011a; Jarić et al., 2007; Šarić-Kundalić et al., 2011; Vogl et al., 2013). European Medicines Agency approved use of meadowsweet flowers, *Filipendulae ulmariae flos*, for preparation of the traditional herbal medicinal products (HMPC, 2011b).

Previous animal studies revealed that *Filipendula* species counteracted inflammatory processes and reduced pain (Katanić et al., 2016; Samardžić et al., 2016). A limited number of mechanistic *in vitro* experiments indicated that *Filipendula* extracts inhibited the classical pathway of the complement system (ESCOP, 2003), production of pro-inflammatory cytokines (Drummond et al., 2013) and expression of adhesion molecules (Vogl et al., 2013). Gastroprotection was to some extent explored earlier in meadowsweet (ESCOP, 2003), whereas respective data concerning dropwort are not available. However, scientific basis for folkloric applications of *Filipendula* species in the treatment of inflammatory conditions and peptic ulcer is not firmly established and additional investigations could considerably contribute

* Corresponding author.

E-mail address: stevans@pharmacy.bg.ac.rs (S. Samardžić).

to the estimation of reported use in traditional medicine.

Phytochemical analysis showed that *Filipendula* species contain significant amount of polyphenolics, among which flavonol glycosides and ellagitannins are the most prominent (Olennikov and Kruglova, 2013). Despite the quite thorough characterization of the corresponding herbal drugs, the active constituents are not sufficiently defined and their role in the medicinal effects of meadowsweet and dropwort flowers is still not fully known.

The current study was designed with the aim to provide scientific evidence that supports ethnomedicinal claims through the investigation of the relevant pharmacological properties of two *Filipendula* species and their active constituents. Anti-inflammatory activity of *F. vulgaris* isolated compounds and *F. vulgaris* and *F. ulmaria* lyophilized flower infusions (LFIs) was examined *ex vivo* in human platelets by monitoring the effects on eicosanoid production. Gastroprotective activity was tested using the ethanol-induced acute mucosal injury in rats and antioxidant activity was investigated because free radicals scavenging and reducing properties may contribute to the tested biological effects.

2. Materials and methods

2.1. General

All solvents used were of analytical grade, except those employed for high pressure liquid chromatography which were of HPLC or LC-MS quality. Reagents and substances required for chemical analysis of LFIs and pharmacological activities investigation were purchased from Sigma-Aldrich (Germany and USA), Carl Roth (Germany), Acros (Belgium), Fluka (Switzerland) and Zdravlje Actavis (Serbia). Spiraeoside, used for HPLC analysis, was isolated from *Anthemis trifurcata* (L.) DC. (Pavlović et al., 2006). Platelets concentrates were obtained from the Institute for Blood Transfusion of Vojvodina (Novi Sad, Serbia) immediately after expiry date for human use.

Five flavonoids and one tannin were isolated from the *F. vulgaris* flowers by column chromatography (using silica gel and Sephadex LH-20 as adsorbents), C18 vacuum liquid chromatography, preparative TLC on cellulose-coated plates and RP-C18 semi-preparative HPLC. In order to elucidate their structures, UV, MS and NMR (^1H and ^{13}C) spectra were recorded. Detailed description of employed procedures and instruments is given in the [Supplementary material](#).

2.2. Plant material and preparation of lyophilized flower infusions

Dropwort flowers were collected in May 2013 and 2014 near Loćika village (Central Serbia), whereas meadowsweet flowers were harvested at Mt. Kopaonik (Central Serbia) in July 2016. Plant material was identified by Professor Branislava Lakušić (Department of Botany, University of Belgrade — Faculty of Pharmacy) and voucher specimens (*F. vulgaris* voucher number: 3713HFF; *F. ulmaria* voucher number: 3872HFF) were deposited in the Herbarium of the Department of Botany, University of Belgrade — Faculty of Pharmacy.

Lyophilized flower infusions (LFIs) were obtained in accordance with traditional method of preparation. Namely, boiling water was poured over comminuted dried plant material (drug-solvent 1:20), the mixture was allowed to steep for 30 min with occasional stirring and filtered. The resulting extracts were freeze-dried. LFIs were obtained as fine powders with 31.22% and 23.80% yield, for *F. vulgaris* and *F. ulmaria*, respectively.

2.3. HPLC analysis of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* lyophilized flower infusions

Analyses of LFIs were performed on an Agilent 1100 Liquid chromatograph coupled to a DAD detector and equipped with Zorbax Eclipse XDB-C18 analytical column (4.6 × 250 mm, 5 μm, Agilent). The aqueous solutions of LFIs were filtered through a 0.45 μm membrane

filter and manually injected (20 μL). Separation was achieved at 25 °C by using a mixture consisting of solvent A (H₃PO₄ in H₂O, pH 2.75) and solvent B (solvent A: acetonitrile, 10: 90 v/v). Gradient composition of the binary mobile phase is presented in [Table 1S \(Supplementary material\)](#). LFIs constituents were identified by matching their retention times and UV spectra with the data of standards obtained under the same chromatographic conditions. Contents of detected substances were determined from calibration curves of gallic acid ($y = 202385x - 293.76$, $R^2 = 0.9992$, concentration range 0.008–0.131 mg/mL), salicylic acid ($y = 318761x + 84.572$, $R^2 = 0.9999$, 0.002–0.066 mg/mL), hyperoside ($y = 23450x - 20.696$, $R^2 = 0.9993$, 0.006–0.090 mg/mL), astragalgin ($y = 39970x$, $R^2 = 0.9999$, 0.009–0.140 mg/mL), isoquercitrin ($y = 19482x - 10.686$, $R^2 = 1$, 0.01–0.66 mg/mL), spiraeoside ($y = 13213x + 45.692$, $R^2 = 0.9979$, 0.015–0.240 mg/mL) and ellagic acid ($y = 14063x + 62.467$, $R^2 = 0.999$, 0.008–0.130 mg/mL). For the purpose of quantification, detection was set at 210 nm for gallic acid and salicylic acid and at 350 nm for other compounds.

2.4. Antioxidant assays

In vitro antioxidant activity of spiraeoside and LFIs was determined using spectrophotometric methods as previously described (Kukić et al., 2006). Briefly, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and 2-deoxyribose assays were used to estimate free radical scavenging capacity of the tested samples. Results are expressed as IC₅₀, i.e. concentration of extract or compound causing 50% of DPPH or hydroxyl radical neutralization, respectively, and they were determined by regression analysis. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assay, which is based on the ability of a sample to convert Fe³⁺–2,4,6-tris-(2-pyridyl)-s-triazine (Fe³⁺-TPTZ) to Fe²⁺-TPTZ complex, was applied to examine reducing properties. Results are expressed as FRAP value, i.e. mmol/g Fe²⁺ in the tested extract or compound.

2.5. Inhibition of eicosanoid biosynthesis

Anti-inflammatory activity of isolated flavonoids and LFIs was studied *ex vivo* in human platelets by monitoring the inhibition of synthesis of pro-inflammatory mediators prostaglandin E₂ (PGE₂), thromboxane B₂ (TXB₂) and 12(S)-hydroxy-(5Z,8Z,10E,14Z)-eicosatetraenoic acid (12-HETE) (Lesjak et al., 2013). The formation of mediators was induced by addition of calcium ionophore A23187 and their concentrations were measured by LC-MS/MS. Inhibition of mediator production, I (%), was calculated according to the equation: $I(\%) = 100 \times (R_0 - R) / R_0$. Response ratios (metabolite peak area/internal standard peak area) in the control reaction and tested samples were designated R₀ and R, respectively. The results were expressed as IC₅₀ values (obtained in Origin software, version 8.0), i.e. concentration of extract or compound leading to 50% inhibition of mediator synthesis.

2.6. Gastroprotective activity

Investigation was conducted on male Wistar rats (6–8 weeks old; average weight 220 g) obtained from Military Academy Breeding Farm, Belgrade, Serbia. After delivery to our laboratory, animals were allowed to acclimatize for two weeks. Twenty hours before the start of the experiment, rats were fasted; meanwhile they had free access to tap water. Gastric lesions were induced by oral gavage of absolute ethanol (5 mL/kg, p.o.). Tested *F. ulmaria* and *F. vulgaris* LFIs (100–300 mg/kg, p.o.) and isolated compounds spiraeoside (50 mg/kg, p.o.) and tellimagrandin II (40 mg/kg, p.o.) were administered an hour before inducing the lesions. Animals from positive and negative control groups received ranitidine (20 mg/kg, p.o.) or vehicle (water, 1 mL/kg, p.o.), respectively. One hour after the treatment with absolute ethanol, animals were euthanized in atmosphere with high carbon dioxide content. Next, their stomachs were removed, opened along greater curvature and rinsed with saline solution. Lesions were examined under a

magnifying glass (3×). Damage to mucosa was expressed as gastric damage score by using modified scoring system of Adami et al.: 0, no lesions; 0.5, slight hyperaemia or ≤ 5 petechiae; 1, ≤ 5 erosions ≤ 5 mm length; 1.5, ≤ 5 erosions ≤ 5 mm length and many petechiae; 2, 6–10 erosions ≤ 5 mm length; 2.5, 1–5 erosions > 5 mm length; 3, > 5–10 erosions > 5 mm length; 3.5, > 10 erosions > 5 mm length; 4, 1–3 erosions ≤ 5 mm length and 0.5–1 mm width; 4.5, 4–5 erosions ≤ 5 mm length and 0.5–1 mm width; 5, 1–3 erosions > 5 mm length and 0.5–1 mm width; 6, 4–5 grade 5 lesions; 7, ≥ 6 grade 5 lesions; 8, complete lesion of the mucosa with hemorrhage. Presence of statistically significant differences (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$) between test and control animal groups was estimated using Mann-Whitney *U*-test in SPSS software version 20.0 (Đorđević et al., 2012). Experiment was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Belgrade — Faculty of Pharmacy (the bioethical allowance number: 323-07-1193/2014-05). All procedures were in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of Europe.

3. Results and discussion

3.1. Structure elucidation of the *F. vulgaris* flowers isolated compounds

Processes of isolation, purification and structure elucidation led to the identification of five flavonol glycosides (1–5) and one ellagitannin (6) of the *F. vulgaris* flowers. UV and NMR (¹H, ¹³C) spectra of the isolated compounds were in agreement with previous reports (Supplementary material) and MS data corresponded to the determined structures. Based on literature, compound 1 was identified as kaempferol 4'-*O*-β-D-glucoside; 2 as spiraeoside (quercetin 4'-*O*-β-D-glucoside); 3 as kaempferol 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-glucoside (astragalol 2''-*O*-gallate); mixture of 4 and 5 was identified as mixture of quercetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-glucoside (isoquercitrin 2''-*O*-gallate) and quercetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-galactoside (hyperoside 2''-*O*-gallate) (2:1 w/w, based on HPLC-UV chromatograms and NMR spectra integration), respectively; and finally, 6 was identified as tellimagrandin II (1,2,3-trigalloyl-4,6-hexahydroxydiphenyl-β-D-glucopyranose). Presence of these constituents, with the exception of kaempferol 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-glucoside and quercetin 3-*O*-(2''-*O*-galloyl)-β-D-glucoside, was demonstrated earlier in *F. vulgaris* (Olennikov and Kruglova, 2013; Pukalskienė et al., 2015). A recent mass spectral analysis of dropwort extract showed presence of kaempferol *O*-galloyl-hexoside, consistent with our results (Pukalskienė et al., 2015).

Compounds 1, 2 and 3 and mixture 4 + 5 were tested for their anti-inflammatory activity, whereas the gastroprotective effects were investigated for the compounds 2 and 6. The antioxidant activity of compound 2 was also assayed.

3.2. Composition of lyophilized flower infusions determined by HPLC

HPLC analysis of LFIs revealed the presence of flavonol glycosides, phenolic acids and tannin (Table 1). Both LFIs contained glycosides of quercetin and kaempferol, but with certain differences in the composition. The dominant flavonoid constituent in both samples was spiraeoside (55.67 ± 1.82 and 46.17 ± 1.67 mg/g in *F. vulgaris* and *F. ulmaria* LFIs, respectively). In addition, the presence of isoquercitrin, hyperoside, astragalol, isoquercitrin 2''-*O*-gallate, hyperoside 2''-*O*-gallate, astragalol 2''-*O*-gallate and kaempferol 4'-*O*-β-D-glucoside was unambiguously confirmed in *F. vulgaris* LFI. Beside the dominant spiraeoside, meadowsweet LFI contained miquelianin (quercetin 3-*O*-β-D-glucuronide), kaempferol 4'-*O*-β-D-glucoside and a kaempferol glycoside. However, in contrast to dropwort LFI, hyperoside, isoquercitrin, astragalol and their respective 2''-*O*-galloylated derivatives were not detected in the meadowsweet LFI.

Regarding phenolic acids, both LFIs contained gallic acid as the most abundant, 10.22 ± 0.28 mg/g of dropwort LFI, 11.15 ± 0.13 mg/g

Table 1
Composition of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* lyophilized flower infusions (LFIs).

Compound	Content (mg/g)	
	<i>F. ulmaria</i> LFI	<i>F. vulgaris</i> LFI
Flavonol glycosides		
Spiraeoside	46.17 ± 1.67	55.67 ± 1.82
Hyperoside	nd	5.12 ± 0.17
Hyperoside 2''- <i>O</i> -gallate	nd	3.8 ± 0.1 ^a
Isoquercitrin	nd	13.24 ± 0.33
Isoquercitrin 2''- <i>O</i> -gallate	nd	6.3 ± 0.19 ^b
Miquelianin	26.95 ± 0.27 ^b	nd
Astragalol	nd	11.22 ± 0.35
Astragalol 2''- <i>O</i> -gallate	nd	4.58 ± 0.01 ^c
Kaempferol 4'- <i>O</i> -β-D-glucoside	8.27 ± 0.12 ^c	4.91 ± 0.03 ^c
Kaempferol glycoside	7.37 ± 0.33 ^c	nd
Phenolic acids		
Gallic acid	11.15 ± 0.13	10.22 ± 0.28
Ellagic acid	nd	3.8 ± 0.18
Salicylic acid	1.55 ± 0.03	3.5 ± 0.12
Tannin		
Tellimagrandin II	11.48 ± 0.13 ^d	15.80 ± 0.46 ^d

Data are presented as means ± SD, $n = 3$; nd, not detected.

^a Calculated as hyperoside.

^b Calculated as isoquercitrin.

^c Calculated as astragalol.

^d Calculated as gallic acid.

of meadowsweet LFI. Salicylic acid was present in lower amounts in both samples, whereas ellagic acid was detected only in dropwort LFI.

Tellimagrandin II, a hydrolysable tannin, occurred in substantial amounts in investigated extracts of dropwort (15.80 ± 0.46 mg/g) and meadowsweet (11.48 ± 0.13 mg/g).

Our results correspond relatively well with the recent studies of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* flowers constituents (Bączek et al., 2012; Gniewosz et al., 2014; Olennikov and Kruglova, 2013).

3.3. Antioxidant activity

In DPPH and FRAP assays, LFIs and their quantitatively dominant flavonoid glycoside spiraeoside displayed significant antioxidant properties comparable to those of the control substance (Table 2). Spiraeoside surprisingly exhibited lower potency than LFIs in the DPPH assay, possibly due to the lack of a key structural feature (o-dihydroxy system) generally required for high flavonoid antiradical effectiveness (Yokozawa et al., 1998).

On the other hand, hydroxyl radical scavenging of LFIs, determined by 2-deoxyribose assay, did not reach 50% inhibition. However, spiraeoside was active (IC₅₀ = 5.1 μg/mL).

Demonstrated good anti-DPPH and Fe³⁺ reducing properties of LFIs are in agreement with previously published reports on different types of *Filipendula* extracts (Maksimović et al., 2007; Olennikov et al., 2016). Based on the results of HPLC analysis (Table 1), it could be assumed

Table 2
Antioxidant activity of lyophilized flower infusions (LFIs) and spiraeoside.

	DPPH IC ₅₀ ^a (μg/mL)	OH IC ₅₀ ^b (μg/mL)	FRAP value ^a (mmol Fe ²⁺ /g)
<i>F. vulgaris</i> LFI	9.10 ± 0.09	ne	7.72 ± 0.04
<i>F. ulmaria</i> LFI	8.45 ± 0.06	ne	4.46 ± 0.1
Spiraeoside	19.54 ± 0.23	5.1	15.02 ± 0.64
L-ascorbic acid	4.09 ^c	nt	13.29 ± 0.26
Quercetin	nt	3.1 ^c	nt

nt, not tested; ne, not effective – IC₅₀ > 16.67 μg/mL.

^a Expressed as mean ± SD ($n = 3$).

^b Data from three independent experiments.

^c Kukić et al. (2006).

Table 3
Inhibition of eicosanoid production by lyophilized flower infusions (LFIs) and *F. vulgaris* isolated compounds.

	12-HETE IC ₅₀ (µg/mL)	PGE ₂	TXB ₂
LFIs			
<i>F. vulgaris</i> LFI	961 ± 83	4241 ± 67	4401 ± 62
<i>F. ulmaria</i> LFI	3415 ± 294	6768 ± 108	ne
<i>F. vulgaris</i> isolated compounds			
Kaempferol 4'-O-β-D-glucoside	na	na	na
Spiraeoside	4.69 ± 0.4	ncd	ne
Astragalín 2''-O-gallate	90.21 ± 7.76	141.1 ± 2.24	ne
Mixture of hyperoside 2''-O-gallate and isoquercitrín 2''-O-gallate (1:2 w/w)	121.8 ± 10.47	ncd	ne
Control substances			
Acetylsalicylic acid	na	5.58 ± 0.53 ^a	4.98 ± 0.06 ^a
Quercetin	7.44 ± 0.65 ^a	12.75 ± 0.26 ^a	53.69 ± 2.47 ^a

Results are expressed as means ± SD ($n = 3$); nt, not tested; na, not active — did not exhibit any activity; ne, not effective — did not reach 50% inhibition; ncd, inhibition above 50% but not concentration dependent.

^a Lesjak et al. (2013).

that LFIs considerable antioxidant capacity is related to their high content of polyphenolic compounds. Moreover, it seems likely that spiraeoside participates in the LFIs total antioxidant effect. Antioxidants could assist in attenuation of inflammatory response and in prevention of gastric ulceration (Đorđević et al., 2012), so the data obtained in our experiment are of relevance for the investigated medicinal plants.

3.4. Inhibition of eicosanoid biosynthesis *ex vivo*

In this study, hypothesis that diminished eicosanoid formation is involved in anti-inflammatory effect of flowers of investigated *Filipendula* species was checked using stimulated human platelets as an *ex vivo* model system. After their exposure to LFIs or *F. vulgaris* isolated compounds, the concentrations of generated eicosanoids (PGE₂, TXB₂ and 12-HETE) were measured. Most of the tested samples, *i.e.* LFIs and isolated flavonoids, in the applied concentration ranges (0.25–10 mg/mL for LFIs; 0.4–200 µg/mL for kaempferol 4'-O-β-D-glucoside, astragalín 2''-O-gallate and mixture of isoquercitrín 2''-O-gallate and hyperoside 2''-O-gallate; 2–160 µg/mL for spiraeoside) were able to decrease the levels of monitored metabolites (Table 3).

IC₅₀ values were in the range of 0.961–4.401 mg/mL and 3.415–6.768 mg/mL for dropwort and meadowsweet LFIs, respectively, and were higher than the corresponding values of control substances (acetylsalicylic acid and quercetin). *F. vulgaris* LFI more effectively inhibited production of all monitored mediators compared to *F. ulmaria* LFI. Investigated extracts exhibited the greatest potency in attenuation of 12-HETE synthesis, weaker activity was observed for reduction of PGE₂ level, whereas only *F. vulgaris* LFI was able to reach more than 50% inhibition of TXB₂ generation.

Capacity of isolated flavonoids to affect concentration of eicosanoids varied considerably. Tested compounds did not reach 50% suppression of TXB₂ formation. Regarding inhibition of PGE₂ production, astragalín 2''-O-gallate was the most effective among examined compounds (IC₅₀ = 141.1 µg/mL). Mixture of hyperoside 2''-O-gallate and isoquercitrín 2''-O-gallate (1:2), as well as spiraeoside, decreased PGE₂ levels by more than 50%, but the effect was not concentration-dependent. Spiraeoside inhibited production of 12-HETE with notable potency (IC₅₀ = 4.69 µg/mL) comparable to that of quercetin (IC₅₀ = 7.44 µg/mL). Astragalín 2''-O-gallate and mixture of hyperoside 2''-O-gallate and isoquercitrín 2''-O-gallate were less active with IC₅₀ values of 90.21 and 121.8 µg/mL, respectively. It appears that glycosylation of quercetin hydroxyl group at the position 4' does not diminish potential to inhibit 12-HETE production. On the other hand, galloylated glycosyl

groups at the position 3 of aglycone and/or lack of hydroxyl group at the position 3' seems to be unfavorable. Kaempferol 4'-O-β-D-glucoside displayed no activity in the tested concentration range.

Elevated eicosanoids production often accompanies inflammatory processes and suppression of their biosynthesis represents a clinically useful therapeutic approach. They are derived by enzymatically catalyzed transformation of arachidonic acid. PGE₂ plays many important roles in human organism, however, its vasodilating, hyperalgesic and pyrogenic properties are the most relevant for the current study (Rang et al., 2012). 12-HETE was identified as a neutrophil chemotaxin. In addition, involvement of this eicosanoid in different conditions (*i.e.* cancer and hypertension) is increasingly recognized (Porro et al., 2014). Thromboxane A₂ (TXA₂) exerts procoagulatory and proinflammatory actions (Rang et al., 2012; Semple et al., 2011). The effect of studied samples on TXA₂ biosynthesis was monitored indirectly, through the measurement of the concentration of its inactive metabolite (TXB₂). Direct determination of TXA₂ is not suitable as it rapidly and spontaneously converts to TXB₂ (Rang et al., 2012).

Taking into account the abovementioned facts and our results, it could be assumed that examined compounds contribute to the medicinal action of the *Filipendula* flowers. In that regard, current finding that spiraeoside, astragalín 2''-O-gallate and tested mixture of galloylated flavonoids attenuated synthesis of PGE₂ may be important to explain traditional use for alleviation of inflammatory and painful conditions. High potential of spiraeoside to suppress 12-HETE production represents considerable therapeutic potential and requires more detailed investigation. The observed low effectiveness of LFIs and isolated flavonoids in the inhibition of TXB₂ formation may indicate that studied samples do not modulate inflammation and coagulation processes mediated by TXA₂. *In vivo* studies are required to determine whether the pharmacokinetic fate influences the demonstrated activities of the tested flavonoids.

LFIs were characterized by high polyphenol content (Table 1) and prominent antioxidant properties (Table 2). Therefore, their mode of action may be based in part on neutralizing free radicals, which are important mediators in the eicosanoid biosynthetic pathways (Schneider et al., 2007). Isolated compounds may also act in similar manner due to generally good scavenging ability of polyphenols (Lesjak et al., 2013).

Gallic and salicylic acid, that are also present in the LFIs (Table 1), were reported to inhibit COX-1 (one of key enzymes responsible for prostaglandins generation) (Chandramohan Reddy et al., 2010; Grosser et al., 2011). In addition to tested compounds, they may contribute to the LFIs effect on PGE₂ production. Hence, it seems that several different active constituents contribute to the beneficial anti-inflammatory effect of investigated LFIs.

In previous *in vitro* studies, which were carried out by using isolated cyclooxygenase enzymes or bovine seminal vesicle microsomes, several extracts of *F. ulmaria* inhibited PGE₂ biosynthesis (ESCOMP, 2003; Katanić et al., 2016). Investigation of *F. vulgaris* effect on 12-HETE, TXA₂ and PGE₂ formation has not been conducted so far. Pain relieving and antiedematous properties of certain meadowsweet and dropwort extracts (Katanić et al., 2016; Samardžić et al., 2016) were demonstrated in animal studies, nevertheless, their mechanism of action and active constituents are still not sufficiently defined. Moreover, data regarding the traditionally used preparations lack.

The present experiment was carried out on the intact cells, enabling better prediction of the *in vivo* action when compared with the tests performed on the isolated enzymes or subcellular structures. More complete picture of the anti-inflammatory effect of tested samples was obtained by detecting their influence on 12-HETE and TXA₂ in addition to PGE₂. The present study revealed the significant anti-inflammatory activity of flower infusions, preparation relevant for the reported ethnopharmacological application (HMPC, 2011b). Moreover, for the first time it was shown that flavonoids from *Filipendula* LFIs represented the active principles responsible for the suppression of the eicosanoids

Table 4

Average gastric damage scores (GDSs) in animal groups treated with lyophilized flower infusions (LFIs), isolated compounds, referent drug or vehicle.

		GDS
Lyophilized flower infusions		
<i>F. vulgaris</i>	100 mg/kg	3.92 ± 2.5
	200 mg/kg	4 ± 1.76 [*]
	300 mg/kg	3.42 ± 2.11 [*]
<i>F. ulmaria</i>	100 mg/kg	2.6 ± 2.38 [*]
	200 mg/kg	2.9 ± 1.95 [†]
	300 mg/kg	1.4 ± 2.01 [†]
<i>F. vulgaris</i> isolated compounds		
Tellimagrandin II 40 mg/kg		3.67 ± 2.04 [*]
Spiraeoside 50 mg/kg		3.58 ± 2.2 [*]
Referent drug		
Ranitidine 20 mg/kg		2.5 ± 1.87 ^{**}
Control		
Vehicle (water) [‡]		6 ± 1.26

Data are presented as means ± SD ($n = 5-6$).

* Statistically significant versus control group for $p < 0.05$.

** Statistically significant versus control group for $p < 0.01$.

† Applied in the same volume as tested samples (1 mL/kg).

production.

3.5. Gastroprotective activity

F. vulgaris and *F. ulmaria* LFIs gastroprotective effects were demonstrated for all tested doses ($p < 0.05$), with the exception of the lowest dose of *F. vulgaris* LFI (100 mg/kg) (Table 4). Average gastric damage scores (GDSs) in animal groups treated with dropwort and meadowsweet LFIs were in the range of 3.4–4 and 1.4–2.9, respectively. Although GDSs of LFIs were the most reduced in animal groups receiving the highest quantities of the examined extracts (300 mg/kg), statistically significant dose-response relationship was not observed. Oral administration of isolated compounds, spiraeoside (50 mg/kg, GDS 3.6, $p < 0.05$) and tellimagrandin II (40 mg/kg, GDS 3.7, $p < 0.05$), also decreased severity of the formed lesions in the present animal study. Ranitidine, as a positive control, evidently protected gastric mucosa (GDS 2.5, $p < 0.01$), whereas control group of animals which received vehicle (water) developed the most extensive damage of stomach mucosa (GDS 6).

To the best of our knowledge, this is the first report of dropwort capability to prevent ethanol-induced mucosal injury. Established activity of LFI is in accordance with the literature data regarding meadowsweet preparations. Specifically, it was shown that *F. ulmaria* flowers decoctions were effective in some animal models of stomach ulcerations (ESCOP, 2003).

Demonstrated protective activity of isolated tannin tellimagrandin II is supported by the fact that molecules with relative structural resemblance applied in similar doses (pedunculagin, 50 mg/kg, i.g.; corilagin, 30 mg/kg, p.o.) exerted activity in the mice treated with the same harmful agent as in the current experiment (de Jesus et al., 2012; Klein-Júnior et al., 2017). Spiraeoside effectiveness is in line with previously observed capacity of some flavonoid glycosides to prevent stomach injury in animals (de Lira Mota et al., 2009).

Free radical species are involved in the onset of the mucosal damage evoked by necrotizing agent ethanol (Đorđević et al., 2012). Hence, pronounced antioxidant activity of tested LFIs and isolated compounds (Table 2) (Chen et al., 2014) probably contributed to the preservation of the stomach mucosal integrity. Furthermore, attenuation of lesions formation achieved by tellimagrandin II could be related to the recently demonstrated histidine decarboxylase inhibition *in vitro* (Nitta et al., 2013).

Our data strongly suggest that LFIs beneficial effects are associated with the presence of spiraeoside and tellimagrandin II, but role of other LFIs components should also be investigated in the future studies.

4. Conclusion

Lyophilized flower infusions of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* were rich in polyphenolics that belong to the classes of flavonol glycosides, phenolic acids and hydrolysable tannins. These preparations, as well as the *F. vulgaris* flowers flavonoids (spiraeoside, astragalgin 2"-O-gallate and mixture of hyperoside 2"-O-gallate and isoquercitrin 2"-O-gallate), were able to decrease production of proinflammatory eicosanoids *ex vivo* in human platelets. The investigated extracts, along with spiraeoside and tellimagrandin II, also protected stomach mucosa of the rats from toxic effects induced by absolute ethanol.

The results obtained in this study support reported traditional use of meadowsweet and dropwort flowers in the treatment of inflammatory conditions and peptic ulcer and indicate that examined flavonoid and tannin compounds are pharmacologically active constituents.

Acknowledgments

Experimental part of anti-inflammatory activity investigation was conducted at the Department of Chemistry, Biochemistry and Environmental Protection (University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Serbia) with the great help of Associate Professor Dr Ivana Beara and Assistant Professor Dr Nataša Simin.

The authors are grateful to Dr Jelena Randelović for constructive discussion.

This research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (grant no. 173021).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

SS performed all the experiments (as a part of his Ph.D. work) and wrote the manuscript. SS and JA performed HPLC analysis, isolation of compounds and interpretation of the collected data. SS, DB and MM conducted investigation of gastroprotective activity and analysis of the obtained results. SS and VT interpreted the recorded spectra and determined structures of the isolated compounds. SS and ZM designed experiments and interpreted the acquired data. All authors read and approved the final manuscript.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.013>.

References

- Bączek, K., Cygan, M., Przybył, J.L., Kosakowska, O., Węglarz, Z., 2012. Seasonal variation of phenolics content in above- and underground organs of dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench). *Herba Pol.* 58, 24–32.
- Ball, P.W., 1968. *Filipendula* Miller. In: Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A. (Eds.), *Flora Europaea*. Roseaceae to Umbelliferae 2. Cambridge University Press, London, pp. 6–7.
- Chandramohan Reddy, T., Aparoy, P., Kishore Babu, N., Anil Kumar, K., Kumar Kalangi, S., Reddanna, P., 2010. Kinetics and docking studies of a COX-2 inhibitor isolated from *Terminalia bellerica* fruits. *Protein Pept. Lett.* 17, 1251–1257.
- Chen, Y., Wang, J., Ou, Y., Chen, H., Xiao, S., Liu, G., Cao, Y., Huang, Q., 2014. Cellular antioxidant activities of polyphenols isolated from *Eucalyptus* leaves (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla* GL9). *J. Funct. Foods* 7, 737–745.
- Đorđević, S., Tadić, V., Petrović, S., Kukić-Marković, J., Dobrić, S., Milenković, M., Hadžifejzović, N., 2012. Bioactivity assays on *Carlina acaulis* and *C. acanthifolia* root and herb extracts. *Dig. J. Nanomater. Biostruct.* 7, 1213–1222.
- Drummond, E.M., Harbourne, N., Marete, E., Martyn, D., Jacquier, J., O'Riordan, D., Gibney, E.R., 2013. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother. Res.* 27, 588–594.

- ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), 2003. ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd ed. Thieme, New York, New York.
- Gniewosz, M., Synowiec, A., Kraśniewska, K., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z., 2014. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. *Food Control* 37, 351–361.
- Grosser, T., Smith, F.M., FitzGerald, G.A., 2011. Anti-inflammatory, antipyretic and analgesic agents; pharmacotherapy of gout. In: Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (Eds.), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, pp. 959–1004.
- HMPC (Committee on herbal medicinal products), 2011a. Assessment report on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., herba and *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., flos. Reference number: EMA/HMPC/434892/2010. European Medicines Agency, London.
- HMPC (Committee on herbal medicinal products), 2011b. Community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., flos. Reference number: EMA/HMPC/434894/2010. European Medicines Agency, London.
- Jarić, S., Popović, Z., Maćukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mijatović, M., Karadžić, B., Mitrović, M., Pavlović, P., 2007. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *J. Ethnopharmacol.* 111, 160–175.
- de Jesus, N.Z.T., de Souza Falcão, H., Gomes, I.F., de Almeida Leite, T.J., de Moraes Lima, G.R., Barbosa-Filho, J.M., Tavares, J.F., da Silva, M.S., de Athayde-Filho, P.F., Batista, L.M., 2012. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 3203–3228.
- Katanić, J., Boroja, T., Mihailović, V., Nikles, S., Pan, S.-P., Rosić, G., Selaković, D., Joksimović, J., Mitrović, S., Bauer, R., 2016de. *In vitro* and *in vivo* assessment of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) as anti-inflammatory agent. *J. Ethnopharmacol.* 193, 627–636.
- Klein-Júnior, L.C., Silva, L.M., da Boeing, T., Somensi, L.B., Beber, A.P., Rocha, J.A.R., Henriques, A.T., Andrade, S.F., Cechinel-Filho, V., 2017. The protective potential of *Phyllanthus niruri* and corilagin on gastric lesions induced in rodents by different harmful agents. *Planta Med.* 83, 30–39.
- Kukić, J., Petrović, S., Niketić, M., 2006. Antioxidant activity of four endemic *Stachys* taxa. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 725–729.
- de Lira Mota, K.S., Dias, G.E.N., Pinto, M.E.F., Luiz-Ferreira, Â., Monteiro Souza-Brito, A.R., Hiruma-Lima, C.A., Barbosa-Filho, J.M., Batista, L.M., 2009. Flavonoids with gastroprotective activity. *Molecules* 14, 979–1012.
- Lesjak, M.M., Beara, I.N., Orčić, D.Z., Ristić, J.D., Anačkov, G.T., Božin, B.N., Mimica-Dukić, N.M., 2013. Chemical characterisation and biological effects of *Juniperus foetidissima* Willd. 1806. *LWT - Food Sci. Technol.* 53, 530–539.
- Maksimović, Z., Petrović, S., Pavlović, M., Kovačević, N., Kukić, J., 2007. Antioxidant activity of *Filipendula hexapetala* flowers. *Fitoterapia* 78, 265–267.
- Nitta, Y., Kikuzaki, H., Azuma, T., Ye, Y., Sakaue, M., Higuchi, Y., Komori, H., Ueno, H., 2013. Inhibitory activity of *Filipendula ulmaria* constituents on recombinant human histidine decarboxylase. *Food Chem.* 138, 1551–1556.
- Olennikov, D.N., Kruglova, M.Y., 2013. A new quercetin glycoside and other phenolic compounds from the genus *Filipendula*. *Chem. Nat. Compd.* 49, 610–616.
- Olennikov, D.N., Kashchenko, N.I., Chirikova, N.K., 2016. Meadowsweet teas as new functional beverages: comparative analysis of nutrients, phytochemicals and biological effects of four *Filipendula* species. *Molecules* 22, 16.
- Pavlović, M., Kovačević, N., Couladis, M., Tzakou, O., 2006. Phenolic constituents of *Anthemis triumfetti* (L.) DC. *Biochem. Syst. Ecol.* 34, 449–452.
- Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E., Cavalca, V., 2014. Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: a neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *J. Chromatogr. B* 964, 26–40.
- Pukalskienė, M., Venskutonis, P.R., Pukalskas, A., 2015. Phytochemical composition and antioxidant properties of *Filipendula vulgaris* as a source of healthy functional ingredients. *J. Funct. Foods* 15, 233–242.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2012. *Rang & Dale's Pharmacology*, 7th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Samardžić, S., Tomić, M., Pecikoza, U., Stepanović-Petrović, R., Maksimović, Z., 2016. Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation. *J. Ethnopharmacol.* 193, 652–656.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J., 2011. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 133, 1051–1076.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A., Brash, A.R., 2007. Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem. Biol.* 14, 473–488.
- Semple, J.W., Italiano, J.E., Freedman, J., 2011. Platelets and the immune continuum. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 264–274.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhruddin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B., 2013. Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine—an unexplored *in vitro* anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J. Ethnopharmacol.* 149, 750–771.
- Yokozawa, T., Chen, C.P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G.-I., Nishioka, I., 1998. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* 56, 213–222.



Ethnopharmacological communication

Antihyperalgesic activity of *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. and *Filipendula vulgaris* Moench in a rat model of inflammation

Stevan Samardžić^{a,*}, Maja Tomić^b, Uroš Pecikoza^b, Radica Stepanović-Petrović^b, Zoran Maksimović^a

^a Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia

^b Department of Pharmacology, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade, Vojvode Stepe 450, 11221 Belgrade, Serbia



ARTICLE INFO

Keywords:

Filipendula
Meadowsweet
Dropwort
HPLC
Inflammatory pain
Acute toxicity

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), and dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench) flowers are traditionally used to treat various ailments, including inflammatory conditions. The aim of the present study was to validate the aforementioned ethnomedicinal claim by assessing antihyperalgesic and antiedematous activities and toxicity of orally administered lyophilized flower infusions (LFIs) of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* in experimental animals.

Materials and methods: The phytochemical analysis of LFIs was performed by HPLC-DAD. Antihyperalgesic and antiedematous activities were estimated in a rat model of inflammation induced by intraplantar injection of carrageenan using Von Frey anesthesiometer and plethysmometer, respectively. Moreover, acute oral toxicity of LFIs in mice was evaluated by observing changes in animal behavior and mortality for a period of 14 days following the treatment.

Results: HPLC-DAD analysis revealed the presence of phenolic acids and flavonoids in LFIs, among which spiraeoside was identified as the principal component (56.27 ± 1.03 and 55.67 ± 1.82 mg/g of LFI in *F. ulmaria* and *F. vulgaris*, respectively). The LFIs of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* (100–300 mg/kg; p.o.) produced significant and dose-dependent antihyperalgesic effects: ED₅₀ ± SEM values were 164.8 ± 15.4 mg/kg (110.3–246.3 mg/kg) and 172.2 ± 6.2 mg/kg (147.4–201.3 mg/kg) for *F. ulmaria* and *F. vulgaris*, respectively. On the other hand, LFIs of both species (100–300 mg/kg; p.o.) did not significantly reduce edema. Good safety profiles were evidenced in the toxicological study. The median lethal dose (LD₅₀) of the tested extracts is likely to be greater than 2000 mg/kg.

Conclusion: The results of the present study support the use of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* flowers in folk medicine for relieving pain in diseases with an inflammatory component.

1. Introduction

Meadowsweet (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) and dropwort (*Filipendula vulgaris* Moench) are medicinal plants belonging to the Rosaceae family, with flowers that are traditionally used in the treatment of rheumatism, gout, infections, fever and common cold (Šarić-Kundalić et al., 2011; Vogl et al., 2013). In line with this, European Medicines Agency monograph on *Filipendulae ulmariae flos* specifies that dried meadowsweet flowers can be employed in the form of an herbal tea for the relief of minor articular pain and as a supportive treatment of common cold (HMPC, 2011).

Flavonoid glycosides, phenolic acids and ellagitannins have been identified as the main constituents of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* (Olennikov and Kruglova, 2013). Moreover, it was shown that mea-

dowsweet and dropwort extracts possess diverse pharmacological properties (Čebović and Maksimović, 2012; ESCOP, 2003; Vogl et al., 2013). Previous evaluation of anti-inflammatory action of *Filipendula* species, including *F. ulmaria* and *F. vulgaris*, is limited to a few *in vitro* investigations (Drummond et al., 2013; ESCOP, 2003; Vogl et al., 2013). Thus, the additional evidence from animal studies using traditionally relevant pharmaceutical forms, administration routes and doses regimens is required.

The goal of the present study was to evaluate antihyperalgesic and antiedematous effects of orally administered lyophilized flower infusions (LFIs) of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* in a rat model of localized inflammation induced by carrageenan. In order to fully comprehend and to compare compositions and activities of LFIs, their phytochemical characterization was performed using HPLC-DAD. Finally, acute

* Corresponding author.

E-mail address: stevans@pharmacy.bg.ac.rs (S. Samardžić).

toxicities of LFI applied orally were studied in mice.

2. Materials and methods

2.1. Plant material, preparation of lyophilized infusions and phytochemical analysis

The flowers of wild growing *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (syn. *Spiraea ulmaria* L.; Rosaceae) and *Filipendula vulgaris* Moench (syn. *Filipendula hexapetala* Gilib.; syn. *Spiraea filipendula* L.; Rosaceae) (Tutin et al., 1968) were harvested in 2014. (Table 1S in Supplementary material) and air dried. Voucher specimens of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* were deposited at the Herbarium of the Institute of Botany and Botanical Garden “Jevremovac”, University of Belgrade (42083BEOU) and at the Herbarium of the Department of Botany, Faculty of Pharmacy, University of Belgrade (3713HFF), respectively. The infusions were prepared by pouring boiling water over comminuted material (1:20, w/v) and letting the samples steep for 30 min. After filtration, infusions were freeze-dried. The obtained lyophilizates (LFIs) were used for further qualitative and quantitative analysis by HPLC (Supplementary material) as well as for pharmacological and toxicological studies.

2.2. Animals

Male Wistar rats (180–220 g) were used for the assessment of antihyperalgesic and antiedematous activity. Male Swiss Webster mice (20–30 g) were used for acute toxicity testing. Animal handling details are described in Supplementary materials. All experiments were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Faculty of Pharmacy, University of Belgrade (bioethical allowance number 2/11).

2.3. Induction of inflammation, treatment administration and assessment of antihyperalgesic and antiedematous activity

Inflammation of the rat hind paw was induced by an intraplantar (i.pl.) injection of carrageenan (Morris, 2003; Stepanović-Petrović et al., 2012; see Supplementary materials). LFIs or acetylsalicylic acid (as a reference drug) were applied by oral gavage, 30 min before or 30 min after carrageenan, respectively. Inflammation is followed by the development of nociceptive hypersensitivity (hyperalgesia) and edema (Morris, 2003; Stepanović-Petrović et al., 2012; Vivancos et al., 2004). Antihyperalgesic and antiedematous activity of the LFIs of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* were examined by electronic Von Frey anesthesiometer (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) and plethysmometer (UgoBasile, Comerio, Italy), respectively.

2.4. Calculations and statistical analysis

The results from antihyperalgesic and antiedematous activity assessment are presented as mean group values \pm SEM. The statistical analysis and pharmacological computations were performed using SigmaPlot 11 (Systat Software Inc., Richmond, California) and Pharm PCS (Micro-Computer Specialists, Philadelphia, PA), as described in Supplementary materials. Differences between corresponding means were assessed by using a two-way repeated-measures ANOVA followed by Tukey HSD *post hoc* test. A $P < 0.05$ was considered significant.

2.5. Acute oral toxicity study

Fasted mice (3 groups with 2 mice) received a single oral dose (2000 mg/kg) of the *F. vulgaris* or *F. ulmaria* LFI, or an equivalent amount of vehicle. Animals were observed for changes in behavior (piloerection, sensitivity to sound and touch, mobility, tremors, aggres-

sion) and mortality continuously for 30 min and then periodically during the first 24 h after treatment. They were followed 14 days afterwards.

3. Results and discussion

3.1. HPLC analysis

The results of HPLC analysis showed that LFIs of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* had similar chromatographic profiles (Supplementary material). Kaempferol glycoside (astragalín), quercetin glycosides (spiraeoside and isoquercitrin), as well as phenolic acids (gallic acid, ellagic acid and salicylic acid), were detected in both species. Spiraeoside (56.27 ± 1.03 and 55.67 ± 1.82 mg/g of LFI of *F. ulmaria* and *F. vulgaris*, respectively) and isoquercitrin (38.44 ± 0.66 mg/g in *F. ulmaria* LFI; 13.24 ± 0.33 mg/g in *F. vulgaris* LFI) were the dominant compounds in both samples. Hyperoside was present only in the LFI of dropwort, which was also characterized by lower contents of isoquercitrin and salicylic acid in comparison with the meadowsweet LFI.

3.2. The antihyperalgesic and antiedematous effects of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* LFIs

The LFIs of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* (100–300 mg/kg; p.o.) produced significant and dose-dependent antihyperalgesic effects in the model of inflammatory hyperalgesia (Fig. 1A and B). The peak effects were achieved 60 min after the induction of inflammation and were from 38.3% to 59.9% for the *F. vulgaris* LFI and from 31.8% to 63.7% for the *F. ulmaria* LFI (smaller graphs in Fig. 1A and B). The corresponding $ED_{50} \pm$ SEM values (95% confidence limits) of the LFIs, obtained at the time of peak effects, were 172.2 ± 6.2 mg/kg (147.4–201.3 mg/kg) and 164.8 ± 15.4 mg/kg (110.3–246.3 mg/kg) for *F. vulgaris* and *F. ulmaria*, respectively. Acetylsalicylic acid (400 mg/kg; p.o.) produced a maximal antihyperalgesic effect of 61.8%, 90 min after the induction of inflammation (Fig. 1A and B).

As investigated LFIs produced significant and dose-dependent antihyperalgesic effect in doses which are in accordance with those traditionally used by humans (Supplementary material), our results support ethnomedicinal use of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* for pain relief.

The LFIs of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* (100–300 mg/kg; p.o.) did not produce a significant antiedematous effect (Fig. 2A and B). Additionally, we tested the effect of the *F. vulgaris* LFI in a dose of 600 mg/kg (p.o.) ($n=3$), and found that there was no tendency toward greater reduction of carrageenan-induced edema than those produced with other examined doses (not shown). Acetylsalicylic acid (400 mg/kg; p.o.) produced a maximal antiedematous effect of 64.8%, 60 min after the induction of inflammation (Fig. 2A and B).

Therefore, tested doses of LFIs, which correspond to those traditionally applied (Supplementary material), did not exert valuable anti-inflammatory activity in our experiment.

Earlier studies demonstrated analgesic efficacy of several compounds present in examined LFIs. Namely, gallic acid (30 mg/kg; Trevisan et al., 2014), astragalín (150–600 mg/kg; Wang et al., 2014), ellagic acid (0.1–100 mg/kg; Rogerio et al., 2006), as well as mixture of hyperoside and isoquercitrin (2:1, w/w) (97.31 mg/kg; Erdemoglu et al., 2008) exerted antinociceptive effect in animal models of chemically induced pain after oral administration. It should be noticed that, with the exception of ellagic acid, the quantity of these phenolics sufficient to exhibit analgesic properties on its own was considerably higher than their quantity administered within LFIs. Therefore, it is likely that these components of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* LFIs interact synergistically in producing the antihyperalgesia (Williamson, 2001).

Inflammatory response in rats initiated by carrageenan is a three phase process. First phase (0–1.5 h after carrageenan injection) is

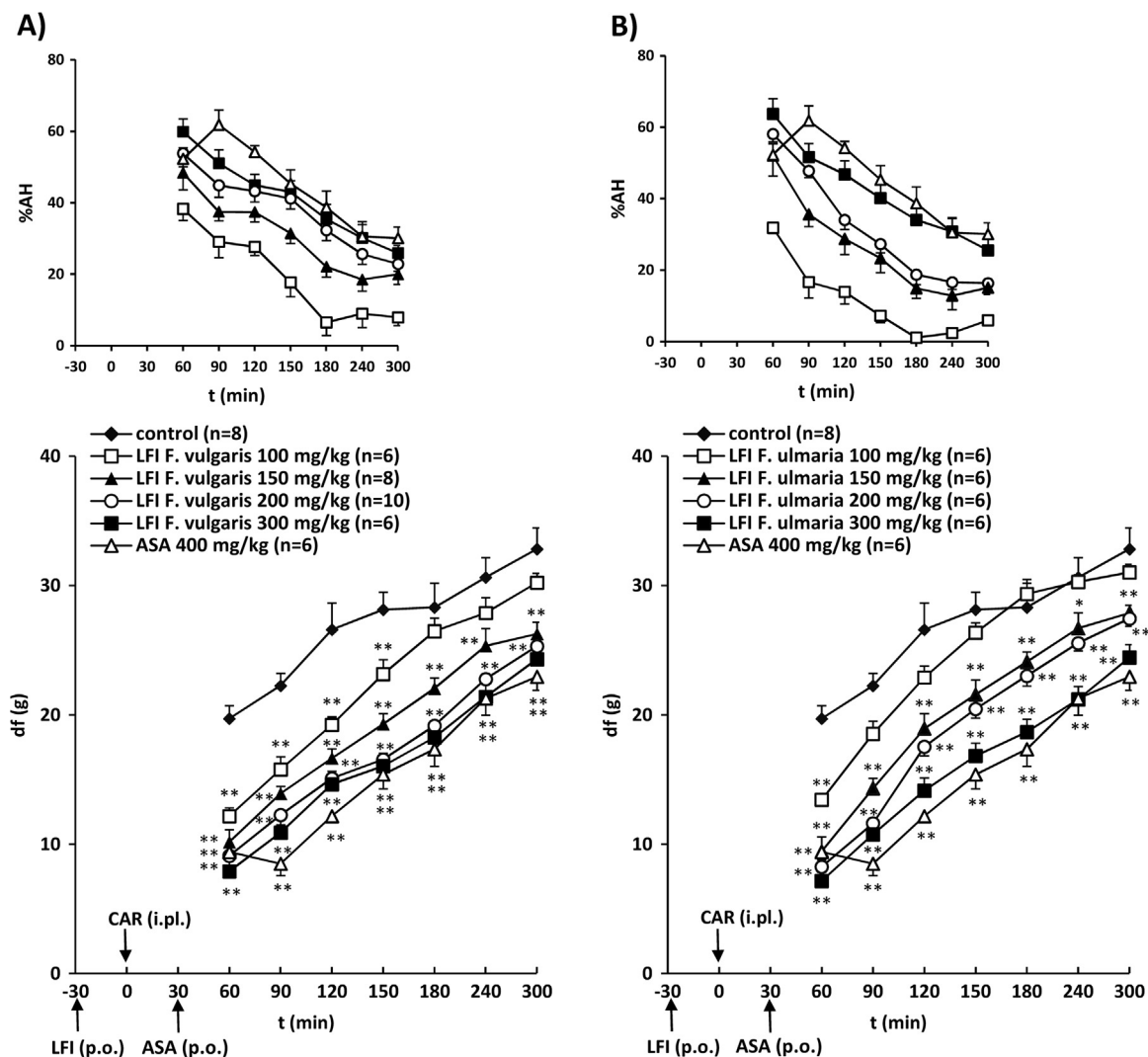


Fig. 1. The effects of *F. vulgaris* (A) and *F. ulmaria* (B) lyophilized flower infusions (LFIs) on carrageenan (CAR)-induced hyperalgesia, expressed as the difference in grams (df) between basal and post-treatment paw withdrawal thresholds (larger graphs) or as the percentage of antihyperalgesic activity (%AH) (smaller graphs). The legend is for both graphs. The LFIs were administered p.o. 30 min before CAR injection, while acetylsalicylic acid (ASA) was applied p.o. 30 min after the induction of inflammation (denoted by arrows). Each point represents the mean \pm SEM of df (g) or %AH. Statistical significance (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey HSD test) was determined by comparison with the curve of the control group. i.pl.=intraplantar; p.o.=oral.

characterized by the release of histamine and serotonin, second phase (1.5–2.5 h) is mediated by kinins, whereas third phase (2.5–6 h) is linked to prostaglandin action (Di Rosa et al., 1971). Since investigated LFIs exhibited antihyperalgesic effect throughout the entire experimental period, it's reasonable to assume that their components have the ability to modulate the effects of various proinflammatory mediators. In this regard, it has already been shown that isoquercitrin and gallic acid are capable of inhibiting the histamine release (Kim et al., 2006; Shimoda et al., 2008). Furthermore, inhibition of cyclooxygenase enzymes was demonstrated for salicylic and gallic acids (Grosser et al., 2011; Reddy et al., 2010), whereas astragaline, gallic and ellagic acids suppressed cyclooxygenase-2 induction (El-Shitany et al., 2014; Hsiang et al., 2013; Kim and Kim, 2011). Additionally, hyperoside, isoquercitrin and astragaline diminished production of prostaglandin E_2 (Hammer et al., 2007; Lee et al., 2011).

Lack of LFIs antiedematous effect was unexpected, as literature survey suggested that the development of edema induced by carrageenan could be attenuated by several constituents of investigated *Filipendula* species, e.g. gallic acid, ellagic acid, mixture of hyperoside and isoquercitrin, as well as astragaline (Erdemoglu et al., 2008; Hammer et al., 2007; Kim et al., 2006; Lee et al., 2011; Rogerio et al., 2006; Trevisan et al., 2014; Wang et al., 2014). Further studies

are needed in order to elucidate the possible causes of these unusual pharmacological profiles.

Nevertheless, our finding that LFIs could diminish hyperalgesia caused by localized peripheral inflammation is in accordance with Medicines Agency monograph of *Filipendulae ulmariae flos* which specifies that meadowsweet flowers tea can be used for the relief of minor articular pain (HMPC, 2011), as well as with reported traditional use of dropwort flowers.

3.3. Acute oral toxicity of *F. vulgaris* and *F. ulmaria* LFIs

During the initial observation, only one mouse treated with the *F. vulgaris* LFI appeared to be slightly sedated in the first two hours following LFI application. All other mice displayed normal behavior with respect to the control (vehicle-treated) group. No lethality was observed with the dose of 2000 mg/kg (p.o.) during the 14 days observation period. So the median lethal dose (LD_{50}) of the tested LFIs for the p.o. route is likely to be greater than 2000 mg/kg.

4. Conclusion

Lyophilized flower infusions of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* were

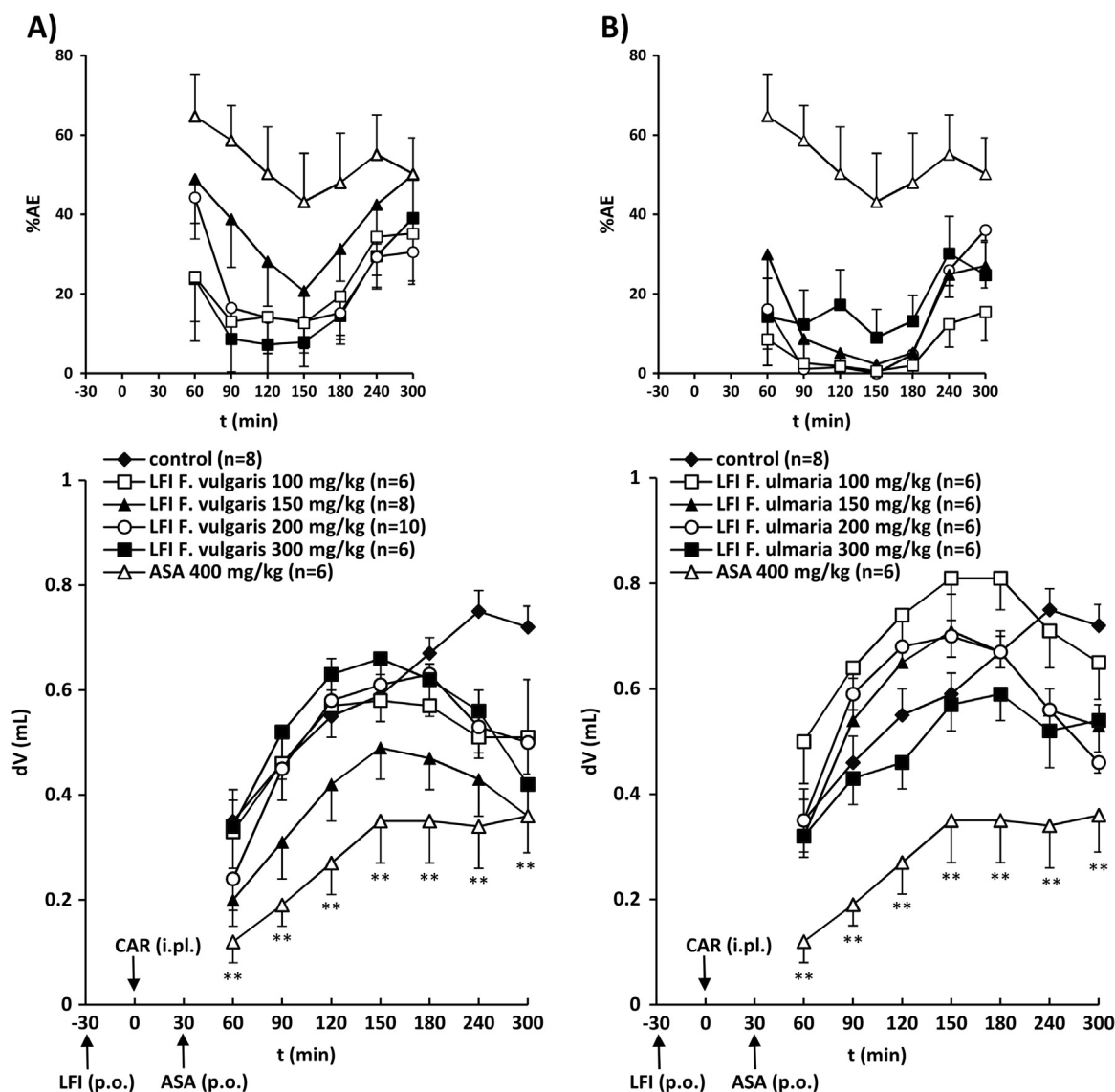


Fig. 2. The effects of *F. vulgaris* (A) and *F. ulmaria* (B) lyophilized flower infusions (LFIs) on carrageenan (CAR)-induced paw edema, expressed as the difference between paw volumes in milliliters (dV) after and before CAR injection (larger graphs) or as the percentage of antiedematous activity (%AE) (smaller graphs). The legend is for both graphs. The LFIs were administered p.o. 30 min before CAR injection, while acetylsalicylic acid (ASA) was applied p.o. 30 min after the induction of inflammation (denoted by arrows). Each point represents the mean \pm SEM of dV (mL) or %AE. Statistical significance (** $P < 0.01$; two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey HSD test) was determined by comparison with the curve of the control group. i.pl.=intraplantar; p.o.=oral.

similar regarding chemical composition and exhibited significant, dose-related antihyperalgesic activity in a rat model of localized inflammation. Both species displayed good safety profiles. All together, results obtained in the present study provided data that support ethnomedicinal use of *F. ulmaria* and *F. vulgaris* for pain relief in diseases with inflammation as an underlying mechanism.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia (Grants nos. 175045 and 173021).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.jep.2016.10.024.

References

- Čebović, T., Maksimović, Z., 2012. Hepatoprotective effect of *Filipendula hexapetala* Gilib. (Rosaceae) in carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Phytother. Res.* 26, 1088–1091.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15–29.
- Drummond, E.M., Harbourne, N., Marete, E., Martyn, D., Jacquier, J., O'Riordan, D., Gibney, E.R., 2013. Inhibition of proinflammatory biomarkers in THP1 macrophages by polyphenols derived from chamomile, meadowsweet and willow bark. *Phytother. Res.* 27, 588–594.
- ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytotherapy), 2003. ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products. 2nd ed. The European Scientific Cooperative on Phytotherapy, Exeter; Georg Thieme Verlag, Stuttgart; Thieme New York, New York.
- El-Shitany, N.A., El-Bastawissy, E.A., El-desoky, K., 2014. Ellagic acid protects against carrageenan-induced acute inflammation through inhibition of nuclear factor kappa B, inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines and enhancement of interleukin-10 via an antioxidant mechanism. *Int. Immunopharmacol.* 19, 290–299.
- Erdemoglu, N., Akkol, E.K., Yesilada, E., Cahş, I., 2008. Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum* L. leaves. *J. Ethnopharmacol.* 119, 172–178.
- Grosser, T., Smith, E.M., FitzGerald, G.A., 2011. Anti-inflammatory, antipyretic and

- analgesic agents; pharmacotherapy of gout. In: Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, 959–1004.
- Hammer, K.D.P., Hillwig, M.L., Solco, A.K.S., Dixon, P.M., Delate, K., Murphy, P.A., Wurtele, E.S., Birt, D.F., 2007. Inhibition of prostaglandin E₂ production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW264.7 mouse macrophage cells. *J. Agric. Food Chem.* 55, 7323–7331.
- HMPC (Committee on herbal medicinal products), 2011. Final community herbal monograph on *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim., *flor.* Reference number: EMA/HMPC/434894/2010. European Medicines Agency
- Hsiang, C.-Y., Hseu, Y.-C., Chang, Y.-C., Kumar, K.J.S., Ho, T.-Y., Yang, H.-L., 2013. *Toona sinensis* and its major bioactive compound gallic acid inhibit LPS-induced inflammation in nuclear factor- κ B transgenic mice as evaluated by in vivo bioluminescence imaging. *Food Chem.* 136, 426–434.
- Kim, M.-S., Kim, S.-H., 2011. Inhibitory effect of astragaloside on expression of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediators through NF- κ B in macrophages. *Arch. Pharm. Res.* 34, 2101–2107.
- Kim, S.-H., Jun, C.-D., Suk, K., Choi, B.-J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.-Y., Kim, D.-K., Shin, T.-Y., 2006. Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicol. Sci.* 91, 123–131.
- Lee, H.-B., Kim, E.-K., Park, S.-J., Bang, S., Kim, T.G., Chung, D., 2011. Isolation and anti-inflammatory effect of astragaloside synthesized by enzymatic hydrolysis of tea seed extract. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2315–2321.
- Morris, C.J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol. Biol.* 225, 115–121.
- Olenikov, D.N., Kruglova, M.Y., 2013. A new quercetin glycoside and other phenolic compounds from the genus *Filipendula*. *Chem. Nat. Compd.* 49, 610–616.
- Reddy, T.C., Aparoy, P., Babu, N.K., Kumar, K.A., Kalangi, S.K., Reddanna, P., 2010. Kinetics and docking studies of a COX-2 inhibitor isolated from *Terminalia bellerica* fruits. *Protein Pept. Lett.* 17, 1251–1257.
- Rogerio, A.P., Fontanari, C., Melo, M.C.C., Ambrosio, S.R., de Souza, G.E.P., Pereira, P.S., França, S.C., da Costa, F.B., Albuquerque, D.A., Faccioli, L.H., 2006. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafroensia pacari* extract and ellagic acid. *J. Pharm. Pharmacol.* 58, 1265–1273.
- Šarić-Kundalić, B., Dobeš, C., Klatte-Asselmeyer, V., Saukel, J., 2011. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J. Ethnopharmacol.* 133, 1051–1076.
- Shimoda, K., Kobayashi, T., Akagi, M., Hamada, H., Hamada, H., 2008. Synthesis of oligosaccharides of genistein and quercetin as potential anti-inflammatory agents. *Chem. Lett.* 37, 876–877.
- Stepanović-Petrović, R.M., Micov, A.M., Tomić, M.A., Ugrešić, N.D., 2012. The local peripheral antihyperalgesic effect of levetiracetam and its mechanism of action in an inflammatory pain model. *Anesth. Analg.* 115, 1457–1466.
- Trevisan, G., Rossato, M.F., Tonello, R., Hoffmeister, C., Klafke, J.Z., Rosa, F., Pinheiro, K.V., Pinheiro, F.V., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2014. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn-Schmiede. Arch. Pharmacol.* 387, 679–689.
- Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., 1968. *Flora Europaea Vol 2. Roseaceae to Umbelliferae*, Cambridge University Press, London.
- Vivancos, G.G., Verri, W.A., Cunha, T.M., Schivo, I.R., Parada, C.A., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H., 2004. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 391–399.
- Vogl, S., Picker, P., Mihaly-Bison, J., Fakhrudin, N., Atanasov, A.G., Heiss, E.H., Wawrosch, C., Reznicek, G., Dirsch, V.M., Saukel, J., Kopp, B., 2013. Ethnopharmacological *in vitro* studies on Austria's folk medicine – an unexplored lore *in vitro* anti-inflammatory activities of 71 Austrian traditional herbal drugs. *J. Ethnopharmacol.* 149, 750–771.
- Wang, Y., Chen, P., Tang, C., Wang, Y., Li, Y., Zhang, H., 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and two isolated flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. *J. Ethnopharmacol.* 151, 944–950.
- Williamson, E.M., 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8, 401–409.