

UNIVERZITET U BEOGRADU

FARMACEUTSKI FAKULTET

Jelena Č. Živković

**MORFOLOŠKA, HEMIJSKA I
FARMAKOLOŠKA KARAKTERIZACIJA
ODABRANIH VRSTA RODA
VERONICA L. (PLANTAGINACEAE)**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF PHARMACY

Jelena Č. Živković

**MORPHOLOGICAL, CHEMICAL AND
PHARMACOLOGICAL
CHARACTERISATION OF SELECTED
VERONICA L. SPECIES
(PLANTAGINACEAE)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

Mentori

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

Dr Teodora Janković, viši naučni saradnik, mentor,
Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić", Beograd

Članovi komisije

Prof. dr Slavica Ražić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Prof. dr Branislava Lakušić, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu - Farmaceutski fakultet

Dr Tatjana Ćebović, docent,
Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski fakultet

Datum odbrane _____

Svojim mentorima, vanrednom profesoru dr Zoranu Maksimoviću i višem naučnom saradniku dr Teodori Janković, izražavam veliku zahvalnost na sveobuhvatnom angažovanju i podršci, stručnoj pomoći i korisnim savetima tokom izrade ove disertacije.

Vanrednom profesoru dr Branislavi Lakušić, redovnom profesoru dr Slavici Ražić i docentu dr Tatjani Čebović najiskrenije se zahvaljujem na svestranoj stručnoj pomoći, korisnim sugestijama i podršci u toku izrade ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem dr Dragani Rančić na stručnoj pomoći u morfološkoj analizi ispitivanih vrsta, Dejanu Stojkoviću na pomoći u izvođenju eksperimenata za procenu antibakterijske aktivnosti, dr Đurđici Ignjatović i dr Gordani Tovilović na nesebičnom angažovanju u eksperimentalnom radu pri ispitivanju neuroprotektivne aktivnosti, dr Isabel Ferreira na pomoći u hemijskoj karakterizaciji ekstrakata, kao i dr Ivani Beara, dr Mariji Lesjak i Jeleni Ristić na dragocenoj pomoći pri izvođenju eksperimenata za procenu antiinflamatorne aktivnosti. Posebnu zahvalnost dugujem dr Katarini Šavikin i dr Gordani Zdunić na brojnim sugestijama u planiranju, izvođenju eksperimentalnog dela i pisanju teze, a pre svega na iskrenom prijateljstvu.

Svim kolegama iz Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“, koji su mi svako na sebi svojstven način pomogli u izradi ovog rada, dugujem veliku zahvalnost.

Prijateljima i porodici, beskrajno hvala na ljubavi i podršci.

Morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija odabranih vrsta roda *Veronica* L. (Plantaginaceae)

Rezime

U okviru doktorske disertacije izvršeno je morfološko, hemijsko i farmakološko ispitivanje tri taksona roda *Veronica* L.: *V. urticifolia* Jacq., *V. jacquinii* Baumg. i *V. teucrium* L., široko rasprostranjenih na teritoriji Srbije. Odabrane vrste su do sada samo delimično hemijski ispitivane, dok nema podataka o njihovom farmakološkom delovanju.

Sa ciljem utvrđivanja mikromorfoloških obeležja kao i anatomske građe, sprovedena je mikroskopska analiza sprasene herbe, i poprečnih preseka lista i stabla odabranih *Veronica* vrsta. Histo-hemijska analiza ukazala je na prisustvo lipida, alkaloida, skroba i fenolnih jedinjenja u ispitivanim vrstama, dok je primenom fluorescentne mikroskopije pokazano da su fenolna jedinjenja lokalizovana u kutikularnom sloju, trihomima i lignificiranim ćelijskim zidovima ksilema listova i stabla.

Analizom sadržaja teških metala primenom plamene atomske apsorpcione spektrometrije (FAAS) i atomske apsorpcione spektrometrije sa grafitnom kivetom (GF-AAS) u biljnim uzorcima nije pokazana značajna razlika između testiranih *Veronica* vrsta sa istog lokaliteta, ukazujući na to da obrazac preuzimanja teških metala nije karakteristika vrste. Na osnovu sadržaja Cr u herbi vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia* raslih na serpentinskom zemljištu, zaključeno je da one predstavljaju potencijalne hiperakumulatore ovog teškog metala.

U okviru preliminarne hemijske analize, primenom kolorimetrijskih metoda, u metanolnim, vodenim i 70%-nim acetonskim ekstraktima nadzemnih delova ispitivanih biljaka u cvetu određen je sadržaj ukupnih polifenola, fenilpropanoide i iridoida. Obzirom da je spektrofotometrijska analiza izdvojila 70%-ne acetonске ekstrakte kao najbogatije pomenutim klasama sekundarnih metabolita, oni su odabrani za dalju hemijsku i farmakološku analizu.

Tenikama visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) i visokoefikasne tankoslojne hromatografije (HPTLC), uz primenu standardnih supstanci, određen je sadržaj aukubina i akteozida u 70%-nim acetonskim ekstraktima ispitivanih taksona. Za razliku od akteozida koj je prisutan u sve tri ispitivane vrste, aukubin je identifikovan samo u ekstraktu nadzemnog dela vrste *V. urticifolia*. Primećena razlika u sadržaju jedinjenja određenih primenom HPLC-DAD i HPTLC tehnika nije imala statističku značajnost.

Kvantitativna analiza ispitivanih taksona roda *Veronica* izvršena je primenom tačnog hromatografa kuplovanog sa detektorom sa diodnim nizom i masenim spektrometrom. U ekstraktima herbi *V. urticifolia* i *V. teucrium* glavnu frakciju činili su flavoni (derivati apigenina, luteolina i izoskutelareina), dok su pored njih bili zastupljeni i derivati hidroksicimetnih kiselina (kafene, *p*-kumarinske i protokatehinske). U ekstraktu herbe *V. jacquinii* dominirali su derivati fenolkarbonskih kiselina, kafene i protokatehinske kiseline, a osim njih bili su prisutni i flavonoli (derivati kvercetina) i flavoni (derivati luteolina i izoskutelareina). Dok je akteozdi najzastupljenije jedinjenje

u ekstraktu vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia*, u herbi *V. teucrium* je to izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)- β -alozil-(1'''' \rightarrow 2'''')- β -glukopiranozid.

Dodatna saznanja o hemijskom sastavu herbi ispitivanih vrsta dobijena su kvantifikacijom odabranih fenolnih jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) i hina kiseline u 70%-nim acetonskim ekstraktima primenom visoko selektivne i specifične tečne hromatografije sa trostrukim kvadrupolom masenim spektrometrom sa elektrosprej jonizacijom. Fenolne komponente prisutne u značajnijoj količini su hlorogenska kiselina, bajkalin, izokvercitrin i hiperozid, kao i derivat cikloheksana hina kiseline. Iako u tragovima, genistein je po prvi put identifikovan u familiji Plantaginaceae, dok je u rodu *Veronica* po prvi put utvrđeno prisustvo kumarina.

U okviru farmakološke karakterizacije ispitivana je antioksidantna, neuroprotektivna, antiinflamatorna, antitumorska i antibakterijska aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata testiranih *Veronica* vrsta.

In vitro antioksidantna aktivnost acetonsko-vodenih ekstrakata herbi odabranih *Veronica* vrsta određena je primenom FRAP i DPPH testa. Ispitivani ekstrakti pokazali su značajnu dozno-zavisnu inhibiciju DPPH radikala, kao i ukupnu antioksidantnu aktivnost. Najveća redukciona sposobnost i antiradikalni efekat pokazani su za ekstrakt herbe *V. teucrium*, dok je najniža aktivnost zabeležena za ekstrakt herbe *V. urticifolia*.

Antioksidantna aktivnost *in vivo* ispitivana je na modelu hepatotoksičnosti indukovane primenom CCl₄ kod pacova. Praćenjem nivoa enzimskih i neenzimskih antioksidanasa pokazano je da ispitivani ekstrakti imaju zaštitnu ulogu. Prema rezultatima sadržaja GSH i TBARS nivoa zaključeno je da u oksidativnom stresu vrste *V. jacquinii* i *V. teucrium* pokazuju slični antioksidantni efekat koji je nešto izraženiji od efekta vrste *V. urticifolia*, što je u saglasnosti sa rezultatima *in vitro* testova.

Neuroprotektivni efekat acetonsko-vodenih ekstrakata odabranih *Veronica* vrsta ispitivan je u kulturi humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y gde je testom kisele fosfataze praćen uticaj ekstrakata na preživljavanje ovih ćelija nakon kombinovanog tretmana stresora (SNP ili H₂O₂) i odgovarajućeg ekstrakta. Ispitivani ekstrakti su ispoljili blagu protektivnu aktivnost što se manifestovalo povećanjem preživljavanja ćelija izloženih SNP (9,7-12,0%) ili H₂O₂ (17,0-18,3%). Najjaču zaštitu kod primene SNP je pokazao ekstrakt vrste *V. jacquinii*, dok je najefikasniji u preživljavanju ćelija tretiranih sa H₂O₂ bio ekstrakt vrste *V. teucrium*. Praćenjem produkcije superoksid jona (O₂^{-*}), kao i intenziteta lipidne peroksidacije zaključeno je da je za ispoljeno neuroprotektivno delovanje ekstrakata kod primene SNP kao stresora odgovoran mehanizam "hvatanja" slobodnih radikala, dok kod primene H₂O₂ to nije bio slučaj.

Antiinflamatorni efekat acetonsko-vodenih ekstrakata određen je primenom *ex vivo* metode zasnovane na praćenju produkcije metabolita 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ kao proizvoda ciklooksigenaznog puta i 12-HETE kao proizvoda lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Ekstrakt herbe *V. urticifolia* je pokazao značajno veći potencijal inhibicije COX-1 enzima, dok je najsnažniju inhibiciju 12-LOX aktivnosti postigao ekstrakt vrste *V. jacquinii*. Obzirom da su svi ispitivani ekstrakti pokazali i snažno antioksidantno delovanje, može se pretpostaviti da takva njihova aktivnost delom doprinosi ispoljenom antiinflamatornom efektu.

Antitumorska svojstva ispitivanih ekstrakata procenjena su kod miševa sa Erlihovim ascitnim tumorom praćenjem zapremine ascitesa, broja tumorskih ćelija i njihove vijabilnosti. Svi primenjeni ekstrakti su statistički značajno smanjili zapreminu

ascitesa, dok je statistički značajno smanjenje ćelijske vijabilnosti primećeno samo nakon aplikacije *V. urticifolia* ekstrakta. Takođe, u grupama životinja koje su primale ekstrakte došlo je do blage redukcije broja tumorskih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom (bez statističkog značaja), ukazujući na njihov onkostatski efekat.

Antibakterijska aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata odabranih taksona roda *Veronica* testirana je bujon mikrodilucionim testom prema sojevima četiri Gram (+) i tri Gram (-) bakterije. Ispitivani ekstrakti su ispoljili umerenu do slabu aktivnost. Najizraženiji efekat prema većini testiranih mikroorganizama ispoljio je ekstrakt herbe *V. teucrium*.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije otvaraju put daljim istraživanjima u cilju primene ispitivanih vrsta u fitoterapiji kao prirodnih lekovitih sirovina.

Ključne reči: *Veronica jacquinii*, *V. teucrium*, *V. urticifolia*, morfološka karakterizacija, hemijska karakterizacija, farmakološka karakterizacija

Naučna oblast: Farmacija

Uža naučna oblast: Farmakognozija

UDK

Morphological, chemical and pharmacological characterization of selected *Veronica* L. species (Plantaginaceae)

Abstract

Morphological, chemical and pharmacological characterization of three taxa from genus *Veronica* L: *V. urticifolia* Jacq., *V. jacquinii* Baumg. i *V. teucrium* L., was performed. The selected species were only scarcely chemically investigated so far, while there is no information regarding their pharmacological effects.

To determine micromorphological and anatomical characteristics, microscopic analysis of pulverized aerial parts was conducted together with cross-sections of leaf and stem of selected *Veronica* species. Histochemical analysis revealed the presence of lipids, alkaloids, starch and phenolic compounds in selected species, while the application of fluorescence microscopy demonstrated that phenolic compounds are located in cuticle, trichomes and lignified cell walls in xylem of leaves and stems of investigated species.

Analysis of heavy metal contents by flame and electrothermal absorption spectroscopy techniques after microwave-assisted acid digestion of samples showed no significant differences in heavy metal concentrations between the tested plant species from the same location, indicating that their heavy metal uptake pattern was not species specific. The results of Cr content in aerial parts of *V. jacquinii* and *V. urticifolia* grown on serpentine soil confirmed that these species are promising Cr hyperaccumulator plants.

In the preliminary chemical analysis of methanolic, 70% aqueous acetone and water extracts of flowering aerial parts of investigated plant species, total contents of phenolics, phenylethanoids and iridoids have been determined using colorimetric methods. Since the spectrophotometric analysis revealed that aqueous acetone extracts are the richest with abovementioned classes of secondary metabolites, they were selected for further chemical and pharmacological investigation.

The content of aucubin and acteoside in aqueous acetone extracts of investigated taxa was determined using high performance liquid chromatography (HPLC) and high performance thin layer chromatography (HPTLC). Contrary to acteoside which was detected in all of the investigated extracts, aucubin was identified only in *V. urticifolia* extract. No significant differences between the conducted methods were observed.

Phenolic compounds in tested *Veronica* species were tentatively identified by HPLC-DAD-ESI/MS. In *V. urticifolia* and *V. teucrium* extracts flavones (apigenin, luteolin and isoscutellarein derivatives) provided a dominant fraction and derivatives of hydroxycinnamic acids were also observed (caffeic, *p*-coumaric and procatechuic acid). Derivatives of caffeic and procatechuic acids prevailed in extract of *V. jacquinii* aerial parts, while flavonols (quercetin derivatives) and flavones (luteolin and isoscutellarein derivatives) were also present. While acteoside was the most abundant compound in *V. jacquinii* and *V. urticifolia* extracts, in *V. teucrium* extract it was isoscutellarein 7-O-(6'''-O-acetyl)- β -allosyl-(1'''- \rightarrow 2''')- β -glucopyranoside.

Further information on qualitative composition of selected species was obtained using liquid chromatograph coupled with triple quadrupole tandem mass spectrometer with electrospray ion source. The content of quinic acid and 44 selected phenolic compounds

(14 phenolic acids, 25 flavonoids, 3 coumarins and 2 lignans) was investigated in aqueous acetone extracts. Compounds present in significant quantities were baicalin, hyperoside, isoquercetine, chlorogenic acid and quinic acid. Although in traces, the presence of isoflavonoid genistein was recorded for the first time in Plantaginaceae family, while this is the first report of the presence of coumarins in genus *Veronica*.

As the part of pharmacological investigation aqueous acetone extracts of tested *Veronica* species were evaluated for their antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, antitumour and antibacterial activity.

Antioxidant potential of 70% aqueous acetone extracts of selected *Veronica* species were estimated using two different *in vitro* assays: FRAP assay (total antioxidant activity) and DPPH assay (antiradical activity). All of the extracts exhibited strong free radical scavenging activity, as well as total antioxidant activity. The highest reducing power as well as free-radical scavenging capacity were shown for *V. teucrium* extract.

The results obtained from *in vitro* analysis were confirmed with *in vivo* tests using CCl₄-induced hepatotoxicity model in rats. Based on the results from multiple assay systems (TBA-RS, GSH, GR, GSHPx, XOD, CAT and Px) after treatment with tested extracts in combination with CCl₄ we demonstrated their protective role in oxidative stress. According to the results obtained for the values of TBA-RS and GSH content it can be concluded that antioxidant effects of *V. jacquinii* and *V. teucrium* species were similar to each other and higher than that of *V. urticifolia*, which is in accordance with the results from *in vitro* tests.

Neuroprotective effect of 70% aqueous acetone extracts was evaluated on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. The influence of extracts on survival of stressed cells was assessed by acid phosphatase assay. All extracts exhibited modest protective activity by increasing cell survival in cells stressed with SNP (9-12%) and H₂O₂ (16-21%), compared to non-treated cells. The strongest protection against SNP-induced cellular damage was achieved with *V. jacquinii* extract, while the highest survival rate after exposure of cells to H₂O₂ was noticed after treatment with *V. teucrium* extract. Neuroprotection on cells stressed with SNP was accompanied by the reduction in amount of superoxide radicals and index of lipid peroxidation, while in the case of H₂O₂ application this was not the case.

The anti-inflammatory potential of 70% acetone aqueous extracts was determined using *ex vivo* method based on monitoring of the production of 12-HHT, TXB₂ i PGE₂ and 12-HETE as main arachidonic acid metabolites formed by enzymes COX-1 and 12-LOX. *V. urticifolia* extract exerted the strongest COX-1 inhibition, while *V. jacquinii* extract exhibited the highest ability to inhibit 12-LOX activity. Since all of the tested extracts exhibited also strong antioxidant activity, it can be assumed that showed antioxidant properties contributed to observed anti-inflammatory activity.

Antitumour activity of investigated extracts was assessed in Ehrlich ascites carcinoma (EAC) model by parameters such as ascites volume, tumour cell count and cell viability. All of the investigated extracts statistically significantly decreased the ascites volume, while statistically significant decrease of cell viability was observed only after administration of *V. urticifolia* extract. Also, application of tested extracts led to slight but insignificant reduction of number of tumour cells as compared to control group, demonstrating oncostatic activity.

Antibacterial activity of 70% aqueous acetone extracts of selected *Veronica* species was investigated using microbroth dilution assay against four G (+) and three G

(-) bacterial strains. Investigated extracts expressed low to moderate activity. *V. teucrium* extract showed the most pronounced inhibitory effect against most of the tested microorganisms.

The results obtained within the framework of this doctoral dissertation suggest the areas for further research aiming to implement investigated species as phytotherapy medicines.

Keywords: *Veronica jacquinii*, *V. teucrium*, *V. urticifolia*, morphological characterisation, chemical characterisation, pharmacological characterisation.

Academic expertise: Pharmacy

Major in: Pharmacognosy

UDK

Sadržaj

<u>UVOD</u>	1
1. Položaj roda <i>Veronica</i> L. u sistemu klasifikacije, rasprostranjenje i opis	2
1.1. Zastupljenost vrsta roda <i>Veronica</i> u Flori Evrope i Flori Srbije	4
1.2. Odabrane vrste roda <i>Veronica</i>	6
1.2.1. <i>Veronica urticifolia</i> Jacq.	6
1.2.2. <i>Veronica jacquinii</i> Baumg.	8
1.2.3. <i>Veronica teucrium</i> L.	10
2. Tradicionalna upotreba vrsta roda <i>Veronica</i>	12
3. Sekundarni metaboliti vrsta roda <i>Veronica</i>	16
3.1. Flavonoidi	16
3.1.1. Flavonoidni aglikoni	17
3.1.2. Flavonoidni glikozidi	23
3.2. Iridoidi	32
3.3. Feniletanoidni glikozidi	42
3.4. Ostale grupe jedinjenja roda <i>Veronica</i>	50
4. Dosadašnja proučavanja sadržaja teških metala u vrstama roda <i>Veronica</i> L.	50
5. Dosadašnja farmakološka proučavanja vrsta roda <i>Veronica</i>	52
6. Slobodni radikali i oksidativni stres	53
6.1. Oksidativni stres i neurodegenerativne bolesti	54
6.2. Oksidativni stres i inflamacija	55
6.3. Oksidativni stres i kancerogeneza	56
<u>CILJ</u>	57
<u>MATERIJAL I METODE</u>	59
1. Biljni materijal	60
2. Instrumenti i operativni uslovi	64
3. Priprema ekstrakata	65
4. Morfološko-anatomska karakterizacija	67
4.2. Mikroskopska analiza	67
4.3. Histochemijska analiza	67
4.4. Fluorescentna mikroskopija	67
5. Hemijska analiza	68
5.1. Određivanje sadržaja teških metala u biljnim i uzorcima zemljišta	68
5.1.1. Određivanje kiselosti zemljišta	68
5.1.2. Mikrotalasna digestija	68
5.1.3. Atomska apsorpciona spektrometrija	68
5.2. VIS spektrofotometrijske metode	69

5.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola	69
5.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenilpropanoida	69
5.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih iridoida	70
5.3. Kvantitativna HPTLC analiza aukubina i akteozida	70
5.4. Kvantitativna HPLC analiza aukubina i akteozida	71
5.5. HPLC-DAD/ESI-MS analiza	71
5.6. Kvantitativna LC-MS/MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja	72
6. Farmakološka analiza	76
6.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	76
6.1.1. <i>In vitro</i> ispitivanje antioksidantne aktivnosti	76
6.1.1.1. Ispitivanje ukupne antioksidantne aktivnosti (FRAP test)	77
6.1.1.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala	78
6.1.2. <i>In vivo</i> ispitivanje antioksidantne aktivnosti	79
6.1.2.1. Eksperimentalne životinje	79
6.1.2.2. Postupak <i>in vivo</i> ispitivanja	79
6.1.2.3. Biohemijska ispitivanja	80
6.1.2.4. Statistička analiza	83
6.2. Ispitivanje neuroprotektivne aktivnosti	83
6.2.1. Čelijska linija	83
6.2.2. Određivanje vijabilnosti ćelija testom kisele fosfataze	84
6.2.3. Određivanje indeksa lipidne peroksidacije	84
6.2.4. Merenje produkcije superoksidnih jona	84
6.2.5. Statistička analiza	84
6.3. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti	85
6.3.1. Priprema uzoraka	85
6.3.2. LC-MS/MS analiza	86
6.3.3. Statistička analiza	87
6.4. <i>In vivo</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti	87
6.4.1. Statistička analiza	88
6.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	88
6.5.1. Kultivacija mikroorganizama	89
6.5.2. Bujon mikrodilucioni test	89
6.5.3. Statistička analiza	90
<u>REZULTATI I DISKUSIJA</u>	91
1. Morfološka analiza	92
1.1. Mikroskopska analiza spraćenog biljnog materijala	92
1.2. Anatomsko-morfološka analiza poprečnih preseka	94
1.2.1. <i>Veronica urticifolia</i>	94
1.2.2. <i>Veronica jacquinii</i>	97
1.2.3. <i>Veronica teucrium</i>	97

1.3. Histochemijska analiza	102
1.4. Flurescentna mikroskopija	106
2. Hemijska analiza	110
2.1. Analiza sadržaja teških metala u biljnim i uzorcima zemljišta	110
2.1.1. Analiza teških metala u biljnim uzorcima	110
2.1.2. Analiza teških metala u zemljištu	113
2.1.3. Korelaciona analiza	115
2.2. Analiza sadržaja aktivnih komponenti odabranih <i>Veronica</i>	119
vrsta	119
2.2.1. Kolorimetrijske tehnike	119
2.2.1.1. Sadržaj ukupnih polifenola	119
2.2.1.2. Sadržaj ukupnih fenilpropanoida	120
2.2.1.3. Sadržaj ukupnih iridoida	121
2.2.2. Određivanje sadržaja sekundarnih metabolite primenom	122
hromatografskih metoda	122
2.2.2.1. Određivanje sadržaja aukubina i akteozida	122
primenom HPLC i HPTLC metoda	122
2.2.2.2. Analiza fenolnih jedinjenja primenom LC-	133
DAD/ESI-MS metode	133
2.2.2.3. Kvantitativna LC-MS/MS analiza odabranih	146
fenolnih jedinjenja	146
3. Farmakološka analiza	155
3.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti	155
3.1.1. <i>In vitro</i> ispitivanje antioksidantne aktivnosti	155
3.1.2. <i>In vivo</i> ispitivanje antioksidantne aktivnosti	158
3.2. Ispitivanje neuroprotektivne aktivnosti	167
3.3. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti	174
3.4. <i>In vivo</i> ispitivanje citotoksične aktivnosti	184
3.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti	187
8. <u>ZAKLJUČCI</u>	190
9. <u>LITERATURA</u>	192

UVOD

1. Položaj roda *Veronica* L. u sistemu klasifikacije, rasprostranjenje i opis

Red Lamiales u okviru cvetnica obuhvata nekoliko velikih i dobro poznatih familija. Dugo se smatralo da je kosmopolitska familija Scrophulariaceae najveća među njima, međutim odsustvo zajedničkih karakteristika za taksone koji joj pripadaju ukazalo je na mogućnost njenog polifiletskog porekla (Olmstead, 2001). Ubrzo nakon pojave ove hipoteze, rod *Veronica*, familije Scrophulariaceae, postao je predmet većeg broja taksonomskih studija u cilju njegovog odgovarajućeg pozicioniranja.

Na osnovu molekularnih istraživanja, familija Scrophulariaceae je podeljena i jedan broj rodova prebačen je u familiju Plantaginaceae (Albach i sar., 2005a). Predložena je i nova klasifikacija roda *Veronica* prema kojoj je podeljen na 13 podrodova i koja se značajno razlikuje od prethodne zasnovane isključivo na morfološkim karakterima (Albach i sar., 2004). I rezultati hemotaksonomskih istraživanja su potvrdili odnose uspostavljene novom klasifikacijom. Primenjivani su različiti hemotaksonomski karakteri iz grupe flavonoidnih glikozida i iridoidnih glukozida (Grayer-Barkmeijer, 1973; Grayer-Barkmeijer, 1978; Taskova i sar., 2002; Taskova i sar., 2004). Dakle, prema poslednjoj klasifikaciji skrivenosemenica (Angiosperm Phylogeny Group, 2003) rod *Veronica* sa oko 450 vrsta predstavlja najveći rod familije Plantaginaceae. Vrste roda *Veronica* su rasprostranjene širom sveta sa centrima diverziteta u zapadnoj Aziji, na Novom Zelandu (Albach i Meudt, 2010), centralnoj i južnoj Evropi i Turskoj (Albach i sar., 2003). Rod *Veronica* čine biljne vrste različitih životnih formi (od jednogodišnjih zeljastih do niskog drveća) i staništa (od polupustinjskih do vodenih; tropskih do polarnih i od nadmoskih visina bliskih nivou mora do alpskih) (Albach i Meudt, 2010). Nekoliko vrsta roda, kao kosmopolitski korovi, poseduje i ekonomski značaj (Albach i Chase, 2001).

Na osnovu molekularnih istraživanja rod *Veronica* podeljen je na 13 podrodova (Albach i sar., 2004):

- *Veronica* subg. *Veronica*;
- *Veronica* subg. *Beccabunga*;
- *Veronica* subg. *Pseudolysimachium*;

- *Veronica* subg. *Synthyris*;
- *Veronica* subg. *Cochlidiosperma*;
- *Veronica* subg. *Pellidosperma*;
- *Veronica* subg. *Stenocarpon*;
- *Veronica* subg. *Pocilla*;
- *Veronica* subg. *Pentasepalae*;
- *Veronica* subg. *Chamaedrys*;
- *Veronica* subg. *Derwentia*;
- *Veronica* subg. *Hebe*;
- *Veronica* subg. *Triangulicapsula*.

Predstavnici roda *Veronica* su jednogodišnje ili višegodišnje zeljaste biljke, ređe polužbunovi. Stabljika je uspravna, puzi po zemlji ili se izdiže. Listovi su naspramni, retko u pršljenovima. Cvetovi su zigomorfni, pojedinačni, nalaze se u pazuhu listova ili su složeni u vršne ili bočne grozdaste ili klasaste cvasti. Čašica je najčešće duboko deljena na 4-5 režnjeva, dok je krunica sa sraslim kruničnim listićima. Krunična cev je valjkasta, kratka ili skoro neprimetna; otvor krunice je tanjirast ili zvonast, duboko deljen na 4-5 režnjeva, režnjevi se po veličini malo razlikuju. Dva su prašnika, prašnički konci su učvršćeni za kruničnu cev, kraći ili duži od krunice, prašnica je sa dve paralelne, razdvojene ili na vrhu spojene poluprašnice. Stubić je različite dužine, žig je glavičast. Plod je čaura sa dva okca, uglavnom bočno spljoštena, ređe je naduvena, na vrhu je često više ili manje duboko usečena, sa stubićem u urezu, gola ili pokrivena dlakama, glatka ili sa istaknutim, mrežasto povezanim nervima. Seme može biti različitih oblika i veličine (Diklić, 1974). Osnovne razlike vrsta roda *Veronica* podrazumevaju životnu formu (višegodišnje ili jednogodišnje; zeljaste ili polužbunaste), položaj cvasti (lateralno ili terminalno postavljene), laminu lista (velika ili mala; linearna, nedeljena ili deljena), veličinu krunice, oblik semena (ravno ili izdubljeno) i indumentum (struktura dlaka, glandularne ili neglandularne).

1.1. Zastupljenost vrsta roda *Veronica* u Flori Evrope i Flori Srbije

Prema Waltersu i Webbu (1972), u Flori Evropi zabeležene su 62 vrste roda *Veronica* u okviru 5 sekcija (**Tabela 1**).

Tabela 1. Rod *Veronica* u Flori Evrope (Walters i Webb, 1972)

Sekcija <i>Veronica</i>	Sekcija <i>Pocilla</i>	Sekcija <i>Veronicastrum</i>
<i>V. allionii</i> Vill.	<i>V. acinifolia</i> L.	<i>V. alpina</i> L.
<i>V. aphylla</i> L.	<i>V. agrestis</i> L.	<i>V. bellidioides</i> L.
<i>V. aragonensis</i> Stroh.	<i>V. arvensis</i> L.	<i>V. erinoides</i> Boiss. & Sprunen
<i>V. austriaca</i> L.	<i>V. aznavourii</i> Dörfler	<i>V. fruticans</i> Jacq.
<i>V. baumgartenii</i> Roem. & Schult.	<i>V. chamaepithyoides</i> Lam.	<i>V. fruticulosa</i> L.
<i>V. chamaedrys</i> L.	<i>V. cymbalaria</i> Bodard	<i>V. gentianoides</i> Vahl.
<i>V. dabneyi</i> Hochst.	<i>V. dillenii</i> Crantz	<i>V. fruticulosa</i> L.
<i>V. melissifolia</i> Poiret	<i>V. filiformis</i> Sm.	<i>V. nummalaria</i> Gouan.
<i>V. micrantha</i> Hoffmanns. & Link	<i>V. glauca</i> Sibth. & Sm.	<i>V. ponae</i> Gouan.
<i>V. montana</i> L.	<i>V. grisebachii</i> Walters	<i>V. saturejoides</i> Vis.
<i>V. multifida</i> L.	<i>V. hederifolia</i> L.	
<i>V. officinalis</i> L.	<i>V. opaca</i> Fries	Sekcija <i>Beccabunga</i>
<i>V. orientalis</i> Miller	<i>V. peregrina</i> L.	<i>V. anagallis-aquatica</i> L.
<i>V. pectinata</i> L.	<i>V. persica</i> Poiret	<i>V. anagalloides</i> Guss.
<i>V. peduncularis</i> Bieb.	<i>V. polita</i> Fries	<i>V. beccabunga</i> L.
<i>V. prostrata</i> L.	<i>V. praecox</i> All.	<i>V. catenata</i> Pennell
<i>V. rhodopaea</i> (Velen.) Degen	<i>V. triphyllos</i> L.	<i>V. scardiaca</i> Griseb.
<i>V. rosea</i> Desf.	<i>V. verna</i> L.	
<i>V. scutellata</i> L.		
<i>V. tenuifolia</i> Asso	Sekcija <i>Pseudolysimachium</i>	
<i>V. thessalica</i> Bentham	<i>V. bachofenii</i> Heuffel	
<i>V. thymifolia</i> Sibth & Sm.	<i>V. longifolia</i> L.	
<i>V. turrilliana</i> Stoj. & Stefanov	<i>V. paniculata</i> L.	
<i>V. urticifolia</i> Jacq.	<i>V. spicata</i> L.	

U spontanoj flori Srbije zabeležene su 43 *Veronica* vrste u okviru 5 sekcija (Diklić, 1974) (Tabela 2).

Tabela 2. Rod *Veronica* u Flori Srbije (Diklić, 1974)

Sekcija Diplophyllum	Sekcija Pseudolysimachion
<i>V. agrestis</i> L.	<i>V. andrasovszkyi</i> Jav.
<i>V. hederifolia</i> L.	<i>V. crassifolia</i> Wierzb.
<i>V. opaca</i> Fr.	<i>V. incana</i> L.
<i>V. persica</i> Poir.	<i>V. longifolia</i> L.
<i>V. polita</i> Fr.	<i>V. orchidea</i> Crantz
	<i>V. spicata</i> L.
	<i>V. spuria</i> L.
Sekcija Beccabunga	Sekcija Veronicastrum
<i>V. anagallis-aquatica</i> L.	<i>V. acinifolia</i> L.
<i>V. anagalloides</i> Guss.	<i>V. alpina</i> L.
<i>V. aquatica</i> Bernh.	<i>V. arvensis</i> L.
<i>V. beccabunga</i> L.	<i>V. balcanica</i> Vel.
<i>V. scardica</i> Gris.	<i>V. bellidioides</i> L.
	<i>V. dillenii</i> Crantz
	<i>V. fruticans</i> Jacq.
	<i>V. peregrina</i> L.
	<i>V. praecox</i> All.
	<i>V. satureoides</i> Visiani
	<i>V. serpyllifolia</i> L.
	<i>V. triphyllos</i> L.
	<i>V. verna</i> L.
Sekcija Veronica	
<i>V. aphylla</i> L.	
<i>V. austriaca</i> L.	
<i>V. baumgartenii</i> Roem & Scult.	
<i>V. chamaedrys</i> L.	
<i>V. crinita</i> Kit.	
<i>V. jacquinii</i> Baumg.	
<i>V. montana</i> L.	
<i>V. officinalis</i> L.	
<i>V. orsiniana</i> Ten.	
<i>V. prostrata</i> L.	
<i>V. scutallata</i> L.	
<i>V. teucrium</i> L.	
<i>V. urticifolia</i> Jacq.	

1.2. Odabrane vrste roda *Veronica*

U okviru ove doktorske disertacije, ispitane su tri vrste roda *Veronica*, široko rasprostranjene na teritoriji Srbije: *V. urticifolia* Jacq., *V. jacquinii* Baumg., *V. teucrium* L.

1.2.1. *Veronica urticiolia* Jacq. (syn. *V. latifolia* L.)

Vrsta *V. urticifolia* (veličje) (**Slika 1**) je višegodišnja biljka sa razgranatim, puzećim rizomom. Stabljika je visine 10-50 (70) cm, uspravna ili se izdiže, nerazgranata, sa svih strana ravnomerno pokrivena kratkim dlakama ili gola, ređe je u gornjem delu pokrivena žlezdanim dlakama. Listovi su naspramni, široko jajasti, duž oboda grubo oštro nazubljeni, na licu i na naličju proređeno pokriveni dlakama. Donji listovi su mali, okruglasti i na vrhu šiljati sa kratkom lisnom drškom, pri osnovi zaokrugljeni, dok su srednji i gornji listovi znatno veći, dužine 4-8 cm, širine 2-5 cm, pri osnovi skoro asimetrični i plitko srcasto urezani, sedeći, na vrhu šiljati. Cvetovi su složeni u 2-5 naspramnih, rastresitih grozdastih cvasti; drške cvasti su kose i polaze iz pazuha gornjih listova stabla. Priperci su lancetasti do linearni, 1,5-3 puta kraći od cvetnih drški. Cvetne drške su srazmerno dugačke, 2-3 puta duže od čašice, kao i osovina cvasti pokrivena su žlezdanim dlakama, u vreme plodonošenja naniže savijene. Čašica je deljenja u 4 nejednaka, lancetasta režnja, pokrivena duž oboda žlezdanim dlakama. Krunica je tanjirasta, široka 4-7 mm, blede ružičasta, vrlo retko bela, deljena na nejednake režnjeve pokrivena duž oboda trepljama. Čaura je skoro okrugla, bočno spljoštena, na vrhu plitko usečena, dugačka oko 3 mm, pokrivena proređeno žlezdanim dlakama. Seme je žučkasto, štitastog oblika, dugačko oko 1 mm.

Cveta od juna do avgusta.

Raste u šumama i šikarama, na stenama, u planinskom i subalpijskom pojasu. Pripada alpsko-balkanskm vrstama.

U Srbiji je široko rasprostranjena, i zabeležena je u mnogim vlažnim lišćarskim i četinarskim šumama (Diklić, 1974).



Slika 1. *Veronica urticifolia*

1.2.2. *Veronica jacquinii* Baumg. (syn. *V. multifida* Kern, Scop., Vel., Petrović; *V. pinnatifida* Andrae; *V. austriaca* L. subsp. *Jacquinii* (Baumg.) Maly)

Vrsta *V. jacquinii* (**Slika 2**) je višegodišnja zeljasta biljka sa kosim, valjkastim rizomom. Stabljike mogu biti mnogobrojne, ili samo jedna, uspravna, visine (10) 30-70 cm, ređe izdignuta. Stabljika je pokrivena sivim dlakama, katkad manje ili više gola. Listovi su okruglasti ili široko lancetasti, perasto isečeni, perasto ili dvojno perasto deljeni, režnjevi su uzani, linearni ili linearno lancetasti, duž oboda nenazubljeni ili nazubljeni, više ili manje uvijeni, pokriveni dlakama ili ređe goli. Listovi sterilnog dela izdanka na vrhu stabljike su manje deljeni ili skoro celi. Cvetovi su složeni u 2-4 bočne, naspramne, u kasnijem stadijumu razvoja izdužene grozdaste cvasti, čije drške polaze iz pazuha gornjih listova stabla. Čašica je deljena u 4, ređe 5 linearno lancetastih, nejednakih režnjeva. Krunica je tanjirasta, širine 7-10 mm, intenzivno plave boje, režnjevi krunice su nejednaki, jajasti. Čaura je spljoštena, okruglasto, obrnuto srcasta, na vrhu usečena, široka 4-5 mm, dugačka kao i čašica ili malo duža, pri osnovi je zaokrugljena, pokrivena dlakama ili gola, stubić je skoro 2 puta duži od čaure. Seme je spljošteno, skoro okruglo.

Cveta od juna do jula.

Raste na osunčenim, sušnim mestima, na kamenjarima, pašnjacima, u šibljacima. Najčešće učestvuje u izgradnji kserofilnih biljnih zajednica, na krečnjaku i serpentinu. Pripada pontsko-balkansko-kavkavskim vrstama.

U Srbiji je rasprostranjena vrsta (Diklić, 1974).



Slika 2. *Veronica jacquinii*

1.2.3. *Veronica teucrium* L. (syn. *V. latifolia* Pančić; *V. pseudochamedrys* Jacq.;
V. teucrium L. subsp. *pseudochamaedrys* (Jacq.) Nym.)

Vrsta *V. teucrium* (Slika 3) je višegodišnja zeljasta biljka sa valjkastim, čvornovatim, puzećim i razgranatim rizomom. Stabljika (manji broj, ređe samo jedna) visine 30-70 (100) cm, je uspravna, ili se izdiže, pokrivena manje više proređenim dlakama, sterilni izdanci su uspravni. Listovi su sedeći, okruglasto jajasti, jajasti do lancetasti, dužine 3-5,5 cm, širine 1,5-2,5 cm, pri osnovi su zaobljeni ili odsečeni do plitko srcasto urezani, tako da skoro obuhvataju stabljiku, na vrhu su šiljati, duž oboda grubo tupo testerasto nazubljeni. Na licu su pokriveni proređenim priljubljenim dlakama ili skoro goli, dok su na naličju, naročito duž nerava, pokriveni kovrdžavim dlakama. Listovi sterilnog dela izdanka su na vrhu stabljike uži i testerasto nazubljeni. Cvetovi su složeni u bočne, naspramne, u početku zbijene, a kasnije jako izdužene cvasti, dužine 6-15 cm; drške cvasti polaze iz pazuha gornjih listova stabla. Čašica je gola ili pokrivena proređenim dlakama, deljena je u 5 nejednakih, linearno lancetastih režnjeva, dužine 3-4 mm. Krunica je tanjirasta, širine 10-13 mm, azurno plave boje, režnjevi krunice su nejednaki, donji je najmanji i najtanji. Čaura je obrnuto srcasta ili okruglasta, na vrhu je plitko urezana, pri osnovi je više manje zaokrugljena, gola ili pokrivena dlakama. Seme je štitastog oblika.

Cveta od maja do jula.

Raste na padinama pokrivenim žbunjem, u šikarama, kserotermnim šumama, na livadama, od nizija do subalpijskog pojasa. Pripada evroazijskim vrstama, rasprostranjena je u srednjoj i južnoj Evropi, na Kavkazu, Sibiru, Armeniji.

U Srbiji je zabeležena u većem broju šumskih i livadskih zajednica (Diklić, 1974).



Slika 3. *Veronica teucrium* L.

(<http://www.actaplantarum.org/acta/galleria1.php?id=3403>)

2. Tradicionalna upotreba vrsta roda *Veronica*

Među vrstama roda *Veronica* najpoznatija i najčešće korišćena u tradicionalnoj medicini je kosmopolitska vrsta *V. officinalis* (čestoslavica, razgon, trava od ušljeme, propinjača, ljudska vernost, zmijina čestoslavica, verolima)¹. Još u XVI i XVII veku ova vrsta primenjivana je kod renalne litijaze, kolika, poremećaja gastrointestinalnog i respiratornog trakta (Gründemann i sar., 2013). Čajkanović (1985) u „Rečniku srpskih narodnih verovanja o biljkama“ pominje razgon kao „lek od glavobolje (privija se pelenom), kao i za ranu kada se podljuti“. Danas se infuz pripremljen od osušenog nadzemnog dela čestoslavice u Bugarskoj upotrebljava kao apetizer, antitusik, antiinflamatorni ekspektorans u terapiji astme i faringitisa, a u Italiji kao diuretik i za umirenje kožnih iritacija (Leporatti i Ivancheva, 2003). U tradicionalnoj medicini Španije ova biljka koristi se u lečenju ekcema (Pardo De Santayana i sar., 2005), kao laksans (Rigat i sar., 2007) i ekspektorans (Rigat i sar., 2013), a u Rumuniji kod renalnih i respiratornih poremećaja, kao i spolja u lečenju rana (Gründemann i sar., 2013) U oblasti crnogorskih Prokletija herba čestoslavice primenjuje se interno kod bronhitisa i reumatskih bolova, a spolja kod rana i različitih kožnih oboljenja (Menković i sar., 2011). U Srbiji je zabeležena njena primena kao ekspektoransa u kombinaciji sa drugim biljnim vrstama, kao blagog diuretika i kod bolova u stomaku (Jarić i sar., 2007). U Austriji se *V. officinalis* koristi interno u obliku čaja kod oboljenja nervnog, respiratornog i kardiovaskularnog sistema, kao i kod poremećaja metabolizma (Vogl i sar., 2013).

U **Tabeli 3** navedena je primena i nekih drugih vrsta ovog roda u narodnoj medicini.

Za biljke koje predstavljaju predmet ove doktorske disertacije nisu nađeni podaci o tradicionalnoj upotrebi.

¹ Konjević i Tatić, 2006 – Rečnik naziva biljaka

Tabela 3. Primena nekih vrsta roda *Veronica* u narodnoj medicini

Vrsta	Zemlja	Deo biljke	Oblik primene	Primena	Referenca
<i>V. anagallis-aquatica</i> L.	Iran	Herba	Dekokt	Kod opekotina	Mosaddegh i sar., 2012
	Južnoafrička Republika	List	-	Kod karcinoma i bolova u leđima; kao kupka kod umornih stopala	De Beer i Van Wyk, 2011
	Turska	Herba	Suva biljka se kuva u mleku i primenjuje kao obloga	Kod reumatskih bolova	Harput i sar., 2004
	Kina			Kod prehlade i trbušne kile	Küpeli i sar., 2005
<i>V. austriaca</i> L.	Bosna i Hercegovina	Herba, cvet, list	-	Kod tuberkuloze, glavobolje, bolova u stomaku, opstipacije i čireva	Šarić-Kundalić i sar., 2011
	Španija	Herba	-	Kod glavobolje	Agelet i Vallés, 2001
<i>V. beccabunga</i> L.	Italija	Herba	Dekokt, sveža biljka	Diuretik	Pieroni i sar., 2004

<i>V. cephaloides</i> Pennell	Butan	Herba	-	Za zaustavljanje krvarenja, ublažavanje čireva i obnovljanje oštećenih ćelija. Za snižavanje temperature udružene sa ranama	Wangchuk i sar., 2011
<i>V. chamaedrys</i> L.	Bosna i Hercegovina	Herba, cvet, list	-	Kod tuberkuloze, glavobolje, bolova u stomaku, opstipacije i čireva	Šarić-Kudalić i sar., 2011
	Austrija	Herba		Kod oboljenja nervnog, respiratornog i kardiovaskularnog sistema, kao i kod poremećaja metabolizma	Vogl i sar., 2013
<i>V. cymbalaria</i> Bodard	Italija	Herba	Dekokt	Antimalarik	De Natale i Pollio, 2007
<i>V. incana</i> L.	Mongolija, Rusija	Herba		Kod oboljenja kardiovaskularnog sistema, digestivnog trakta, bubrega, poremećaja metabolizma, i neuroza. Spolja kod akni, apscesa, dermatitisa i opekotina	Gusev i Nemereshina, 2005
	Ukrajina	Herba		Kod prehlade i povišenog krvnog pritiska	
<i>V. kotschyana</i> Benth.	Nigerija	Koren	-	Kod dijareje	Etuk i sar., 2009

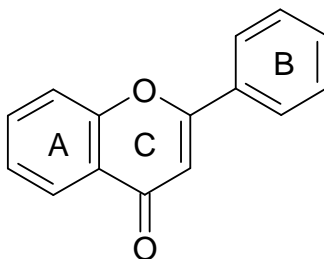
<i>V. orientalis</i> Miller	Turska	Herba	Infuz	Kod kamena u bubregu i respiratornih oboljenja	Altundag i Ozturk, 2011
<i>V. peregrina</i> L.	Kina			Kod dismenoreje, različitih krvarenja i preloma	Kwak i sar., 2009
	Koreja			Kod čira na želucu	Jeon, 2012
<i>V. serpyllifolia</i> L.	Španija	Herba	Dekokt	Kod infekcije oka	Rigat i sar., 2007
<i>V. undulata</i> Wall.	Kina	Cela biljka	Dekokt	Za zaustavljanje krvarenja, kod zapušenog nosa i menstrualnih bolova	Weckerle i sar., 2009

3. Sekundarni metaboliti vrsta roda *Veronica*

Medicinski značaj i interes za taksonomiju roda *Veronica* bili su podstrek za njegova intenzivna fitohemijska ispitivanja. Morfološka raznovrsnost, različiti ekološki faktori i hibridizacija uslovali su veliku raznovrsnost u strukturi sekundarnih metabolita prisutnih u vrstama ovog roda. Dosadašnja fitohemijska ispitivanja ukazala su na prisustvo iridoidnih glukozida, feniletanoidnih i flavonoidnih glikozida (Chari i sar., 1981; Harput i sar., 2002a; Harput i sar., 2002b; Harput i sar., 2002c; Harput i sar., 2003; Saracoglu i sar., 2002; Taskova i sar., 1998; Taskova i sar., 2002).

3.1. Flavonoidi

Flavonoidi predstavljaju najveću grupu polifenola biljaka. U osnovi molekula aglikona kod ove grupe jedinjenja nalazi se 2-fenil-benzo- γ -piron (flavon) (**Slika 4**). Do danas je opisano više od 8000 različitih flavonoida (Kuntić i sar., 2014) koji se, u zavisnosti od stepena oksidacije centralnog pironovog prstena, mogu klasifikovati u nekoliko grupa: flavoni, flavonoli, flavanoni, izoflavoni, flavanoli i antocijani (Anand i Singh, 2013). Flavonoidi se često koriste kao markeri u hemosistematici zahvaljujući njihovoj hemijskoj stabilnosti (može se koristiti i herbarski, ne samo živi materijal), velikom strukturnom diverzitetu, relativno lakoj identifikaciji i gotovo univerzalnom prisustvu u višim biljkama (Pavlović, 2008).



Slika 4. Struktura flavona

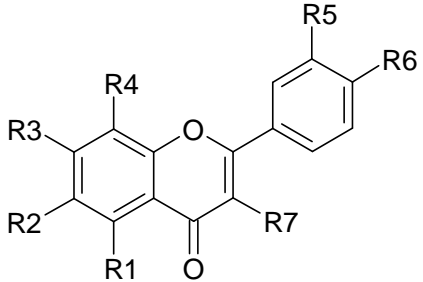
3.1.1. Flavonoidni aglikoni

Aglikoni flavonoida kao lipofilna jedinjenja imaju ograničenu distribuciju u biljkama u poređenju sa njihovim hidrosolubilnim glikozidima koji su karakteristični za većinu angiospermi. Ovi aglikoni obično su akumulirani na površini listova i drugih nadzemnih organa, u obliku eksudata ili su rastvoreni u lipofilnom matriksu. Smatra se da je njihova distribucija na površini lista uslovljena hemo-ekološkom funkcijom (zaštita od zagrevanja i UV zračenja, antimikrobna i alelopatska aktivnost, kao i odbijanje insekata) (Nikolova i sar., 2005). Ovo je potvrđeno i u okviru roda *Veronica*. Naime, u uzorcima sakupljenim na većim nadmorskim visinama uočena je kompleksnija smeša aglikona u poređenju sa uzorcima sa nižih nadmorskih visina. Takođe, značajna akumulacija ovih jedinjenja primećena je kod kserofitnih vrsta (Nikolova i sar., 2005).

Slobodni aglikoni izolovani iz vrsta roda *Veronica* uglavnom su flavonski, uz značajan broj metilovanih derivata flavonola (**Tabela 4**). Apigenin i luteolin su najčešći površinski aglikoni, praćeni metilovanim derivatima: apigenin 4'-metilestrom, apigenin 7,4'-dimetilestrom i luteolin-3'-metilestrom. Nešto ređi u *Veronica* vrstama su luteolin-7,4'-dimetil estar, kao i 6-metoksi flavoni skutelarein 6,7,4'-trimetil estar i 6-hidroksi luteolin 6,7,3'-trimetil estar (Nikolova i sar., 2005).

Struktura nekih flavonoidnih aglikona izolovanih iz nadzemnih delova vrsta roda *Veronica* data je u **Tabeli 4**.

Tabela 4. Flavonoidni aglikoni vrsta roda *Veronica*

Aglikon	Podrod	Biljna vrsta	Referenca
			
<p>Apigenin</p> <p>(R₁=R₃=R₆=OH, R₂=R₄=R₅=R₇=H)</p>	<p><i>Pentasepale</i></p>	<p><i>V. turrilliana</i>, <i>V. teucrium ssp. teucrium</i>, <i>V. teucrium ssp. crinite</i>, <i>V. austriaca ssp. jacquinii</i>, <i>V. austriaca ssp. tenuissiana</i>, <i>V. multifida</i></p>	<p>Nikolova i sar., 2005</p>
		<p><i>V. prostrata</i></p>	<p>Nikolova i sar., 2002</p>
	<p><i>Pocilla</i></p>	<p><i>V. persica</i>, <i>V. polita</i>, <i>V. triphyllos</i>, <i>V. praecox</i></p>	<p>Nikolova i sar., 2005</p>
	<p><i>Chamaedrys</i></p>	<p><i>V. chamaedrys</i>, <i>V. vindobonensis</i>, <i>V. orbelica</i>, <i>V. krumovii</i>, <i>V. arvensis</i>, <i>V. verna</i></p>	
	<p><i>Stenocarpon</i></p>	<p><i>V. fruticulosa</i>, <i>V. fruticans</i>, <i>V. kellererii</i></p>	

	<i>Cochlidiosperma</i>	<i>V. hederifolia</i> , <i>V. sublobata</i> , <i>V. triloba</i> , <i>V. cymbalaria</i> ,	
	<i>Veronica</i>	<i>V. alpine</i> , <i>V. bellidioides</i> , <i>V. officinalis</i> , <i>V. urticifolia</i>	
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. beccabunga</i> , <i>V. scardica</i> , <i>V. serpyllifolia</i> <i>V. acinifolia</i>	
	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. spicata</i>	Gusev i sar., 1978
Apigenin 4'-metil etar - akacetin (R ₁ =R ₃ =OH, R ₂ =R ₄ = R ₅ =R ₇ =H, R ₆ =OCH ₃)	<i>Pentasepale</i>	<i>V. turrilliana</i> , <i>V. austriaca ssp. jacquinii</i> , <i>V. multifida</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i> , <i>V. polita</i> , <i>V. praecox</i>	
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. chamaedrys</i> , <i>V. vindobonensis</i> , <i>V. orbelica</i> , <i>V. krumovii</i> , <i>V. arvensis</i> , <i>V. verna</i>	
	<i>Cochlidiosperma</i>	<i>V. hederifolia</i> , <i>V. sublobata</i> , <i>V. triloba</i>	
	<i>Veronica</i>	<i>V. bellidioides</i> , <i>V. officinalis</i>	
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. beccabunga</i> , <i>V. scardica</i> , <i>V. serpyllifolia</i>	
Apigenin 7,4'-dimetil etar (R ₁ =OH, R ₂ =R ₄ = R ₅ =R ₇ =H,	<i>Pentasepale</i>	<i>V. austriaca ssp. jacquinii</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i> , <i>V. polita</i>	

R ₃ =R ₆ =OCH ₃)	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. vindobonensis, V. krumovii, V. arvensis, V. verna</i>	
	<i>Veronica</i>	<i>V. urticifolia, V. officinalis</i>	
Skutelarein 6,4'-dimetil etar (R ₁ =R ₃ =OH, R ₂ =R ₆ =OCH ₃ , R ₄ =R ₅ =R ₇ =H)	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. vindobonensis</i>	Nikolova i sar., 2002
Skutelarein 6,7,4'-trimetil etar (R ₁ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₆ =OCH ₃ , R ₄ =R ₅ =R ₇ =H)	<i>Pentasepale</i>	<i>V. teucrium ssp. teucrium</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. polita, V. praecox</i>	
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. vindobonensis, V. krumovii, V. arvensis, V. verna</i>	
	<i>Stenocarpon</i>	<i>V. fruticans</i>	
	<i>Cochlidiosperma</i>	<i>V. hederifolia</i>	
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. acinifolia</i>	
Luteolin (R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =OH, R ₂ =R ₄ =R ₇ =H)	<i>Pentasepale</i>	<i>V. multifida</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica, V. polita, V. triphyllos, V. praecox</i>	
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. vindobonensis, V. orbelica, V. krumovii, V. arvensis, V. verna</i>	
	<i>Stenocarpon</i>	<i>V. fruticulosa, V. fruticans, V. kellererii</i>	

	<i>Cochlidiosperma</i>	<i>V. hederifolia, V. sublobata, V. teriloba, V. cymbalaria</i>	
	<i>Veronica</i>	<i>V. alpine, V. bellidioides, V. officinalis</i>	Nikolova i sar., 2005
		<i>V. urticifolia</i>	Nikolova i sar., 2002
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. beccabunga, V. serpyllifolia, V. acinifolia</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. spicata</i>	Gusev i sar., 1978
Luteolin 3'-metil etar - hrizoeriol ($R_1=R_3=R_6=OH, R_2=R_4=R_7=H,$ $R_5=CH_3$)	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. chamaedrys, V. vindobonensis, V. krumovii, V. arvensis, V. verna</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. praecox</i>	
Luteolin 7,4'-dimetil etar ($R_1=R_5=OH, R_2=R_4=R_7=H,$ $R_3=R_6=OCH_3$)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica, V. praecox</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. arvensis, V. verna</i>	
Luteolin 7,3'-dimetil etar ($R_1=R_6=OH, R_2=R_4=R_7=H,$ $R_3=R_6=OCH_3$)	<i>Pentasepale</i>	<i>V. austriaca ssp. jacquinii</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Pocilla</i>	<i>V. polita</i>	
	<i>Veronica</i>	<i>V. bellidioides, V. officinalis</i>	
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. serpyllifolia</i>	
6-hidroksiluteolin 6,7,3'-trimetil etar	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica, V. polita, V. praecox</i>	Nikolova i sar., 2005
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. verna</i>	

(R ₁ =R ₆ =OH, R ₂ =R ₃ =R ₅ =OCH ₃ , R ₄ =R ₇ =H)			
Kvercetin (R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =R ₇ =OH, R ₂ =R ₄ =H)	<i>Pocilla</i>	<i>V. francispetae</i> , <i>V. siaretensis</i> Lehmann	Mehrvarz i sar., 2008
Kvercetin 3',4',5',7'-tetrametil etar (R ₁ =R ₃ =R ₅ =R ₆ =OCH ₃ , R ₂ =H, R ₇ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i> , <i>V. polita</i>	Mehrvarz i sar., 2008
5,4'-dihidroksi-6,7,3'- trimetoksiflavon (circilineol) (R ₁ =R ₂ =R ₇ =H, R ₃ =R ₄ =R ₅ =OCH ₃ , R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. pectinata</i> var. <i>glandulosa</i>	Saracoglu i sar., 2004a
	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	

3.1.2. Flavonoidni glikozidi

Flavonski heterozidi su najzastupljeniji tip flavonoida u vrstama roda *Veronica*. Najčešće se radi o heterozidima luteolina i apigenina, odnosno njihovih derivata. Njihova bitna karakteristika je prisustvo hidroksil grupe na položaju C-6 ili C-8 aglikona. Prisustvo 6-hidroksi flavona (flavona sa OH grupama u položajima 5, 6 i 7 u prstenu A je karakteristično za red Lamiales i to za familije Plantaginaceae, Globulariaceae, Lamiaceae, Valerianaceae i Scrophulariaceae (Tomás-Barberán, 1988). Za razliku od njih, 8-hidroksi flavoni (flavoni sa OH grupama u položajima 5, 7 i 8 prstena A) su ređe zastupljeni, pronađeni su kod predstavnika rodova *Veronica* (Plantaginaceae), i *Stachys*, *Sideritis* i *Teucrium* (Lamiaceae), pa se mogu koristiti kao markeri u hemotaksonomiji (Albach i sar., 2005b). U okviru roda *Veronica* do sada su identifikovani u podrodovima *Pocilla*, *Pentasepalae* i *Hebe*. U vrstama Severne hemisfere podrodova *Pocilla* i *Pentasepalae* prisustvo 6-hidroksiflavon glikozida isključuje prisustvo 8-hidroksiflavon glikozida i obrnuto. Izuzetak je vrsta *V. persica* gde su prisutne obe grupe jedinjenja. Kod vrsta Južne hemisfere podroda *Pentasepalae* prisustvo jedinjenja obe grupe je često, što ukazuje na alipoliploidno poreklo predaka ove grupe (Taskova i sar., 2008).

Luteolin 4'- i 3'- glikozidi zastupljeni su u vrstama Severne hemisfere i sporadično su prisutni u vrstama Južne hemisfere. Dodatno, glikozidi luteolin 3'-metil etra (hrizoeriola) karakteristični su za vrste Severne hemisfere, dok u vrstama Južne hemisfere do sada nisu identifikovani (Taskova i sar., 2008).

Glikozilovanje kod flavonoid glikozida najčešće se dešava na položajima C-5 i C-7 (Saracoglu i sar., 2004a), a acilovanje šećerne komponente je još jedna karakteristika ovih jedinjenja u rodu *Veronica* (Albach i sar., 2003). Struktura nekih flavonoidnih heterozida izolovanih iz nadzemnih delova vrsta roda *Veronica* prikazana je u **Tabeli 5**.

Ostali tipovi flavonoidnih heterozida u vrstama ovog roda su retki. Flavonolni heterozidi (derivati kemferola) su sporadično zastupljeni u podrodu *Pocilla* (Mehrvarz i sar., 2008).

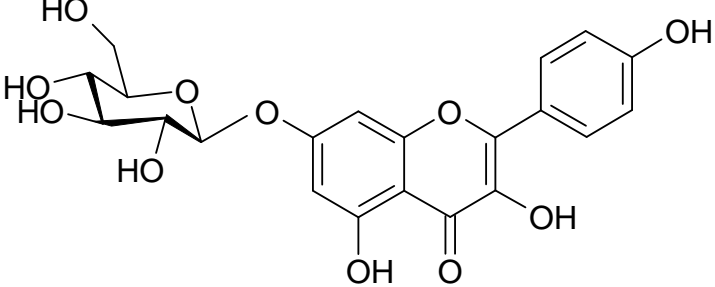
Antocijani su odgovorni za plavu i ružičastu boju cvetova roda *Veronica*. Najčešće su zasnovani na delfinidinu kao aglikonu (Grayer-Barkmeijer, 1978). U

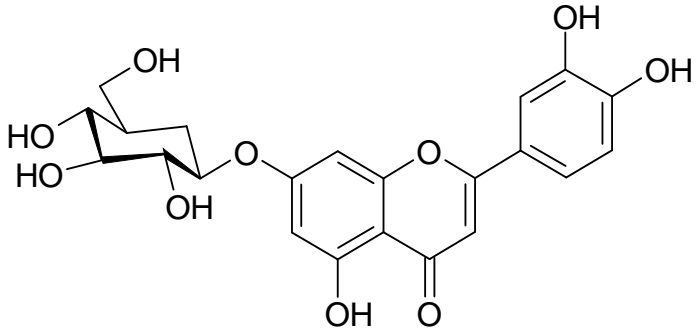
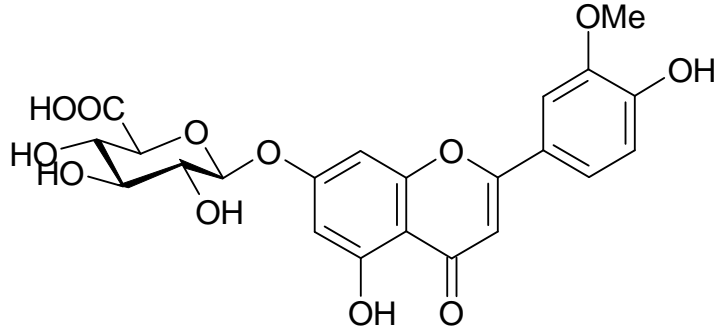
cvetovima vrste *V. persica* identifikovani su visoko glikozilovani flavonoidi delfinidin 3-*O*-(2-*O*-(6-*O*-*p*-kumaroil-glukozil)-6-*O*-*p*-kumaroil glukozid)-5-*O*-glukozid (Ono i sar., 2010), kao i poliacilovani antocijani 3-di-*p*-kumaroilzoforoizid-5-malonil glukozid i demalonil derivat (Mori i sar., 2009).

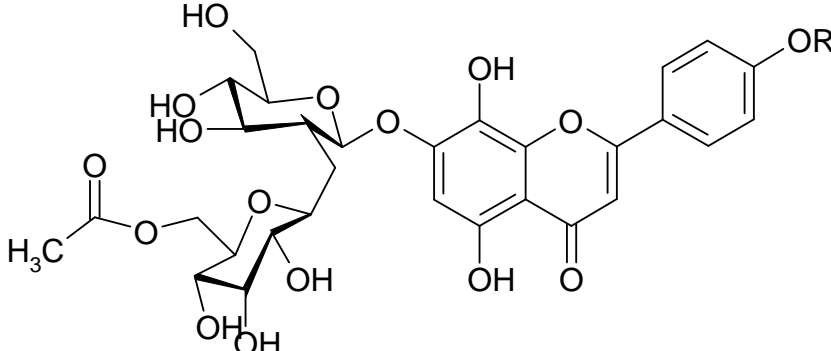
Među taksonima koji su predmet ove doktorske disertacije, iz nadzemnog dela *V. teucrium* do sada su identifikovani 8-hidroksi flavon glikozidi, dok 6-hidroksi flavon glikozidi nisu nađeni (Albach i sar., 2005). Za vrste *V. jacquinii* i *V. urticifolia* nema podataka o prisustvu flavonoid glikozida.

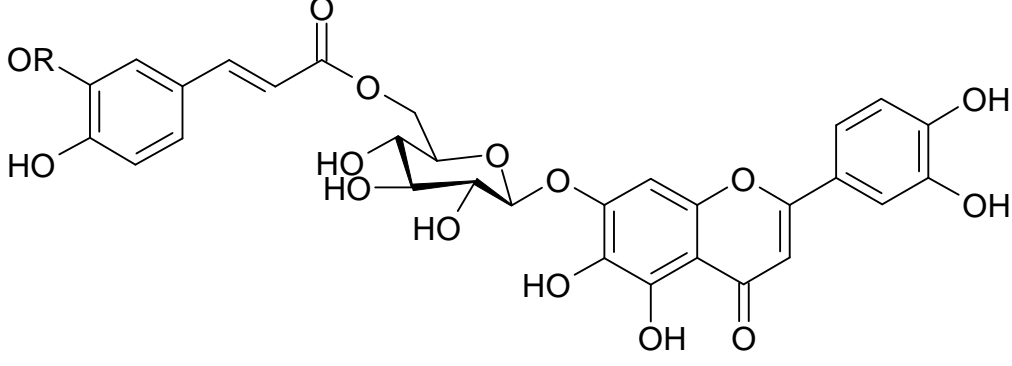
Struktura nekih flavonoidnih glikozida izolovanih iz nadzemnih delova vrsta roda *Veronica* data je u **Tabeli 5**.

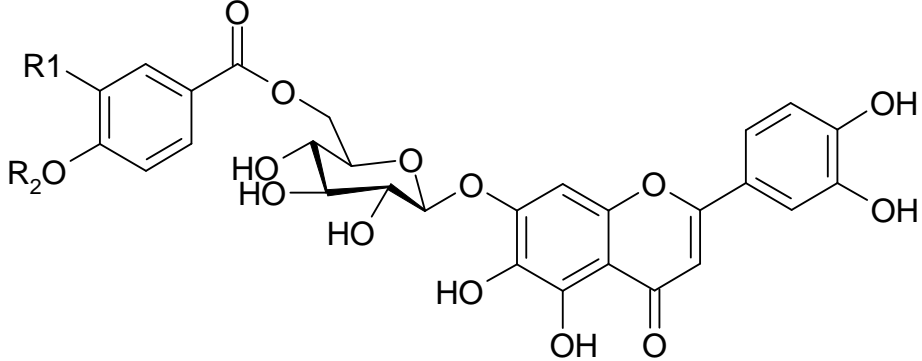
Tabela 5. Flavonoidni glikozidi vrsta roda *Veronica*

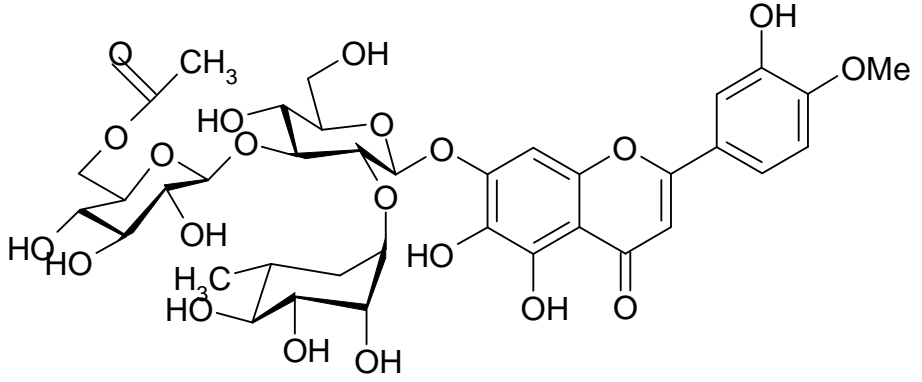
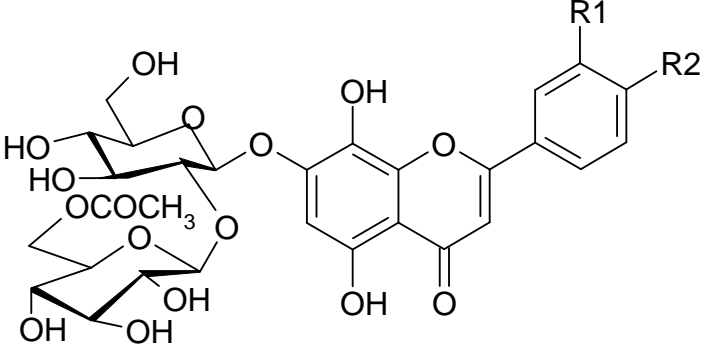
Jedinjenje	Podrod	Vrsta	Referenca
			
Kemferol-7-O-β-G-glukopiranozid	<i>Pocilla</i>	<i>V. francispetae</i> , <i>V. siaretensis</i> , <i>V. polita</i> <i>V. persica</i>	Mehrvarz i sar., 2008

			
<p>Luteolin-7-O-β-D-glukozid (cinarozid)</p>	<p><i>Veronica</i></p>	<p><i>V. officinalis</i></p>	<p>Gusev i sar., 1975</p>
	<p><i>Pentasepalae</i></p>	<p><i>V. fuhsii</i></p>	<p>Ozipek i sar., 1999</p>
			

Hrizoeriol-7-O-glukuronid	<i>Beccabunga</i>	<i>V. peregrina</i>	Kwak i sar., 2009
			
Izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)- β -alopiranozil-(1'''-2'')- β -glukopiranozid (R=H)	<i>Pocilla</i>	<i>V. intercendens</i>	Albach i sar., 2003
Izoskutelarein 4'-metil etar-7-O-(6'''-O-acetil)- β -alopiranozil-(1'''-2'')- β -glukopiranozid (R=CH ₃)	<i>Pentasepalae</i> <i>Pocilla</i>	<i>V. orientalis</i> , <i>V. intercendens</i>	Albach i sar., 2003

			
6-hidroksiluteolin 7-(6''-(E)-kafeoilglukozid) (spikozid A) (R=H)	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. longifolia</i> , <i>V. orchidea</i> , <i>V. ovata</i> , <i>V. spicata</i> , <i>V. spuria</i>	Albach i sar., 2005a
6-hidroksiluteolin 7-(6''-feruloilglukozid) (spikozid B) (R=CH ₃)	<i>Pseudolysimachium</i> <i>Pentasepalae</i>	<i>V. spicata</i> , <i>V. spuria</i> <i>V. thymoides</i> ssp. <i>pseudocinerea</i>	Albach i sar., 2005b Saracoglu i sar., 2004b

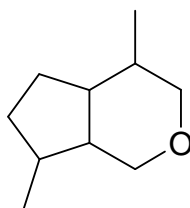
			
6-hidroksiluteolin 7-(6''-p-hidroksibenzoilglukozid) (spikozid C) (R ₁ = R ₂ = H)	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. spicata</i>	Albach i sar., 2005b
6-hidroksiluteolin 7-(6''-protokatehuoilglukozid) (spikozid D) (R ₁ =OH, R ₂ = H)	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. orchidea</i> , <i>V. spicata</i> , <i>V. spuria</i>	Albach i sar., 2005b
	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. thymoides ssp. pseudocinerea</i>	Saracoglu i sar., 2004b
6-hidroksiluteolin 7-(6''-vaniloilglukozid) (spikozid E) (R ₁ =OCH ₃ , R ₂ = H)	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. spicata</i> , <i>V. spuria</i>	Albach i sar., 2005b
6-hidroksiluteolin 7-(6''-veratroilglukozid) (spikozid F) (R ₁ =OCH ₃ R ₂ = CH ₃)	<i>Pseudolysimachium</i>	<i>V. spicata</i>	Albach i sar., 2005b

			
<p>3'-hidroksi-4'-O-metilskutelarein-7-O-[2''-O-α-L-ramnopiranozil-3''-O-(6''''-O-acetil-β-D-glukopiranozil)]-β-D-glukopiranozid (sarahozid)</p>	<p><i>Pentasepalae</i></p>	<p><i>V. pectinata</i> var. <i>glandulosa</i></p>	<p>Saracoglu i sar., 2004a</p>
			
<p>4'-O-metilizoskutelarein-7-O-2''-O-(6''''-O-acetil-β-D-glukopiranozid) ($R_1=H$, $R_2=OCH_3$)</p>	<p><i>Pocilla</i></p>	<p><i>V. persica</i></p>	<p>Saracoglu i sar., 2004a</p>

Izoskutelarein-7-O-2''-O-(6''''-O-acetil-β-D-alopiranozil)-β-D-glukopiranozid (R ₁ =H, R ₂ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Saracoglu i sar., 2004a
	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. multifida</i>	Ozipek i sar., 2002
3'-hidroksi-4'-O-metilizoskutelarein-7-O-2''-O-(6''-O-acetil-β-D-alopiranozil)-β-D-glukopiranozid (R ₁ =OH, R ₂ =OCH ₃)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Saracoglu i sar., 2004a

3.2. Iridoidi

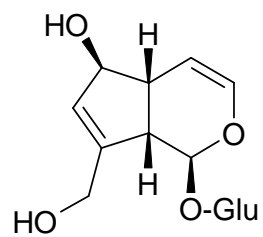
Iridoidi su biciklična, monoterpenska jedinjenja. U biljnim tkivima najčešće su vezani za šećere. Do sada je u biljkama identifikovano preko 2500 iridoidnih jedinjenja međusobno različitih po stepenu i tipu supstitucije na osnovnom ciklopentanskom prstenu (**Slika 5**) (Marin, 2003).



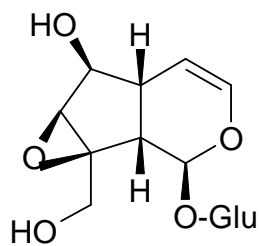
Slika 5. Struktura iridana

Iridoidi su do sada izolovani samo iz grupe dikotiledonih biljaka, uglavnom su prisutni u familijama Apocynaceae, Lamiaceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Scrophulariaceae, Gentianaceae i Verbenaceae i mogu se uspešno koristiti kao hemotaksonomski markeri (Marin, 2003). Iridoidna jedinjenja karakteristična za rod *Veronica* su aukubin i katalpol, kao i estri katalpola sa derivatima cimetine (verminozid i minekozid) i benzoeve kiseline (veronikozid, katalpozid, verprozid, amfikozid) (**Slika 6**). Dodatno, u brojnim *Veronica* vrstama identifikovani su karboksilovani iridoidi: epiloganinska kiselina, gardozid, musaenzidinska kiselina, arboreskozidinska kiselina, genipozidinska kiselina, kao i njihovi estri (**Slika 7**).

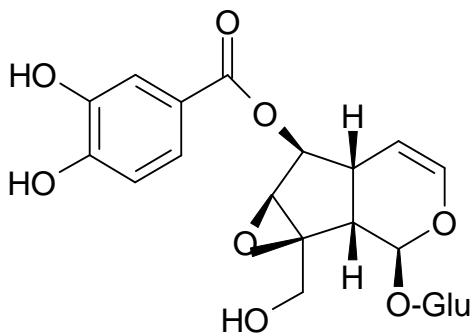
Musaenzid, estar musaenzidinske kiseline, karakterističan je za podrod *Veronica*, ali nije ograničen samo na njega (Jensen i sar., 2005). U okviru podroda *Pocilla* utvrđeno je prisustvo ajugola i 5-hidroksilovanih iridoida melitozida i globulorifolina. Ova jedinjenja karakteristična su za familiju Lamiaceae, ali se sporadično mogu naći i u familiji Plantaginaceae (Jensen i sar., 2005).



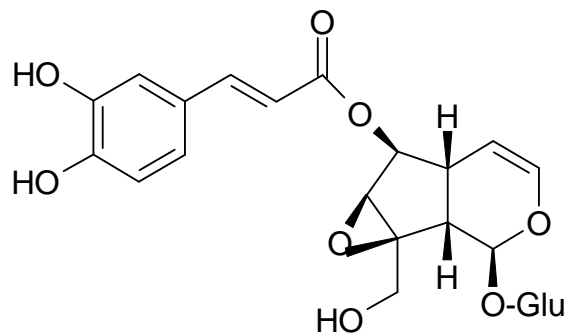
Aukubin



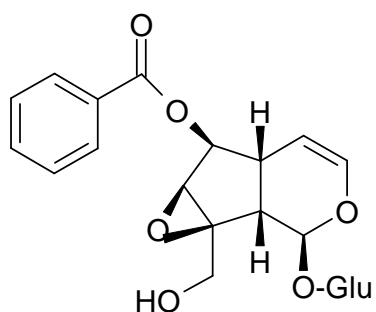
Katalpol



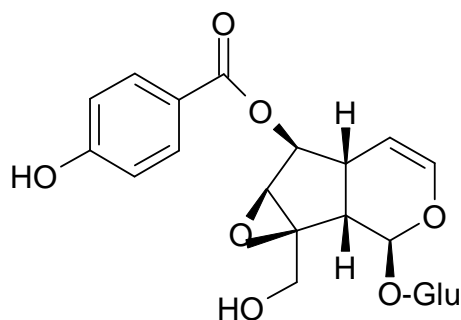
Verprozid



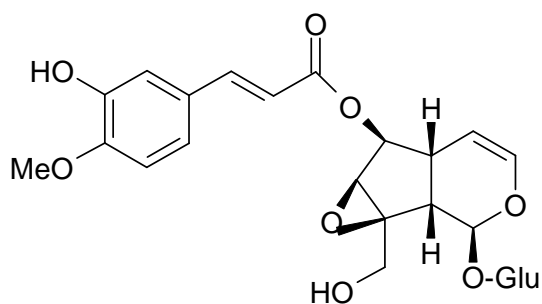
Verminozyd



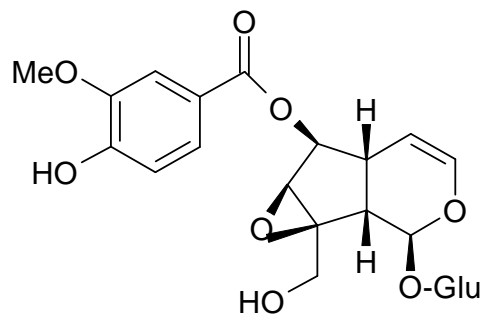
Veronikozid



Katalpozid

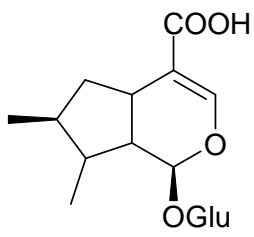


Minekozid

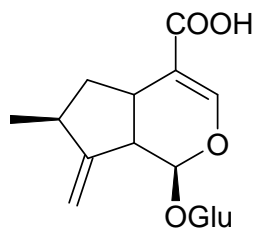


Amfikozid

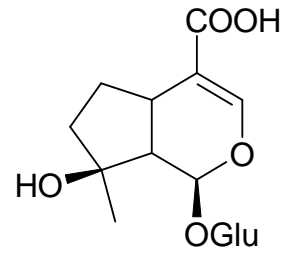
Slika 6. Iridoidni glukozidi karakteristični za rod *Veronica*



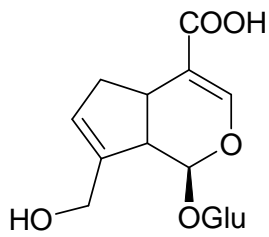
Epiloganinska kiselina



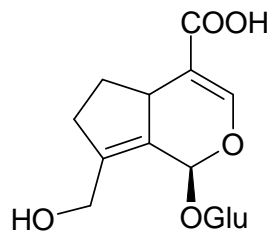
Gardozid



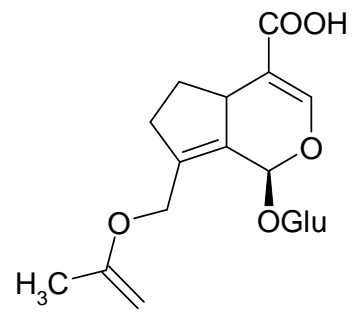
Musaenzidinska kiselina



Genipozidinska kiselina



Arboreskozidinska kiselina



Alpinozid

Slika 7. Karboksilovani iridoidni glukozidi prisutni u brojnim vrstama roda *Veronica*

U pojedinim vrstama roda *Veronica* identifikovani su iridoidni heterozidi specifične strukture (**Tabela 7**).

Iridoidni sastav vrsta koje su predmet ove doktorske disertacije je već ispitan (**Tabela 6**). Za herbu *V. teucrium* karakteristično je prisustvo aukubina, katalpola i estara katalpola sa derivatima benzoeve kiseline (katalpozid, verprozid, amfikoizid, 6-veratroilkatalpozid), dok estri katalpola sa derivatima cimetine kiseline nisu identifikovani (Taskova i sar., 2002).

Pored aukubina i katalpola, za herbu *V. jacquinii* karakteristično je prisustvo estara katalpola sa derivatima benzoeve kiseline (veronikoizid, katalpozid, verprozid, amfikoizid, 6-*O*-izovaniloilkatalpol, 6-*O*-veratroilkatalpozid), dok je spidoizid jedini identifikovan estar katalpola sa derivatom cimetine kiseline (Taskova i sar., 2002).

Od iridoidnih heterozida u herbi *V. urticifolia* detektovani su aukubin, katalpol, musaenoizid, estri katalpola sa derivatima benzoeve kiseline (veronikoizid i katalpozid), kao i estri katalpola sa derivatima cimetine kiseline (minekoizid) (Taskova i sar., 2002).

Tabela 6. Iridoidni heterozidi identifikovani u vrstama *V. teucrium*, *V. jacquinii* i *V. urticifolia*

Vrsta	Iridoidni heterozid														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>V. teucrium</i>	*		*	*	*		*					*			
<i>V. jacquinii</i>	*	*	*	*	*	*	*			*		*			
<i>V. urticifolia</i>	*	*	*						*			*			*

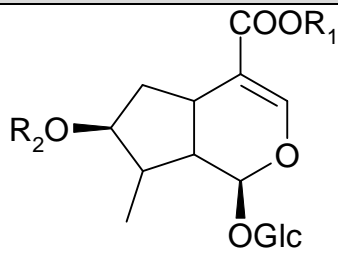
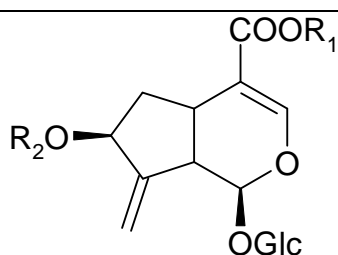
Legenda: 1-katalpol, 2-veronikoizid, 3-katalpozid, 4-verprozid, 5-amfikoizid, 6-6-*O*-izovaniloilkatalpol, 7-6-*O*-veratroilkatalpozid, 8-verminoizid, 9-minekoizid, 10-spidoizid, 11-veloizid, 12-aukubin, 13-genipoizidinska kiselina, 14-musaenoizid, 15-alpinoizid.

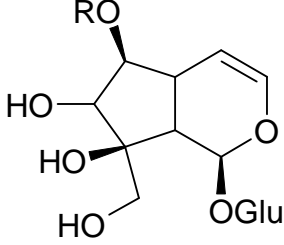
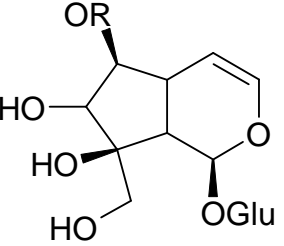
Uloga iridoida u biljkama nije u potpunosti razjašnjena. Obzirom na veliku raznovrsnost ove grupe jedinjenja i činjenicu da se nalaze u tkivima sa intenzivnom metaboličkom aktivnošću, jasno je da je reč o jedinjenjima od velikog značaja za biljku. Zahvaljujući svom gorkom ukusu predstavljaju način odbrane biljaka od herbivora. Takođe, mnogi iridoidi služe kao prekursori drugih tipova jedinjenja (Marin, 2003).

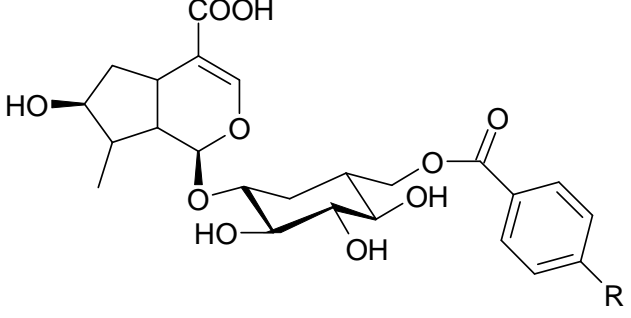
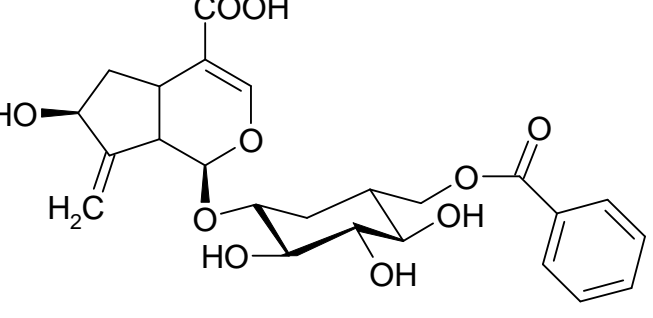
Iridoidni glukozidi su biološki aktivna jedinjenja. Do sada je poznato više različitih aktivnosti iridoida, kao što su: antimikrobna, antidijabetična, antiinflamatorna,

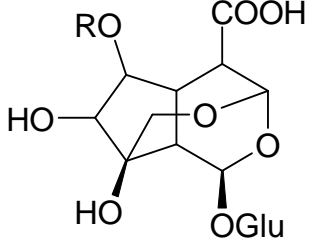
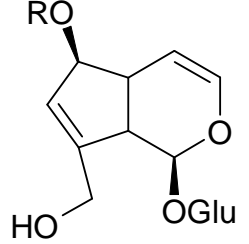
antinociceptivna, antihiperlipidemijska, hepatoprotektivna, antitumorska i imunostimulativna. Takođe, deluju kao inhibitori osteoporoze, humane neutrofilne elastaze i melanogeneze (Dinda i sar., 2007).

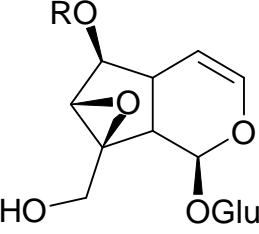
Tabela 7. Iridoidni glikozidi specifične strukture identifikovani u pojedinim vrstama roda *Veronica*

Jedinjenje	Podrod	Vrsta	Referenca
			
Lavaudiozid A (R ₁ =1-manitil; R ₂ =kafeoil)	<i>Hebe</i>	<i>V. lavaudiana</i>	Taskova i sar., 2011
			
Lavaudiozid B (R ₁ =1-manitil; R ₂ =kafeoil)	<i>Hebe</i>	<i>V. lavaudiana</i>	Taskova i sar., 2011

			
Asistaziozid E (R=H)	<i>Pseudolysimachion</i>	<i>V. longifolia</i>	Jensen i sar., 2010
Longifoliozid A (R=3,4-dihidroksibenzoil)			
Longifoliozid B (R=kafeoil)			
Urfozid B (R=vaniloil)			
			
Urfozid A (R=vaniloil)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. pectinata</i> var. <i>glandulosa</i>	Harput i sar., 2003

			
<p>Akvatikozid A (R=H)</p>	<p><i>Beccabunga</i></p>	<p><i>V. anagalis-aquatica</i></p>	<p>Harput i sar., 2004</p>
<p>Akvatikozid B (R=OH)</p>			
			
<p>Akvatikozid C</p>	<p><i>Beccabunga</i></p>	<p><i>V. anagalis-aquatica</i></p>	<p>Harput i sar., 2004</p>

			
<p>Pikurozid (R=vaniloil)</p>	<i>Cochlidiosperma</i>	<i>V. hederifolia</i>	Harput i sar., 2002c
			
<p>Dervenciozid A (R=benzoil)</p>	<i>Hebe</i>	<i>V. derwentiana</i>	Jensen i sar., 2008
<p>Dervenciozid B (R=p-OH-benzoil)</p>			
<p>Dervenciozid C (R=vaniloil)</p>			

			
Spidozid (R=4'-O-Glu-kafeoil)	<i>Veronicastrum</i>	<i>V. alpina</i> , <i>V. bellidioides</i>	Taskova i sar., 2002
	<i>Veronica</i>	<i>V. officinalis</i> , <i>V. austriaca</i>	Taskova i sar., 2002
Velozid (R=4'-O-Glu-feruloil)	<i>Veronicastrum</i>	<i>V. bellidioides</i>	Taskova i sar., 2002

3.3. Feniletanoidni glikozidi

Feniletanski glikozidi su široko rasprostranjeni u biljnom carstvu. Ovi sekundarni metaboliti karakteristični su za red Lamiales a najveći broj njih je identifikovan u taksonima familija Scrophulariaceae, Plantaginaceae, Oleaceae, Lamiaceae i Orobanchaceae. Do sada je poznato više različitih aktivnosti feniletanskih heterozida kao što su: antioksidantna, antiinflamatorna, antibakterijska, antivirusna, antitumorska, imunomodulatorna, hepatoprotektivna i neuroprotektivna (Kukić-Marković, 2013).

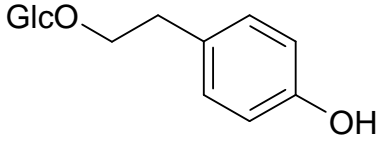
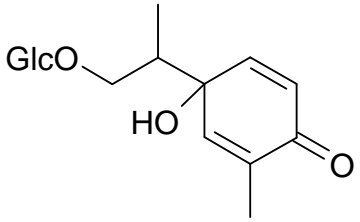
Feniletanski heterozidi karakteristični su i za vrste roda *Veronica* i iz njih je izolovan veliki broj jedinjenja ove klase. Neka od njih kao što su akteozid, martinozid i kornozid su široko rasprostranjena u biljnom carstvu, dok su druga identifikovana samo u vrstama ovog roda (turiliozid A i B).

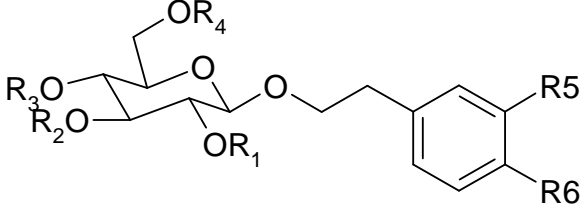
Kafeoil feniletanoidni glukozidi sa 3'-*O*-glukozil supstituentom zabeleženi su samo u rodovima *Plantago* i *Veronica* familije Plantaginaceae (Jensen i sar., 2011).

Obzirom da je kornozid prisutan samo u podrodu *Chamaedrys*, ovaj feniletanski glikozid može biti značajan hemotaksonomski marker roda *Veronica* (Jensen i sar., 2005).

Struktura do sada identifikovanih feniletanskih heterozida u rodu *Veronica* data je u **Tabeli 8**.

Tabela 8. Feniletanski heterozidi identifikovani u pojedinim vrstama roda *Veronica*

Jedinjenje	Podrod	Vrsta	Referenca
			
Salidrozyd	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. arvensis</i>	Jensen i sar., 2005
	<i>Hebe</i>	<i>V. raoulii</i>	Taskova i sar., 2012
	<i>Beccabunga</i>	<i>V. beccabunga</i>	Jensen i sar., 2011
			
Kornozyd	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. arvensis</i> , <i>V. dillenii</i> , <i>V. micans</i> , <i>V. verna</i> , <i>V. vindobonensis</i>	Jensen i sar., 2005

			
Akteozid (R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Harput i sar., 2002b
	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. dillenii</i> , <i>V. micans</i> , <i>V. vindobonensis</i>	Jensen i sar., 2005
	<i>Hebe</i>	<i>V. pentasepalae</i>	Taskova i sar., 2012
		<i>V. brachysiphon</i> , <i>V. odora</i>	Johansen i sar., 2007
		<i>V. stenophylla</i> , <i>V. topiaria</i>	Pedersen i sar., 2007
Izoakteozid (R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =H; R ₄ =kafeoil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Harput i sar., 2002b
	<i>Veronica</i>	<i>V. officinalis</i>	Crişan i sar., 2007
Kalceolariozid C (R ₁ =H; R ₂ =H; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Xyl; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. teucrium</i>	Taskova i sar., 2002
Persikozid (R ₁ =Glu; R ₂ =Glu; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Harput i sar., 2002b
	<i>Hebe</i>	<i>V. hulkeana</i>	Taskova i sar., 2012

		<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
Izopersikozid (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =kafeoil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Lavandulifoliozid (R ₁ =H; R ₂ =Glu(2→1)Ara; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pocilla</i>	<i>V. persica</i>	Harput i sar., 2002b
Verpektozid A (R ₁ =Ara; R ₂ =Rha; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. multifida</i>	Ozipek i sar., 2002
		<i>V. pectinata</i>	Saracoglu i sar., 2002
Verpektozid B (R ₁ =Glu; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Chamaedrys</i>	<i>V. micrantha</i>	Jensen i sar., 2005
	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. pectinata</i>	Saracoglu i sar., 2002
Poliumozid (R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Rha; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. odora</i>	Johansen i sar., 2007
Angarozid A (R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Ara; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. elliptica</i>	Johansen i sar., 2007
Martinozid (R ₁ =H; R ₂ =Rha; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Beccabunga</i>	<i>V. anagallis-</i> <i>aquatica</i>	Harput i sar., 2004
Plantamajozid (R ₁ =H; R ₂ =Glu; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Beccabunga</i>	<i>V. beccabunga</i>	Jensen i sar., 2011
	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. fuhsii</i>	Ozipek i sar., 1999
Fušiozid	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. fuhsii</i>	Ozipek i sar., 1999

(R ₁ =R ₂ =R ₃ =H; R ₄ =kafeoil; R ₅ =R ₆ =OH)			
Hebeozid (R ₁ =Xyl; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. cupressoides</i>	Pedersen i sar., 2007
Parahebeozid (R ₁ =H; R ₂ =Glu(2→1)Xyl; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. hookeriana</i>	Maggi i sar., 2009
Kuprozid (R ₁ =Xyl; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Glc; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. cupressoides</i>	Pedersen i sar., 2007
Aragozid (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
		<i>V. lavaudiana</i>	Taskova i sar., 2011
		<i>V. raoulii</i> , <i>V. pentasepalae</i>	Taskova i sar., 2012
Izoaragozid (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =kafeoil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. raoulii</i> , <i>V. pentasepalae</i>	Taskova i sar., 2012
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid A (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. raoulii</i>	Taskova i sar., 2012
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Izohionozid A (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =feruloil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid B (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010

Izohionozid B (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =feruloil; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid C (R ₁ =Ara; R ₂ =6-Fer-Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid D (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Glc; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. laudiana</i>	Taskova i sar., 2011
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid E (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =Glc; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid F (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Rha; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid G (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
Izohionozid G (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =kafeoil; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid H (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
Izohionozid H (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =feruloil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
Hionozid I (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010

Izohionozid I (R ₁ =Glc; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =feruloil; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Izohionozid J (R ₁ =H; R ₂ =Glc(2→1); R ₃ =H; R ₄ =kafeoil; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Izohionozid K (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =OH; R ₄ =kafeoil; R ₅ = OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Ehrenozid (R ₁ =Ara; R ₂ =Rha; R ₃ =kafeoil; R ₄ =H; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. pectinata</i>	Saracoglu i sar., 2002
	<i>Hebe</i>	<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Lagotozid (R ₁ =Ara; R ₂ =Rha; R ₃ =feruloil; R ₄ =H; R ₅ =OH; R ₆ =OCH ₃)	<i>Hebe</i>	<i>V. raoulii</i>	Taskova i sar., 2012
		<i>V. pulvinaris</i>	Taskova i sar., 2010
		<i>V. thomsonii</i>	Taskova i sar., 2010
Heliozid A (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =kafeoil; R ₄ =Xyl; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. lavaudiana</i>	Taskova i sar., 2011
		<i>V. raoulii, V. hulkeana, V. pentasepalae</i>	Taskova i sar., 2012
Heliozid C (R ₁ =Ara; R ₂ =Glc; R ₃ =feruloil; R ₄ =Xyl; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. lavaudiana, V. pentasepalae</i>	Taskova i sar., 2011
Heliozid F (R ₁ =Xyl; R ₂ =Glc; R ₃ = kafeoil; R ₄ =Glc; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Hebe</i>	<i>V. hulkeana</i>	Taskova i sar., 2012

Turiliozid A (R ₁ =H; R ₂ =K; R ₃ = kafeoil; R ₄ =Glc(1→4)Rha; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. turrilliana</i>	Kostadinova i sar., 2007
Turiliozid B (R ₁ =H; R ₂ =H; R ₃ = kafeoil; R ₄ =6-O-feruloil-Glc(1→4)Rha; R ₅ =R ₆ =OH)	<i>Pentasepalae</i>	<i>V. turrilliana</i>	Kostadinova i sar., 2007

3.4. Ostale grupe jedinjenja roda *Veronica*

Iz vrsta roda *Veronica* izolovani su steroidni saponozidi. Oni su u prirodi retki i karakteristika su monokotiledonih biljaka familija Dioscoreaceae, Liliaceae i Amaryllidaceae. Sporadično se javljaju u biljkama familija Fabaceae i Scrophulariaceae (Kovačević, 2000). Iz vrste *V. chamaedrys* L. izolovani su steroidni saponozidi spirostan tipa (hamedrozidi C i C₁), furostan tipa (hamedrozidi E i E₁), kao i furospirostan tipa (hamedrozidi C₂ i E₂) (Marchenko i sar., 2012). U metanolnom ekstraktu herbe *V. turriliana* Stoj. & Stef. utvrđeno je prisustvo steroidnog saponozida spirostan tipa - turilianozida (Kostadinova i sar., 2007). Steroidni saponozid nautigenin tipa, multifidozid, izolovan je iz vrsta *V. multifida* i *V. fuhsii*, dok je akuleatizid A identifikovan u vrsti *V. fuhsii* (Ozipek i sar., 2002).

U pojedinim *Veronica* vrstama pokazano je i prisustvo acetofenona i alkaloida (Taskova, 1998). Manitol je šećerna komponenta karakteristična za tribus Veroniceae (Taskova i sar., 2006).

Iz vrste *V. turrilliana* izolovani su arbutin i 6-O-E-kafeoilarbutin (Kostadinova i sar., 2007).

4. Dosadašnja proučavanja sadržaja teških metala u vrstama roda *Veronica*

Teški metali su sve prisutniji u okolini, posebno u industrijalizovanim društvima. Kontaminacija tla metalima se značajno razlikuje od zagađenja vazduha ili vode po tome što se teški metali u zemljištu zadržavaju znatno duže u odnosu na ostale delove biosfere. Remedijacija zemljišta zagađenog metalima obično uključuje njihovu imobilizaciju ili ekstrakciju primenom skupih fizičko-hemijskih tehnika koje često imaju negativan uticaj na biološku aktivnost, plodnost i strukturu zemljišta. Tokom poslednjih nekoliko decenija sve je popularnija primena biljaka za uklanjanje kontaminenata iz zemljišta procesom poznatim kao fitoremedijacija (DalCorso i sar., 2013).

Sve biljke imaju mogućnost da iz tla ili vode akumuliraju metale esencijalne za njihov rast. Neke biljke sposobne su da preuzimaju i druge metale i metaloide koji nemaju određenu fiziološku funkciju i toksični su za samu biljku. Teški metali preko biljaka dospevaju u lanac ishrane, i u prekomerenim količinama predstavljaju opasnost po ljudsko zdravlje. Sa druge strane, sposobnost pojedinih biljaka da akumuliraju teške metale u korenu i/ili nadzemnim delovima, može se iskoristiti za regeneraciju kontaminiranog tla (DalCorso i sar., 2013).

Za razliku od sekundarnih metabolita, malo je podataka o neorganskim komponentama *Veronica* vrsta, ili o odnosu neorganskih komponenti u biljci i zemljištu na kojem je ona rasla. Zurayk i sar. (2001) pokazali su značaj pojedinih *Veronica* hidrofita u fitoremedijaciji vode zahvaljujući mogućnosti hiperakumulacije hroma u korenu ovih biljaka uz minimalnu translokaciju u nadzemne delove. Za vrstu *Veronica didydim* pokazana je visoka akumulaciona sposobnost za Zn (Wang i sar., 2005), dok je među pet testiranih makrohidrofita, *Veronica anagallis-aquatica* pokazala najveći sadržaj Fe^{3+} jona (Abu Ziada i sar., 2008). Dodatno, Bayoumi (2012) je utvrdio da *V. anagallis-aquatica* predstavlja potencijalnu biljnu vrstu za fitoremedijaciju sredine sa radioaktivnim otpadom, posebno ukoliko je kontaminirana radiaktivnim cezijumom ili kobaltom.

Sadržaj teških metala u biljakama koje su predmet istraživanja u okviru ove doktorske disertacije do sada nije ispitivan.

5. Dosadašnja farmakološka proučavanja vrsta roda *Veronica*

Nakon pregleda literaturnih podataka može se zaključiti da iako su dosadašnja fitohemijska ispitivanja pojedinih *Veronica* vrsta pokazala da su izvor biološki aktivnih jedinjenja, većina predstavnika ovog roda nije farmakološki okarakterisana.

Na različitim linijama malignih ćelija (Hep-2, RD i L-20B) pokazan je bifazan (citotoksičan i citostatičan) efekat iridoidnih jedinjenja izolovanih iz tri *Veronica* vrste (*V. anagallis-aquatica*, *V. persica* i *V. thymoides*) u zavisnosti od hemijske strukture i tipa karcinomskih ćelija (Saracoglu i sar., 2012), kao i citotoksični efekat vodenih ekstrakata vrsta *V. cuneifolia* subsp. *cuneifolia* i *V. cymbalaria* (Saracoglu i sar., 2011). Iridoidna jedinjenja izolovana iz metanolnog ekstrakta vrste *V. americana* (amerikanozid i 10-*O*-protokatehuil-katalpol) ispoljila su selektivno citotoksično delovanje prema HF-6 i PC-3 ćelijskim linijama (Moreno-Escobar i sar., 2013).

In vitro testovima za pojedine *Veronica* vrste i za jedinjenja izolovana iz njih, pokazana je snažna sposobnost hvatanja slobodnih radikala (DPPH, SO i NO) (Harput i sar., 2011; Jensen i sar., 2010; Kwak i sar., 2009; Nikolova, 2011, Saracoglu i sar., 2002). Kwak i saradnici (2009) su pokazali značajnu antioksidantnu aktivnost EtOAc frakcije MeOH ekstrakta cele biljke *V. peregrina* ORAC testom. Izolovana jedinjenja koja su ispoljila najveću aktivnost u istom testu su luteolin, minekozid, speciozid, amfikozid, 6-*O*-*cis-p*-kumaroilkatalpol i hrizoeriol-7-glukuronid. Antioksidantnu aktivnost uporedivu sa sintetskim antioksidansom Troloxom pokazala su jedinjenja verminozid i protokatehinska kiselina.

Za vrstu *V. officinalis* pokazano je da smanjuje nivo holesterola i triglicerida u serumu životinja čija je ishrana bogata holesterolom. Efekat nije ispoljen kod životinja čija je ishrana oslobođena holesterola (Crisan i sar., 2007).

Za istu vrstu, Gründemann i sar. (2013) pokazali su antiinflamatorno delovanje u humanim epitelnim ćelijama pluća (A549 ćelijama). Kao mehanizmi kojima se ostvaruje pokazana aktivnost predloženi su inhibicija genske i proteinske ekspresije hemokina eotaksina, kao i inhibicija oslobađanja proinflamatornog medijatora PGE₂ u TNF- α aktiviranim ćelijama.

Pokazana je *in vitro* antiinflamatorna aktivnost za pet *Veronica* vrsta (*V. cymbalaria*, *V. hederifolia*, *V. pectinata* var. *glandulosa*, *V. persica* i *V. polita*) putem procene inhibitorynog efekta na produkciju NO u makrofagama peritoneuma miša stimulisanim lipopolisaharidima, kao i citotoksična aktivnost prema KB epidermoidnom karcinomu i B16 melanomu (Harput i sar., 2002a).

Küpeli i sar. (2005) pokazali su snažno antiinflamatorno delovanje metanolnog ekstrakta vrste *V. anagallis-aquatica* L. u karageninskom testu inflamacijskog edema šapice miša, kao i antinociceptivno delovanje u testu *p*-benzohinonom indukovanih abdominalnih kontrakcija. Utvrđeno je da su za ispoljenu aktivnost ekstrakta odgovorni derivati katalpola verprozid i katalpozid.

Gusev i sar. (2012) analizirali su antibakterijsko delovanje pojedinih *Veronica* vrsta i pokazali su da najizraženiji efekat ispoljavaju ekstrakti herbi *V. officinalis* i *V. spicata* prema bakteriji *Staphylococcus aureus*. Autori su ispoljeni efekat pripisali visokom sadržaju fenolkarboksilnih kiselina u ispitivanim ekstraktima.

Za biljke koje predstavljaju predmet ove doktorske disertacije nema podataka o farmakološkom delovanju.

6. Slobodni radikali i oksidativni stres

Slobodni radikali nastaju tokom aerobnih metaboličkih procesa u organizmu. Oni predstavljaju atome, jone ili molekule sa jednim ili više nesparenih elektrona u svojoj strukturi, a mogu nastati prenosom jednog elektrona na neradikalnu vrstu, ili homolitičkim cepanjem kovalentne veze (Cadenas i Davies, 2000). Kao posledica težnje da spare nesparen(e) elektron(e) u poslednjoj orbitali, slobodni radikali se ponašaju kao snažni elektrofili, odnosno jaki oksidacioni agensi (Đukić, 2008). Reaktivne vrste kiseonika (ROS²) obuhvataju kiseonikove radikale (superoksid radikal – O₂⁻, hidroksil radikal - *OH) i neradikalne vrste koje predstavljaju oksidativna sredstva i lako se prevode u radikale (HOCl, HOBr, O₃, i H₂O₂). Pored ROS, značajnu grupu slobodnoradikalnih jedinjenja čine i reaktivne vrste hlora (RCS³), broma (RBS⁴) i

² ROS – reactive oxygen species.

³ RCS – reactive chlorine species.

azota (RNS⁵) (Lesjak, 2011). Ćelijska odbrana od ovih reaktivnih molekula, uključuje enzimске sisteme (katalazu, superoksid dismutazu, glutation peroksidazu, glutation reduktazu) i antioksidantne neenzimske komponente kao što su glutation (GSH), ksantin, koenzim Q-10 i mokraćna kiselina.

U ćeliji, mitohondrijalni respiratorni lanac, aktivnost enzima citohrom P450 u mikrozomima, flavoprotein oksidaze, kao i metabolizam masnih kiselina u peroksizomima su glavni izvori produkcije ROS (Wang i sar., 2010). U fiziološkim uslovima, ROS imaju važnu ulogu u regulisanju razliĉitih procesa u ćeliji kao što su proliferacija, diferencijacija, agregacija, pokretljivost i apoptoza (Filippin i sar., 2008). Takođe, kao sekundarni glasnici oni učestvuju u transdukciji signala u procesima aktiviranja imunog odgovora. Kada se naruše ćelijska homeostaza i redoks status dolazi do povećane produkcije ROS, što vodi u oksidativni stres.

Pokazano je da je oksidativni stres povezan sa preko 100 razliĉitih oboljenja, bilo kao njihov uzrok ili kao posledica (Poljsak i sar., 2013).

6.1. Oksidativni stres i neurodegenerativne bolesti

Usled velike metaboliĉke aktivnosti i visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina osetljivih na peroksidaciju, a sa druge strane usled slabe antioksidantne zaštite (nizak nivo katalaze i glutation peroksidaze), mozak je pogodan za stvaranje slobodnih radikala i osetljiv je na njihovo delovanje (Jovanović, 2011). ROS i RNS predstavljaju glavni uzrok oksidativnog stresa u centralnom nervnom sistemu (Emerit i sar., 2004).

Proces oksidativne fosforilacije u mitohondrijama je glavni izvor ROS. Kada nivo formiranih ROS prekoraĉi kapacitet ćelija i mitohondrija za njihovo uklanjanje, aktiviraju se tranzicione pore mitohondrijalne membrane. Otvaraju se kanali, i omogućava slobodna difuzija malih molekula između matriksa i citosola. Ovo posledično vodi do kolapsa trans-membranskog elektrohemijškog gradijenta, gubitka tečnosti u matriksu, oticanja mitohondrija i oslobađanja faktora koji indukuju apoptozu neurona (Emerit i sar., 2004).

⁴ RBS – reactive bromine species.

⁵ RNS – reactive nitrogen species.

Glutamat je ekscitatorni neurotransmiter prisutan kod većine ekscitatornih sinapsi u CNS sisara. U velikim koncentracijama glutamat ispoljava neurotoksično delovanje. Jedan od mehanizama neurotoksičnosti glutamata je i oksidativna toksičnost nezavisna od glutamatnih receptora (Lee i sar., 2003). Visoka koncentracija ekstracelularnog glutamata inhibira preuzimanje cisteina u neurone, što posledično dovodi do razgradnje cisteina u njima i do gubitka glutationa (GSH). Bez snabdevanja ćelija glutationom, formiraju se velike količine ROS što vodi ćeliju u apoptozu. Takođe, poznato je da glutamat deluje na svoje receptore putem NO mehanizma, pa prekomerena stimulacija ovih receptora može dovesti i do akumulacije RNS (Sundaram i sar., 2012).

6.2. Oksidativni stres i inflamacija

Razvoj zapaljenske, odnosno imune reakcije u organizmu je posledica odbrambenog odgovora organizma na napad patogena. Takođe, i sam odgovor može da prouzrokuje oštećenje i na taj način doprinese procesu razvoja oboljenja. Zaštita organizma od patogena posredovana je ranim reakcijama urođenog i kasnijom reakcijom adaptivnog imunog odgovora. Urođeni (nespecifični) imuni odgovor se aktivira neposredno nakon infekcije, usmerava odgovor domaćina na infektivni organizam i šalje pobuđujući signal za stečeni (adaptivni) imuni odgovor (Rang, 2004). Nakon aktivacije, ćelije urođenog imunog sistema sekretuju proinflamatorne citokine kao što su interferon- γ (IFN- γ), interleukini (IL) i faktor nekroze tumora (TNF- α) koji na mestu oštećenja indukuju i stvaranje ROS/RNS. I TNF- α i ROS aktiviraju redoks-osekljivi transkripcioni faktor NF- κ B koji reguliše ekspresiju različitih gena uključenih u procese inflamacije, imunog odgovora i karcinogeneze. Oksidativni stres može i na indirektan način da učestvuje u aktivaciji NF- κ B i to putem regulisanja aktivnosti protein kinaza koje fosforilišu NF- κ B i na taj način omogućavaju migraciju ovog transkripcionog faktora iz citoplazme u jedro, kao i vezivanje za promotere odgovarajućih gena (Mantena i Katiyar, 2006).

Ukoliko tokom akutnog inflamatornog odgovora organizma ne dođe do uklanjanja egzogenog stimulusa, odgovor može preći u hronični i posledično može biti uzrok različitih oboljenja. Hronična inflamacija u ćeliji pokazuje svoje neželjene efekte kroz povećanje produkciju slobodnih radikala i razgradnju antioksidanasa. Tokom

inflamacije slobodni radikali mogu reagovati sa molekulom DNK u mitotskim ćelijama i na taj način dovesti do stalnih genetskih mutacija (tačkaste mutacije, delecije gena ili njihovo premeštanje). Na ovaj način hronična inflamacija ubrzava transformaciju ćelija i postaje prekursor za formiranje kancera (Khansari i sar., 2009).

6.3. Oksidativni stres i kancerogeneza

Kancer je višestepeni proces čije formiranje prate tri faze ćelijske transformacije: inicijacija, promocija i progresija. Svaka od njih je povezana sa oksidativnim stresom. Tokom faze inicijacije, slobodni radikali dovode do strukturnih promena DNK i posledičnih genskih mutacija. U fazi promocije, oni blokiraju komunikaciju među ćelijama što rezultuje povećanjem proliferacije i/ili smanjenjem apoptoze u iniciranoj ćelijskoj populaciji. Na kraju, oksidativni stres ostvaruje efekat i na fazu progresije kancera, uzrokovanjem dodatnih DNK izmena u već transformisanoj ćelijskoj populaciji. Reaktivne vrste kiseonika mogu povećati i stopu migracije ćelija utičući tako na invazivnost i metastaze tumora (Todorović, 2013).

U poređenju sa normalnim ćelijama, jedna od ključnih karakteristika ćelija kancera je njihova povećana sposobnost preživljavanja. Slobodni radikali se smatraju kancerogenim zahvaljujući sposobnosti da povećaju stepen proliferacije i migracije ovih ćelija. Oštećenjem DNK nastaju genske lezije koje za posledicu imaju inicijaciju i progresiju tumora. Sa druge strane, povećana produkcija ROS vodi do starenja i smrti tumorskih ćelija, pa se oni mogu smatrati i antikancerogenim agensima. Na koji način će ROS delovati zavisi od vrste ćelija i tkiva, koncentracije ROS, kao i od aktivnosti antioksidantnog sistema (Todorović, 2013).

CILJ

Iako je upotreba nekih taksona roda *Veronica* poznata u narodnoj medicini, većina delovanja nije zabeležena i razjašnjena, a njihovi sekundarni metaboliti nisu dovoljno proučeni.

Cilj ovog rada je morfološka, hemijska i farmakološka karakterizacija tri odabrana taksona roda *Veronica* L.:

- *Veronica urticifolia* Jacq.,
- *Veronica jacquinii* Baumg.,
- *Veronica teucrium* L.

Ove vrste su do sada samo delimično hemijski ispitane, dok podataka o njihovoj farmakološkoj aktivnosti nema. Tokom terenskih ispitivanja koja smo izvršili, nije ustanovljena njihova tradicionalna primena.

Morfološka karakterizacija podrazumeva analizu poprečnih preseka nadzemnih delova vrsta *V. teucrium*, *V. jacquinii* i *V. urticifolia*, kao i spraćenog biljnog materijala, primenom histochemijskih metoda i svetlosne mikroskopije.

Naredni cilj disertacije je određivanje sadržaja teških metala (Cu, Zn, Fe, Mn i Cr) nakon mikrotalasne digestije uzoraka u kiseloj sredini primenom tehnika plamene i elektrotermalne atomske apsorpcione spektroskopije u uzorcima odabranih *Veronica* vrsta i odgovarajućeg zemljišta. Takođe, u okviru hemijske karakterizacije primenom kolorimetrijskih metoda biće određen sadržaj sekundarnih metabolita od značaja za farmaciju u metanolnim, 70%-nim acetonskim i vodenim ekstraktima herbi odabranih taksona roda *Veronica*. Uporedna kvalitativna i kvantitativna analiza odabranih ekstrakata ispitivanih vrsta biće sprovedena primenom različitih hromatografskih tehnika. Sadržaj aukubina i akteozida u njima biće određen primenom visokoefikasne tečne hromatografije (HPLC) i visokoefikasne tečne hromatografije na tankom sloju (HPTLC).

Farmakološka karakterizacija podrazumeva ispitivanje antioksidantne, antiinflamatorne, antimikrobne, neuroprotektivne i citotoksične aktivnosti metanolnih i 70%-nih acetonskih ekstrakata taksona *V. jacquinii*, *V. teucrium* i *V. urticifolia*.

MATERIJAL I METODE

1. Biljni materijal

Biljni materijal korišćen za analizu predstavljaju nadzemni delovi u cvetu ispitivanih vrsta roda *Veronica*, prikupljeni na odgovarajućim staništima planinskih regiona Srbije (**Tabela 9**). Determinacija biljnog materijala i taksonomska nomenklatura istraživanih taksona urađena je prema Flori SR Srbije VI (1974). Herbarski materijal je deponovan na Farmaceutskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na Katedri za botaniku, kao i u Institutu za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“.

Veći deo biljnog materijala je osušen prirodnim putem na promajnom mestu u hladu, dok je za morfološku karakterizaciju korišćen svež biljni materijal u 50% etanolu. Neposredno pre pripreme odgovarajućih ekstrakata osušen biljni materijal je usitnjen mlevenjem.

Tabela 9. Lokaliteti i vreme sakupljanja

Vrsta	Lokalitet i vreme sakupljanja	Kolektorski broj
<i>V. jacquinii</i>	Vršačke planine jun 2008. godine	Leg. Živković J. VR 159
	Goč*	Leg. Živković J. VR 213
	Jun 2009. godine	
	Stol* 10.06. 2009. godine	Leg. Živković J. & Arsenijević J., HFF 3219
<i>V. teucrium</i>	Zlatibor** jun 2011. godine	Leg. Živković J. HFF 3536
	Vršačke planine jun 2008. godine	Leg. Živković J. VR 157
	Stol* 10.06. 2009. godine	Leg. Živković J. & Arsenijević J., HFF 3218
	Zlatibor**	

	jun 2011. godine	
<i>V. urticifolia</i>	Goč	Leg. Živković J. VR 165
	9.06. 2009. godine	
	Zlatibor**	
	jun 2011. godine	
Legenda: * - biljni materijal korišćen za ispitivanje neorganskog sastava; ** - biljni materijal korišćen za morfološku analizu		

Sa lokaliteta na kojima je sakupljen biljni materijal za određivanje sadržaja teških metala sakupljeni su i uzorci zemljišta (**Tabela 10**). Za ove lokalitete birane su oblasti sa najgušćim vegetacionim pokrivačem. Zemljište je sakupljeno sa površine udaljenosti do 10 m u odnosu na odgovarajuću biljku. Pre početka analize biljni i uzorci zemljišta su osušeni na sobnoj temperaturi i nakon toga samleveni.

Tabela 10. Lista biljnih uzoraka i lokaliteta sakupljanja

<i>Lokalitet</i>	<i>Vrsta</i>	<i>Stanište</i>	<i>Koordinate</i>	<i>Geološka podloga*</i>
1. Goč	<i>Veronica urticifolia</i>	Livada	N 43° 33' 39.2" E 20° 44' 24.8" H 870 m	Serpentinit
2. Goč	<i>Veronica urticifolia</i>	Pilana	N 43° 33' 29.5" E 20° 44' 53.3" H 840 m	Serpentinit
3. Goč	<i>Veronica urticifolia</i>	Livada pored sportskog terena	N 43° 33' 28.6" E 20° 44' 53.3" H 858 m	Serpentinit
4. Goč	<i>Veronica urticifolia</i>	Livada	N 43° 33' 32.8" E 20° 45' 04.4" H 844 m	Serpentinit
5. Goč	<i>Veronica jacquinii</i>	Livada	N 43° 33' 39.2" E 20° 44' 24.8" H 870 m	Serpentinit
6. Vršačke planine	<i>Veronica teucrium</i>	Planinski put (umeren saobraćaj)	N 45° 07' 11.7" E 21° 19' 47.1" H 293 m	Gnajs

7.	Vršačke planine	<i>Veronica teucrium</i>	Šumska staza	N 45° 07' 10.5" E 21° 19' 57.6" H 291 m	Gnajs
8.	Vršačke planine	<i>Veronica teucrium</i>	Šumska staza	N 45° 07' 18.5" E 21° 21' 10.0" H 418 m	Gnajs
9.	Vršačke planine	<i>Veronica jacquinii</i>	Planinarski dom	N 45° 07' 37.7" E 21° 20' 31.9" H 357 m	Gnajs
10.	Stol	<i>Veronica jacquinii</i>	Šuma	N 44° 10' 08.3" E 22° 07' 41.8" H 831 m	Krečnjak
11.	Stol	<i>Veronica teucrium</i>	Planinarski dom	N 44° 10' 19.6" E 22° 07' 30.0" H 855 m	Krečnjak

* Marković i sar., 1984

2. Instrumenti i operativni uslovi

Za morfološku, hemijsku i farmakološku analizu ispitivanih taksona korišćene su različite instrumentalne metode i aparati.

Za histohemijsku analizu korišćen je LEICA DCML svetlosni mikroskop opremljen digitalnom kamerom i softverom IM 1000.

Za fluorescentnu mikroskopiju biljnih preseka korišćen je epifluorescentni mikroskop LEICA DMLS opremljen HBO 50 W živinom lampom i rasponom filter blokova (A: BP 340 - 380, I3: BP 450-490 i N2.1: BP 515-580).

Aktivna i potencijalna kiselost zemljišta merena je na pHM 240 Radiometer analitičkom pH-metru.

Za mikrotalasnu digestiju biljnih i uzoraka zemljišta u kiseloj sredini korišćena je mikrotalasna pećnica CEM MDS-2000.

Određivanje sadržaja Cu, Zn, Mn i Fe u biljnim i uzorcima zemljišta vršeno je na atomskom apsorpcionom spektrofotometru Perkin-Elmer, model 5000 sa šupljom katodnom lampom. Za određivanje Cr korišćen je takođe atomski apsorpcioni spektrofotometar Perkin-Elmer, model 5000, ali sa grafitnom peći HGA 400 sa automatskim kontrolorom sagorevanja i pirolitičkim grafitnim kivetama.

Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja ukupnih iridoida, fenola i fenilpropanoida je urađeno na UV/VIS spektrofotometru Hewlett-Packard, model HP 8543.

Visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC) izvedena je na aparatu Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) opremljenim detektorom sa diodnim nizom (DAD) model G1315B, binarnom pumpom model G1312A i autosemplerom model G1313A, na koloni Agilent Zorbax SB – C18, veličine čestica 5 μm i dimenzija 150 \times 4,6 mm.

Visokoefikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) izvedena je na Camag aparatu (Švajcarska) opremljenom Linomat 5 aplikatorom, automatskom komorom za razvijanje ploče ADC2, Scanner 3 spektrodensitometrom i Reprostar 3 sistemom za dokumentaciju.

Za LC-DAD-ESI/MS analizu ispitivanih herbi korišćen je Agilent 1100 aparat kuplovan sa kvaternom pumpom i DAD detektorom. Kontrola instrumenata, prikupljanje i obrada podataka vršeni su primenom HPChem Station softvera (ver. A. 05. 04). Primenjena je Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18 kolona, veličine čestica 3 μm i dimenzija 150 \times 4,6 mm.

Za MS detekciju primenjen je API 3200 Qtrap opremljen ESI izvorom i tripl – kvadrupol analizatorom mase koji je kontrolisan primenom Analyst 5.1. softvera.

Za LC-MS/MS analizu odabranih fenolnih jedinjenja u ekstraktima odabranih taksona, kao i za kvantitativnu analizu metabolita arahidonske kiseline, korišćen je Agilent 1200 aparat kuplovan sa 6410B trostrukim kvadrupolom masenim spektrometrom sa elektrosprej jonizacijom (ESI). Kontrola instrumenata, prikupljanje i obrada podataka vršeni su primenom Agilent softvera „MassHunter“ (ver. B.03.01).

3. Priprema ekstrakata

Osušen i prašen biljni materijal ekstrahovan je u tamnim bocama tokom 48 h uz povremeno mešanje. Odnos droge i ekstrakcionog sredstva je iznosio 1:20 (*m/v*). Nakon završene ekstrakcije, pod istim uslovima izvršena je i re-ekstrakcija. Dobijeni ekstrakti su sjedinjeni, a rastvarač je uklonjen uparavanjem pod sniženim pritiskom. Ekstrakti su dodatno osušeni do konstantne mase u vakuum-eksikatoru, na sobnoj temperaturi. Kako razlike u polaritetu odabranog ekstrakcionog sredstva utiču na rastvorljivost sekundarnih metabolita prisutnih u uzorku, svaka od tri ispitivane *Veronica* vrste ekstrahovana je posebno sa vodom, metanolom i 70%-nim acetonom. Prinos dobijenih ekstrakata prikazan je u Tabeli 11.

Dobijeni suvi ekstrakti su čuvani u vakuum eksikatoru i neposredno pre hemijskih i farmakoloških ispitivanja rastvarani su u odgovarajućem rastvaraču primenom ultrazvučnog kupatila i nakon toga su filtrirani.

Tabela 11. Prinos ekstrakata odabranih *Veronica* vrsta dobijenih procesom maceracije uz primenu metanola, vode i 70%-nog acetona kao ekstrakcionog sredstva

Vrsta	Prinos nakon maceracije metanolom (%)	Prinos nakon maceracije 70% acetonom (%)	Prinos nakon maceracije vodom (%)
<i>V. urticifolia</i>	18,52	26,18	26,22
<i>V. teucrium</i>	26,32	41,34	34,21
<i>V. jacquinii</i>	26,78	36,74	37,01

4. Morfološko-anatomska karakterizacija

4.2. Mikroskopska analiza

Mikroskopska analiza sprášenog biljnog materijala (*Veronicae jacquini pulvis*, *Veronicae teucrium pulvis* i *Veronicae urticifoliae pulvis*) izvršena je primenom opšteg reaktiva. Opšti reaktiv za mikroskopiranje sadrži sledeće reagensne: anilin sulfat (boji odrvenjene elemente zlatnožuto), feri-amonijum sulfat (boji tanine plavocrveno ili zeleno), sudan III (boji masna i etarska ulja, smole, suberin, kutin i vosak crveno) i jod (boji skrob plavoljubičasto).

Anatomska građa stabla i lista istraživanih biljaka analizirana je na trajnim preparatima pravljenim standardnom parafinskom metodom (debljine 5-10 μm) i dvojno obojenim primenom alcian plavog i safranina (1% u 50% etanolu) primenom svetlosne mikroskopije.

4.3. Histohehijaska analiza

Za sva histohehijaska ispitivanja korišćen je svež biljni materijal. Poprečni preseki stabla i lista ispitivanih vrsta su ručno pravljeni. Korišćeni su sledeći reagensi: Lugol za skrob (Johansen, 1940), Sudan III (Johansen, 1940; Lison, 1960), fero sulfat i feri hlorid za fenolna jedinjenja (Johansen 1940), aluminijum-trihlorid za flavonoide (Guerin i sur., 1971), gvožđe-sulfat i gvožđe-hlorid (Clark, 1981; Johansen, 1940) za tanine/fenolna jedinjenja, Wagner-ov i Dittmar-ov reagens za alkaloidne (Furr i Mahlberg, 1981) i antimon-trihlorid za steroide (Hardman i Sofowora, 1972). Standardni kontrolni postupci u svim testovima su urađeni istovremeno.

4.4. Fluorescentna mikroskopija

Nebojeni preseki su posmatrani na epifluorescentnom mikroskopu pod UV svetlom (340-380 nm), kako bi se ispitala prisutnost fenola koji autofluoresciraju na ovim talasnim dužinama (Ruzin, 1999). Ispitivani uzorci su takođe tretirani aluminijum trihloridom u cilju ispitivanja prisustva flavonoida (Guerin i sar., 1971).

5. Hemijska analiza

5.1. Određivanje sadržaja teških metala u biljnim i uzorcima zemljišta

5.1.1. Određivanje kiselosti zemljišta

Kiselost uzoraka zemljišta merena je u supernatantu suspenzije zemljišta. Za određivanje aktivne (stvarne) kiselosti suspenzija je dobijena mešanjem zemljišta i destilovane vode u odnosu 1 : 2,5. Isti odnos primenjen je i kod određivanja potencijalne kiselosti, ali je umesto destilovane vode korišćen 1 M rastvor KCl kako bi postali dostupni i H^+ joni adsorbovani za koloidne čestice zemljišta.

5.1.2. Mikrotalasna digestija

Za razaranje materijala korišćena je mikrotalasna digestija u kiseloj sredini. U 0,5 g uzorka (suva masa) dodato je 2 ml H_2O_2 (30% v/v) i 7 ml HNO_3 , a zatim je izvršeno spaljivanje po zadatom temperaturnom programu. Nakon spaljivanja, uzorci su hlađeni i razblaživani redestilovanom vodom do zapremine od 25 ml. Uporedo je pripremana i slepa proba.

5.1.3. Atomska apsorpciona spektrometrija

Određivanje sadržaja Cu, Zn, Mn i Fe izvršeno je metodom plamene atomske apsorpcione spektrometrije (FAAS) uz primenu šupljih katodnih lampi. Signali su mereni uz primenu deuterijumske lampe za pozadinsku korekciju pri optimalnoj visini plamena.

Određivanje sadržaja Cr izvršeno je metodom atomske apsorpcione spektrometrije sa grafitnom kivetom (GF-AAS) uz primenu sledećeg temperaturnog programa: 110, 1650, 2500 i 2650°C, za sušenje, pirolizu, atomizaciju i čišćenje.

U **Tabeli 12** prikazane su radne talasne dužine za svaki od analiziranih elemenata, kao i limiti detekcije za primenjenu metodu.

Tabela 12. Radni uslovi za atomsku apsorpcionu spektroskopiju

Element	λ^a [nm]	λ^b [nm]	MDL [mg/kg]	Radni opseg [mg/kg]
Cu	324,7	-	0,05	4
Fe	248,3	-	0,05	10
Mn	279,5	-	0,05	2
Zn	213,9	-	0,05	1
Cr	-	357,6	0,005	0,2

^aFAAS, ^bGF-AAS, MDL – detekcioni limit metode.

Tačnost metode je potvrđena analizom ispitivanih teških metala u uzorcima standardnih referentnih materijala (NIST SRM 1547 – Peach Leaves i NIST SRM 2711 – Montana II Soil) (**Tabela 13**).

Kvantifikacija je izvršena eksternom kalibracijom nakon regresione i korelacione analize.

Tabela 13. Sadržaj teških metala u uzorcima standardnih referentnih materijala

Element	NIST SRM 1547 – Peach Leaves			NIST SRM 2711 – Montana II Soil		
	Dobijeni sadržaj (μg/g)	Sertifikovana vrednost (μg/g)	Tačnost (%)	Dobijeni sadržaj (μg/g)	Sertifikovana vrednost (μg/g)	Tačnost (%)
Cu	4,2 ± 0,5	3,7 ± 0,4	113,5	120,0 ± 3,0 ^a	114,0 ± 2,0 ^a	95,0 ^a
Fe	199,0 ± 12,0	218,0 ± 14,0	91,2	2,7 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,1 ^b	92,4 ^b
Mn	113,0 ± 8,0	98,0 ± 3,0	115,3	685,0 ± 30,0 ^a	638,0 ± 28,0 ^a	107,4 ^a
Zn	19,6 ± 0,5	17,9 ± 0,4	109,5	325,1 ± 3,2 ^a	350,4 ± 4,8 ^a	92,8 ^a
Cr	0,9	1,0	89,0	51,0 ^a	47,0 ^a	108,5 ^a

^a – μg/ml; ^b - %.

5.2. VIS spektrofotometrijske metode

5.2.1. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Sadržaj ukupnih fenola u vodenim, metanolnim i 70%-nim acetonskim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica* je određivan spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom (Velioglu i sar., 1998). Ispitivani suvi ekstrakti su rastvoreni u 25 ml odgovarajućeg ekstrakcionog sredstva. Sto mikrolitara dobijenog tečnog ekstrakta je dodato u 750 µl razblaženog (1:10) FC reagensa. Pet minuta kasnije, dodato je 750 µl natrijum-karbonata (60 mg/ml). Nakon 90 min inkubacije na sobnoj temperaturi, izmerena je apsorbanacija na 725 nm. Za kalibraciju standardne krive korišćena je galna kiselina (0-100 mg/l). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti galne kiseline po gramu suvog ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

5.2.2. Određivanje sadržaja ukupnih fenilpropanoida

Sadržaj ukupnih fenilpropanoida u ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica* određivan je spektrofotometrijskom metodom, po proceduri opisanoj u Evropskoj farmakopeji 6.0 za drogu *Ballotae nigrae herba* (Ph. Eur. 6.0., 2007). Suvi ekstrakt rastvoren je u odgovarajućem ekstrakcionom sredstvu (metanol, voda ili 70%-ni aceton). Dobijeni tečni ekstrakt prenet je u odmernu tikvicu od 100 ml, i nakon toga dopunjen istim ekstrakcionim sredstvom. Jedan ml dobijenog osnovnog rastvora prenet je u odmernu tikvicu od 10 ml, dodata su 2 ml hlorovodonične kiseline (0,5 M), i 2 ml rastvora nastalog rastvaranjem 10 g natrijum nitrita i 10 g natrijum molibdata u 100 ml vode. Nakon toga je dodato i 2 ml rastvora natrijum hidroksida (2 M) i dopunjeno je vodom do crte. Slepa proba dobijena je prenošenjem 1 ml osnovnog ekstrakta u odmernu tikvicu od 10 ml, dodavanjem 2 ml hlorovodonične kiseline (0,5 M), a zatim i 2 ml rastvora natrijum hidroksida (2 M) i dopunjavanjem do crte. Apsorbancija uzorka merena je uz slepu probu na 525 nm. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja. Sadržaj fenilpropanoida izražen je kao sadržaj derivata hidroksicimene kiseline, prema formuli:

$$\% \text{ akteozida} = (A \times 1000 / m \times 185)$$

A - apsorbanacija uzorka

m - masa ekstrakta u g.

5.2.3. Određivanje sadržaja ukupnih iridoida

Sadržaj ukupnih iridoida u metanolnim, vodenim i 70%-nim acetonskim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica* određivan je spektrofotometrijskom metodom, na bazi reakcije sa Trimm-Hill reagensom (Janković i sar., 2012). Suvi ekstrakt (5 mg), rastvoren je u odgovarajućem ekstrakcionom sredstvu (metanol, voda, 70%-ni aceton). Sto mikrolitara dobijenog tečnog ekstrakta pomešano je sa 1 ml Trim-Hill reagensa (sirćetna kiselina: 0,2% bakar (II) sulfat: koncentrovana hlorovodonična kiselina/ 10:1:0.5). Uzorak je grejan 5 min na 100°C. Ohlađenom rastvoru merena je apsorbanacija na 609 nm. Za kalibraciju standardne krive korišćen je aukubin (0,1-1 mg/ml). Rezultati su izraženi kao ekvivalenti aukubina po gramu suvog ekstrakta. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

5.3. Kvantitativna HPTLC analiza aukubina i akteozida

Za HPTLC analizu 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi ispitivanih vrsta roda *Veronica*, po 40 mg suvog ekstrakta je ekstrahovano sa 2 ml metanola. Ovako dobijeni ekstrakti su pre injektovanja filtrirani kroz membranski filter (0,45 µm).

Za analizu je korišćena HPTLC silika gel 60F₂₅₄ staklena ploča (Merk, Nemačka), dimenzija 20 x 10 cm. Ploče su razvijane u mobilnoj fazi etilacetat: mravlja kiselina: sirćetna kiselina: voda u odnosu 90: 15: 15: 20 (v/v/v/v) u automatskoj komori koja je prethodno zasićena parama mobilne faze u trajanju od 20 min uz primenu filter papira. Ekstrakti su naneti na ploču u zapremini 1-4 µl, dok su rastvori aukubina koncentracije 250 µg/ml i akteozida koncentracije 500 µg/ml naneti u zapremini od 0,5 – 4 µl. Svi rastvori su naneti u vidu trake dužine 9 mm, na visini 8 mm od ivice ploče pomoću šprica Hamilton (zapremine 100 µl). Ploča je razvijana do visine od 80 mm od ivice ploče.

Nakon razvijanja, ploče su osušene na 120 °C tokom 10 min. Posthromatografska derivatizacija ploče izvršena je njenim uranjanjem na par sekundi u reagens

anisaldehyd/sumporna kiselina, nakon čega je ploča osušena na 105 °C tokom 5 min. Pošto je vizuelizacija omogućena, ploča je skenirana na 520 nm, a evaluacija je izvršena polinomijalnom regresionom analizom preko površine pika.

5.4. Kvantitativna HPLC analiza aukubina i akteozida

Za HPLC analizu ispitivani ekstrakti rastvoreni su u eluentu A (1%-na ortofosforna kiselina u vodi), a zatim profiltrirani kroz membranski filter (0,45 µm).

Kao mobilna faza korišćena je 1%-na ortofosforna kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B). Injekciona zapremina uzorka je bila 5 µl, a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0 – 5 min, 2 – 10% B; 5 – 10 min, 10 – 15% B; 10 – 30 min, 15% B, 30 – 32 min, 15 – 18% B; 32 – 42 min, 18% B; 42 – 50 min, 18 – 25% B; 50 – 55 min, 25 – 40% B; 55 – 60 min, 40 – 70% B; 60 – 63 min, 70 – 100% B.

Brzina protoka iznosila je 1 ml/min, a UV apsorbancija je merena na 204, 270 i 330 nm.

Statistička analiza

Podaci su obrađeni u programu Origin, verzija 8,0. Za procenu značajnosti razlike vrednosti aukubina dobijenih primenom HPLC i HPTLC tehnika korišćen je Studentov t-test. Nivo značajnosti je postavljen na 0,05.

5.5. HPLC-DAD/ESI-MS analiza

Jedan g droge ekstrahovan je sa 30 ml 80%-nog metanola na sobnoj temperaturi, tokom 1 h uz neprekidno mešanje. Dobijeni ekstrakt je profiltriran, dok je ostatatak reekstrahovan sa 2 puta po 30 ml istog ekstrakcionog sredstva. Ekstrakti su spojeni, upareni do suva i potom rastvoreni u 80% metanolu do koncentracije 5 mg/ml.

Kao mobilna faza korišćeni su 0,1%-na mravlja kiselina u vodi (faza A) i acetonitril (faza B). Injekciona zapremina uzorka je 5 µl, a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0 – 5 min, 15% B; 5 – 10 min, 15 – 20% B; 10 – 20 min, 20 – 25% B; 20 – 30 min, 25 – 35% B; 30 – 40 min, 35 – 50% B, nakon čega sledi re-ekvilibracija kolone.

Brzina protoka iznosila je 0,5 ml/min, a UV apsorbanija je merena na 280 i 370 nm. Pritisak nosećeg gasa (N₂) iznosio je 20 psi, dok je pritisak raspršivača bio 40 psi na 400 °C. Za elektrosprej jonizaciju primenjen je negativan mod pri kapilarnom naponu od 4500 V.

Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. UV spektri, MS spektri i retencionna vremena identifikovanih jedinjenja su potom upoređeni sa odgovarajućim podacima za standardna jedinjenja, ili sa literaturnim podacima. Za kvantitativnu analizu fenolnih jedinjenja korišćene su kalibracione krive dobijene nakon injektovanja poznatih koncentracija (1-100 µg/ml) različitih standardnih jedinjenja: luteolin-7-*O*-glukozida, apigenin-7-*O*-glukozida, hlorogenske kiseline, kafene kiseline, *p*-kumarinske kiseline.

5.5. Kvantitativna LC-MS/MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja

Odabrane fenolne komponente u 70%-nim acetonskim ekstraktima kvantifikovane su primenom LC-MS/MS tehnike i metode prethodno opisane u doktorskoj disertaciji Marije Lesjak (2011).

Za hromatografsko razdvajanje je korišćena reverzno fazna kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 RR, veličine čestice 1,8 µm i dimenzija 50 × 4,6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Binarna mobilna faza se sastojala od 0,05%-ne mravlje kiseline (A) i metanola (B). Injekciona zapremina je iznosila 5 µl a eluiranje je vršeno gradijentom po sledećoj šemi: 0-6 min 30-70% B, 6-9 min 70-100% B, 9-12 min 100% B, uz post-vreme od 3 min, pri protoku od 1 ml/min i temperaturi od 45 °C.

Protok nosećeg gasa (N₂) je bio 9 l/min, pritisak raspršivača 40 psi a temperatura nosećeg gasa 350°C. Za elektrosprej jonizaciju (ESI) primenjeni su negativna jonska polarnost i kapilarni napon 4000 V.

Sva jedinjenja su kvantifikovana praćenjem višestrukih reakcija (MRM režim). Optimizirani MS/MS parametri su dati u **Tabeli 14**. Ispitivani ekstrakti su rastvoreni u mobilnoj fazi do koncentracije 0,2 mg/ml, a standardna jedinjenja u DMSO do koncentracije 10 mg/ml. Pripremljena je smeša ovih rastvora pri čemu je koncentracija svakog standarda u smeši iznosila 100 µg/ml. Za izradu kalibracione krive napravljena je serija razblaženja pri čemu je opseg koncentracija standardnih jedinjenja iznosio od 0,0015 do 25 µg/ml. Iz površine pikova primenom jednačine za linearnu regresionu analizu dobijene primenom

kalibracionih krivih ($r^2 > 0,995$) određena je njihova koncentracija u ispitivanim ekstraktima. Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. MS spektri i retenciona vremena identifikovanih jedinjenja su potom upoređeni sa odgovarajućim podacima za standardna jedinjenja.

Svi korišćeni standardi nabavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich Chem (Steinheim, Germany), Fluka Chemie GmbH (Buchs, Swizerland) ili ChromaDex (Santa Ana, USA).

Tabela 14. LC-MS/MS podaci za standardna jedinjenja (Lesjak, 2011)

Jedinjenje	Prekursor jon m/z	Produkt jon m/z	Napon fragmentora (V)	Koliziona energija (V)	Retenciono vreme (min)
Hina kiselina	191	85	150	20	0.52
Galna kiselina	169	125	90	10	0.58
Katehin	289	245	150	10	0.74
Protokatehinska kiselina	153	109	105	9	0.79
Hlorogenska kiselina	353	191	100	10	0.80
Epigalokatehin galat	457	169	165	16	0.81
Epikatehin	289	245	150	10	0.95
2,5- dihidroksibenzoeva kiselina	153	109	100	9	1.03
<i>p</i> -hidroksibenzoeva kiselina	137	93	80	10	1.08
Eskuletin	177	133	105	15	1.13
Kafena kiselina	179	135	100	10	1.18
Vanilinska kiselina	167	108	100	15	1.24
Siringinska kiselina	197	182	90	7	1.31
<i>p</i> -kumarinska	163	119	90	9	1.69

kiselina					
Umbeliferon	161	133	120	19	1.73
Skopoletin	191	176	80	8	1.77
Ferulna kiselina	193	134	90	11	1.90
Viteksin	431	311	200	22	1.90
Sinapinska kiselina	223	193	100	17	1.92
Luteolin-7- <i>O</i> - glukozyd (Cinarozid)	447	285	230	30	2.13
Kvercetin-3- <i>O</i> - galaktozyd (Hiperozid)	463	300	200	30	2.16
Kvercetin-3- <i>O</i> - glukozyd (Izokvercetin)	463	300	210	30	2.25
Kvercetin-3- <i>O</i> - rutinozyd (Rutin)	609	300	135	42	2.33
Apiin	563	269	250	36	2.60
<i>o</i> -kumarinska kiselina	163	119	100	5	2.62
Miricetin	317	179	150	20	2.67
Kvercetin-3- <i>O</i> - ramnozyd (Kvercitrin)	447	300	190	27	2.67
Kempferol-3- <i>O</i> - glukozyde (Astragalin)	447	284	190	30	2.80
Apigenin-7- <i>O</i> - glukozyd (Apigetrin)	431	268	135	41	2.81
Sekoizolaricirezinol	361	165	130	26	2.90
3,4-	207	103	110	7	2.99

dimetoksicimetna

kiselina

Bajkalin	445	269	140	22	3.40
Daidzein	253	208	145	31	3.43
Matairezinol	357	122	130	24	3.66
Kvercetin	301	151	130	15	3.43
Naringenin	271	151	130	16	3.87
Cimetna kiselina	147	103	100	5	3.91
Luteolin	285	133	135	25	4.03
Genistein	269	133	145	32	4.12
Kemferol	285	285	130	0	4.55
Apigenin	269	117	130	25	4.71
Izoramnetin	315	300	160	21	4.79
Hrizoeriol	299	284	125	20	4.82
Bajkalein	269	269	165	0	5.15
Amentoflavon	537	375	220	35	5.78

6. Farmakološka analiza

6.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

6.1.1. *In vitro* ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Za *in vitro* ispitivanje antioksidantne aktivnosti 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Veronica* primenjena su dva testa:

- FRAP test za određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti i
- DPPH test za određivanje sposobnost neutralizacije DPPH radikala.

6.1.1.1. Ispitivanje ukupne antioksidantne aktivnosti (FRAP test)

FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) test primenjuje se za određivanje ukupnog antioksidantnog potencijala uzorka, a zasnovan je na redukciji Fe^{3+} - 2,4,6,-tripiridil-S-triazin (Fe^{3+} - TPTZ) kompleksa do plavo obojenog Fe^{2+} - TPTZ kompleksa pri niskoj pH vrednosti čiji se intenzitet boje meri na 593 nm (Pellegrini i sar., 2003). Reagens za FRAP test je dobijen mešanjem 2,5 ml rastvora TPTZ (10 mmol/l 2,4,6-tripiridil-s-triazina u 40 mmol/l hlorovodonične kiseline), 2,5 ml rastvora $\text{FeCl}_3 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (20 mmol/l u destilovanoj vodi) i 25 ml acetatnog pufera (300 mmol/l, pH = 3,6). U epruvete je sipano 3 ml FRAP reagensa, 100 μl ekstrakta odgovarajuće koncentracije rastvorenog u smeši acetona i vode, nakon čega je sadržaj inkubiran 30 min na 37 °C. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 593 nm. Za kalibraciju su korišćeni vodeni rastvori FeSO_4 poznate koncentracije (u rasponu od 100-1000 mmol/l). Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakata je izražena kao $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

6.1.1.2. Ispitivanje sposobnosti neutralizacije DPPH radikala

Sposobnost ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Veronica* da neutrališu 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal je ispitivana po metodi Cuendet-a i saradnika (1997). Usled prisustva nesparenog elektrona DPPH snažno apsorbuje u vidljivom delu spektra na talasnoj

dužini od 517 nm (ljubičasta boja). Nakon sparivanja elektrona boja prelazi u žutu, što predstavlja merilo intenziteta antiradikalske aktivnosti i određuje se spektrofotometrijski.

Na početku testa napravljena je serija razblaženja ispitivanih ekstrakata u 70%-nom acetonu. Po 4 ml dobijenih tečnih ekstrakata je pomešano sa 1 ml 0,5 mM rastvora DPPH u 70%-nom etanolu i ostavljeno u mraku 30 min. Apsorbancija rastvora je zatim merena na 517 nm. Procenat neutralizacije DPPH radikala je izračunat korišćenjem sledeće formule:

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

gde je A_k apsorbancija negativne kontrole (koja umesto rastvora ekstrakta sadrži 4 ml odgovarajućeg rastvarača), a A_a je apsorbancija uzoraka.

Koncentracija ekstrakata potrebna za neutralizaciju 50% DPPH radikala (EC_{50} vrednosti) je određena iz grafika zavisnosti procenta neutralizacije DPPH radikala od koncentracije ekstrakta, primenom algoritma nelinearne regresije. Dobijeni rezultati predstavljaju srednju vrednost tri određivanja.

6.1.2. *In vivo* ispitivanje antioksidantne aktivnosti

In vivo ispitivanje antioksidantne aktivnosti 70%-nih ekstrakata odabranih vrsta roda *Veronica* sprovedeno je primenom postupka opisanog u doktorskoj disertaciji Tatjane Ćebović (2006).

6.1.2.1. Eksperimentalne životinje

Postupak rada sa eksperimentalnim životinjama, kao i primenjeni eksperimentalni protokoli u skladu su sa Pravilnikom o radu i korišćenju laboratorijskih životinja koji uređuje Etička komisija pri Univerzitetu u Novom Sadu. Korišćeni su pacovi soja Spargue Dawley dobijeni iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Instituta za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Novi Sad (Novi Sad, Vojvodina, Srbija). Životinje su čuvane u odgovarajućim kavezima, u strogo kontrolisanim uslovima temperature (25 °C) i vlažnosti vazduha (30-50%), pri režimu svetlo - tama 12h:12h, uz slobodan pristup odgovarajućoj

standardnoj hrani za pacove (PA sa 20% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Vojvodina, Srbija) i vodi. Pacovi korišćeni u ispitivanju bili su oba pola, telesne mase 200-250 g.

6.1.2.2. Postupak *in vivo* ispitivanja

Eksperimenti su urađeni sa pripremljenim 70%-nim acetonskim ekstraktima odbranih taksona. Sve životinje su jednakrotno intraperitonealno (*i.p.*) primale odgovarajuće ekstrakte, odnosno fiziološki rastvor (kontrolna grupa).

Ispitivanja na Spargue Dawley pacovima su sprovedena i planirana prema protokolu prikazanom u **Tabeli 15**. Na kraju eksperimenta životinje su izmerene, anestezirane izofluranom i dekapitovane. Uzorci krvi za biohemijske analize dobijeni su iz donje šuplje vene, a masa jetre je izmerena nakon uklanjanja žučne kese. Uzorci tkiva jetre mase 1 g su homogenizovani u TRIS-HCl/saharoznom medijumu (50 mM, 0.25M, pH 7.40) odnos 1:3, 4°C, primenom Potter-Elvehjem-ovog seta za homogenizaciju. Dobijeni homogenat je centrifugiran na 3000 o/min tokom 10 min, a koncentracija proteina određena je biuretskom metodom primenom bovinog serum albumina kao standarda (Wood, 1989). Eksperiment je ponovljen za svaki ispitivani ekstrakt. Uzorci krvi i jetre korišćeni su za određivanje biohemijskih parametara oksidativnog stresa.

Tabela 15. Protokol tretmana eksperimentalnih životinja

		Grupe životinja:							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Vreme		kontrolna grupa CTRL	negativna kontrolna grupa CTRL-CCL₄	A	B	C	A-CCL₄	B-CCL₄	C-CCL₄
	1 – 6. dan	fiziološki rastvor 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	fiziološki rastvor 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 1,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 2,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 5,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 1,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 2,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	ispitivani ekstrakt 5,0% 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>
	7. dan		CCL ₄ 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	-	-	-	CCL ₄ 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	CCL ₄ 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>	CCL ₄ 2,0 mL/kg <i>i.p.</i>
	8. dan	žrtvovanje							

6.1.2.3. Biohemijska ispitivanja

In vivo ispitivanje antioksidantnih svojstava 70%-nih acetonskih ekstrakata odabranih *Veronica* vrsta podrazumevalo je praćenje biohemijskih parametara (iz homogenata jetre i hemolizata krvi) oksidativnog stresa. Ovi biohemijski testovi uključivali su određivanje aktivnosti nekoliko antioksidantnih enzima: ksantin oksidaze (XOD) (Bergmayer, 1970), katalaze (CAT) (Beers i Sizer, 1950), peroksidaze (Px) (Simon i sar., 1974), glutation peroksidaze (GSHPx) (Chin, 1976), glutation reduktaze (GR) (Goldberg i Spooner, 1983), kao i sadržaja redukovanog glutationa (GSH) (Beuthler, 1983), i intenziteta lipidne peroksidacije (LPx) (Buege i Aust, 1978).

Ksantin oksidaza (XOD)

Sadržaj ksantin oksidaze (XOD) određen je spektrofotometrijski merenjem promene apsorpcije na 293 nm, pri transformaciji ksantina u mokraćnu kiselinu (Bergmayer, 1970).

U uzorak homogenata jere zapremine 20-50 μ l dodato je 3 ml rastvora EDTA i ksantina (1 mol/l) u fosfatnom puferu (pH 7,5). Nakon određenog vremena reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min u toku 10 min. Apsorbancija reakcionog proizvoda je izmerena na 293 nm. Rezultati su izračunati na osnovu specifičnog apsorpcionog koeficijenta mokraćne kiseline ($\epsilon=1,2 \times 10^4$ l/mol \cdot cm) i izraženi u nmol mokraćne kiseline koji nastaje tokom 1 min po 1 mg proteina homogenata jetre.

Katalaza (CAT)

Sadržaj katalaze određen je primenom vodonik peroksida (H₂O₂) kao supstrata (Beers i Sizer, 1950).

Uzorak homogenata jetre zapremine 20-50 μ l dodat je u 3 ml rastvora H₂O₂ u fosfatnom puferu (pH 7) pripremljenog mešanjem 0,075 ml 30% H₂O₂ sa puferom (0,05 mol/l; pH 7) i dopunjen do 50,0 ml. Nakon određenog vremena reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 min. Izmerena je apsorbcija na 240 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=4,36 \times 10^4$ L/mol \cdot cm).

Peroksidaza (Px)

Sadržaj peroksidaze (Px) određen je primenom vodonik peroksida kao supstrata (Simon i sar., 1974).

Na uzorak homogenata jetre zapremine 20-50 μl dodato je 3 ml fosfatnog pufera (0,1 mol/l, pH 7), 50 μl rastvora gvajakola (0,02 mol/l) i 40 μl rastvora vodonik peroksida (0,14 ml 30% H_2O_2 u 100 ml H_2O). Nakon određenog vremena reakcija je zaustavljena, a reakciona smeša centrifugirana je na 3000 o/min tokom 10 min. Merena je apsorbancija reakcionog proizvoda na 436 nm, a rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=2,3\times 10^4$ l/mol \cdot cm).

Glutation peroksidaza (GSHPx)

Sadržaj glutacion peroksidaze (GSHPx) određen je primenom kumol hidroperoksida (α -dimetil-benzilhidroperoksid) kao supstrata (Chin, 1976).

Smeša uzorka homogenata jetre zapremine 20-50 μL i 0,75 ml TRIS/HCl pufera (0,05 mol/l, pH=7,6) je termostatirana 10 min na temperaturi od 37°C, a potom je dodato 0,1 ml rastvora GSH koncentracije 0,0021 mol/l i 0,1 ml metanolnog rastvora kumol hidroperoksida (1:200). Dobijena smeša je termostatirana 5 min na 37 °C. Za zaustavljanje reakcije dodat je 1 ml 20%-nog rastvora TCA. Reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 min. Potom je u 2 ml TRIS/HCl pufera pH vrednosti 8,9 (pufer II) koncentracije 0,4 mol/L dodat 1 ml supernatanta i 0,1 ml rastvora Elmanovog reagensa (0,02 g 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoeve kiseline) DTNB (0,02 g u 5 ml pufera II). Merena je apsorbancija reakcionog proizvoda na 412 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,36\times 10^4$ L/mol \cdot cm).

Glutation reduktaza (GR)

Sadržaj glutacion reduktaze određen je praćenjem enzimske reakcije redukcije oksidovanog glutationa (GSSG) u prisustvu NADPH (Goldberg i Spooner, 1983).

Reakciona smeša je pripremljena od 20-50 μl homogenata jetre, 0,2 ml 2%-nog rastvora GSSG, 0,3 ml rastvora NADPH (0,001 mol/l) i 2 ml fosfatnog pufera (pH=7,6). Nakon određenog vremena reakcija je stopirana, a reakciona smeša je centrifugirana na 3000 o/min tokom 10 min. Apsorbancija nastalog proizvoda merena je na 340 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=6,22\times 10^{-3}$ l/mol \cdot cm).

Redukovani glutation (GSH)

Sadržaj redukovanog glutationa (GSH) određen je na osnovu sadržaja neproteinskih sulfhidrilnih ostataka određenog pomoću Ellman-ovog reagensa (Beuthler, 1984).

Nakon centrifugiranja smeše homogenata jetre zapremine 1 ml i 2 ml rastvora 4%-ne sulfosalicilne kiseline tokom 10 min na 3000 o/min, supernatant je pomešan sa Ellman-ovim reagensom u odnosu 1:40. Apsorbancija dobijenog proizvoda merena je na 412 nm. Sadržaj GSH izračunat je iz molarnog apsorpcionog koeficijenta, a preračunat na masu (mg) proteina preko ukupnih proteina.

Određivanje koncentracije ukupnih proteina

Ukupni proteini određeni su biuretskom metodom (Wood, 1989).

Na uzorak homogenata jetre zapremine 20-50 μ l dodato je 3 ml rastvora biuretskog reagensa ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,15%; K, Na tartarat – 0,6%; rastvor KI – 0,1% u 0,85 mol/l NaOH i deoksiholat – 1,5%) i nakon 30 min merena je apsorbcija nastalog proizvoda na 540 nm. Sadržaj proteina određen je preko kalibracione krive dobijene merenjem različite koncentracije albumina govedeg seruma - BSA (5-50 mg/l).

Intenzitet lipidne peroksidacije (LPx)

Intenzitet lipidne peroksidacije određen je spektrofotometrijski na osnovu reakcije tiobarbiturne kiseline (TBA) sa TBA-reaktivnim vrstama (TBARS) (Buege i Aust, 1978). TBARS podrazumevaju karbonilne produkte peroksidacije lipida ćelijske membrane.

Smeša 20-50 μ l homogenata jetre i 3 ml činidne rastvora izrađenog od 3,75 g TBA, 15 g CCl_3COOH , 20,72 ml 37% HCl i jedne do dve kapi α -tokoferola na 1 l rastvora, zagrevana je tokom 15 min na ključalom vodenom kupatilu. Rastvor je zatim centrifugiran 10 min na 3000 o/min. Apsorbancija supernatanta merena je na 535 nm. Rezultati su izraženi u nmol/mg proteina ($\epsilon=1,56 \times 10^5$ l/mol \times cm).

6.1.2.4. Statistička analiza

Statistički značajne razlike ispoljene antioksidantne aktivnosti testiranih ekstrakata i odgovarajućih kontrola izračunate su primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) uz Bonferoni-jevu korekciju za višestruka poređenja (Origin 8.0). Statistički značajna razlika određivana je nakon poređenja sa kontrolnim grupama za sledeće nivoe značajnosti: $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$; $***p \leq 0,001$.

6.2. Ispitivanje neuroprotektivne aktivnosti

Neuroprotektivna aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata ispitivana je u kulturi ćelija humanog neuroblastoma SH-SY5Y određivanjem vijabilnosti ćelija, indeksa lipidne peroksidacije, i produkcije superoksid jona ($O_2^{\bullet-}$) primenom postupaka opisanih u doktoratu Gordane Tovilović (2012).

Za ovu svrhu, ekstrakti su rastvoreni u dimetil sulfoksidu (DMSO) i potom razblaženi u odgovarajućem medijumu. Konačna DMSO koncentracija iznosila je 0,5 % (v/v), što je unutar opsega u kom se ne ostvaruje značajan uticaj ovog rastvarača na rezultat.

6.2.1. Ćelijska linija

U testu ispitivanja neuroprotektivne aktivnosti korišćene su ćelije humanog neuroblastoma (SH-SY5Y ćelije), a ćelijska linija dobijena je iz ATCC kolekcije (American Type Culture Collection). Ove ćelije su kultivisane u medijumu nastalom mešanjem jednakih zapremina modifikovanog Eagle medijuma i F12 medijuma obogaćenog neesencijalnim amino kiselinama (1%), 2mM L-glutaminom, fetalnim goveđim serumom (FBS) (10%) i smešom antibiotik/antimikotik (1%). Ćelije su, u cilju procene vijabilnosti i produkcije superoksid jona, zasejavane u ploče sa 96 bunara (20×10^3 ćelija po bunaru). Za MDA test ćelije su rasle u sudovima zapremine 25 mL. Nakon 24 h nediferencirane ćelije su tretirane stresorima natrijum nitroprusidom (SNP) i vodonik peroksidom (H_2O_2) i/ili različitim ekstraktima. Ćelijska vijabilnost određivana je 24 h nakon tretmana. Za procenu neuroprotektivne aktivnosti ekstrakata kod ćelija izloženih oksidativnom stresu, ekstrakti su primenjeni kao pretretman, 30 min pre dodatka 1 mM SNP ili 100 μ M H_2O_2 .

6.2.2. Određivanje vijabilnosti ćelija testom kisele fosfataze

Za procenu ćelijske vijabilnosti korišćen je test kisele fosfataze (Connolly i sar., 1986). Nakon perioda inkubacije, medijum je uklonjen, a dodat je 10 mM *p*-nitrofenil fosfat kao supstrat za kiselu fosfatazu. Reakcija je zaustavljena posle 1 h inkubacije dodatkom 0,1 M NaOH na 37 °C. Razvoj boje koji je u korelaciji sa brojem živih, metabolički aktivnih ćelija, praćen je na 405 nm uz primenu ELISA čitača (Multiscan spectrum, Thermo Electron Corporation). Nakon oduzimanja pozadinskog signala (samo NaOH), rezultati su izraženi kao procenat vijabilnosti netretiranih ćelija koje su 100% vijabilne.

6.2.3. Određivanje indeksa lipidne peroksidacije

Indeks lipidne peroksidacije određivan je spektrofotometrijski, kao nivo TBARS. SH-SY5Y ćelije tretirane su sa SNP/H₂O₂ i/ili različitim ekstraktima i sakupljane su primenom tripsinizacije uz dodatak tripsina/EDTA. Nakon centrifugiranja, supernatanti su odbačeni i ćelije su lizirane dvostrukim zamrzavanjem i odmrzavanjem u dejonizovanoj vodi. Sadržaj sponatno formiranih TBARS je meren nakon tretiranja uzoraka ohlađenim reagensom tiobarbiturne kiseline (10%-na trihlorsirćetna kiselina, 0,6%-na tiobarbiturna kiselina) i zagrevanja nastale smeše na 100 °C (Rehncrona i sar., 1980). Apsorbancija je merena na 520 nm.

6.2.4. Merenje produkcije superoksidnih jona

Količina superoksidnih jona merena je putem redukcije nitro plavih tetrazolijum soli po prethodno opisanoj metodi (Song i sar., 2011). Obojeni formazan proizvod koji tom prilikom nastaje kvantifikovan je spektrofotometrijski. Redukcija nitro plavog tetrazolijuma merena je na 560 nm uz primenu ELISA čitača (Multiscan spectrum, Thermo Electron Corporation).

6.2.5. Statistička analiza

Statistički značajne razlike ispoljene neuroprotektivne aktivnosti testiranih ekstrakata i odgovarajuće negativne kontrole određene su primenom jednofaktorske analize varijanse

(ANOVA) uz Bonferoni-jevu korekciju za višestruka poređenja (Origin 8.0). Statistički značajna razlika određivana je u poređenju sa kontrolnim grupama za sledeće nivoe značajnosti: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ i *** $p \leq 0,001$.

6.3. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti

Antiinflamatorna aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata vrsta *V. jacquini*, *V. urticifolia* i *V. teucrium* određena je primenom *ex vivo* metode zasnovane na određivanju sposobnosti inhibicije produkcije medijatora inflamacije i to: 12-HHT, TXB₂, PGE₂ koji nastaju delovanjem enzima ciklooksigenaze-1 i 12-HETE koji se formira delovanjem enzima 12-lipooksigenaze. Proces inflamacije je indukovano delovanjem kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicinom) (Lesjak, 2011). Optimizacija i validacija ove metode detaljno su opisane u doktorskoj disertaciji Ivane Beare (2010). U eksperimentu su primenjeni trombociti kao intaktan ćelijski sistem i izvor ovih enzima, kao i visoko osetljiva i specifična LC-MS/MS tehnika za određivanje glavnih metabolita arahidonske kiseline formiranih u njihovom prisustvu.

6.3.1. Priprema uzoraka

Alikvot humanih trombocita sa 4×10^8 ćelija suspendovan je u puferu (0,137 mol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 2,0 mmol/l KH₂PO₄, 5,0 mmol/l Na₂HPO₄ i 5,0 mmol/l glukoze, pH 7,2) do konačne zapremine 2 mL. Tokom narednih 5 min smeša je lagano mešana na 37 °C. Nakon toga dodati su ekstrakti i standardna jedinjenja rastvorena u DMSO (koncentracioni opseg iznosio je od 10,0 do 300,0; od 0,156 do 5,0 i od 0,01 do 0,6 mg/ml za ekstrakte, kvercetin i aspirin), kao i 0,1 ml kalcimicina (125 µmol/l u DMSO). Tokom naredna 2 min smeša je inkubirana na 37 °C uz umereno mešanje. Ekstrakt u kontroli i kalcimicin u slepoj probi zamenjeni su rastvaračem (DMSO). Smeši je potom dodato 0,3 ml vodenog rastvora CaCl₂ (16,7 mmol/l) ili vode (slepa proba), nakon čega je inkubirana narednih 5 min na 37 °C uz mešanje. Reakcija je stopirana zakišeljavanjem sa 1%-nom mravljom kiselinom do pH 3 (5,8 ml). Interni standard prostaglandina B₂ (50 µl rastvora u DMSO koncentracije 6 µg/ml) je dodat i ekstrakcija proizvoda reakcije je izvršena smešom hloroforma i metanola (1:1, 8,0 ml) uz snažno mućkanje tokom 15 min. Nakon centrifugiranja na $7012 \times g$ tokom 15 min na 4 °C,

organski sloj je odvojen, uparen do suva. Nakon rastvaranja u metanolu i filtriranja korišćen je za dalju LC-MS/MS analizu. Sve analize rađene su u triplikatu.

6.3.2. LC-MS/MS analiza

Za razdvajanje je korišćena reverzno fazna kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 RR, veličine čestice 3,5 μm i dimenzija 30 \times 2,1 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Injekciona zapremina je iznosila 5 μl . Kao mobilna faza A je korišćena 0,6%-na sirćetna kiselina, a kao mobilna faza B metanol. Razdvajanje komponenti je izvršeno prema sledećem gradijentnom programu: 0-2 min 65-100% B, 2-3,5 min 100% B, sa post-vremenom od 3 min, pri protoku mobilne faze od 1 ml/min i temperaturi od 65 $^{\circ}\text{C}$.

Nakon razdvajanja, eluat je usmeravan na ESI jonski izvor. Protok nosećeg gasa (N_2) je iznosio 9 l/min, pritisak raspršivača 30 psi a temperatura nosećeg gasa 350 $^{\circ}\text{C}$. Za elektrosprej jonizaciju (ESI) primenjeni su negativna jonska polarnost i kapilarni napon od 4000 V.

Sva jedinjenja su kvantifikovana u negativnom MRM režimu, a optimizovani parametri za kvantifikaciju prikazani su u **Tabeli 16**. Metoda internog standarda je primenjena kako bi se izbegla potreba za izradom kalibracionih krivih za svako pojedinačno jedinjenje. Za sve preračune korišćen je odnos površina pika analita i internog standarda.

Tabela 16. Optimizovani parametri za kvantifikaciju 12-HHT, TXB₂, PGE₂, 12-HETE i PGB₂ (Lešjak, 2011)

Jedinjenje	Režim	Polaritet jona	Jonska vrsta	Jon prekursor (m/z)	Jon proizvod (m/z)	Kolizijska energija (V)	Napon fragmentora (V)
12-HHT	MRM	NI	[M-H] ⁻	279	261	5	120
TXB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	369	169	15	120
PGE ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	351	271	15	120
12-HETE	MRM	NI	[M-H] ⁻	319	310	7	120
PGB ₂	MRM	NI	[M-H] ⁻	333	315	13	120

6.3.3. Statistička analiza

Procenat inhibicije COX-1 i 12-LOX enzima ostvaren primenom različitih koncentracija ispitivanih ekstrakata izračunat je primenom sledeće jednačine: $I(\%) = 100 \times (R_0 - R) / R_0$, gde R_0 i R predstavljaju nivo odgovora (površina pika metabolita/površina pika internog standarda) u kontrolnoj i u reakciji ispitivanih uzoraka. Vrednosti R i R_0 su korigovane za vrednost slepe probe. Primenom softvera Origin verzija 8.0 napravljene su odgovarajuće inhibiciono-koncentracione krive i sa njih su određene IC_{50} vrednosti (koncentracija ekstrakta koja inhibira formiranje COX-1 i 12-LOX metabolita). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost za tri merenja. Statistička obrada rezultata izvršena je primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA). Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti za $p < 0,05$.

6.4. *In vivo* ispitivanje citotoksične aktivnosti

Rukovanje životinjama i svi eksperimentalni protokoli sprovedeni su u skladu sa Pravilnikom o radu i korišćenju laboratorijskih životinja koji uređuje Etička komisija pri Univerzitetu u Novom Sadu. Za ispitivanje citotoksičnog efekta korišćeni su miševi soja Hannover National Medical Institute (Hann:NMRI). Sve životinje dobijene su iz laboratorije Samostalnog odseka za biohemiju Instituta za laboratorijsku medicinu, Kliničkog centra Novi Sad (Novi Sad, Vojvodina, Srbija). Čuvane su u odgovarajućim kavezima, u strogo kontrolisanim uslovima temperature (25°C) i vlažnosti vazduha (30-50%), pri režimu svetlostima 12 h:12 h, uz slobodan pristup standardnoj hrani za miševе (LM₂ sa 19% proteina, Veterinarski zavod Subotica, Vojvodina, Srbija) i vodi. Za ispitivanje citotoksične aktivnosti korišćeni su NMRI miševi oba pola, starosti 7-8 nedelja, telesne mase 200-250g.

Eksperimenti su izvođeni sa 70%-nim acetonskim ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta. Sve životinje jednokratno su primale intraperitonealno (*i.p.*) odgovarajući ekstrakt, odnosno fiziološki rastvor (kontrolna grupa).

Miševi soja NMRI podeljeni su slučajnim izborom u grupe od po 6 jedinki i tretirane su po sledećem protokolu (Ćebović, 2008):

Grupa EAC - životinje sa implantiranim ćelijama Ehrlich-ovog ascitnog karcinoma (EAC) tretirane sa po 2 ml/kg fiziološkog rastvora, *i.p.*, (n=6)

Grupa PRETRETMAN – životinje su pretretirane sa 2 ml/kg ispitivanog ekstrakta, i.p., tokom 7 dana (n=6)

Nakon 14 dana od dana implementacije EAC, sve životinje su žrtvovane i ascites je sakupljen za dalje biohemijske analize. Eksperiment je ponovljen za svaki od ispitvanih ekstrakata. Da bi se proverila hipoteza da se uticaj ekstrakata na rast i razvoj tumora zasniva na promeni antioksidantnog statusa u ćelijama EAC, isti postupak sproveden je i sa antioksidansom, N-acetil-L-cisteinom (Sigma, 5 mM).

Dozna zavisnost primene ekstrakata je ispitana primenom 5 doza rastvora ekstrakata (1,5 ml/kg, 1 ml/kg, 0,5 ml/kg, 0,2 ml/kg i 0,1 ml/kg). U ovom delu ispitivanja praćen je procenat oštećenih ćelija. Nastavak ogleda sproveden je primenom doze od 2,0 ml/kg telesne mase.

6.4.1. Statistička analiza

Statistička obrada rezultata izvršena je primenom jednofaktorske analize varijanse (ANOVA) (Origin 8.0). Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti za $p < 0,05$.

6.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Za ispitivanje antibakterijskog delovanja 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi odabranih vrsta roda *Veronica* primenjen je bujon mikrodilucioni test (Hanel i Raether, 1988).

U eksperimentalnom radu korišćeni su standardni mikroorganizmi iz kolekcije ATCC (American Type of Culture Collection). Svi sojevi nabavljeni su iz Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u Beogradu.

Ispitivanje antibakterijske aktivnosti sprovedeno je na sedam sojeva bakterija:

G (-) bakterije:

1. *Escherichia coli* ATCC 35210
2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
3. *Enterobacter cloacae* humani izolat

G (+) bakterije:

1. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
2. *Bacillus cereus* humani izolat
3. *Micrococcus flavus* ATCC 10240
4. *Listeria monocytogenes* NCTC 7973

Za procenu aktivnosti ekstrakata kao standardno jedinjenje korišćen je antibiotik streptomycin (Sigma P 7794) (0,05– 3mg/ml).

6.5.1. Kultivacija mikroorganizama

Bakterije korišćene u ispitivanju kultivisane su na TBS (Tryptic Soy Broth) medijumu na 37 °C. Nakon 18h formirana je bakterijska suspenzija uz dodatak sterilnog fiziološkog rastvora, pri čemu je konačna koncentracija bakterijskog inokuluma iznosila $1,0 \times 10^6$ u zapremini od 100 µl. Dobijeni inokulum je čuvan na +4°C do dalje upotrebe.

6.5.2. Bujon mikrodilucionni test

Minimalna koncentracija ispitivanih ekstrakata koja inhibira vidljivi rast mikroorganizama određena je primenom bujon mikrodilucionog testa u mikrotitracionim pločama sa ravnim dnom i 96 mesta.

Uzorci za testiranje pripremljeni su razblaživanjem u 5%-nom vodenom rastvoru DMSO. Serijska razblaženja ispitivanih ekstrakata dodata su u čašice sa hranljivom podlogom (Mueller Hinton) sa 10 µl bakterijske suspenzije (10^5 CFU/ml), tako da je finalna zapremina iznosila 100 µl. Nakon dodavanja uzoraka u čašice, mikrotitarske ploče su inkubirane na 37 °C tokom 24 h. Najniža koncentracija pri kojoj nije došlo do vidljivog rasta bakterija (posmatrano na binokularnom mikroskopu) definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) označava najnižu koncentraciju koja ubija 99,9% bakterija.

DMSO je korišćen kao kontrola, dok je streptomycin korišćen kao pozitivna kontrola.

6.5.3. Statistička analiza

Jednofaktorska analiza varijanse korišćena je za statističku obradu dobijenih podataka i utvrđivanje značajnosti razlike između srednjih vrednosti (Origin 8.0). Statistički značajnim su smatrane razlike srednjih vrednosti za $p < 0,05$.

REZULTATI I DISKUSIJA

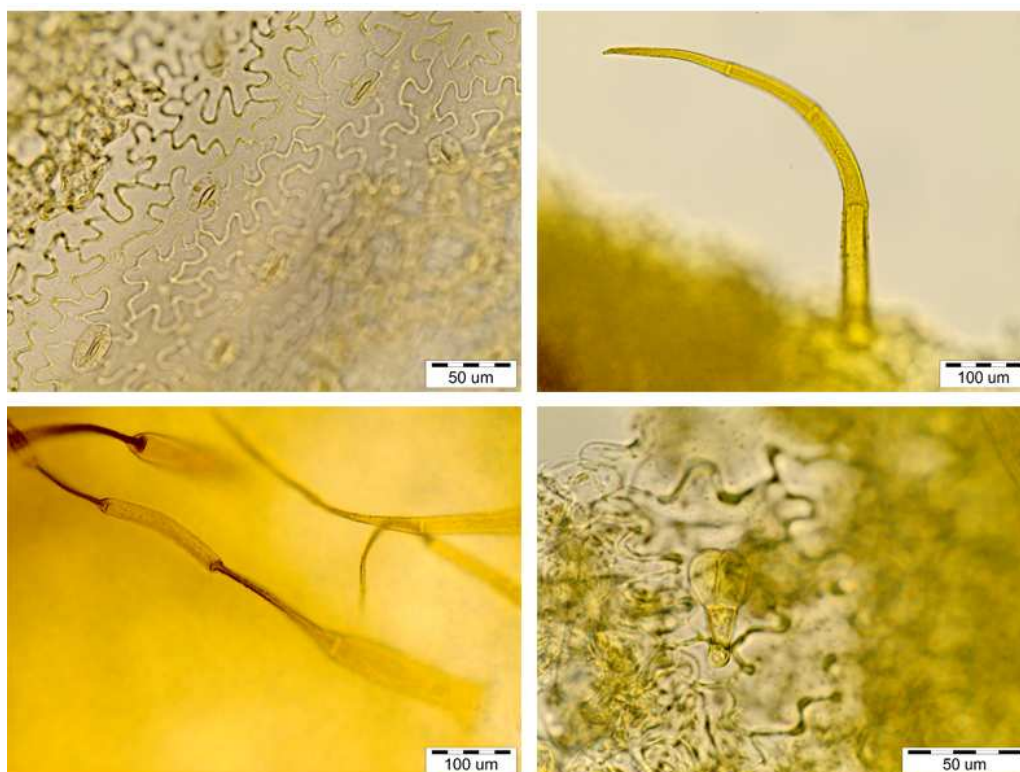
1. Morfološka analiza

Sa ciljem utvrđivanja mikromorfoloških obeležja, kao i anatomske građe, u okviru ove disertacije sprovedena je mikroskopska analiza sprasene herbe, kao i poprečnih preseka lista i stabla odabranih *Veronica* vrsta.

1.1. Mikroskopska analiza sprasenog biljnog materijala

Mikroskopska analiza sprasene herbe vrste *V. urticifolia* pokazala je prisustvo sledećih elemenata:

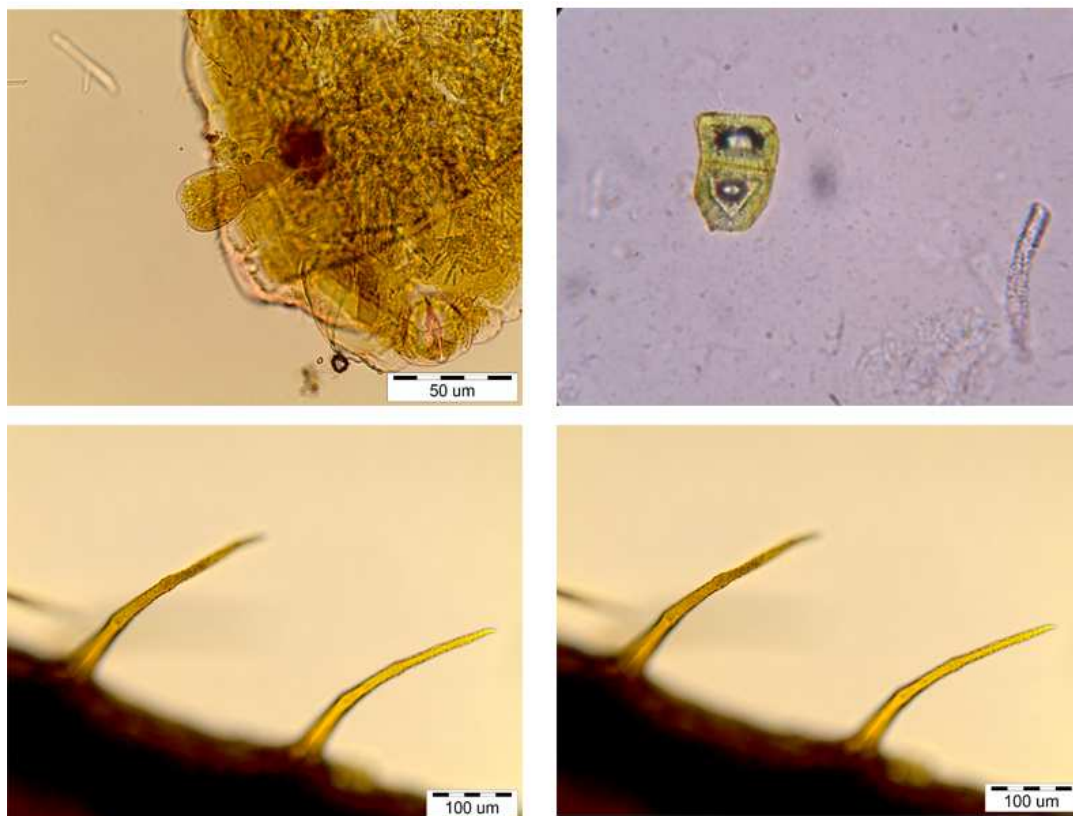
- fragmenata epidermisa sa stomama anomocitnog tipa,
- brojnih nežlezdanih, višecelijskih, uniserijatnih, dlaka,
- retkih, žlezdanih dlaka, tipa kapitatnih koje se sastoje od višecelijske drške i sekretorne glave od 1, 2 ili 4 ćelije (**Slika 8**).



Slika 8. Morfološki elementi u prašku herbe *V. urticifolia*

Mikroskopska analiza prašenog materijala vrste *V. jacquinii* pokazala je prisustvo sledećih elemenata:

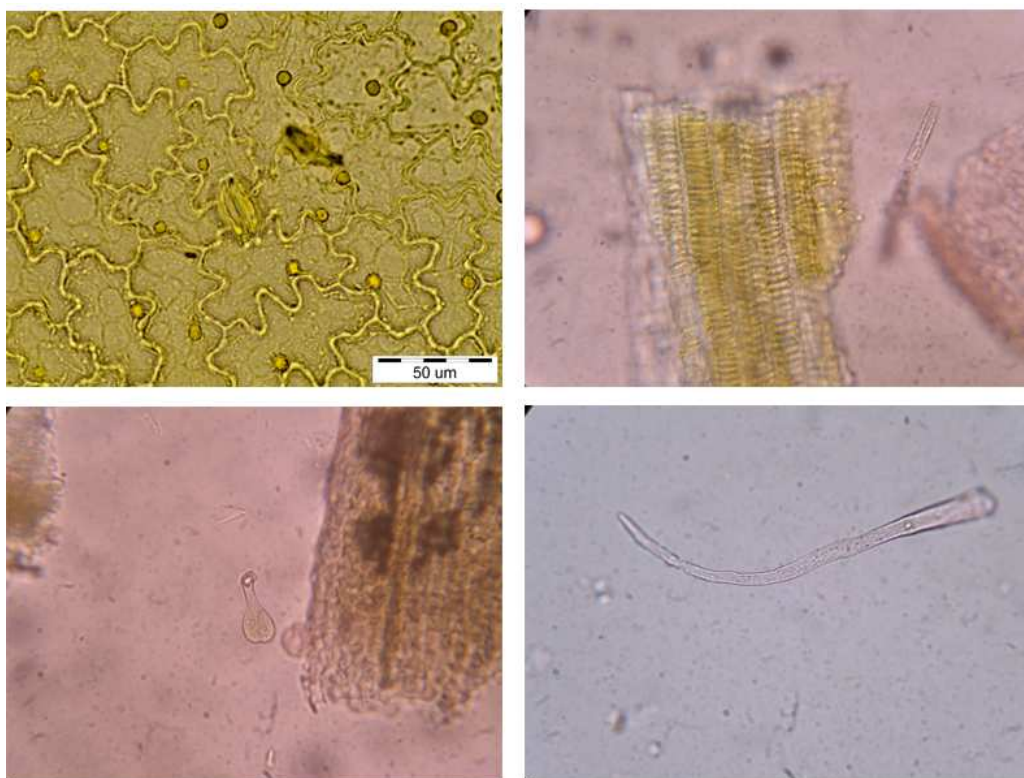
- fragmenti epidermisa sa stomama anomocitnog tipa,
- brojne nežlezdane višecelijske, uniserijatne, negranate mehaničke dlake,
- žlezdane dlake tipa kapitatnih,
- grupe brahisklereida (**Slika 9**).



Slika 9. Morfološki elementi u prašku herbe *V. jacquinii*

Mikroskopska analiza prašenog materijala vrste *V. teucrium* pokazala je prisustvo sledećih elemenata:

- fragmenti epidermisa sa stomama anomocitnog tipa,
- brojne nežlezdane višecelijske, uniserijatne dlake,
- žlezdane dlake tipa kapitatnih,
- fragmenti traheja i traheida (**Slika 10**).



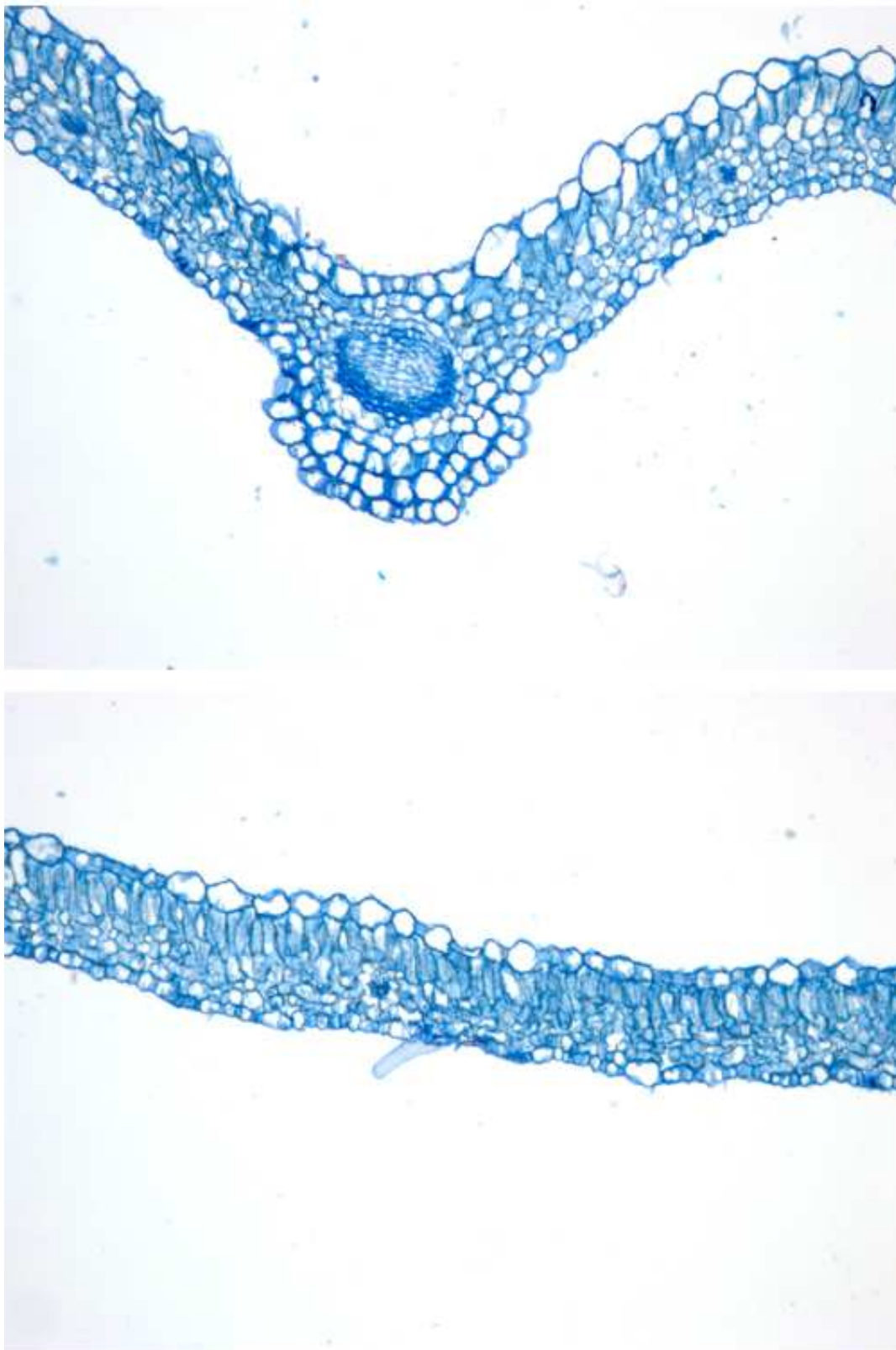
Slika 10. Morfološki elementi u prašku herbe *V. teucrium*

1.2. Anatomsko-morfološka analiza poprečnih preseka

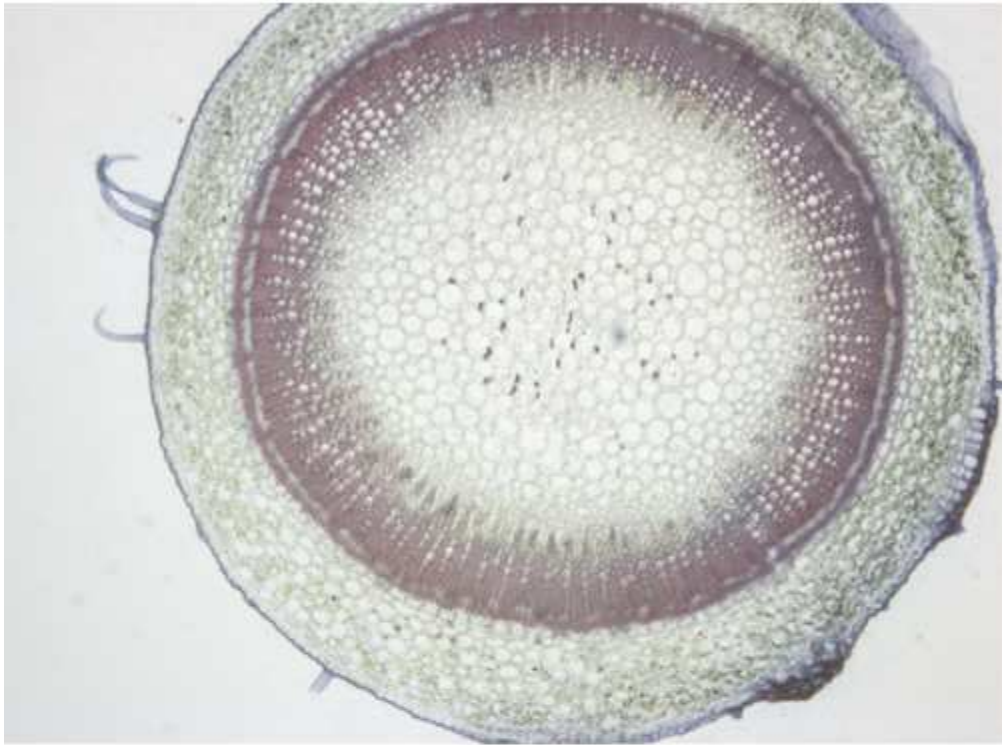
1.2.1. *Veronica urticifolia*

Grada lista: List je dorzoventralne građe (**Slika 11**). Na površini je jednoslojan epidermis. Čelije epidermisa lica su znatno krupnije od čelija epidermisa naličja lista. Mezofil lista diferenciran je na palisadno i sunderasto tkivo. Palisadni parenhim je jednoslojan, a sunderasto tkivo je formirano od čelija loptastog oblika, između kojih se mogu uočiti krupni intercelulari. Dominira provodni snopić glavnog nerva, dok su ostali snopići znatno manji.

Grada stabla: Stablo je na poprečnom preseku okruglo. Ispod jednoslojnog epidermisa sa retkim nežlezdanim dlakama nalazi se 5-6 slojeva hlorenhima. U centralnom cilindru dominira ksilem. Najveći deo stabla zauzimaju krupne parenhimske čelije srži (**Slika 12**).



Slika 11. *V. urticifolia* – poprečni presek lista



Slika 12. *V. urticifolia* – poprečni presek stabla

1.2.2. *Veronica jacquinii*

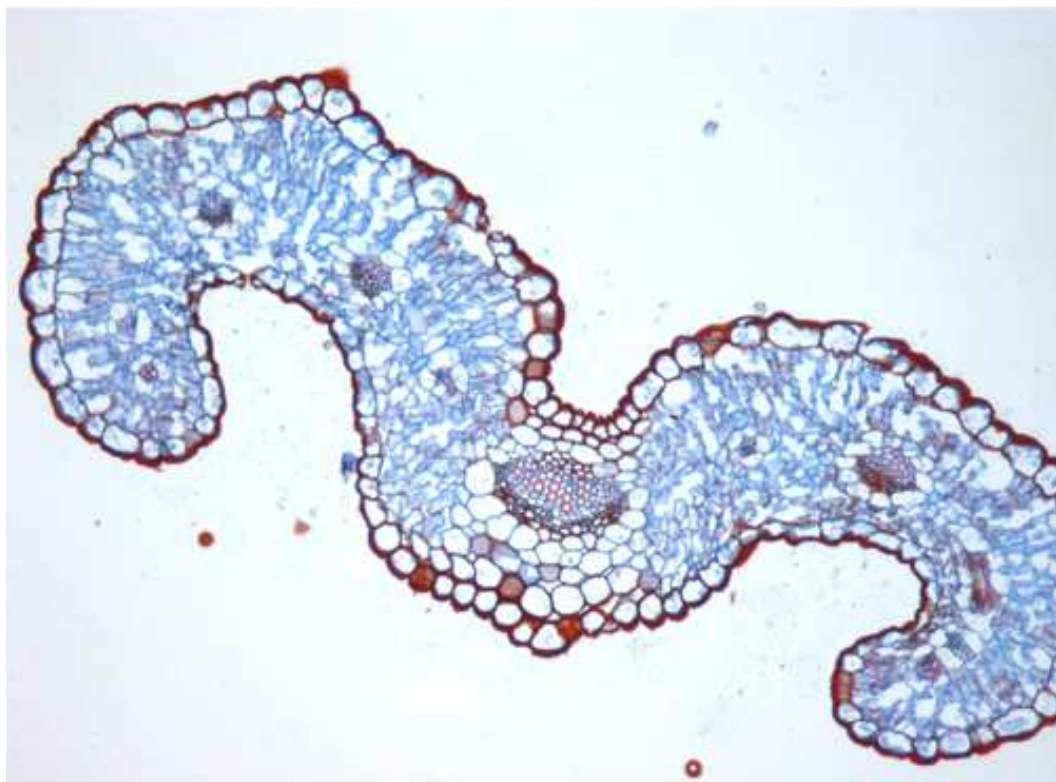
Grada lista: List je sa blago savijenim ivicama liske prema naličju lista (**Slika 13**). Na površini jednoslojnog epidermisa je debeo sloj kutikule. Čelije epidermisa lica krupnije su od čelija epidermisa naličja. U epidermisu lica i naličja lista se nalaze stome – amfistomatičan tip lista. Mezofil lista je diferenciran na palisadno i sunderasto tkivo. Ispod epidermisa lica lista prisutna su dva do tri sloja palisadnog tkiva, a ostatak mezofila čini sunderasto tkivo. Oko provodnih snopića je parenhimska sara od krupnih čelija. Od trihoma vidljivi su nežlezdani i žlezdani kapitatni trihomi.

Grada stabla: Stablo je na poprečnom preseku okruglo (**Slika 14**). Ispod jednoslojnog epidermisa sa retkim nežlezdanim dlakama nalazi se 5-6 slojeva hlorenhima. U centralnom cilindru floem i ksilem su u cilindrima – tip stabla bez provodnih snopića, a u centru stabla je srž od parenhimskih čelija koja je raskinuta, tako da se formira reksigena šupljina.

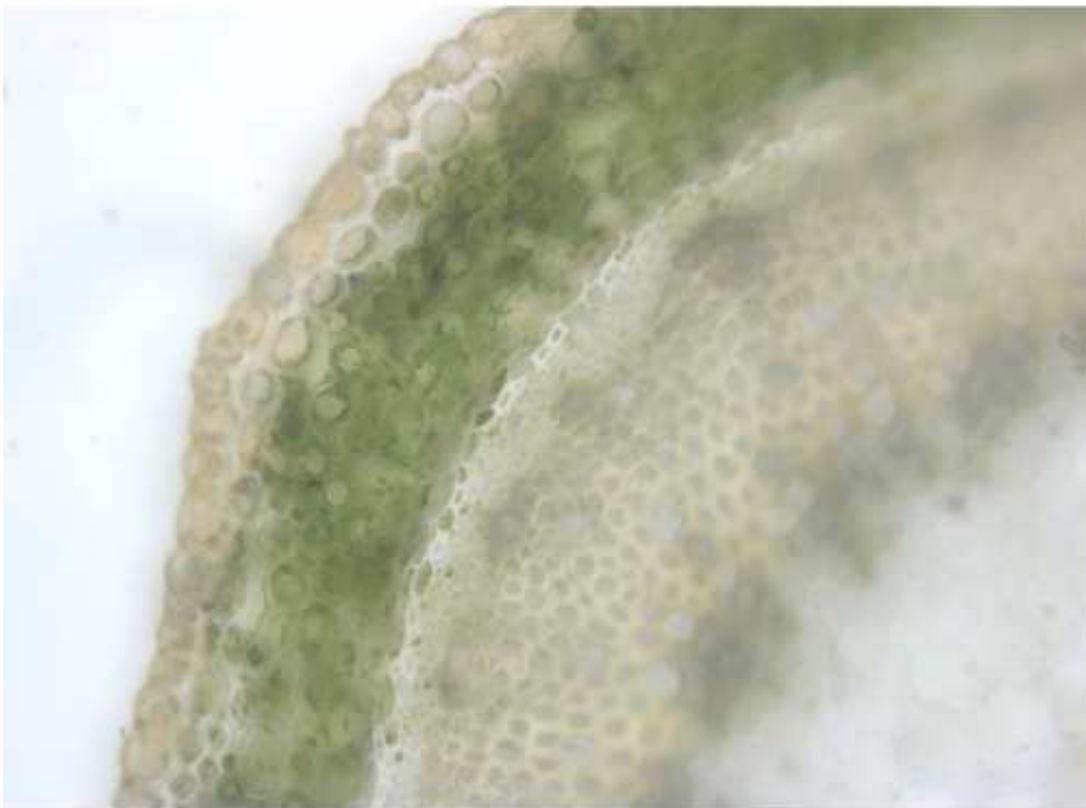
1.2.3. *Veronica teucrium*

Grada lista: List je dorzoventralne građe. Na površini lista nalazi se jednoslojni epidermis. Mezofil lista je diferenciran na palisadno i sunderasto tkivo. Palisadni parenhim čini sloj izduženih, gusto zbijenih, čelija ispod epidermisa lica, dok je ispod epidermisa naličja manje ili više rastesito sunderasto tkivo. U centralnom delu lista prisutan je glavni, izražen, zatvoren kolatarni provodni snopić, dok su bočni provodni snopići slabije razvijeni. Od trihoma vidljivi su glandularni kapitatni trihomi (**Slika 15**).

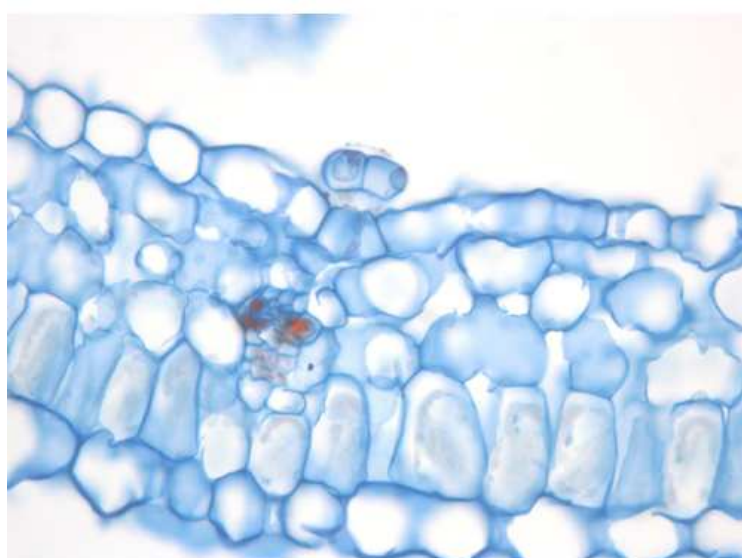
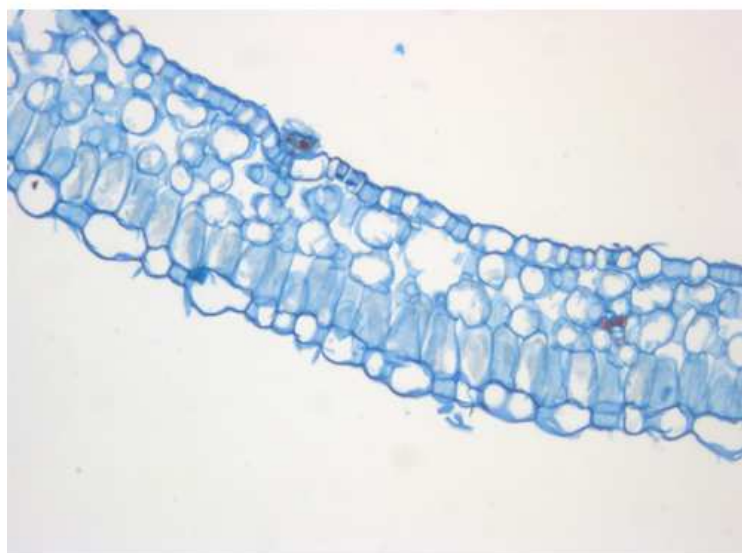
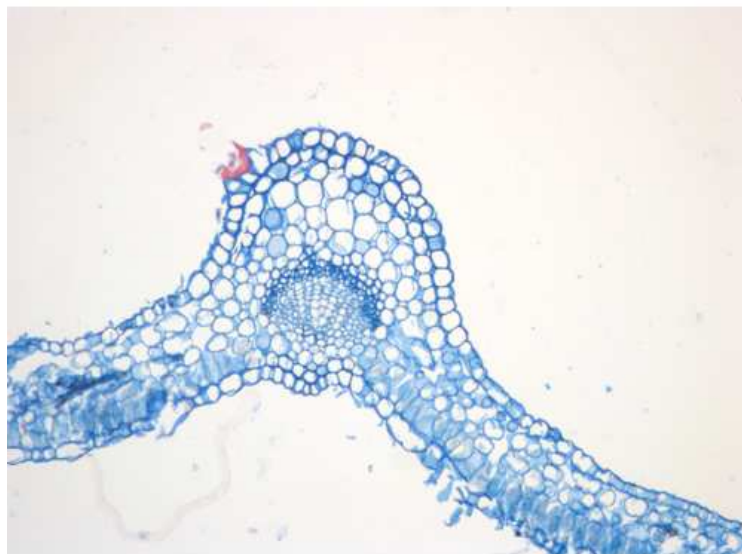
Grada stabla: Stablo je na poprečnom preseku okruglo (**Slika 16**). Razlikuju se tri zone: epidermis, primarna kora i centralni cilindar. Jednoslojni epidermis je sa prisutnim nežlezdanim i žlezdanim dlakama. Ispod epidermisa je 7-8 slojeva parenhimskih čelija koje sadrže hloroplaste, što ukazuje da u izvesnoj meri imaju fotosintetičku ulogu. Poslednji sloj primarne kore čine krupne parenhimske čelije raspoređene u obliku prstena. Centralni cilindar sastoji se od provodnih elemenata floema i ksilema koji formiraju cilindre. U centru stabla dominira srž od krupnih parenhimskih čelija.



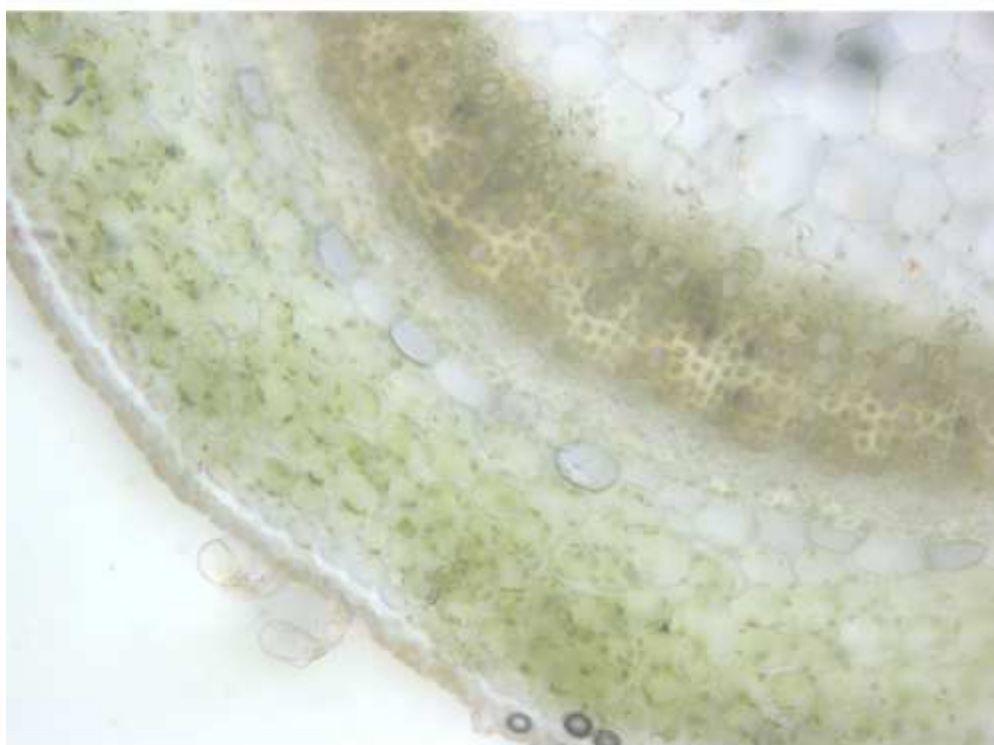
Slika 13. *V. jacquinii* – poprečni presek lista i detalj lista



Slika 14. *Veronica jacquinii* – poprečni presek stabla i detalj stabla



Slika 15. *V. teucrium* – poprečni presek lista i detalji lista



Slika 16. *V. teucrium* – poprečni presek stabla i detalj stabla

1.3. Histochemijska analiza

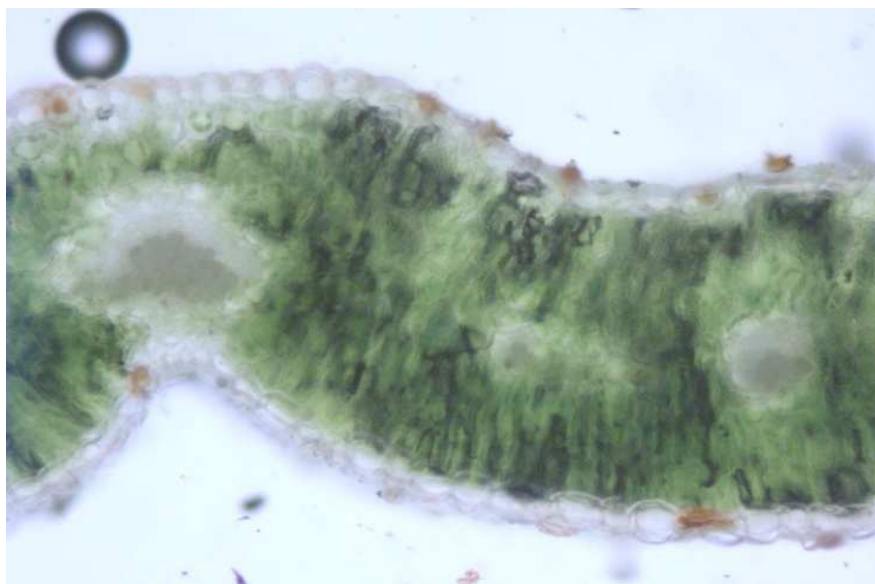
Rezultati histochemijske analize (**Tabela 17**) su ukazali na prisustvo lipida, alkaloida, skroba, fenolnih jedinjenja i među njima flavonoida u ispitivanim vrstama roda *Veronica*.

Lipidi su detektovani u epidermisu lista vrste *V. jacquinii* (**Slika 17**), kao i u epidermisu stabla, i to u spoljašnjem zidu - kutikularnom sloju stabla sva tri taksona (**Slika 18**).

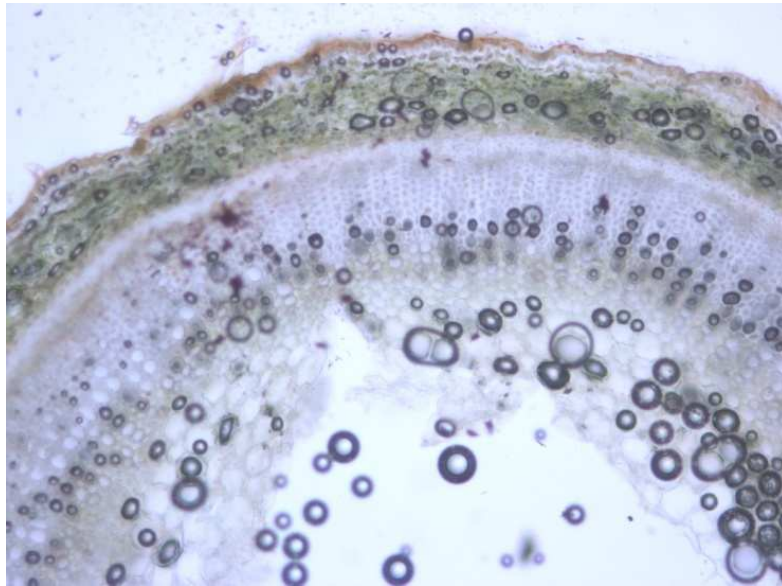
Nakon bojenja Lugolovim reagensom pokazano je prisustvo skroba u hlorenhimu stabla ispitivanih vrsta (**Slika 19**).

U žlezdanim trihomima na površini lista vrste *V. teucrium* nakon primene Wagner-ovog reagensa utvrđeno je prisustvo alkaloda (**Slika 20**). Dittmar-ovim reagensom detektovani su alkaloidi u trihomima i floemu stabla sva tri ispitivana taksona, kao i u poslednjem sloju kore stabla *V. teucrium* (**Slika 21**). Do sada, prisustvo alkaloida pokazano je u vrsti *V. officinalis* (Hultin i Torssell, 1965).

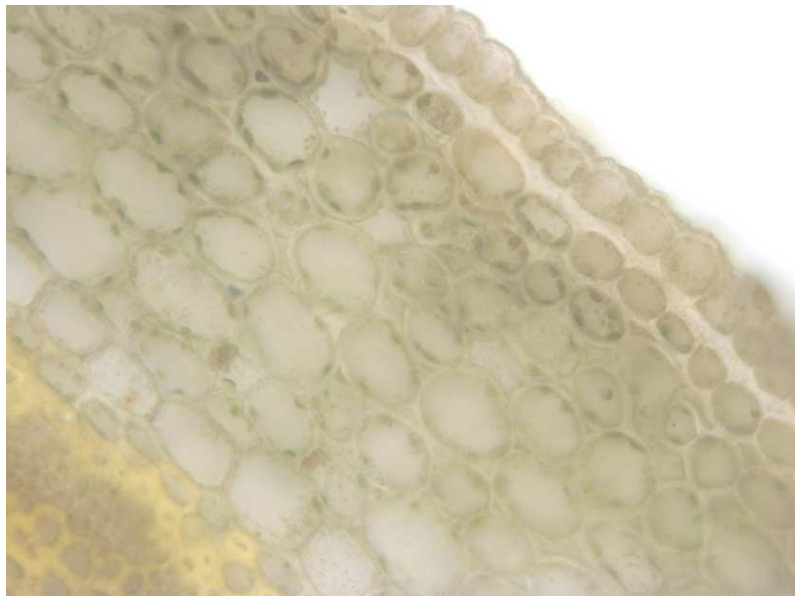
Prisustvo alkaloida u žlezdanim trihomima utvrđeno je i u rodovima *Lippia* (Argyropolou i sar, 2010), *Cannabis* (Furr i Mahlberg, 1981), *Nicotiana* (Zador i Jones, 1968), *Camptotheca* (Valleta i sar., 2013) i *Isodon* (Liu i Liu, 2012), dok su u rodu *Erythrina* (Da Silva i sar., 2013) pored glandularnih, alkaloidi zastupljeni i u tektornim trihomima, kao i u parenhimskim ćelijama stabla.



Slika 17. Lipidi u epidermisu lista *V. jacquinii*



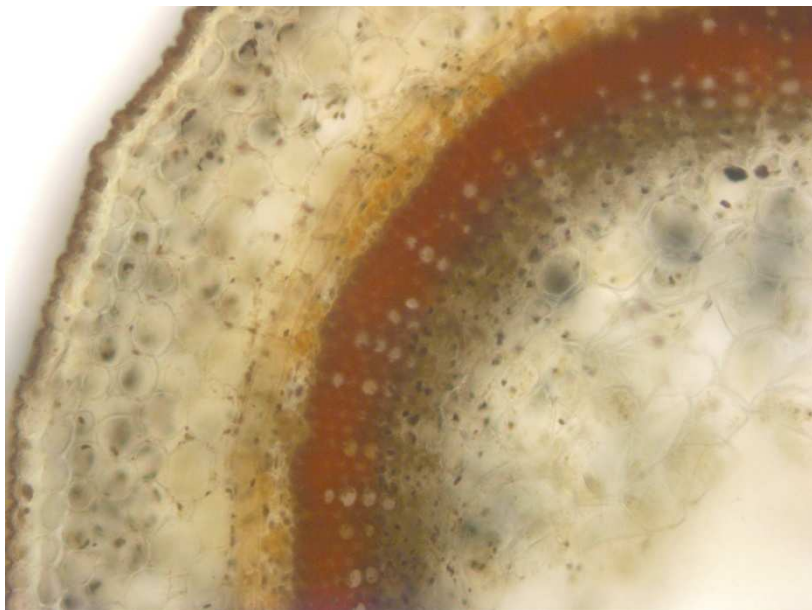
Slika 18. Lipidi u kutikularnom sloju – *V. urticifolia*



Slika 19. Skrob u hlorenhimu stabla– *V. urticifolia*



Slika 20. Alkaloidi u žlezdanim trihomima – *V. teucrium*



Slika 21. Alkaloidi u posljednjem sloju parenhima kore i u floemu – *V. teucrium*

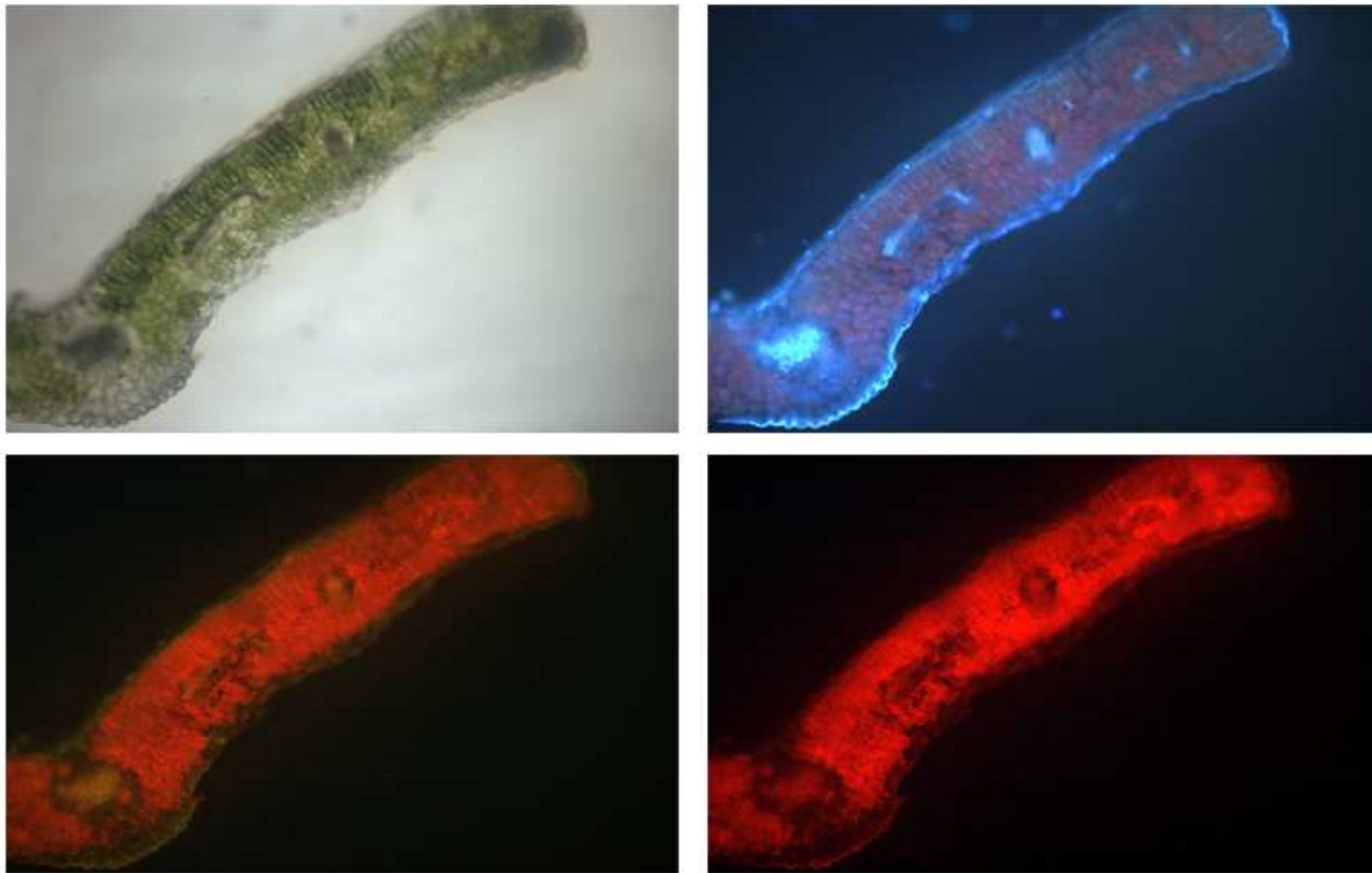
Tabela 17. Ispitivana grupa metabolita, histochemijski reagensi i rezultati primene na tkivu lista i stabla odabranih *Veronica* vrsta

Procedura bojenja	Ciljna jedinjenja	Primećena boja	List			Stablo		
			<i>V. jacquini</i>	<i>V. teucrium</i>	<i>V. urticifolia</i>	<i>V. jacquini</i>	<i>V. teucrium</i>	<i>V. urticifolia</i>
Sudan III	Lipidi	Crvena	+	-	-	+	+	+
Nadi	Etarska ulja	Plavo-ljubičasta	-	-	-	-	-	-
	Smolne kiseline	Crvena	-	-	-	-	-	-
Lugol	Skrob	Tamno-plava do crvena	-	-	-	+	+	+
Feri sulfat	Fenolna jedinjenja	Tamno-plava	+	+	+	+	+	+
Feri hlorid	Fenolna jedinjenja	Tamno-zelena	+	+	+	+	+	+
Wagner-ov reagens	Alkaloidi	Crveno-braon	-	+	-	-	-	-
Dittmar-ov reagens	Alkaloidi	Crveno-braon	-	-	+	+	+	+
Antimon hlorid	Steroidi	Crvena	-	-	-	-	-	-

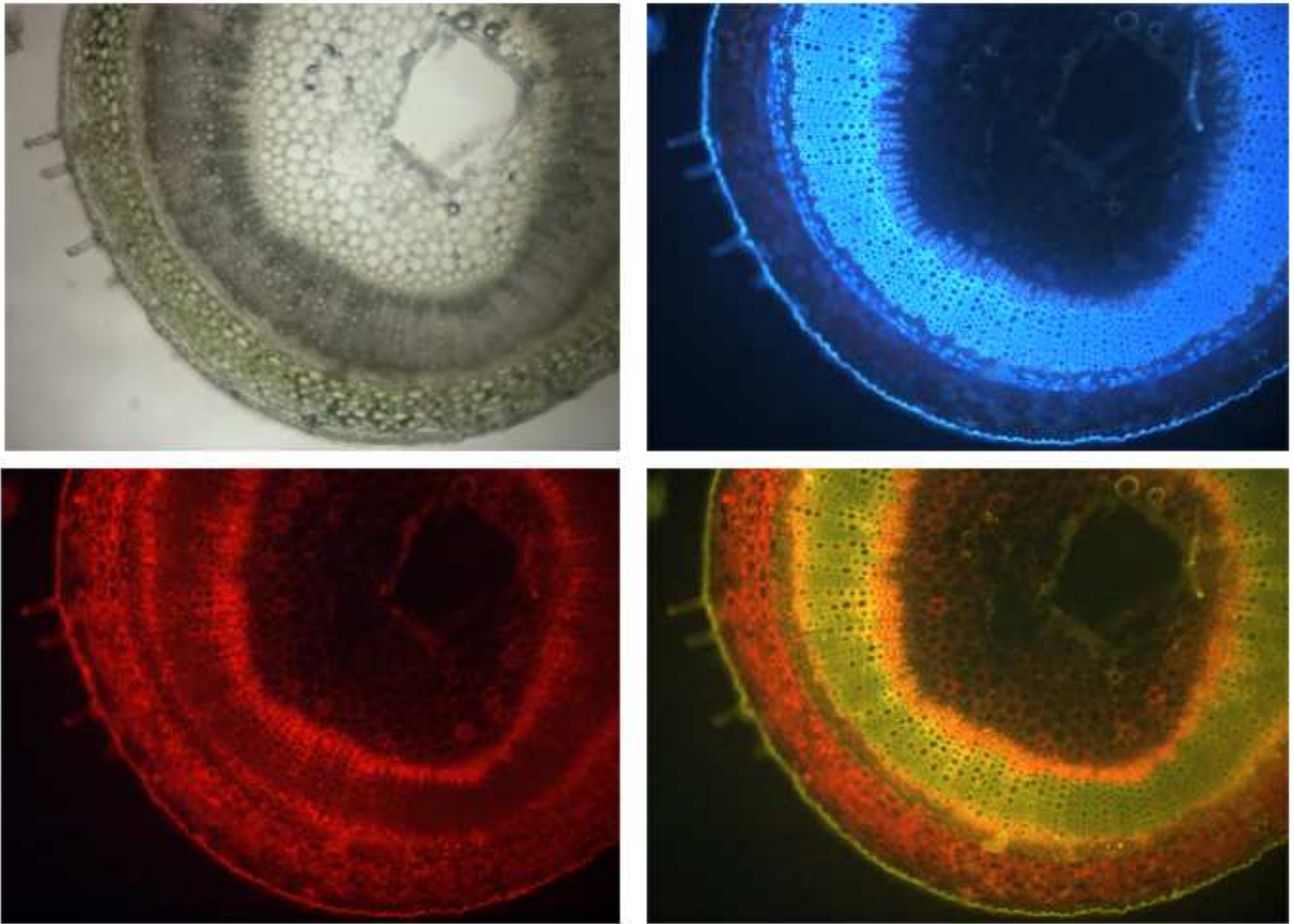
1.4. Fluorescentna mikroskopija

Fenolna jedinjenja imaju značajnu funkciju u interakciji biljaka i njihove životne sredine. Ona mogu privlačiti insekte oprašivače a odbijati herbivore, učestvovati u alelopatskim interakcijama, ili u interakcijama između biljaka i simbiotskih, ili patogenih organizama. Ovi sekundarni metaboliti akumuliraju se u različitim biljnim tkivima i ćelijama, tokom ontogeneze pod različitim uticajima spoljašnje sredine. Utvrđivanje lokalizacije fenolnih jedinjenja obezbeđuje neophodnu osnovu za razumevanje njihove ekološke funkcije (Hutzler i sar., 1998).

Autofluorescencija u UV delu spektra ukazuje na prisustvo fenolnih jedinjenja (Ruzin, 1999). Pojedine klase fenolnih jedinjenja (hidroksicimetne kiseline, kumarini i stilbeni) snažno autofluoresciraju pod UV svetlom. Dakle, fluorescentna mikroskopija je značajna tehnika u ispitivanju lokalizacije ovih klasa jedinjenja. U okviru ove disertacije, na ispitivanim presecima listova i stabla utvrđene su intenzivna svetlo plava autofluorescencija na 340-380 nm, kao i slabe svetlo žuta fluorescencija na 450-490 nm i svetlo crvena autofluorescencija na 515-580 nm. Pokazano je da su fenolna jedinjenja prisutna u ksilemu, trihomima i kutikularnom sloju (posebno izraženo iznad glavnog nerva) listova sva tri ispitivana taksona (**Slika 22**). U stablu su fenolna jedinjenja detektovana u kutikularnom sloju, trihomima, i u ksilemu (**Slika 23**). Na presecima se jasno vidi da je fluorescencija u ćelijama provodnih snopića vezana isključivo za lignificirane ćelijske zidove ksilema. Lignin kao najčešći polimer sekundarnih ćelijskih zidova ksilema (Alberts i sar., 2002) predstavlja heterogeni polimer koji čine tri tipa monomernih jedinica (monolignoli) i to: *p*-kumaroil, koniferil i sinapil alkoholi. Nakon biosinteze monolignoli se moraju transportovati u ćelijske zidove gde podležu oksidaciji i polimerizaciji pri čemu dolazi do formiranja lignina (Li i Chapple, 2010).



Slika 22. Fluorescencija fenolnih jedinjenja u listu *V. jacquinii*



Slika 23. Fluorescencija fenolnih jedinjenja u stablu *V. jacquinii*

Tabela 18. Ispitivana jedinjenja, histochemijski reagensi i rezultati primene na tkivu listova i stabla odabranih *Veronica* vrsta

Procedura bojenja	Ciljna jedinjenja	Primećena boja	List			Stablo		
			<i>V. jacquinii</i>	<i>V. teucrium</i>	<i>V. urticifolia</i>	<i>V. jacquinii</i>	<i>V. teucrium</i>	<i>V. urticifolia</i>
Autofluorescencija neobojenih preseka A: BP 340-380	Lignini i fenolna jedinjenja	Svetlo-plava do beličasta	+	+	+	+	+	+
Autofluorescencija neobojenih preseka I3: BP 450-490	Lignini i fenolna jedinjenja	Svetlo-žuta	+	+	+	+	+	+
Autofluorescencija neobojenih preseka N2.1: BP 515-580	Fenolna jedinjenja	Svetlo-crvena	+	+	+	+	+	+
Aluminijum trihlorid u UV oblasti A: BP 340-380	Flavonoidi	Plavo-zelena	+	+	+	+	+	+

2. Hemijska analiza

2.1. Analiza sadržaja teških metala u biljnim i uzorcima zemljišta

Primarni značaj zemljišta za biljke leži u činjenici da je ono izvor mineralnih elemenata neophodnih za osnovne životne funkcije, sintezu organskih jedinjenja, rast i produkciju biljaka. Biljke korenovim sistemom apsorbuju jednostavna neorganska jedinjenja, katjone i anjone iz okolnog zemljišta (Stevanović i Janković, 2001). Mineralni elementi su u tlu prisutni u rastvorenom ili vezanom obliku (kao kompleksi sa neorganskim ili organskim ligandima). Apsorpcijom od strane biljaka hemijski elementi se distribuiraju i ugrađuju u biljno tkivo, a preko lanca ishrane stižu i do drugih organizama. Osim toga, razlaganjem odbačenih biljnih delova, ovi hemijski elementi se vraćaju nazad u spoljašnju sredinu (Stevanović i Janković, 2001).

Kontaminacija zemljišta teškim metalima jedan je od najznačajnijih ekoloških problema danas. U poslednje vreme, razvojem industrije i intenziviranjem poljoprivrede došlo je do primene raznih materija koje dovode do povećane koncentracije teških metala u zemljištu. Obzirom da nisu biorazgradivi, i da imaju dugo poluvreme života u zemljištu, oni mogu ostvariti značajnu toksičnost kod svih živih organizama (Del Bubba i sar., 2013).

Primena viših biljaka kao indikatora zagađenosti zemljišta zasnovana je na njihovoj sposobnosti da apsorbuju metale i druge toksične supstance iz zemljišta, transportuju ih kroz organizam, ili ih na određenom mestu akumuliraju. Većina biljaka osetljiva je i na minimalne količine teških metala u podlozi, ipak izvestan broj njih je u stanju da akumulira velike količine teških metala, a da pri tom fiziološke funkcije biljke ne budu ugrožene. Takve biljke su, tokom evolucije, razvile brojne adaptivne mehanizme kojima savladavaju nepovoljne uslove staništa (Stevanović i Janković, 2001).

2.1.1. Analiza teških metala u biljnim uzorcima

U manjim koncentracijama pojedini teški metali (Cu, Zn, Fe i Mn) neophodni su za optimalan rast i razvoj biljaka, dok drugi (Cr^{6+}) pokazuju štetno dejstvo i pri veoma niskim koncentracijama, pa se definišu kao zagađivači (Ali i sar., 2013a). Biljke ne pokazuju visoku selektivnost za usvajanje metala, već preuzimaju i one koji nemaju poznatu funkciju u

biljnom svetu, i koji na taj način, dospevaju u lanac ishrane. U ljudskom organizmu oni imaju kumulativna svojstva, tj. nakupljaju se u pojedinim tkivima i organima, gde ispoljavaju svoje štetno delovanje (Jakšić i sar., 2013).

Hrom, tj. njegova šestovalentna forma, je danas jedan od glavnih kontaminanata životne sredine. Poslednjih decenija došlo je do značajnog povećanja njegove primene u različitim industrijskim granama kao što su: elektrohemijska i drvna, kao i u industrijama kože i boja (Choppala i sar., 2013). Njegova raspoloživost i toksičnost zavise od oksidacionog stanja. U životnoj sredini dominantan je kao Cr(III) i Cr(VI). Za razliku od Cr(III) koji je u malim količinama (50-200 µg/ml) esencijalan za ljude, Cr(VI) je toksičan, mutagen i teratogen. Osim toga Cr(VI) minerali su rastvorljiviji i mobilniji u odnosu na Cr(III) vrste. Hrom je toksičan za biljke i može indukovati promene u brojnim fiziološkim procesima u njima. Dezorganizacija ultrastrukture hloroplasta i inhibicija procesa elektronskog transporta moguće su objašnjenje za Cr-indukovano smanjenje nivoa fotosinteze (Ali i sar., 2013b). U herbama ispitivanih *Veronica* sadržaj hroma je iznosio 0,44-0,59 mg/kg (**Tabela 22**). Najniži sadržaj pokazan je u uzorcima sa Vršačkih planina (0,44-0,59 mg/kg), dok je najveći sadržaj utvrđen u uzorku 3 sa Goča. Prema rezultatima Zurayk-a i saradnika (2003) vrste *V. beccabunga*, *V. lysimachioides* i *V. anagalloides* predstavljaju bioindikatore zagađenja hromom. Takođe, isti autori pokazali su da se Cr najvećim delom akumulira u korenu ovih biljaka. Translokacija hroma od korena do izdanka je izuzetno ograničena, i njegov sadržaj u korenu je obično oko 100 puta veći u odnosu na izdanak, bez obzira na ispitivanu vrstu. Prema Chaney-u i saradnicima (1997) svaka biljna vrsta čiji je sadržaj u nadzemnom delu veći od 5 mg/kg, od interesa je kao potencijalni hiperakumulator. Na osnovu rezultata dobijenih pri izradi ove disertacije, ovakav zaključak izvodi se za vrste *V. urticifolia* i *V. jacquinii* koje su rasle na serpentinskom zemljištu.

Joni mangana aktiviraju brojne enzime u biljnoj ćeliji. Najznačajnija uloga ovog elementa u zelenim biljkama je funkcija u razgradnji molekula vode uz oslobađanje kiseonika (Prasad i Hagemeyer, 1999). Za obavljanje metaboličkih funkcija, Mn je biljci neophodan u malim koncentracijama (20 mg/kg s.m.⁶). U ispitivanim biljnim uzorcima, njegova koncentracija je bila relativno uniformna (od 25,38 do 49,50 mg/kg s.m.), uz izuzetak uzorka 8 (89,25 mg/kg) kod kojeg je i zemljište na kom je biljka rasla bilo sa značajno većim sadržajem ovog elementa (**Tabela 22**). Dobijene vrednosti odgovaraju koncentraciji Mn u nadzemnom delu *V. officinalis* (52,3 mg/kg) do koje su došli Mezyk i Wieckowski (1999).

⁶ s.m. – suva masa

Uniformnost koncentracije Mn u biljnim uzorcima uprkos njenih velikih variranja u zemljištu može se objasniti unutrašnjim mehanizmima ispitivanih *Veronica* vrsta da kontrolišu/preveniraju preuzimanje Mn u koren, i/ili izbegavaju translokaciju Mn u nadzemne delove biljke. Ovi mehanizmi su kontrolisani njihovom potrebom za mikronutrientima i kapacitetom da apsorbuju ili eliminišu toksične elemente.

Cink je značajan kao komponenta enzima koji učestvuju u sintezi proteina i proizvodnji energije, kao i za održavanje strukturnog integriteta bioloških membrana (Hänsch i Mendel, 2009). Granice toksičnosti za biljku zavise od biljne vrste i faze rasta (300-400 mg/kg) (Kabata-Pendias i Pendias, 2001). Za lekovite biljke Svetska zdravstvena organizacija još nije ustanovila granične vrednosti za Zn. Prema Allaway-u (1968) koncentracija ovog elementa u poljoprivrednim proizvodima treba da iznosi između 15 i 200 ppm. U ispitivanim uzorcima *Veronica* vrsta njegova koncentracija varirala je od 27,66 do 58,01 mg/kg (**Tabela 22**).

Bakar je esencijalan za procese fotosinteze i ćelijskog disanja u mitohondrijama, metabolizam ugljenika i azota, zaštitu od oksidativnog stresa, kao i za sintezu komponenti ćelijskog zida (Hänsch i Mendel, 2009). Njegov sadržaj u biljnim uzorcima kretao se od 6,04 do 12,8 mg/kg, u zavisnosti od lokaliteta na kom su uzorci sakupljeni (**Tabela 22**). Srednje vrednosti iznosile su 10,17, 6,64 i 12,49 mg/kg za uzorke sakupljene na planinama Goč, Vršačke planine i Stol, redom. Najniža koncentracija Cu dobijena je u uzorcima sa Vršačkih planina, gde je zabeležena i najveća koncentracija Fe. Ovo je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji ukazuju na to da bioraspoloživost Cu može biti redukovana visokim sadržajem Fe u rastvoru zemljišta (Mallick i sar., 2010). U rastresitim zemljištima, Fe se uglavnom nalazi u formi Fe(III)-oksida ili hidroksida (Lindsay i Schwab, 1982), koji predstavljaju efikasne adsorbense za neorganske jone (Ražić i Đogo, 2010). Prema Allaway-u (1968) koncentracija Cu u poljoprivrednim proizvodima treba da iznosi od 4-15 ppm, što je u saglasnosti sa dobijenim rezultatima.

Gvožđe je jedan od ključnih elemenata za normalno funkcionisanje enzima, posebno onih uključenih u redoks procese, kao što su sinteza porfirina, redukcija nitrita i sulfata, i N₂-fiksacija (Prasad i Hagemeyer, 1999). Sadržaj Fe u ispitivanim uzorcima *Veronica* vrsta iznosio je od 35,53 do 563,26 mg/kg, sa najvećim koncentracijama zabeleženim u uzorcima sa planine Goč (**Tabela 22**). Kako su i Fe i Mn uključeni u metaboličke procese, za adekvatan rast biljaka potrebno je da njihov odnos bude između 1,5 i 2,5 (Kabata-Pendias i Pendias, 2001). U našem ispitivanju za većinu ispitivanih uzoraka (uz izuzetak uzoraka 1 i 10), ovaj odnos nije bio u očekivanom opsegu.

Generalno, nisu pokazane značajne razlike između testiranih *Veronica* spp. sa istog lokaliteta, ukazujući na to da obrazac preuzimanja teških metala nije karakteristika vrste.

2.1.2. Analiza teških metala u zemljištu

Sadržaj teških metala u zemljištu zavisi od prirodnih i antropogenih izvora u ekosistemima. U nezagađenim zemljištima oni su prisutni u relativno niskim koncentracijama i rezultat su raspadanja matičnog supstrata. Pod uticajem antropogenog faktora i daljinskog transporta polutanata ove prirodne koncentracije mogu se značajno povećati i premašiti kritične ili toksične koncentracije za određeni ekosistem (Belanović i sar., 2004).

Ponašanje teških metala u zemljištu uslovljeno je mnogobrojnim faktorima koji mogu uticati na njihovu mobilnost i akumulaciju od strane biljaka, a najznačajniji su kiselost zemljišta, sadržaj organske materije i koloidne gline. Kiselost zemljišta indirektno utiče na raspoloživost i toksičnost teških metala, izazivajući njihov minimalan ili maksimalan efekat, u zavisnosti od pH opsega (Wong, 2003). Mobilnost teških metala u zemljištu je generalno mala, posebno pri alkalnim pH vrednostima. Dobijene pH vrednosti stvarne i potencijalne kiselosti za ispitivane uzorke zemljišta iznose od 5,24 do 7,43 i od 4,09 do 7,09 (**Tabela 19**), pri čemu srednje pH vrednosti za uzorke zemljišta sa Goča, Vršačkih planina i Stola iznose 6,62, 5,91 i 6,97. Uz izuzetak uzorka 4, uzorci zemljišta sa Vršačkih planina imaju nešto niže pH vrednosti u poređenju sa ostalim lokalitetima. Planina Stol nalazi se u Karpatskoj oblasti istočne Srbije, u blizini grada Bor. Prerada rude bakra u rudarsko topioničarskom basenu Bor dovodi do masivnog zagađenja vazduha sumpor dioksidom. Visoke koncentracije ovog polutanta vode do formiranja kiselih kiša. Njihov efekat na životnu sredinu u velikoj meri zavisi od sposobnosti zemljišta da ih neutrališe. Alkalna zemljišta, kao što su ona bogata krečnjakom (CaCO_3) mogu da neutrališu kiselinu direktno. Ovo može biti objašnjenje za nešto više pH vrednosti uzoraka zemljišta sa planine Stol gde je zastupljeno krečnjačko zemljište.

Tabela 19. Kiselost uzoraka zemljišta

Uzorak	Lokalitet	pH	
		Stvarna kiselost	Potencijalna kiselost
Z1	Goč	6,77	5,44
Z2	Goč	6,39	5,28
Z3	Goč	7,43	7,09
Z4	Goč	5,87	4,74
Z5	Goč	6,77	5,44
Z6	Vršačke planine	6,09	4,87
Z7	Vršačke planine	6,14	5,43
Z8	Vršačke planine	6,18	5,41
Z9	Vršačke planine	5,24	4,09
Z10	Stol	7,18	6,45
Z11	Stol	6,76	5,80

Hrom se veoma često veže u zemljištima bogatim glinom i organskom materijom. Kao takav slabo je pokretljiv i adsorbovan u površinskom sloju dubine 5-10 cm. Količina hroma u zemljištu kreće se u intervalu od 5 do 100 mg/kg, ali se često mogu naći i mnogo veće koncentracije, posebno kod zemljišta formiranih na serpentinitima (Ubavić i Bogdanović, 1995). U ispitivanim uzorcima zemljišta izmerena koncentracija hroma iznosi od 36,18 do 115,15 mg/kg, pri čemu su najveće vrednosti zabeležene u uzorcima sa Goča (95,74-115,15 mg/kg) (**Tabela 22**), što je u saglasnosti sa postojećim literaturnim podacima za isti lokalitet (Obratov-Petković i sar., 2008). Planina Goč predstavlja jednu od serpentinskih oblasti centralne Srbije (Dudić i sar., 2007), a visoke koncentracije potencijalnih fitotoksičnih elementa (Ni, Cr i Co) predstavljaju karakteristiku ovog tipa zemljišta (Kazakou i sar., 2008).

U uzorcima zemljišta nivo Cu varirao je od 12,38 do 47,77 mg/kg (**Tabela 22**). Povećane koncentracije Cu u uzorcima sa Stola u poređenju sa drugim lokalitetima, mogu biti posledica emisije tokom industrijsko-tehnoloških procesa rudnika Bor.

Prema velikom broju autora (Kabata-Pendias i Pendias, 2001; Adriano, 1986) sadržaj ukupnog cinka u zemljištu kreće se od 10-300 mg/kg. Na ispitivanim lokalitetima izmerene koncentracije variraju od 62,78 do 138,00 mg/kg, pri čemu prosečan sadržaj iznosi 95,47 mg/kg (**Tabela 22**). Na lokalitetima sa Vršačkih planina sadržaj Zn bio je veći u uzorcima 6 i

9 u odnosu na uzorke 7 i 8, ukazujući na mogući uticaj antropogenih aktivnosti. Naime, lokalitet 9 je u blizini planinarskog doma, dok su lokaliteti 7 i 8 u šumskoj oblasti, bez uticaja antropogenih aktivnosti.

Prema Adrianu (1986) očekivani sadržaj Mn za većinu tipova zemljišta iznosi od 500-1000 mg/kg. Kabata-Pendias i Pendias (2001) predložili su "kritičnu" koncentraciju 1500 mg/kg pri kojoj se mogu javiti toksični simptomi na biljkama. Količina za biljke pristupačnog Mn u zemljištu je utoliko veća ukoliko su redoks potencijal i pH vrednost manji, odnosno, što su uslovi za redukcione procese u zemljištu povoljniji (Kadović i sar., 2005). U okviru ove disertacije, sadržaj Mn u uzorcima zemljišta varirao je od 517,58 do 1675,78 mg/kg i bio je najveći na staništima sa Vršačkih planina (**Tabela 22**).

Gvožđe je najzastupljeniji teški metal u ispitivanim uzorcima zemljišta sa koncentracijom od 13,57 g/kg do 35,92 g/kg (**Tabela 22**). Veća koncentracija zabeležena je u uzorcima sa Vršačkih planina (22,1 do 35,92 g/kg). Dobijeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da zemljišta formirana na geološkoj podlozi gnajs sadrže visok nivo ovog metala.

Za potencijalno toksične elemente (Cu, Zn i Cr) izračunati su biokoncentracioni faktori, kao odnos koncentracija odgovarajućeg elementa u biljci i zemljištu (**Tabela 20**). Uz izuzetak vrednosti BCF faktora za Cr u uzorku 3, koji je bio blizu dozvoljenog limita, za sve ostale uzorke BCF factor bio je niži u odnosu na maksimalne vrednosti predložene od strane Idaho National Engineering and Environmental Laboratory ($BCF_{Cu}=0,80$; $BCF_{Zn}=1,50$; $BCF_{Cr}=0,19$) ukazujući na odsustvo značajnog zagađenja.

2.1.3. Korelaciona analiza

Korelaciona analiza primenjena je za procenu odnosa teških metala u ispitivanim biljnim i uzorcima zemljišta (**Tabela 21**). Nameće se nekoliko zaključaka. Izuzev u slučaju Mn ($r=0,694$, $p<0,05$), nije primećena direktna korelacija između koncentracije analiziranih teških metala u uzorcima zemljišta i ispitivanih biljnih vrsta. Sadržaj hroma je u snažnoj pozitivnoj korelaciji sa sadržajem Fe u biljnim uzorcima ($r=0,721$, $p<0,001$). Ovakav rezultat je u saglasnosti sa literaturnim podacima koji svedoče o sinergističkoj interakciji između ova dva metala (Kabata-Pendias i Pendias, 2001).

Dodatno, pokazana je visoka korelacija ($r=0,721$, $p<0,05$) sadržaja Zn i Cu u uzorcima zemljišta, ukazujući na moguću kontaminaciju na pojedinim lokalitetima koja može biti posledica saobraćaja, ili industrijskih aktivnosti.

Tabela 20. Preračunate BCF vrednosti za Cu, Cr i Zn

Uzorak	Cu	Cr	Zn
1	0,34	0,03	0,52
2	0,51	0,04	0,33
3	0,34	0,19	0,35
4	0,33	0,03	0,35
5	0,42	0,07	0,63
6	0,22	0,01	0,23
7	0,58	0,01	0,44
8	0,46	0,01	0,92
9	0,26	0,01	0,25
10	0,25	0,03	0,29
11	0,44	0,16	0,45

Tabela 21. Korelaciona analiza - koncentracija elemenata u *Veronica* vrstama i zemljištu

Uzorak	Element	Biljka					Zemljište			
		Cu	Fe	Mn	Zn	Cr	Cu	Fe	Mn	Zn
Biljka	Fe	0,172	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mn	-0,383	-0,001	-	-	-	-	-	-	-
	Zn	-0,028	-0,238	0,558	-	-	-	-	-	-
	Cr	0,442	0,928^a	-0,077	-0,060	-	-	-	-	-
Zemljište	Cu	0,601	0,011	-0,436	-0,154	-0,442	-	-	-	-
	Fe	-0,728^b	-0,281	-0,076	-0,397	-0,558	-0,189			
	Mn	-0,512	-0,368	0,694	0,307	-0,519	-0,327	0,448	-	-
	Zn	0,147	-0,158	-0,554	-0,283	-0,085	0,721^b	0,328	-0,199	-
	Cr	0,194	0,355	-0,164	0,183	-0,491	-0,022	-0,511	-0,574	0,081

Tabela 22. Sadržaj teških metala u biljnim i uzorcima zemljišta

<i>Uzorak</i>	<i>Cr</i>		<i>Zn</i>		<i>Cu</i>		<i>Fe</i>		<i>Mn</i>	
	<i>Biljka</i>	<i>Zemljište</i>	<i>Biljka</i>	<i>Zemljište</i>	<i>Biljka</i>	<i>Zemljište</i>	<i>Biljka</i>	<i>Zemljište</i>	<i>Biljka</i>	<i>Zemljište</i>
1	3,55	111,33	46,69	88,87	8,40	24,41	102,73	13574,20	49,5	517,58
2	5,18	115,15	34,53	105,15	11,17	21,91	182,82	18226,40	30,47	665,97
3	18,96	97,13	31,41	91,06	10,83	31,36	563,26	14164,30	43,33	536,22
4	2,48	95,74	33,04	94,98	10,10	30,40	100,95	17667,20	38,55	750,38
5	7,43	111,33	55,76	88,87	10,33	24,41	175,55	13574,20	27,88	517,58
6	0,59	54,19	31,66	112,43	6,64	29,53	158,29	33580,00	34,21	803,53
7	0,53	48,86	27,66	63,29	7,17	12,38	143,44	26560,00	32,27	927,37
8	0,44	48,93	58,01	62,78	6,69	14,63	98,18	22100,00	89,25	1675,78
9	0,48	65,86	31,61	125,87	6,04	22,97	97,62	35920,00	33,00	980,20
10	1,62	53,08	39,59	138,00	12,18	47,77	35,53	20169,90	25,38	923,57
11	3,84	36,18	35,45	78,84	12,80	29,05	118,16	15435,70	36,43	639,00
Min	0,44	36,18	27,66	62,78	6,04	12,38	35,53	13574,22	25,38	517,58
Max	18,96	115,15	58,01	138,00	12,80	47,77	563,26	35920,00	89,25	1675,78
<i>x_{sr}</i>	4,10	76,16	38,67	95,47	9,30	26,26	161,50	20997,44	40,02	812,47
<i>Sd</i>	5,420	30,040	10,312	23,668	2,407	9,427	139,770	7876,856	17,707	332,371
max/min	43,09	3,18	2,10	2,20	2,12	3,86	15,85	2,65	3,52	3,24

2.2 Analiza sadržaja aktivnih komponenti odabranih *Veronica* vrsta

2.2.1 Kolorimetrijske tehnike

Na osnovu kvalitativnog i kvantitativnog sastava ekstrakta moguće je pretpostaviti koji tip biološke aktivnosti bi on mogao ispoljavati, što može biti smernica za dalje farmakološke analize (Kukić-Marković, 2013).

Kolorimetrijske tehnike se kao brze i jednostavne za izvođenje najčešće koriste za preliminarnu analizu biljnih sirovina i njihovih derivata.

2.2.1.1. Sadržaj ukupnih fenola

Fenolna jedinjenja predstavljaju jednu od najšire rasprostranjenih grupa sekundarnih metabolita biljaka. Pored uloge u rastu i reprodukciji, ova jedinjenja učestvuju i u zaštiti biljaka od predatora i patogena. Dodatno, fenolna jedinjenja ispoljavaju i čitav niz bioloških aktivnosti (antialergijska, antiarterogena, antimikrobna, antioksidantna, antitrombotska, kardioprotektivna, vazodilatatorna) koje mogu doprineti očuvanju ljudskog zdravlja (Balasundram i sar., 2006).

Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim, vodeno-acetonskim i vodenim ekstraktima ispitivanih taksona je određivan spektrofotometrijski na bazi bojene reakcije sa Folin-Ciocalteu (FC) reagensom, a rezultati su izraženi u miligram ekvivalentima galne kiseline po gramu suvog ekstrakta (mg GAE/g suvog ekstrakta).

Sadržaj ukupnih fenola varirao je od 116 do 201 mg GAE/ g suvog ekstrakta (**Tabela 23**). Najveći sadržaj detektovan je u ekstraktima herbe *V. jacquinii*, dok je najniži sadržaj zabeležen u ekstraktima herbe *V. teucrium*. Najniže vrednosti ukupnih fenola dobijene su sa vodom kao ekstrakcionim sredstvom, dok se smeša acetona i vode pokazala kao najbolji rastvarač za ekstrakciju fenolnih jedinjenja. Ovo se može objasniti činjenicom da prisustvo organskog rastvarača olakšava penetraciju ekstrakcionog sredstva u ćelije biljke, čime se ubrzava rastvaranje fenolnih jedinjenja u vodenoj sredini (Moure i sar., 2001).

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije slični su utvrđenom sadržaju ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima herbi drugih vrsta roda *Veronica* (40,90 - 200,20 mg GAE/g suvog ekstrakta) (Harput i sar., 2011). Prema rezultatima ispitivanja koje je sprovela Nikolova (2011) sadržaj ukupnih fenola u metanolnim ekstraktima herbi pojedinih

Veronica vrsta (među kojima su i taksoni ispitivani u okviru ove disertacije) iznosio je od 23,12 do 79,93 mg GAE/g ekstrakta, pri čemu su vrednosti za *V. jacquinii*, *V. teucrium* i *V. urticifolia* iznosile oko 30 mg GAE/g ekstrakta, što je znatno niže od vrednosti dobijenih u ovom radu i može se objasniti različitim ekstrakcionim procedurama.

Tabela 23. Sadržaj ukupnih fenola u metanolnim, vodeno-acetonskim i vodenim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica*

Biljna vrsta	Ukupni fenoli (mg GAE/g)		
	Metanolni ekstrakt	Vodeno- acetonski ekstrakt	Vodeni ekstrakt
<i>V. urticifolia</i>	167,6 ± 1,3	171,5 ± 2,2	143,6 ± 0,9
<i>V. jacquinii</i>	195,4 ± 1,5	201,4 ± 3,1	174,7 ± 1,5
<i>V. teucrium</i>	156,7 ± 0,9	172,1 ± 1,5	116,4 ± 0,8

2.2.1.2. Sadržaj ukupnih fenilpropanoida

Fenilpropanoidni glikozidi su široko rasprostranjeni sekundarni metaboliti u biljnom svetu. I pored interesantnih svojstava ove klase jedinjenja, nizak sadržaj u biljkama (manje od 5% w/w) ograničio je njihovu izolaciju i komercijalnu primenu (López-Munguía i sar., 2011).

Rezultati određivanja ukupnih fenilpropanoida u metanolnim, vodenim i 70%-nim acetonskim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica* prikazani su u **Tabeli 24**. Najviši sadržaj je izmeren u 70%-nim acetonskim ekstraktima, dok je najniži zabeležen nakon primene vode kao ekstrakcionog sredstva. Takođe, među ispitivanim taksonima vrsta *V. teucrium* najbogatija je ovom grupom sekundarnih metabolita. Iako su fenilpropanoidni derivati široko rasprostranjeni u vrstama roda *Veronica*, ne postoje literaturni podaci o određivanju njihovog ukupnog sadržaja u njima.

Tabela 24. Sadržaj ukupnih fenilpropanoida u metanolnim, vodeno-acetonskim i vodenim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica*

Biljna vrsta	Ukupni fenilpropanoidi (mg akteozida/g)		
	Metanolni ekstrakt	Vodeno-acetonski ekstrakt	Vodeni ekstrakt
<i>V. urticifolia</i>	13,4 ± 0,2	35,0 ± 0,6	11,2 ± 0,2
<i>V. jacquinii</i>	18,7 ± 0,3	31,5 ± 0,4	11,8 ± 0,4
<i>V. teucrium</i>	26,3 ± 0,5	38,0 ± 0,6	17,9 ± 0,5

2.2.1.3. Sadržaj ukupnih iridoida

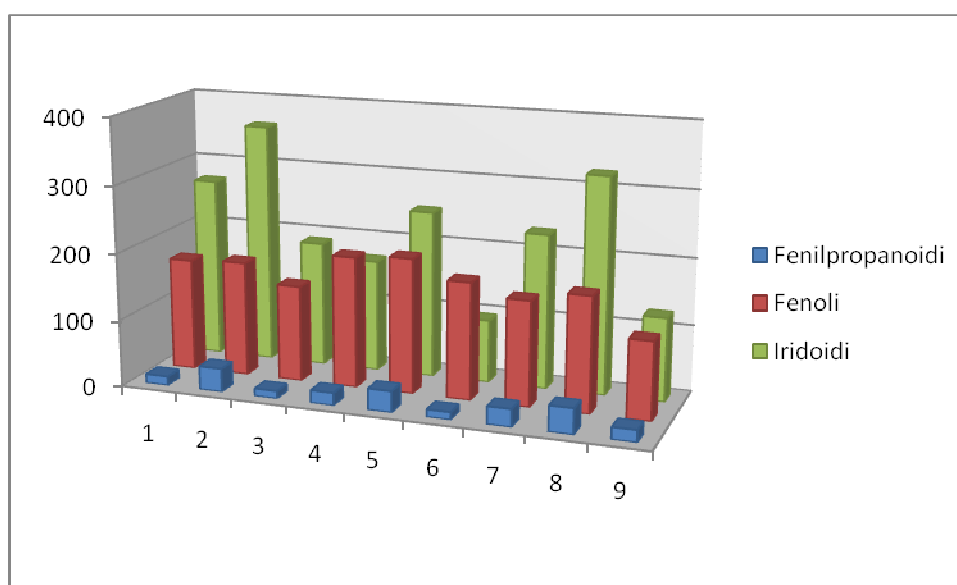
Sadržaj iridoida u ispitivanim ekstraktima određivan je spektrofotometrijski na bazi reakcije sa Trimm-Hill reagensom. Rezultati određivanja iridoidnih jedinjenja u nadzemnim delovima u cvetu odabranih *Veronica* vrsta prikazani su u **Tabeli 25**. Sadržaj ovih jedinjenja bio je najveći u ekstraktima herbe *V. urticifolia*, dok je najniži sadržaj zabeležen u ekstraktima herbe *V. jacquinii*. Takođe, na osnovu rezultata može se zaključiti da je najbolje ekstrakciono sredstvo za iridoidna jedinjenja 70%-ni aceton, dok je najniži prinos ove grupe jedinjenja postignut primenom vode kao ekstrakcionog sredstva.

Tabela 25. Sadržaj ukupnih iridoida u metanolnim, vodeno-acetonskim i vodenim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica*

Biljna vrsta	Ukupni iridoidi (mg aukubina/g)		
	Metanolni ekstrakt	Vodeno-acetonski ekstrakt	Vodeni ekstrakt
<i>V. urticifolia</i>	270,2 ± 4,5	359,7 ± 4,8	187,6 ± 4,3
<i>V. jacquinii</i>	167,8 ± 3,2	249,6 ± 3,6	94,3 ± 2,5
<i>V. teucrium</i>	231,0 ± 5,1	322,9 ± 6,1	124,6 ± 3,7

Sadržaj određivanih grupa sekundarnih metabolita u suvim metanolnim, vodenim i 70%-nim acetonskim ekstraktima je radi bolje preglednosti prikazan i grafički (**Slika 25**). Kod većine ispitivanih ekstrakata, dominantna klasa jedinjenja su iridoidi. Izuzetak predstavljaju metanolni i vodeni ekstrakt vrste *V. jacquinii*, gde su fenoli zastupljeniji.

Obzirom da je spektrofotometrijska analiza izdvojila 70%-ne acetonske ekstrakte kao najbogatije ukupnim fenolima, ukupnim fenilpropanoidima i ukupnim iridoidima, oni su primenjivani kod dalje hemijske i farmakološke analize.



Slika 25. Odnos ukupnih fenilpropanoida, iridoida i fenola u ispitivanim ekstraktima

2.2.2 Određivanje sadržaja sekundarnih metabolita primenom hromatografskih metoda

2.2.2.1. Određivanje sadržaja aukubina i akteozida primenom HPLC i HPTLC metoda

Među analitičkim metodama koje se koriste u ispitivanju lekovitog bilja, hromatografske tehnike imaju značajnu ulogu i uvedene su u sve savremene farmakopeje. Najčešće primenjivane hromatografske metode u fitohemijskoj analizi su tankoslojna hromatografija (TLC), visokoefikasna tečna hromatografija (HPLC) i gasna hromatografija (GC) (Waksmundzka-Hajnos i Sherma, 2011).

HPLC je najčešće korišćena tehnika za razdvajanje, kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenolnih jedinjenja. Njena visoka efikasnost zasnovana je na primeni reverzno-fazne stacionarne faze u kombinaciji sa različitim sistemima detekcije. Najčešće korišćen tip detekcije je UV/VIS detekcija uz primenu detektora na principu fotodioda (Waxmundzka-Hajnos i Sherma, 2011).

U okviru ove disertacije sadržaj aukubina i akteozida određen je HPLC-DAD tehnikom. Njihova kvantifikacija vršena je preko površine pikova dobijenih integracijom sa odgovarajućih hromatograma uz primenu eksternog standarda. Retenciona vremena aukubina i akteozida iznose 5,42 i 26,90 min sa standardnim devijacijama od 0,01 i 0,46. U UV spektru akteozida uočavaju se apsorpcioni maksimumi karakteristični za feniletanoidna jedinjenja na 246, 290 i 330 nm, dok je u UV spektru aukubina prisutan samo jedan apsorpcioni maksimum na 210 nm. Rezultati određivanja aukubina i akteozida prikazani su u **Tabeli 26**, a odgovarajući HPLC profili dati su na **Slikama 31-33**.

Tabela 26. Sadržaj aukubina i akteozida u 70%-nim acetonskim ekstraktima određen primenom HPLC tehnike

Uzorak	Sadržaj aukubina (mg/g suvog ekstrakta)	Sadržaj akteozida (mg/g suvog ekstrakta)
<i>V. jacquinii</i>	n.d.	30,93 ± 0,58
<i>V. teucrium</i>	n.d.	33,29 ± 0,40
<i>V. urticifolia</i>	10,15±0,86	90,62 ± 2,20

n.d. – nije detektovan

U odnosu na sadržaj aukubina i akteozida, ispitivane biljne vrste do sada nisu analizirane.

Aukubin je prisutan uglavnom u biljkama familija Scrophulariaceae, Plantaginaceae i Rubiaceae, gde igra značajnu ulogu kao hemotaksonomski marker (Marin, 2003). Njegovo prisustvo je takođe pokazano u brojnim *Veronica* vrstama (Crišan i sar., 2010). Zbog bioloških aktivnosti aukubina pokazanih tokom poslednjih decenija, interes za biljkama bogatim ovim sekundarnim metabolitom raste. U okviru ove studije aukubin je identifikovan samo u ekstraktu herbe *V. urticifolia*, gde njegov sadržaj iznosi 10,15 mg/g suvog ekstrakta, što preračunato po gramu suve biljne sirovine iznosi 5,24 mg.

Sadržaj aukubina do sada je određivan primenom različitih metoda: LC-MS (Xu i sar., 2012; Janković i sar., 2010), HPLC-DAD (Janković i sar., 2010; Luo i sar., 2004), HPTLC (Janković i sar., 2010; Hajimehdipoor i sar., 2011; Biringanine i sar., 2006; Rischer i sar.; 1998), kapilarne hromatografije (MECC) i kapilarne elektroforeze (Li i sar., 2008). U *Veronica* vrstama aukubin je kvantifikovan samo primenom LC/MS (Crišan i sar., 2010) i MECC-MS metoda (Suomi i sar., 2001). Sadržaj aukubina određen primenom LC/MS tehnike varirao je od 0,69 do 12,80 mg/g s.m., pri čemu je u vrsti *V. urticifolia* iznosio 10,66 mg/g (Crišan i sar., 2010). Razlika u odnosu na sadržaj dobijen u okviru ove doktorske disertacije može se objasniti primenom metanola kao ekstrakcionog sredstva. U vrstama *V. spicata*, *V. longifolia* i *V. chamaedrys* sadržaj aukubina određen primenom MECC-MS metode, je iznosio 4-24 mg/g s.m. (Suomi i sar., 2000; Suomi i sar., 2001).

Sadržaj akteozida u herbi *V. urticifolia* je približno tri puta veći u odnosu na njegov sadržaj u herbama *V. jacquinii* i *V. teucrium* (**Tabela 26**). Njegov sadržaj do sada je određivan primenom LC-MS (Wu i sar., 2006), HPTLC (Deepak i Handa, 2000; Biringanine i sar., 2006; Umek i sar., 2005) i HPLC-UV (Deepak i Handa, 2000) metoda. Prema dostupnim literaturnim podacima, do sada nije kvantifikovan u *Veronica* vrstama. Sadržaj akteozida preračunat po gramu suve biljne sirovine za *V. urticifolia* (23,80 mg/g) uporediv je sa njegovim sadržajem u vrsti *Plantago lanceolata* koja je oficinalna prema važećoj Evropskoj farmakopeji (Ph. Eur. VII), gde on iznosi 21,71 mg/g (Janković i sar., 2012).

Distribucija i sadržaj aukubina i akteozida u ispitivanim taksonima roda *Veronica* u skladu je sa njihovom taksonomskom pripadnošću. Najveća sličnost uočava se između ekstrakata herbi *V. jacquinii* i *V. teucrium* koje pripadaju istom podrodu *Pentasepalae*, dok *V. urticifolia* spada u podrod *Veronica*.

Visokoeffikasna tankoslojna hromatografija (HPTLC) se zbog svoje ekonomičnosti, brzine, jednostavnosti izvođenja, mogućnosti testiranja više uzoraka istovremeno, kao i primene većeg broja rastvarača u sastavu mobilne faze, u poslednje vreme sve više koristi kao tehnika izbora za kvalitativnu i kvantitativnu analizu aktivnih komponenti u biljnim uzorcima (Srivastava, 2011). Zbog toga je u okviru ove doktorske disertacije HPTLC metoda korišćena za kvantifikaciju aukubina i akteozida u 70%-nim acetonskim ekstraktima odabranih vrsta roda *Veronica*.

Rezultati određivanja aukubina i akteozida primenom HPTLC tehnike prikazani su u **Tabeli 27**, a odgovarajući HPTLC profili dati su na **Slikama 27-30**. Na HPTLC ploči

crvenoljubičaste zone sa Rf vrednostima 0,24 i 0,72 odgovaraju aukubinu, odnosno akteozidu (Slika 26).

Tabela 27. Sadržaj aukubina i akteozida u 70% acetonskim ekstraktima određen HPTLC metodom

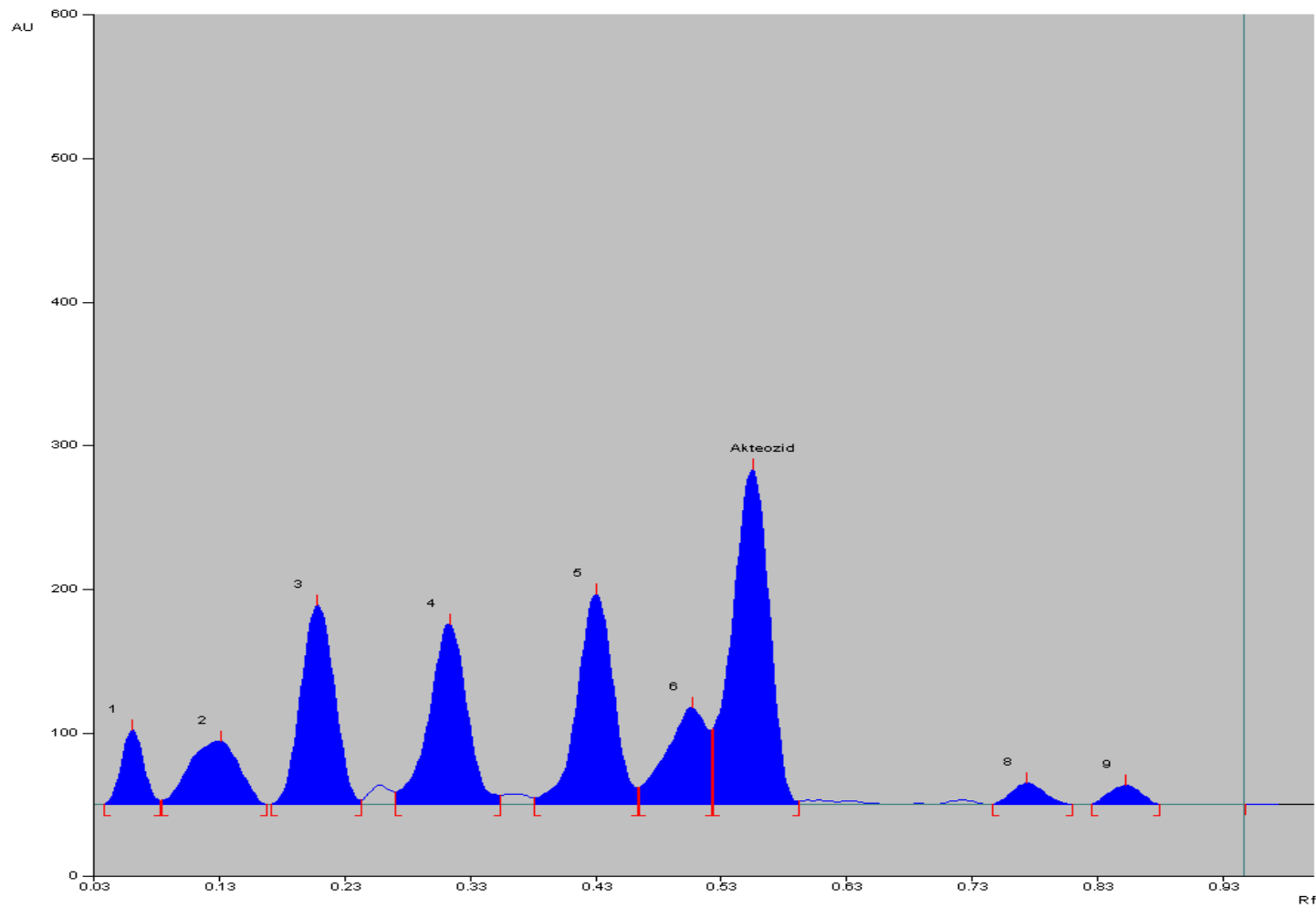
Uzorak	Sadržaj aukubina (mg/g suvog ekstrakta)	Sadržaj akteozida (mg/g suvog ekstrakta)
<i>V. jacquinii</i>	n.d.	29,28 ± 1,60
<i>V. teucrium</i>	n.d.	32,89 ± 1,42
<i>V. urticifolia</i>	11,04 ± 0,33	88,37 ± 4,58

n.d. – nije detektovan

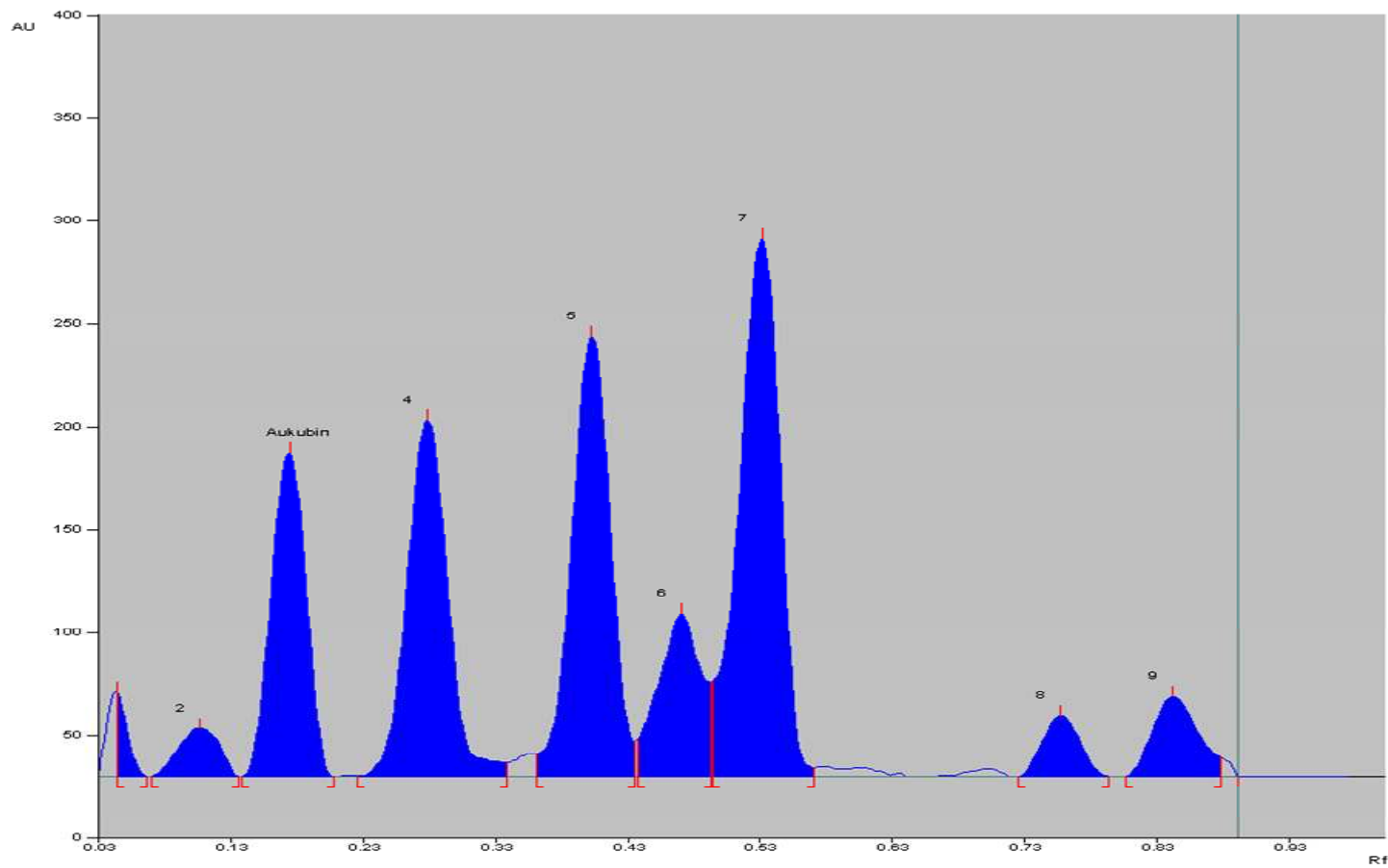
Primena dva nezavisna metoda sa različitim mehanizmima razdvajanja poželjna je za precizno određivanje sadržaja biljnih metabolita (Janković i sar., 2010). HPTLC metodom potvrđeni su rezultati HPLC analize. Studentovim t-testom koji je korišćen za procenu statističke značajnosti razlike između vrednosti dobijenih HPTLC i HPLC metodama, pokazano je da su one ekvivalentne. Predložena HPTLC hromatografska metoda može biti pogodna za rutinsku identifikaciju i kvantifikaciju aukubina i akteozida u *Veronica* vrstama, i može biti deo protokola za procenu autentičnosti biljnog materijala.



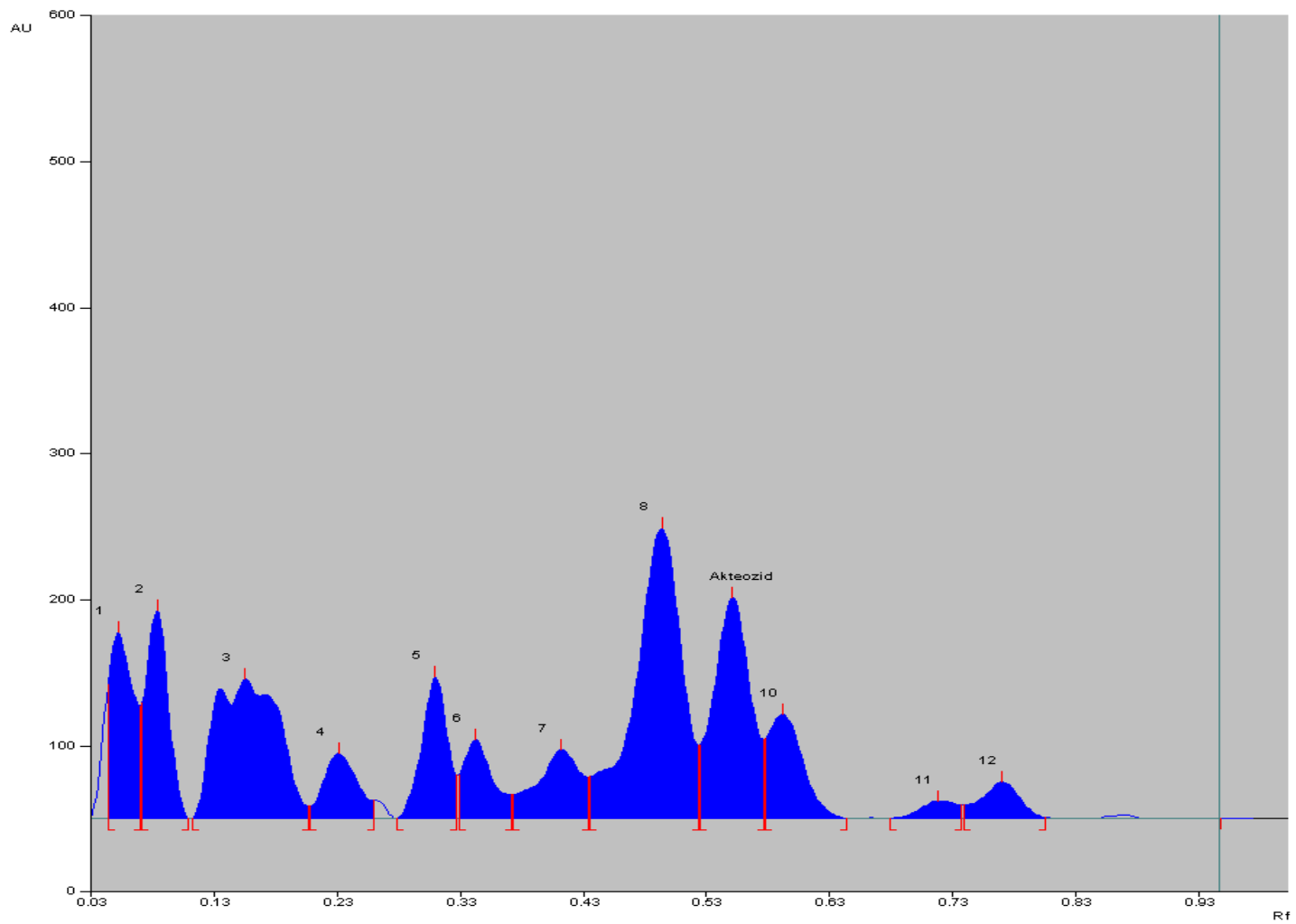
Slika 26. HPTLC hromatogram akteozida u ispitivanim *Veronica* vrstama



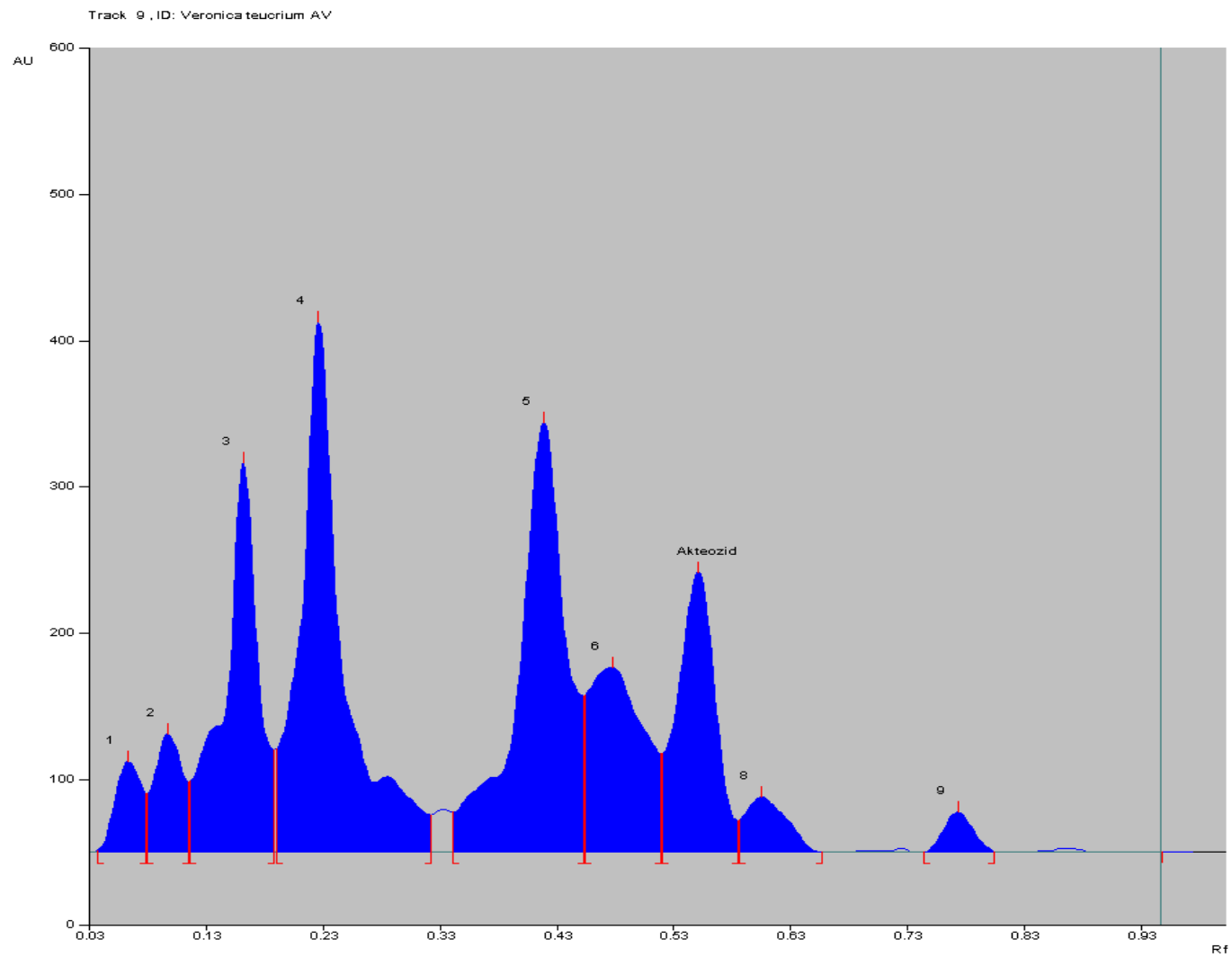
Slika 27. HPTLC hromatogram ekstrakta herbe *V. urticifolia* (metoda za određivanje akteozida)



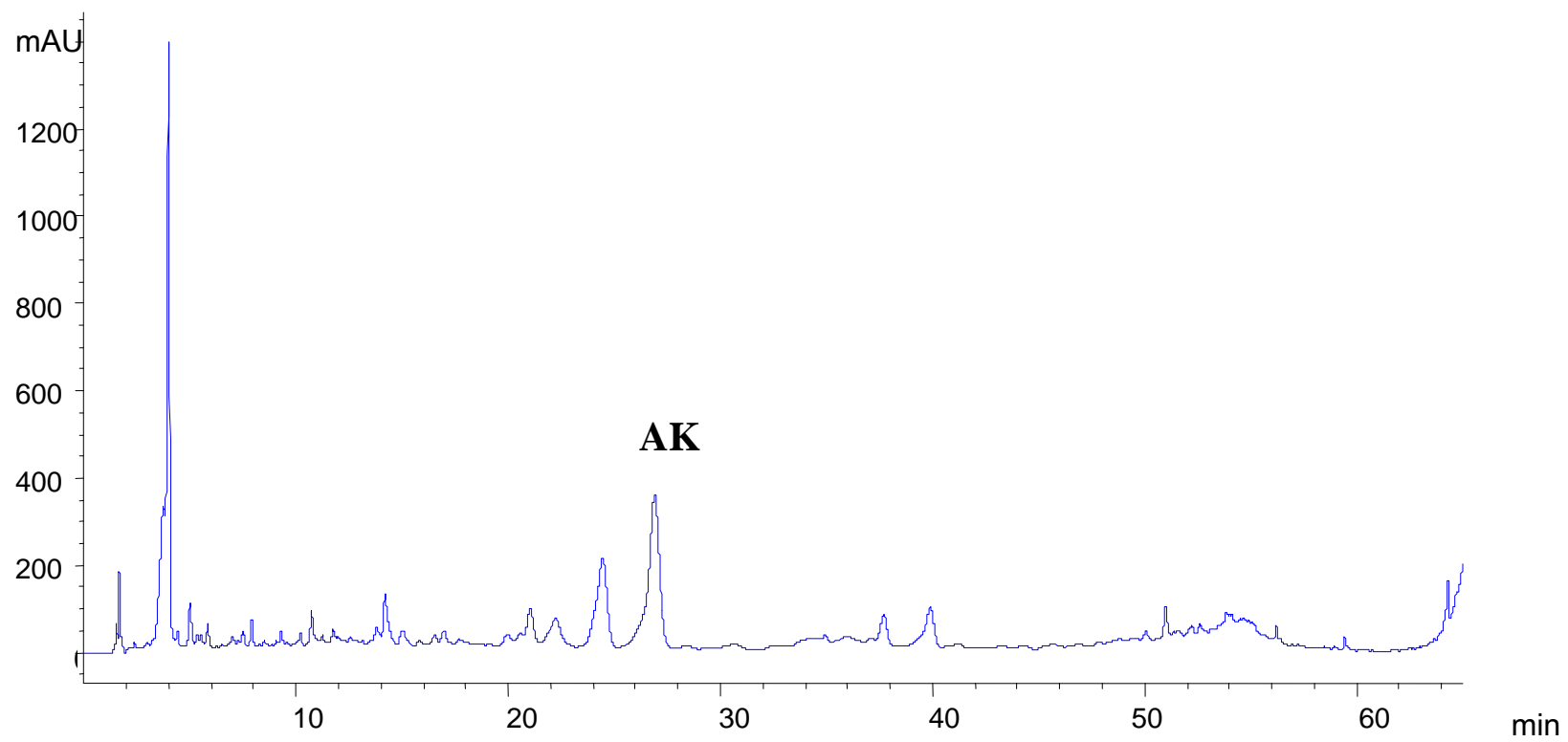
Slika 28. HPTLC hromatogram ekstrakta *V. urticifolia* (metoda za određivanje aukubina)



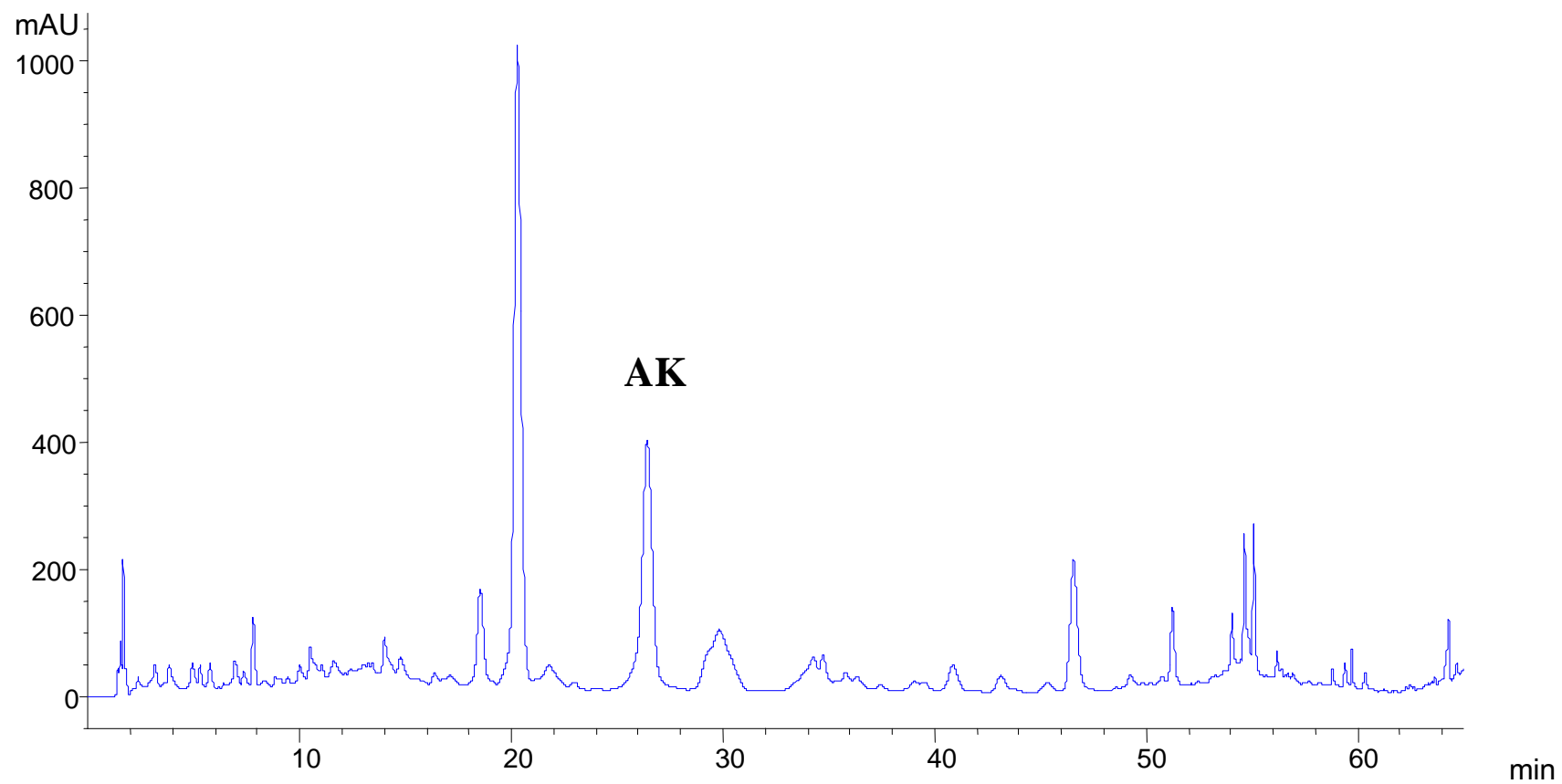
Slika 29. HPTLC hromatogram ekstrakta *V. jacquinii* (metoda za određivanje akteozida)



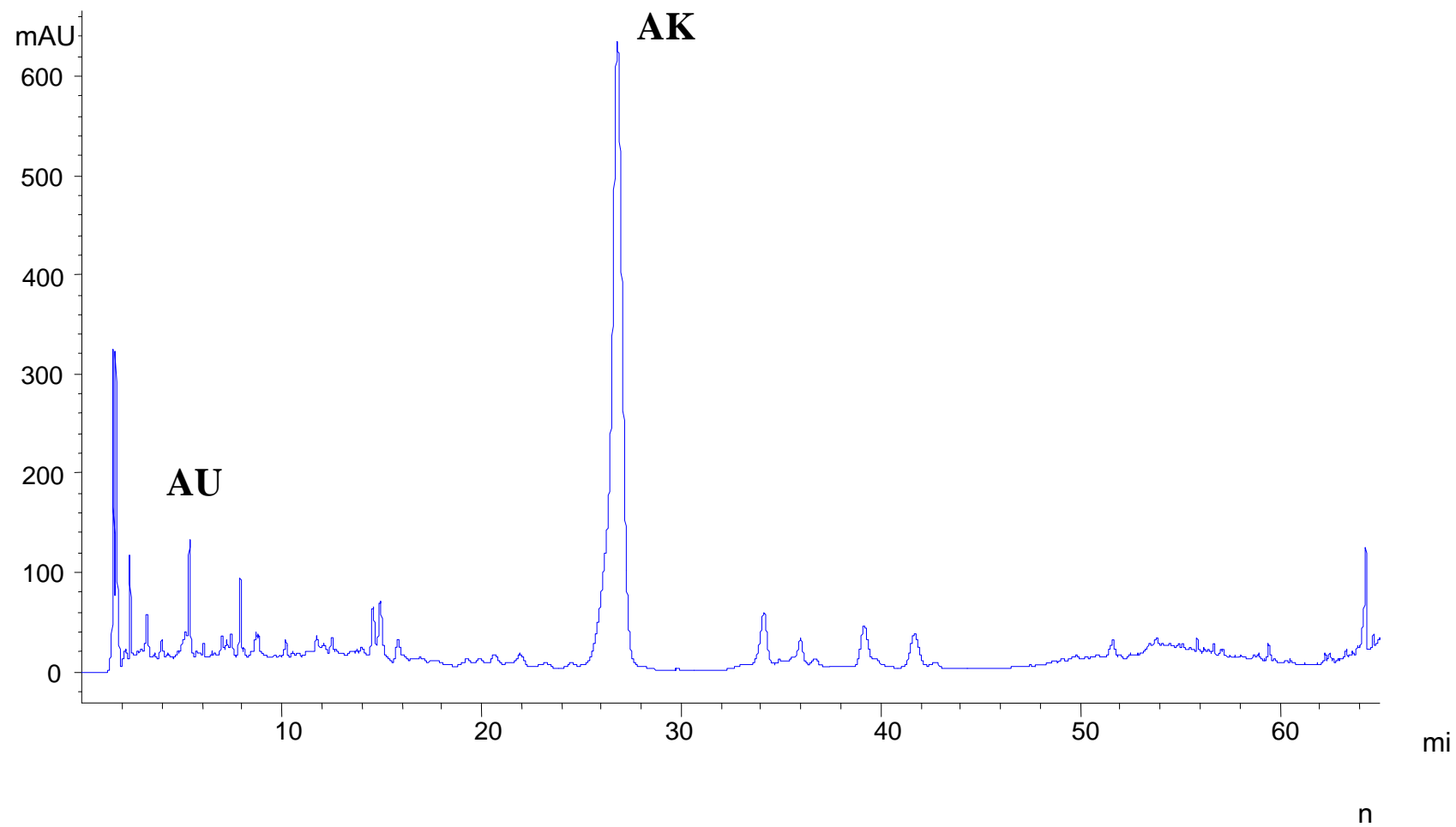
Slika 30. HPTLC hromatogram ekstrakta herbe *V. teucrium* (metoda za određivanje akteozida)



Slika 31. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. jacquinii* ($\lambda=204$ nm); AK – akteozid.



Slika 32. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. teucrium* ($\lambda=204$ nm); AK – akteozid.



Slika 33. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. urticifolia* ($\lambda=204$ nm); AU – aukubin, AK – aktezid.

2.2.2.2. Analiza fenolnih jedinjenja primenom LC-DAD/ESI-MS metode

Detaljna kvalitativna hemijska analiza fenolnih jedinjenja u herbi vrsta *V. jacquinii*, *V. teucrium* i *V. urticifolia* izvršena je primenom HPLC-DAD-ESI/MS metode. HPLC hromatogrami dobijeni u uslovima optimizovanim za razdvajanje fenolnih jedinjenja na detekcionoj talasnoj dužini 280 nm dati su na **Slikama 34-36**.

Identifikacija jedinjenja je izvršena na osnovu karakterističnog izgleda UV spektra i molekulske formule izračunate iz preciznih masa kvazimolekulskih jona u ESI masenim spektrima. Očitane vrednosti retencionih vremena, talasnih dužina, molekulske mase pseudomolekularnih jona, i glavnih fragmentnih jona, date su u **Tabelama 28-30**.

UV i maseni spektri dobijeni HPLC-DAD-ESI/MS analizom pokazali su da je profil ispitivanih ekstrakata okarakterisan prisustvom fenolnih kiselina (derivati hidroksibenzoeve i cimetine kiseline), flavonoida i iridoida. Analiza MS² fragmenata ukazala je na prisustvo *O*- i *C*- glikozida flavonoida, i to: flavanola (derivati kvercetin) i flavona (derivati apigenina, luteolina, izoskutelareina i hrizoeriola).

a) *Veronica urticifolia*

U ekstraktu herbe *V. urticifolia* glavnu frakciju činili su flavonoidi (oko 61%), i to flavoni kao jedini detektovani flavonoidi. Pikovi 5 i 12 identifikovani su kao derivati apigenina, dok su pikovi 9 i 13 identifikovani kao derivati luteolina na osnovu njihovih UV i MS spektralnih karakteristika. Analizom masenih spektara jedinjenja 5 i 12 utvrđeno je prisustvo kvazi molekulskih jona na m/z 621 i 445, redom, koji predstavljaju molekulsku masu umanjenu za jedinicu. Kod oba jedinjenja prisustvo fragmentnog jona na m/z 269 ([M-176]⁻ i [M-176-176]⁻) ukazuje na prisustvo glukuronil ostataka. MS analizom za jedinjenja 5 i 12 utvrđene su molekulske mase 622 i 445, čemu odgovaraju molekulske formule C₂₇H₂₆O₁₇ i C₂₁H₁₈O₁₁, redom. U oba slučaja molekulska masa aglikona iznosi 270. Jedinjenja **5** i **12** prvobitno su identifikovana kao **apigenin-O-diglukuronid** i **apigenin-O-glukuronid**. Na osnovu pojave signala fragmentnog jona na m/z 445 kod jedinjenja 5 zaključeno je da je svaki glukuronidni ostatak lociran na različitim položajima apigenin aglikona.

Kod jedinjenja **9** uočava se prisustvo kvazi molekuskog jona na m/z 461 koji predstavlja molekulsku masu umanjenu za jedinicu [M-H]⁻, kao i fragmentnog jona na m/z 285 ([M-H-176]⁻) što odgovara gubitku jedne glukuronil jedinice. Masa aglikona iznosi 286

što odgovara luteolinu, pa je jedinjenje **9** identifikovano kao **luteolin-7-O-glukuronid**. Kod jedinjenja **13** je prisutan isti kvazi molekulski jon na m/z 461, ali i fragmentni jon na m/z 299 ($[M-H-162]^-$) koji ukazuje na prisustvo molekula heksoze, kao i fragmentni jon na m/z 285 koji svedoči o prisustvu metil grupe (-14 masenih jedinica). Dakle, ovo jedinjenje je derivat luteolina, i to hrizoeriol (3'-metil-luteolin) ili diosmetin (4'-metil-luteolin). Na osnovu navedenih karakteristika jedinjenje **13** je prvobitno identifikovano kao **metil-luteolin-O-glukuronid**. Eluiranje nakon luteolin-7-O-glukuronida je u saglasnosti sa smanjenjem polarnosti usled prisustva dodatne metil grupe. Među navedenim flavonima dominantan je luteolin-7-O-glukuronid čija koncentracija u analiziranom ekstraktu inosi 14,2 mg/g.

Pored flavona u herbi *V. urticifolia* prisutni su i derivati hidroksicimetnih kiselina, i to kafene (jedinjenja 1-4, 6-8 i 10) i *p*-kumarinske kiseline (jedinjenje 11). Jedinjenje **1** identifikovano je kao **3-O-kafeoilhina kiselina** na osnovu prisustva fragmentnog jona deprotonovane hina kiseline (m/z na 179) kao osnovnog pika i drugog fragmentnog jona na m/z 179 ($[kafena\ kiselina-H]^-$), intenziteta većeg od polovine intenziteta osnovnog pika. Ovo predstavlja fragmentacioni model karakterističan za 3-acilhlorogenske kiseline (Clifford i sar., 2005). Kod jedinjenja 2 i 3 prisutan je isti kvazi molekulski jon $[M-H]^-$ na m/z 487, kao i sličan fragmentacioni model koji ukazuje na gubitak 308 masenih jedinica (heksozil i deoksiheksozil jedinice), pri čemu nastaju osnovni pik na m/z 179 ($[kafena\ kiselina-H]^-$) i dva fragmentna jona na m/z 161 ($[kafena\ kiselina-H-H_2O_2]^-$) i na m/z 135 ($[kafena\ kiselina-H-CO_2]^-$). Činjenica da nema fragmentnih jona koji bi ukazali na alternativni gubitak heksozil (-162 masene jedinice) i deoksiheksozil (-146 masenih jedinica) ostataka ukazuje na to da su ove dve šećerne komponente deo disaharida (npr. rutinoza ili neohesperidoza). Ipak, prava priroda šećernog ostatka ne može se utvrditi na osnovu MS analize. Iz tog razloga, jedinjenja **2** i **3** su prvobitno identifikovana kao **kafeoil deoksiheksozil-heksozidi I i II**.

Jedinjenje **4** identifikovano je kao **kafena kiselina** na osnovu poređenja retencionog vremena, UV i MS spektara sa odgovarajućim retencionim vremenom i spektrima komercijalno dostupnog standardnog jedinjenja.

Jedinjenja 6, 7, 8 i 10 sa kvazi molekulskim jonom $[M-H]^-$ na m/z 477 i m/z 453, označena su kao derivati kafene kiseline na osnovu prisustva fragmentnih jona na m/z 179, 161 i 135. UV spektri jedinjenja 7 i 10 pokazali su apsorpcione maksimume na 234 i 330 nm, karakteristične za feniletanoidne glikozide. HPLC-DAD/ESI-MS analiza jedinjenja 7 je pokazala prisustvo deprotonovanog molekulskog jona $[M-H]^-$ na m/z 623 koji može biti pripisan akteozidu. Ovo je potvrđeno i putem dostupnih literaturnih podataka o UV spektru i

MS² fragmentacionom modelu akteozida (Li i sar., 2005). Na osnovu MS² spektra jasno je da od molekuskog jona na m/z 623 nastaje glavni fragmentni jon na m/z 461 gubitkom kafeoil grupe ([M-H-161]⁻), kao i slabiji jon na m/z 315 koji ukazuje na gubitak ramnoze, i joni na m/z 161 i m/z 135 koji svedoče o prisustvu kafeoil ostatka. Jedinjenje **7** prvobitno je identifikovano kao **akteozid** u skladu sa podacima do kojih su došli Li i saradnici (2005). Sadržaj akteozida u herbi *V. urticifolia* (14,9 mg/g) čini je značajnim izvorom ovog bioaktivnog jedinjenja. Jedinjenje **10** prvobitno je identifikovano kao **izomer akteozida**.

Za jedinjenje **11** pokazano je prisustvo molekuskog jona [M-H]⁻ na m/z 437 koji dalje fragmentacijom daje MS² osnovni pik na m/z 163 ([kumarinska kiselina-H]⁻), što u kombinaciji sa UV spektrom (λ_{\max} na 312 nm) potvrđuje da je u pitanju **derivat kumarinske kiseline**.

b) *Veronica teucrium*

U ekstraktu herbe *V. teucrium* glavnu frakciju činili su flavonoidi (oko 61%) i to flavoni kao jedini detektovani flavonoidi. Pikovi 3 i 11 identifikovani su kao derivati apigenina, dok su pikovi 10 i 12 identifikovani kao derivati izoskutelareina na osnovu njihovih UV i MS spektralnih karakteristika. Osim flavonoida prisutni su i derivati fenolkarbonskih kiselina, čiji sadržaj u ispitivanom ekstraktu iznosi 39%.

Iako je na osnovu UV spektra jasno da je u pitanju derivat apigenina, u MS spektru jedinjenja 3 u herbi *V. teucrium* nema fragmentnog jona na m/z 269 koji bi ukazao na aglikon apigenina. Ovo jedinjenje identifikovano je kao C-glikozilovani derivat. Pored niskog retencionog vremena, ovaj tip jedinjenja okarakterisan je gubitkom karakterističnih fragmenata nastalih cepanjem pirano prstena šećera veličine 120 i 90 masenih jedinica u slučaju heksozida. U masenom spektru jedinjenja 3 uočava se prisustvo kvazi molekuskog jona [M-H]⁻ na m/z 593, kao i karakterističnih fragmentnih jona na m/z 503 (-90 masenih jedinica), 473 (-120 masenih jedinica), 383 (-120-90 masenih jedinica) i 353 (-120-120 masenih jedinica). Fragmentacioni model jedinjenja **3** u saglasnosti je sa literaturnim podacima za **apigenin-6,8-di-C-glukozid (vicenin 2)** (Grayer i sar., 2000). Na osnovu podataka iznetih za LC-MS/ESI-MS analizu herbe *V. urticifolia* jedinjenje **11** identifikovano je kao **apigenin-7-O-glukuronid**.

UV spektri jedinjenja 10 i 12 karakteristični su za izoskutelarein derivate i pokazuju λ_{\max} na 278, 302 i 333 nm, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim podacima za derivate

izoskutelareina prisutne u *Veronica* vrstama (Saracoglu i sar., 2004b). U MS spektrima jedinjenja 9 i 10 prisutni su kvazi molekularni ($[M-H]^-$) na m/z 651 i fragmentni jon ($[M-H-42-162-162]^-$) na m/z 285 koji predstavlja molekularnu masu aglikona umanjenu za jedan. Takođe, prisutni su i fragmentni jon na m/z 609 koji svedoči o prisustvu acetil grupe kod oba jedinjenja, kao i $[M-H-42-162]^-$ koji svedoči o gubitku obe heksozil grupe. Fragmentni jon ($[M-H-42-180]^-$) na m/z 429 kod jedinjenja 11 ukazuje na prisustvo acetil grupe na molekulu terminalne heksoze (Karioti i sar., 2010). Glavni fragmentni jon na m/z 285 nastaje gubitkom jedinice od 324 Da, što ukazuje na O-glikozilovanje fenolne grupe diheksozom (Ferrerres i sar., 2004). Fragmentni jon $[M-H-180]^-$ na m/z 429 ukazuje na 1→2 glikozidnu vezu između šećernih komponenti (Ferrerres i sar., 2004; Petreska i sar., 2011). Na osnovu prethodnih podataka o derivatima izoskutelareina u *Veronica* vrstama (Albach i sar., 2005b), kao i na osnovu zastupljenosti pojedinih fragmentnih jona (Pereira i sar., 2012), jedinjenje **10** je prvobitno identifikovano kao **izoskutelarein 7-O-[alozil-(1→2)]-glukopiranozid**. Njegovo prisustvo prethodno je pokazano u biljkama porodice Lamiaceae, i to u okviru rodova *Sideritis*, *Stachys* i *Lamium* (Perreira i sar., 2012). Jedinjenje **12** prvobitno je identifikovano kao **izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)-β-alozil-(1'''→2''')-β-glukopiranozid**. Saracoglu i saradnici (2004b) pokazali su prisustvo jedinjenja 12 i u vrsti *Veronica thymoides* subsp *pseudocinerea*.

Pored flavona u herbi *V. teucrium* prisutna je i protokatehinska kiselina (jedinjenje 1), kao i derivati hidrokscimetnih kiselina, i to kafene (jedinjenja 2, 5, 6, 7, 8 i 9) i protokatehinske kiseline (jedinjenje 4). Jedinjenje **1** identifikovano je kao **protokatehinska kiselina** poređenjem UV spektra i retencionog vremena sa istim parametrima standardnog jedinjenja. Na sličan način, jedinjenje **2** identifikovano je kao **5-O-kafeoilhina kiselina** na osnovu poređenja sa autentičnim standardom, kao i na osnovu MS fragmentacionog modela. Jedinjenje **4**, sa UV spektrom karakterističnim za benzojeve kiseline, identifikovano je kao **derivat protokatehinske kiseline** na osnovu kvazi molekularnog jona $[M-H]^-$ na m/z 497 i fragmentacionog modela koji nastaje cepanjem heksozil jedinice (- 162 masene jedinice), kao i dva fragmentna jona na m/z 153 ($[protokatehinska\ kiselina-H]^-$) i 109 ($[protokatehinska\ kiselina-H-CO_2]^-$).

UV spektri jedinjenja 5, 6, 7, 8 i 9 pokazali su apsorpcione maksimume na 234 i 330 nm, karakteristične za feniletanoidne glikozide. Većina feniletanoidnih glukozida uključuje supstituente kao što su feruloil, ili kafeoil grupa koje su vezane najčešće za hidroksilnu grupu položaja 4 ili 6 centralnog molekula šećera. Za njihov MS spektar karakteristično je prisustvo

fragmentnih jona na m/z 179, 161 i 135, koji ukazuju na cepanje kafeoil grupe, anhidroglukoze i anhidrofenetanol. Na osnovu podataka iznetih za LC-DAD/ESI-MS analizu herbe *V. urticifolia* jedinjenje **7** identifikovano je kao **akteozid**. Slične karakteristike pokazuje i pik 8, što ukazuje na to da su ova dva jedinjenja izomeri. Na osnovu redosleda eluiranja, kao i prema literaturnim podacima do kojih su došli Li i sar. (2008) jedinjenje **8** identifikovano je kao **izoakteozid**. Jedinjenja 5 i 9 imaju isti kvazi molekulski jon na m/z 771. U njihovom MS² spektru prisutni su fragmentni jon ([M-H-162]⁻) na m/z 609 koji ukazuje na gubitak kafeoil/heksozil jedinice, ([M-H-162-132]⁻) koji nastaje gubitkom dodatne pentozil jedinice na m/z 477 i ([M-H-162]) na m/z 315 koji je rezultat cepanja još jedne kafeoil/heksozil grupe. Detektovan je i fragmentni jon na m/z 161 kao karakteristika kafeoil ostatka kao i kod prethodnih feniletanoidnih glikozida. Jedinjenja **5** i **9** su prvobitno identifikovana kao **aragozid** i **izoaragozid**. Njihovo prisustvo i ranije je pokazano u *Veronica* vrstama, i to u herbi *V. lavaudiana* (Taskova i sar., 2011; Taskova i sar., 2012), *V. pentasepala* i *V. raoulii* (Taskova i sar., 2012). Za jedinjenje **6** pokazane su slične karakteristike. Na osnovu kvazi molekulskog jona na m/z 639 i fragmentnih jona na m/z 179, m/z 161 i m/z 135, kao i nakon poređenja sa dostupnim literaturnim podacima (Qi i sar., 2012), ovo jedinjenje je prvobitno identifikovano kao **plantamajozid**. Na osnovu njegovog sadržaja u ekstraktu *V. teucrium* može se zaključiti da je dominantno feniletanoidno jedinjenje u ovoj biljnoj vrsti. Njegovo prisustvo je ranije pokazano i u vrsti *V. fuchsii* (Ozipek i sar., 1999).

c) *Veronica jacquinii*

U ekstraktu herbe *V. jacquinii* glavnu frakciju činili su derivati fenolkarbonskih kiselina (oko 63%), kafene i protokatehinske kiseline. Pored njih prisutni su i flavonoidi (37%) i to flavonoli i flavoni kao jedini detektovani flavonoidi. Pikovi 1, 4, 9-11 identifikovani su kao derivati kvercetina, pik 6 kao derivat luteolina, dok su pikovi 14 i 15 identifikovani kao derivati izoskutelareina na osnovu njihovih UV i MS spektralnih karakteristika.

Jedinjenje **10** identifikovano je kao **kvercetin-3-O-glukozid** na osnovu poređenja retencionog vremena, MS i UV spektara sa retencionim vremenima i spektrima komercijalnog standarada. Jedinjenje **11** sa UV spektrom karakterističnim za derivate kvercetina, kvazi molekulskim jonom na m/z 463 identifikovano je kao **kvercetin heksozid**. U njegovom MS spektru prisutan je fragmentni jon na m/z 301 koji ukazuje na jedinicu heksoze vezanu za atom kiseonika. Jedinjenja **1** i **4** identifikovana kao **kvercetin diheksozidi I i II** ([M-H]⁻ na

m/z 625). Njihova identifikacija vršena je na osnovu njihovih kvazi molekulskih jona, kao i fragmentnih jona koji nastaju cepanjem jednog ili dva heksozil ostatka (162 masene jedinice). Ni kod jednog od ovih jedinjenja nije moguće utvrditi identitet šećerne komponente, kao ni položaj supstituenta samo na osnovu MS analize. U masenom spektru jedinjenja 10 uočen je fragmentni jon ($[M-H-42]^-$) na m/z 625 koji odgovara gubitku acetil grupe, kao i fragmentni joni na ($[M-H-42-162]^-$) na m/z 463 i ($[M-H-42-162-162]^-$) na m/z 301 koji ukazuju na prisustvo dva molekula heksoze. Jedinjenje **9** je prvobitno identifikovano kao **kvercetin acetil-di-heksozid**. Kvercetin i njegovi derivati do sada su identifikovani samo u podrodu *Pocilla*. Mehrvarz i sar. (2008) pokazali su da je kvercetin prisutan u vrstama *V. franisetae* i *V. siaretensis*, dok u vrstama *V. polita* i *V. persica* on predstavlja prekursor za sintezu kvercetin 3',4',5,7-tetrametiletra.

Kao jedinjenje **6** na hromatogramu prisutan je **derivat luteolina** sa kvazi molekulskim jonom na ($[M-H]^-$) na 623, kao i MS² fragmentnim jonima na ($[M-134]^-$) na m/z 489, ($[M-134-162]^-$) na m/z 327 i ($[M-134-126-42]^-$) na m/z 285. Dok poreklo prvog među njima nije utvrđeno, druga dva potiču od gubitka heksozil i acetil grupa, redom.

UV spektri jedinjenja 13 i 14 karakteristični su za izoskutelarein derivate. Na osnovu kvazi molekulskog jona ($[M-H]^-$) na m/z 651, i fragmentnih jona ($[M-H-324-42]^-$) na m/z 285 koji ukazuje na *O*-acetil glikozilovanje fenolne hidroksilne grupe, i jona ($[M-H-42-180]^-$) na m/z 429 koji ukazuje na prisustvo acetil grupe na terminalnoj šećernoj komponenti, jedinjenje **13** je prvobitno identifikovano kao **izoskutelarein 7-O-(6-O-acetilalozil)(1→2)glukopiranozid**. Jedinjenje **14** je prvobitno identifikovano kao **izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)-β-alopiranozil-(1'''→2''')-β-glukopiranozid**.

Pored flavona u herbi *V. jacquinii* prisutni su i derivati hidroksicimetnih kiselina, i to kafene (jedinjenja 3, 5, 7, 8, 12 i 13) i protokatehinske kiseline (jedinjenje 2). Jedinjenje **2** identifikovano je kao **derivat protokatehinske kiseline** na osnovu kvazi molekulskog jona $[M-H]^-$ na m/z 335 i dva fragmentna jona na m/z 153 ($[protokatehinska\ kiselina-H]^-$) i 109 ($[protokatehinska\ kiselina-H-CO_2]^-$). Jedinjenja **3**, **5** i **7** na osnovu fragmentnih jona na m/z 179 ($[kafena\ kiselina-H]^-$), m/z 161 ($[kafena\ kiselina-H-H_2O]^-$) i m/z 135 ($[kafena\ kiselina-H-CO_2]^-$) prvobitno su identifikovana kao **derivati kafene kiseline I, II i III**. Šećerne komponente čine heksoza, deoksiheksoza, disaharidi i glukuronidi, što se može zaključiti na osnovu gubitka 162 Da, 146 Da, 308 Da i 176 Da.

Jedinjenje **8** identifikovano je kao **akteozid**. Na osnovu UV spektra jedinjenja 13 i njegovog kvazi molekulskog jona koji je za 14 Da manji u odnosu na kvazi molekulski jon

akteozida, ukazujući na prisustvo metil grupe, jasno je da je u pitanju njegov derivat. U MS² spektru ovog jedinjenja prisutni su fragmentni joni na m/z 461 i 315, što ukazuje na gubitak feruloil grupe, kao i feruloil i ramnozil grupe, redom. Primećeni su fragmentni joni [ferulna kiselina-H-] na m/z 193 i [ferulna kiselina-H-H₂O]. Prema ovim podacima, kao i prema rezultatima do kojih je došao Innocenti sa saradnicima (2006) jedinjenje **12** prvobitno je identifikovano kao **eukovozid**. Ovo jedinjenje do sada je identifikovano u biljkama familija Verbenaceae (Dawoud i El-Morsy, 2012; Quirantes-Piné i sar., 2009), Orobanchaceae (Shuya i sar., 2004) i Scrophulariaceae (Emam, 2010), a ovo je prvi podatak o njegovom prisustvu u familiji Plantaginaceae i rodu *Veronica*.

Tabela 28. Prvobitna identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktu herbe *V. urticifolia*

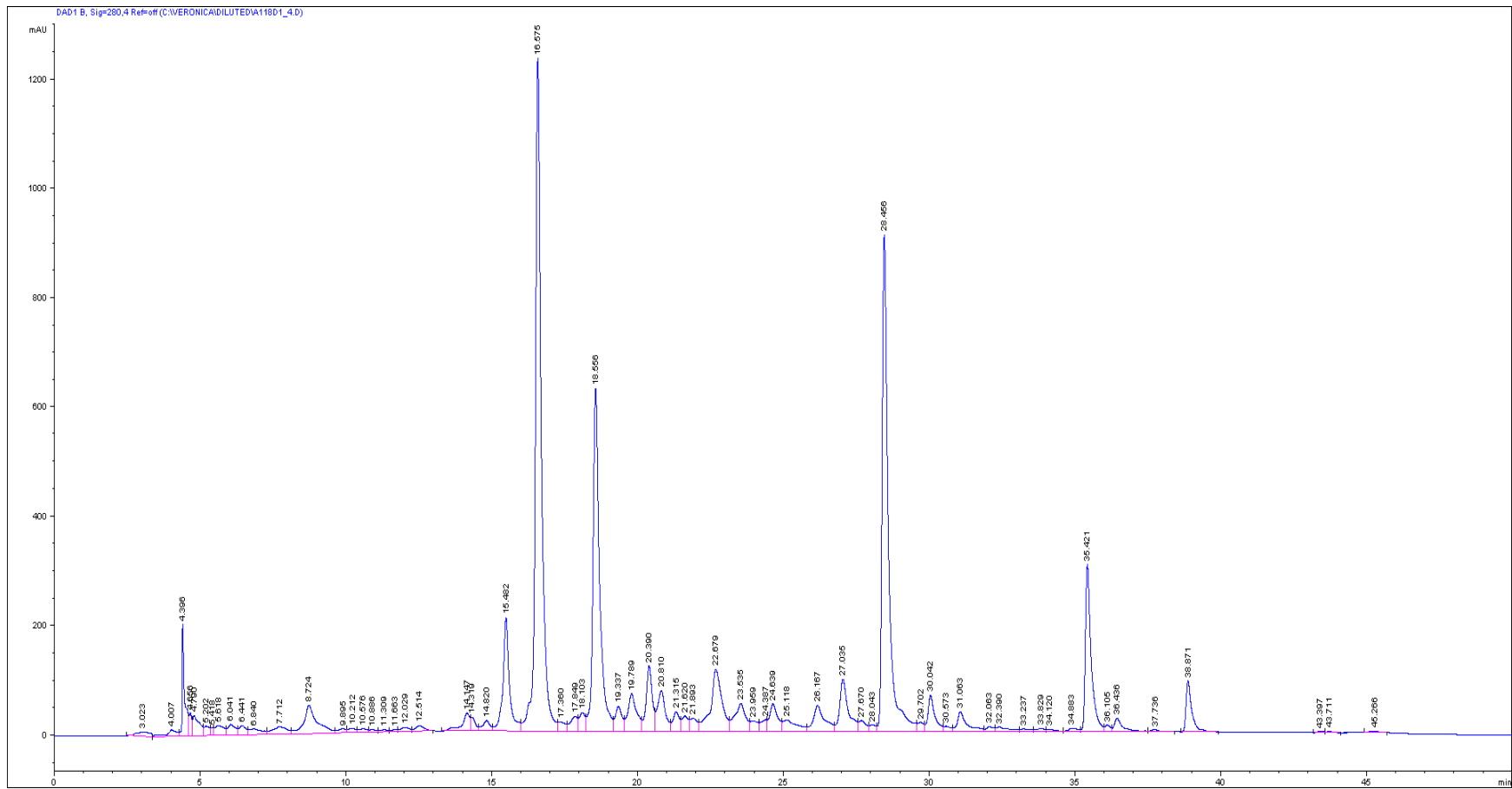
Pik	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	MS ² (<i>m/z</i>)	Prvobitna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g ekstrakta)
1	5,56	324	353	191(100), 179(75), 173(7), 135(57)	3- <i>O</i> -kafeoilhina kiselina	0,160±0,010
2	5,74	330	487	179(100), 161(11), 135(56), 119(3)	Kafoil deoksiheksozil-heksozid I	0,048±0,005
3	6,04	330	487	179(100), 161(24), 135(76)	Kafoil deoksiheksozil-heksozid II	0,031±0,001
4	14,51	326	179	135(43)	Kafena kiselina	0,050±0,010
5	15,47	268/328	621	445(65), 269(60)	Apigenin- <i>O</i> -diglukuronid	2,100±0,010
6	18,06	330	477	315(2), 179(13), 161(76), 135(13)	Derivat kafene kiseline	0,090±0,010
7	18,50	330	623	461(43), 315(4), 161(29), 135(2)	Akteozid	14,923±0,101
8	19,57	328	453	341(27), 281(26), 251(29), 221(34), 179(100), 161(22), 135(34)	Derivat kafene kiseline	0,171±0,011
9	21,32	348	461	285(100)	Luteolin-7- <i>O</i> -glukuronid	14,210±0,100
10	21,59	326	623	461(55), 315(5), 161(14), 135(2)	Izomer akteozida	0,760±0,021
11	24,85	312	437	265(92), 235(36), 163(100), 145(44), 119(36)	Derivat <i>p</i> -kumarinske kiseline	0,082±0,012
12	26,04	330	445	269(100), 175(7), 113(18)	Apigenin- <i>O</i> -glukuronid	2,080±0,043
13	27,35	348	461	299(37), 285(16)	Metil-luteolin- <i>O</i> -glukuronid	6,610±0,041

Tabela 29. Prvobitna identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktu herbe *V. jacquini*

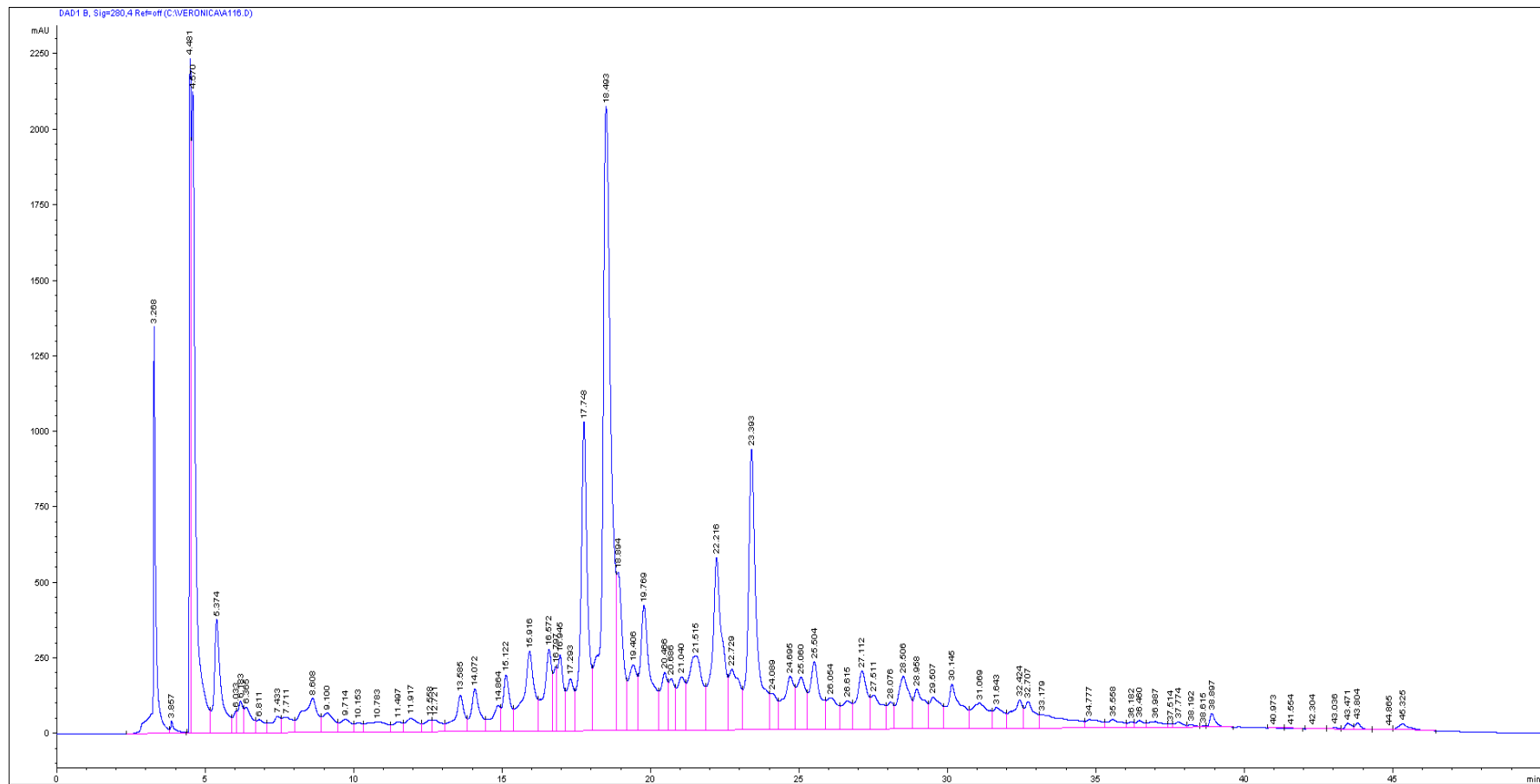
Peak	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Molekulski jon [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Prvobitna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g ekstrakta)
1	8,6	356	625	463(47), 301(52)	Kvercetin di-heksozid I	0,622±0,002
2	14,1	264	497	335(25), 221(22), 153(29), 109(11)	Derivat protokatehinske kiseline	0,555±0,002
3	15,1	332	539	377(36), 341(36), 281(18), 251(14), 179(45), 161(18), 135(18)	Derivat kafene kiseline I	0,280±0,008
4	15,9	344	625	463(8), 301(56)	Kvercetin di-heksozid II	0,654±0,004
5	16,6	334	433	323(86), 179(24), 161(100), 135(14)	Derivat kafene kiseline II	0,779±0,001
6	17,3	350	623	489(4), 327(22), 285(100)	Derivat luteolina	1,420±0,009
7	17,8	330	477	179(14), 161(56), 135(13)	Derivat kafene kiseline III	1,712±0,046
8	18,5	330	623	461(28), 315(2), 161(16), 135(3)	Akteozid	5,000±0,015
9	19,7	352	667	625(43), 463(6), 301(51)	Kvercetin acetil-di-heksozid	0,614±0,003
10	21,0	350	463	301(100)	Kvercetin 3-O-glukozid	0,314±0,005
11	21,4	350	463	301(100)	Kvercetin heksozid	1,342±0,023
12	23,4	330	637	491(4), 461(54), 315(2), 193(5), 175(8), 161(5), 135(2)	Eukovozid	1,679±0,006
13	27,1	268/298/328	651	609(6), 429(22), 285(86)	Izoskutelarein 7-O-(6-O-acetilalozil) (1→2)-β-glukopiranozid	0,144±0,004
14	28,5	280/306/328	651	609(4), 447(4), 429(17), 285(80)	Izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)-β- alozil (1'''→2''')-β-glukopiranozid	0,386±0,005

Tabela 30. Prvobitna identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja u ekstraktu herbe *V. teucrium*

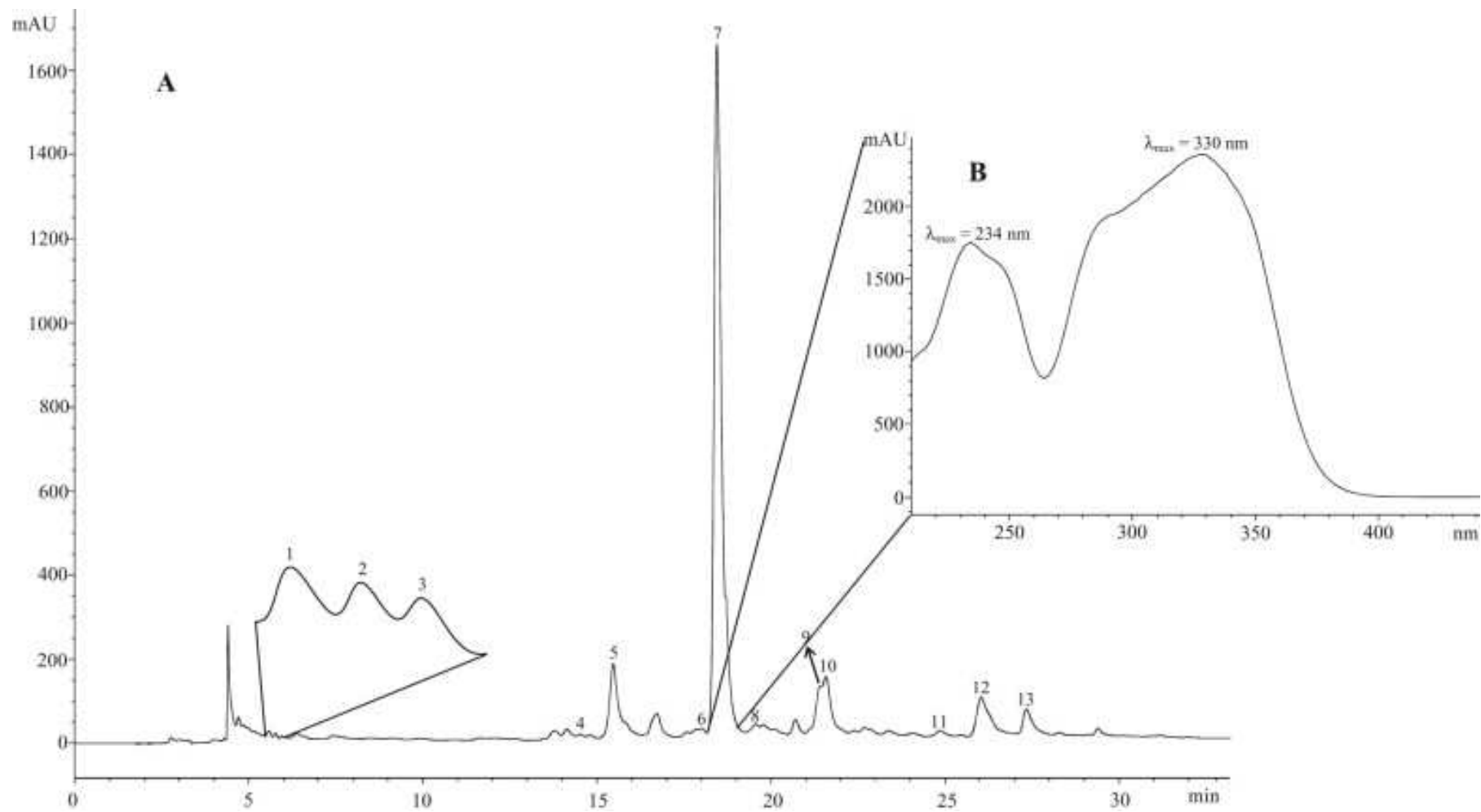
Peak	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Molekulski jon [M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	MS ² (<i>m/z</i>)	Prvobitna identifikacija	Kvantifikacija (mg/g extract)
1	6,4	258	153	109(100)	Protokatehinska kiselina	0,169±0,006
2	8,7	326	353	191(100), 179(3), 173(3), 161(59), 135(4)	5- <i>O</i> -Kafeoil-hina kiselina	1,199±0,029
3	11,9	330	593	503(4), 473(16), 383(11), 353(26)	Apigenin- <i>C</i> -heksozid- <i>C</i> -heksozid	0,040±0,000
4	14,1	264	497	335(38), 221(34), 153(41), 109(17)	Derivat protokatehinske kiseline I	0,570±0,013
5	15,4	328	771	609(50), 477(33), 315(4), 161(7)	Aragozid	1,663±0,007
6	16,4	328	639	477(41), 315(5), 179(2), 161(31), 135(3)	Plantamajozid	10,060±0,033
7	18,5	330	623	461(42), 315(2), 161(25), 135(3)	Akteozid	5,240±0,007
8	19,3	326	623	461(20), 315(2), 161(18)	Izoakteozid	0,317±0,004
9	21,4	330	771	609(18), 477(14), 315(3), 161(3)	Izoaragozid	n.k.
10	22,6	330	609	447(4), 429(20), 285(100)	Izoskutelarein-7- <i>O</i> -alozil-glukozid	3,239±0,032
11	26,1	336	445	269(100)	Apigenin-7- <i>O</i> -glukuronid	0,978±0,003
12	28,4	278/306/326	651	609(7), 447(9), 429(33), 285(100)	Izoskutelarein 7- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -acetil)-β-alozil (1'''-→2''')-β-glukopiranozid	26,326±0,117



Slika 34. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. teucrium* ($\lambda=280$ nm)



Slika 35. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. jacquinii* ($\lambda=280$ nm)



Slika 36. HPLC hromatogram ekstrakta herbe *V. urticifolia* ($\lambda=280$ nm)

2.2.2.3. Kvantitativna LC-MS/MS analiza odabranih fenolnih jedinjenja

Dodatna saznanja o hemijskom sastavu herbi ispitivanih vrsta dobijena su kvantifikacijom odabranih jedinjenja u 70%-nim acetonskim ekstraktima primenom visoko selektivne i specifične LC-MS/MS tehnike sa trostrukim kvadrupolom masenim spektrometrom sa elektrosprej jonizacijom. Fitohemijski skrining obuhvatio je analizu 1 cikloheksan karboksilne kiseline, 14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana od kojih je većina detektovana po prvi put u ispitivanim *Veronica* vrstama. Odgovarajući hromatogrami ispitivanih ekstrakata prikazani su na **Slikama 37-39**. Sadržaj određivanih fenolnih jedinjenja je dat u **Tabeli 31** i značajno se razlikuje u zavisnosti od ispitivane *Veronica* vrste.

Rezultati analize pokazuju da je među kiselinama u 70%-nom acetonskom ekstraktu vrste *V. teucrium* dominantna hlorogenska kiselina (749,71 µg/g suve mase ekstrakta), dok je hina kiselina dominantna u ekstraktima vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia* (310,03 i 38,44 µg/g s.m. ekstrakta). U poređenju sa ostalim fenolnim kiselinama, galna kiselina (prisutna samo u ekstraktu vrste *V. jacquinii*) i siringinska kiselina prisutne su u najmanjim količinama. U ispitivanim ekstraktima nije pokazano prisustvo *o*-kumarinske, cimetine, sinapinske i 3,4 dimetoksicimetine kiseline. Sadržaj hlorogenske kiseline značajno varira među ispitivanim vrstama (749,71; 195,63 i 7,32 µg/g s.m. u ekstraktima vrsta *V. teucrium*, *V. jacquinii* i *V. urticifolia*). Uz izuzetak hlorogenske i hina kiseline, sadržaj ostalih ispitivanih kiselina je uglavnom ujednačen. Ekstrakt herbe *V. jacquinii* ima najveći procenat fenolkarbonskih kiselina, dok je taj procenat najmanji u ekstraktu herbe *V. urticifolia*.

Dosadašnja analiza flavonoidnog profila *Veronica* vrsta pokazala je da su flavoni dominantna klasa flavonoidnih jedinjenja (Albach i sar., 2003). Naši rezultati pokazuju da je bajkalin dominantan flavonoid u ekstraktima vrsta *V. urticifolia* (779,05 µg/g s.m.) i *V. teucrium* (347,02 µg/g s.m.), dok u ekstraktu vrste *V. jacquinii* nije detektovan. Prethodna ispitivanja (Samuelsen, 2000) ukazala su na prisustvo bajkalina i u *Plantago* vrstama, ali je ovo prvi takav podatak za *Veronica* vrste. Apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, viteksin i hrizoeriol prisutni su u tragovima, i to apigenin, apigenin-7-*O*-glukozid, i hrizoeriol detektovani su u svim ispitivanim ekstraktima, dok je viteksin prisutan samo u ekstraktima vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia*. Slična situacija je i sa luteolinom i luteolin-7-*O*-glukozidom u ekstraktu vrste *V. teucrium*, dok su nešto veće koncentracije zastupljene u ekstraktima vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia* (11,73-37,33 µg/g s.m.). Dakle, rezultati pokazuju da vrste *V.*

teucrium i *V. urticifolia* mogu biti klasifikovane u flavon hemotip. Za razliku od fenolnih kiselina, ukupan sadržaj analiziranih flavona bio je najveći u ekstraktu *V. teucrium*, dok je u ekstraktu herbe *V. jacquinii* on zanemarljiv u poređenju sa druge dve vrste. U okviru ovog ispitivanja načinjen je pokušaj za detektovanjem prisustva drugih klasa flavonoida kao što su flavanoni, flavanoli, izoflavoni i flavanoli. Kemferol-3-*O*-glukozid dominantan je flavonol među analiziranim ekstraktima. Iako u tragovima, interesantno je prisustvo izoflavona genisteina u ekstraktu vrste *V. jacquinii*. Ovo je prvi podatak o identifikaciji izoflavonoida u familiji Plantaginaceae. Njihovo prisustvo je gotovo u potpunosti ograničeno na familiju Fabaceae, ali su predstavnici ove klase sporadično detektovani i u nekoliko desetina drugih familija, među njima i u familiji Scrophulariaceae (Mackova i sar., 2006). Kako je rod *Veronica* premešten iz familije Scrophulariaceae u familiju Plantaginaceae, prisustvo genisteina u njemu svedoči o njihovoj bliskoj vezi. Naša prethodna ispitivanja pokazala su prisustvo derivata genisteina i u vrstama *V. montana*, *V. polita* i *V. spuria* (Barreira i sar., 2014). Što se tiče drugih klasa flavonoida, u ispitivanom ekstraktu vrste *V. teucrium* detektovan je flavanon naringenin u tragovima (0,23 µg/g suve mase), dok je prisustvo flavanola primećeno samo u ekstraktu vrste *V. urticifolia* gde je određen katehin u koncentraciji 2,68 µg/g s.m.

Po prvi put utvrđeno je i prisustvo tri kumarina u rodu *Veronica*, umbeliferona, skopoletina i eskuletina. U najvećoj koncentraciji kumarini su prisutni u ekstraktu vrste *V. jacquinii*, dok je u ekstraktu vrste *V. teucrium* zastupljen samo eskuletin. U vrsti *V. urticifolia* umbeliferon i eskuletin su prisutni u tragovima.

Lignan sekoizolaricirezinol detektovan je u ispitivanom ekstraktu vrste *V. urticifolia* (6,94 µg/g s.m).

Fenolni profil odabranih vrsta roda *Veronica* bio je predmet malobrojnih ispitivanja, a pregled dostupnih podataka dat je u Uvodu. U navedenim publikacijama postoje samo rezultati o kvalitativnom sastavu ovih jedinjenja.

Uopšteno, fenolne komponente koje se nalaze u značajnijoj količini u ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta su hlorogenska kiselina, bajkalin, kvercetin-3-*O*-glukozid i hiperozid, kao i derivat cikloheksana hina kiselina. Imajući u vidu da ova jedinjenja poseduju veliki biološki potencijal i ispoljavaju aktivnosti kao što su antioksidantna, neuroprotektivna, antiinflamatorna, antitumorska, antimikrobna, sadržaj ovih jedinjenja u ispitivanim ekstraktima ukazuje nam na njihovo potencijalno delovanje i usmerava dalja ispitivanja njihovih farmakoloških efekata.

Dobijeni rezultati fitohemijskog skrininga su izuzetno važni za karakterizaciju roda *Veronica*, obzirom da predstavljaju nove podatke o fenolnom sastavu tri ispitivane vrste, pa se mogu smatrati i potencijalnim hemotaksonomskim markerima.

Tabela 31. Koncentracije odabranih fenolnih jedinjenja u ispitivanim 70%-nim acetonskim ekstraktima

Jedinjenje	Sadržaj fenolnih jedinjenja u ispitivanim <i>Veronica</i> ekstraktima ($\mu\text{g/g}$ suvog ekstrakta)		
	<i>V. teucrium</i>	<i>V. jacquinii</i>	<i>V. urticifolia</i>
<i>Fenolne kiseline</i>			
p-Hidroksibenzoeva kiselina	53,06 \pm 0,10 ^a	25,08 \pm 0,04 ^b	17,08 \pm 0,06 ^c
2,5- Dihidroksibenzoeva kiselina	31,37 \pm 0,33 ^a	53,48 \pm 0,84 ^b	6,10 \pm 0,09 ^c
Protokatehinska kiselina	28,93 \pm 0,31 ^a	53,57 \pm 0,97 ^b	5,93 \pm 0,04 ^c
Vanilinska kiselina	17,39 \pm 0,77 ^a	46,14 \pm 0,74 ^b	9,07 \pm 0,32 ^c
Galna kiselina	1,05 \pm 0,05 ^a	n.d. ^b	n.d. ^b
Siringinska kiselina	0,56 \pm 0,06 ^a	0,90 \pm 0,03 ^b	0,30 \pm 0,03 ^c
Cimetna kiselina	n.d.	n.d.	n.d.
o-Kumarinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.
p-Kumarinska kiselina	14,36 \pm 0,11 ^a	13,62 \pm 0,04 ^b	11,32 \pm 0,14 ^c
Kafena kiselina	39,52 \pm 0,11 ^a	28,15 \pm 0,15 ^b	11,67 \pm 0,13 ^c
Ferulna kiselina	5,50 \pm 0,19 ^a	7,20 \pm 0,20 ^b	4,59 \pm 0,08 ^c
3,4- Dimetoksicimetna	n.d.	n.d.	n.d.

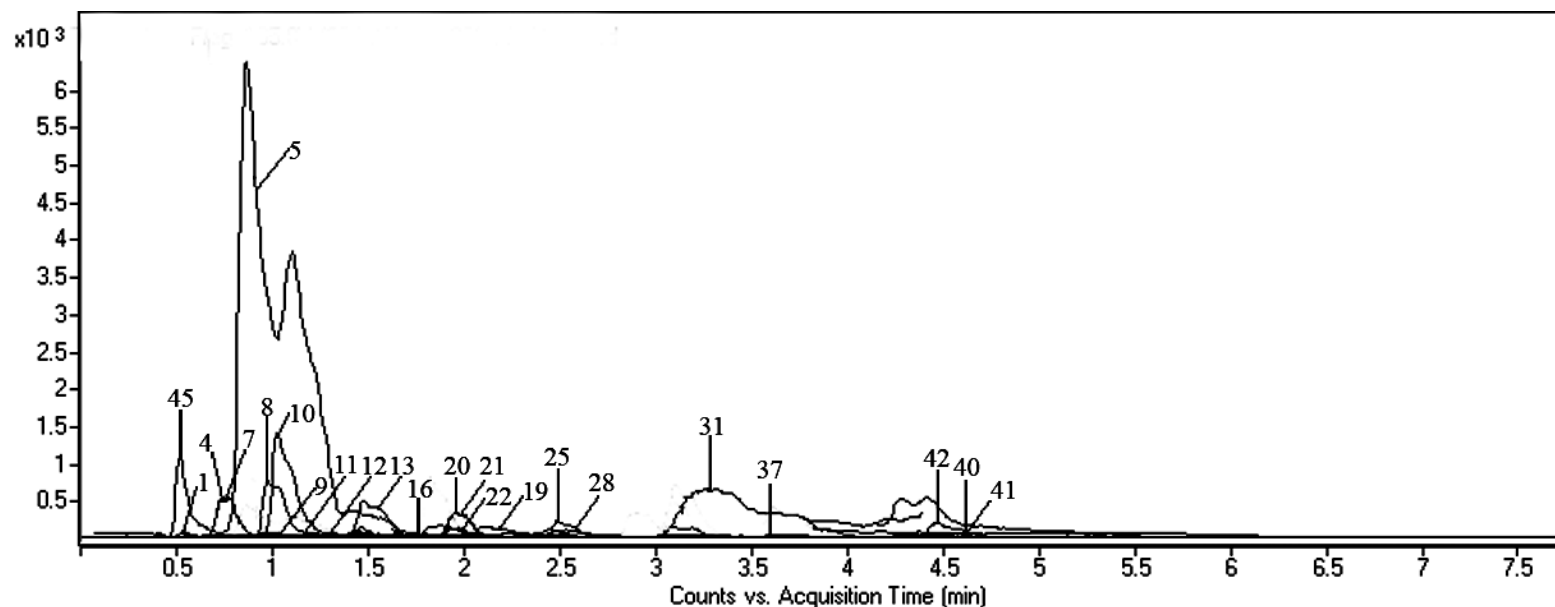
kiselina			
Sinapinska kiselina	n.d.	n.d.	n.d.
Hlorogenska kiselina	749,71 ± 1,14 ^a	195,63 ± 0,57 ^b	7,32 ± 0,10 ^c
Hina kiselina	310,91 ± 3,78 ^a	310,03 ± 2,87 ^a	38,44 ± 0,55 ^b

Flavonoidi

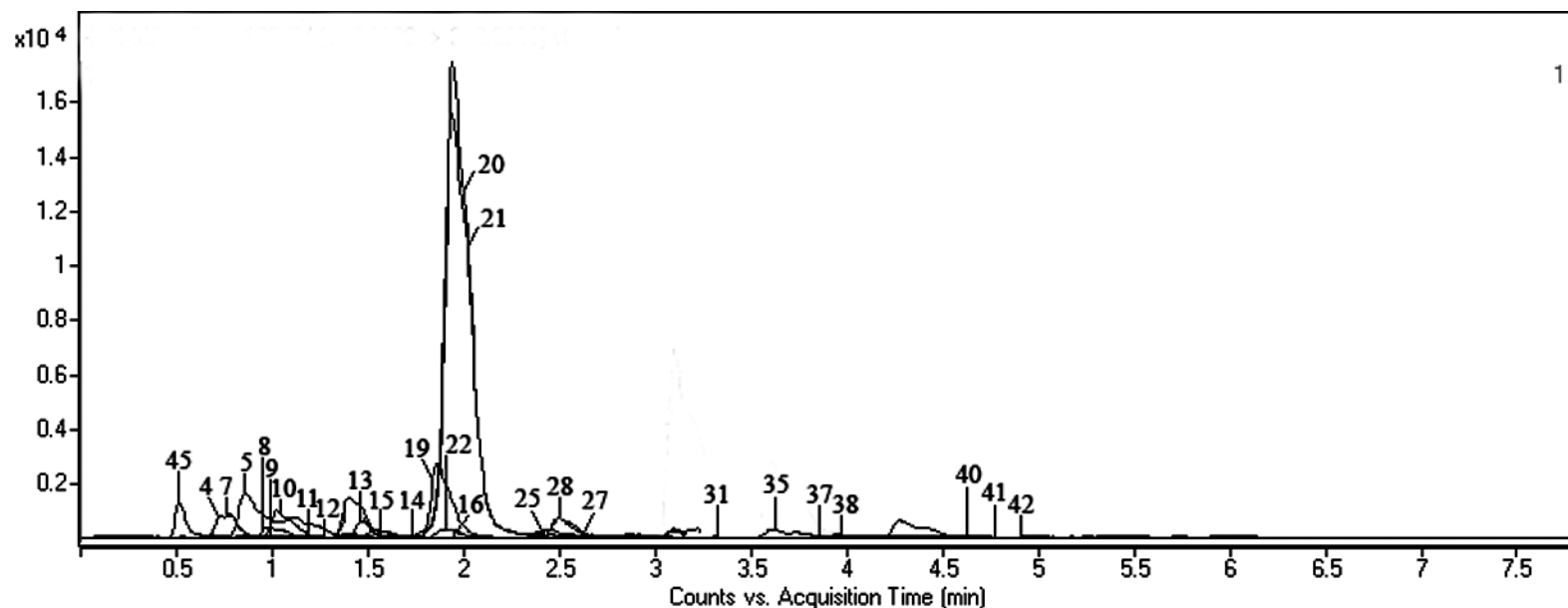
Apigenin	3,27 ± 0,08 ^a	4,25 ± 0,33 ^b	10,19 ± 0,07 ^c
Apigenin-7-O-glukozid	1,39 ± 0,04 ^a	5,17 ± 0,02 ^b	4,43 ± 0,03 ^c
Apiin	n.d.	n.d.	n.d.
Viteksin	n.d. ^a	0,06 ± 0,00 ^b	2,72 ± 0,03 ^c
Amentoflavon	n.d.	n.d.	n.d.
Bajkalein	n.d.	n.d.	n.d.
Bajkalin	347,02 ± 0,46 ^a	9,66 ± 0,20 ^b	779,10 ± 0,47 ^c
Daidzein	n.d.	n.d.	n.d.
Genistein	n.d. ^a	3,37 ± 0,06 ^b	n.d. ^a
Isoramnetin	0,16 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,04 ^{ab}	0,05 ± 0,00 ^b
Kemferol	n.d.	n.d.	n.d.
Kemferol-3-O-glukozid	4,76 ± 0,02 ^a	19,89 ± 0,05 ^b	1,00 ± 0,01 ^c
Hrizoeriol	1,90 ± 0,05 ^a	0,38 ± 0,02 ^b	7,70 ± 0,04 ^c
Luteolin	2,39 ± 0,03 ^a	24,30 ± 0,06 ^b	11,73 ± 0,16 ^c
Luteolin-7-O-glukozid	2,18 ± 0,02 ^a	37,33 ± 0,04 ^b	33,54 ± 0,05 ^c
Kvercetin	n.d.	n.d.	n.d.
Kvercitrin	n.d. ^a	0,81 ± 0,03 ^b	0,25 ± 0,01 ^c
Kvercetin-3-O-glukozid	5,39 ± 0,04 ^a	377,08 ± 0,08 ^b	1,98 ± 0,04 ^c
Hiperozid	5,83 ± 0,04 ^a	362,37 ± 0,41 ^b	2,25 ± 0,04 ^c

Rutin	4,91 ± 0,02 ^a	14,61 ± 0,03 ^b	22,72 ± 0,03 ^c
Mircetin	n.d.	n.d.	n.d.
Naringenin	n.d. ^a	0,22 ± 0,01 ^b	n.d. ^a
Epikatehin	n.d.	n.d.	n.d.
Katehin	n.d. ^a	n.d. ^a	2,68 ± 0,13 ^b
Epigalokatehin galat	n.d.	n.d.	n.d.
<i>Kumarini</i>			
Umbeliferon	n.d. ^a	14,30 ± 1,42 ^b	0,74 ± 0,04 ^c
Eskuletin	2,46 ± 0,08 ^a	1,70 ± 0,04 ^b	1,03 ± 0,03 ^c
Skopoletin	n.d. ^a	0,13 ± 0,01 ^b	n.d. ^a
<i>Lignani</i>			
Matairezinol	n.d.	n.d.	n.d.
Sekoizolaricirezinol	n.d. ^a	n.d. ^a	6,94 ± 0,29 ^b

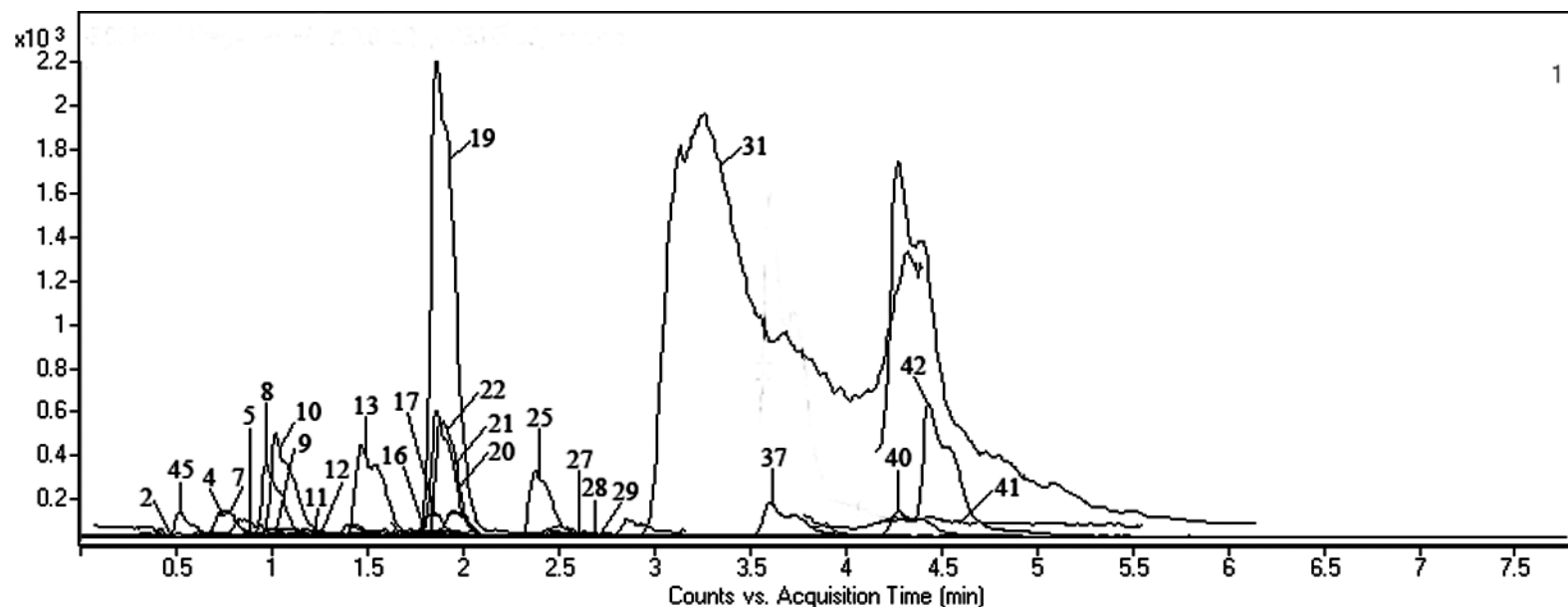
n.d. – nije detektovano.



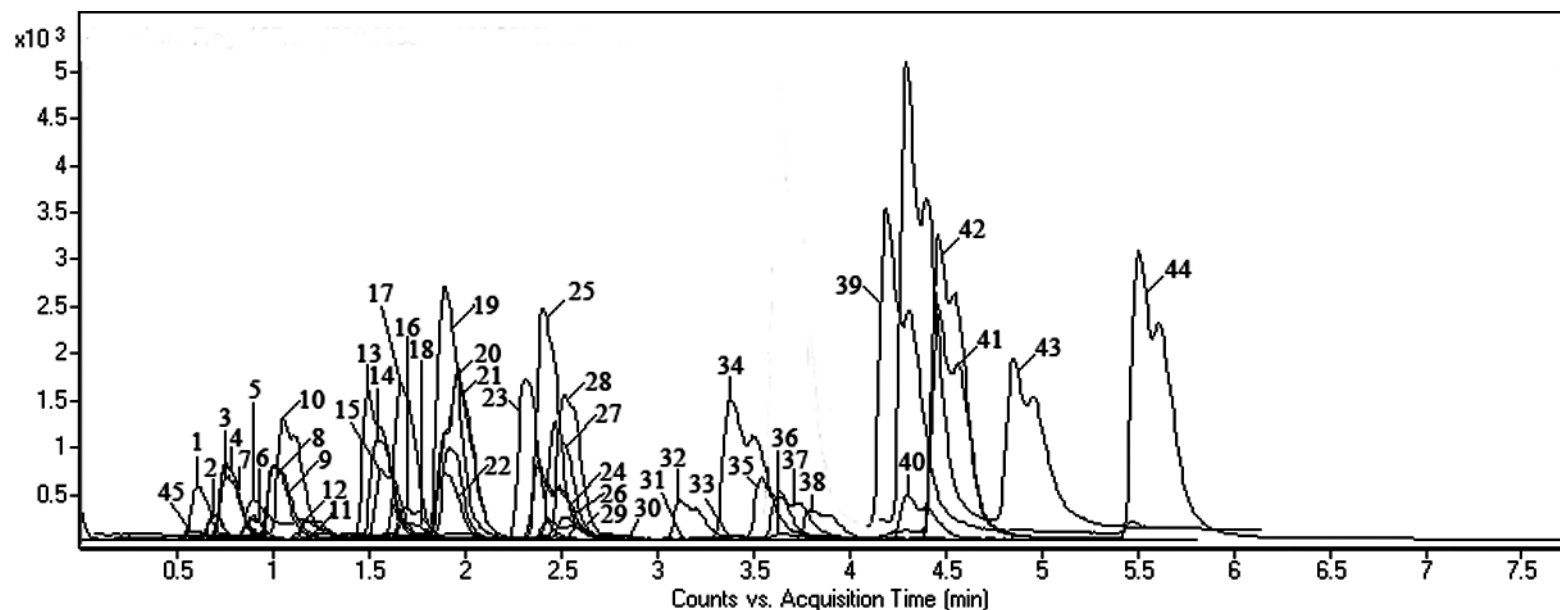
Slika 37. LC/MS-MS hromatogram ekstrakta herbe *V. jacquinii*: 1: galna kiselina, 2: katehin, 3: epigalokatehin galat, 4: protokatehinska kiselina, 5: hlorogenska kiselina, 6: epikatehin, 7: 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, 8: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 9: eskuletin, 10: kafena kiselina, 11: vanilinska kiselina, 12: siringinska kiselina, 13: *p*-kumarinska kiselina, 14: skopoletin, 15: umbeliferon, 16: ferula kiselina, 17: viteksin, 18: sinapinska kiselina, 19: luteolin 7-*O*-glukozid, 20: hiperozid, 21: kvercetin 3-*O*-glukozid, 22: rutin, 23: apiin, 24: *o*-kumarinska kiselina, 25: apigenin 7-*O*-glukozid, 26: mircetin, 27: kvercitrin, 28: kemferol 3-*O*-glukozid, 29: sekoizolaricirezinol, 30: 3,4-dimetoksicimetna kiselina, 31: bajkalin, 32: daidzein, 33: matairezinol, 34: kvercetin, 35: naringenin, 36: cimetna kiselina, 37: luteolin, 38: genistein, 39: kemferol, 40: apigenin, 41: izoramnetin, 42: hrizoeriol, 43: bajkalein, 44: amentoflavon, 45: hina kiselina.



Slika 38. LC/MS-MS hromatogram ekstrakta herbe *V. teucrium*: 1: galna kiselina, 2: katehin, 3: epigalokatehin galat, 4: protokatehinska kiselina, 5: hlorogenska kiselina, 6: epikatehin, 7: 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, 8: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 9: eskuletin, 10: kafena kiselina, 11: vanilinska kiselina, 12: siringinska kiselina, 13: *p*-kumarinska kiselina, 14: skopoletin, 15: umbeliferon, 16: ferula kiselina, 17: viteksin, 18: sinapinska kiselina, 19: luteolin 7-*O*-glukozid, 20: hiperozid, 21: kvercetin 3-*O*-glukozid, 22: rutin, 23: apiin, 24: *o*-kumarinska kiselina, 25: apigenin 7-*O*-glukozid, 26: mircetin, 27: kvercitrin, 28: kemferol 3-*O*-glukozid, 29: sekoizolaricirezinol, 30: 3,4-dimetoksicimetna kiselina, 31: bajkalin, 32: daidzein, 33: matairezinol, 34: kvercetin, 35: naringenin, 36: cimetna kiselina, 37: luteolin, 38: genistein, 39: kemferol, 40: apigenin, 41: izoramnetin, 42: hrizoeriol, 43: bajkalein, 44: amentoflavon, 45: hina kiselina.



Slika 39. LC/MS-MS hromatogram ekstrakta herbe *V. urticifolia*: 1: galna kiselina, 2: katehin, 3: epigalokatehin galat, 4: protokatehinska kiselina, 5: hlorogenska kiselina, 6: epikatehin, 7: 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, 8: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 9: eskuletin, 10: kafena kiselina, 11: vanilinska kiselina, 12: siringinska kiselina, 13: *p*-kumarinska kiselina, 14: skopoletin, 15: umbeliferon, 16: ferula kiselina, 17: viteksin, 18: sinapinska kiselina, 19: luteolin 7-*O*-glukozid, 20: hiperozid, 21: kvercetin 3-*O*-glukozid, 22: rutin, 23: apiin, 24: *o*-kumarinska kiselina, 25: apigenin 7-*O*-glukozid, 26: mircetin, 27: kvercitrin, 28: kemferol 3-*O*-glukozid, 29: sekoizolaricirezinol, 30: 3,4-dimetoksicimetna kiselina, 31: bajkalin, 32: daidzein, 33: matairezinol, 34: kvercetin, 35: naringenin, 36: cimetna kiselina, 37: luteolin, 38: genistein, 39: kemferol, 40: apigenin, 41: izoramnetin, 42: hrizoeriol, 43: bajkalein, 44: amentoflavon, 45: hina kiselina.



Slika 40. LC/MS hromatogram smeše standarda: 1: galna kiselina, 2: katehin, 3: epigalokatehin galat, 4: protokatehinska kiselina, 5: hlorogenska kiselina, 6: epikatehin, 7: 2,5-dihidroksibenzoeva kiselina, 8: *p*-hidroksibenzoeva kiselina, 9: eskuletin, 10: kafena kiselina, 11: vanilinska kiselina, 12: siringinska kiselina, 13: *p*-kumarinska kiselina, 14: skopoletin, 15: umbeliferon, 16: ferula kiselina, 17: viteksin, 18: sinapinska kiselina, 19: luteolin 7-*O*-glukozid, 20: hiperozid, 21: kvercetin 3-*O*-glukozid, 22: rutin, 23: apiin, 24: *o*-kumarinska kiselina, 25: apigenin 7-*O*-glukozid, 26: mircetin, 27: kvercitrin, 28: kemferol 3-*O*-glukozid, 29: sekoizolaricirezinol, 30: 3,4-dimetoksicimetna kiselina, 31: bajkalin, 32: daidzein, 33: matairezinol, 34: kvercetin, 35: naringenin, 36: cimetna kiselina, 37: luteolin, 38: genistein, 39: kemferol, 40: apigenin, 41: izoramnetin, 42: hrizoeriol, 43: bajkalein, 44: amentoflavon, 45: hina kiselina.

3. Farmakološka aktivnost

3.1. Ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Organizam se od oštećenja slobodnim radikalima štiti antioksidantnim enzimima (superoksid dizmutaza, katalaza, ksantin oksidaza, glutation zavisni enzimi), kao i jedinjenjima poput askorbinske kiseline, α -tokoferola i glutationa (Datta i sar., 2000). Kako ovi mehanizmi zaštite mogu biti narušeni kod različitih patoloških procesa, često su antioksidantni suplementi esencijalni za borbu sa oksidativnim oštećenjima. Tokom poslednjih decenija raste interes istraživača za prirodne antioksidanse, kao posledica ustanovljene karcinogenosti sintetskih (Valyova i sar., 2009).

3.1.1. *In vitro* ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Acetonsko-vodeni ekstrakti odabranih *Veronica* vrsta testirani su u pogledu antiradikalske aktivnosti testom sposobnosti neutralizacije DPPH radikala, kao i u pogledu ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP testom. Ispoljena aktivnost ekstrakata i butil hidroksitoluena (BHT) korišćenog za poređenje, data je u **Tabeli 32**.

DPPH je slobodni organski radikal koji se koristi za određivanje sposobnosti "hvatanja" slobodnih radikala antioksidanasa zahvaljujući njegovoj velikoj osetljivosti (Zou i sar., 2004).

Iako su ispitivani ekstrakti pokazali značajnu dozno-zavisnu inhibiciju DPPH radikala, njihova aktivnost nije bila snažnija od aktivnosti BHT. Koncentracija neophodna za "hvatanje" 50% prisutnih DPPH radikala varirala je od 12,58 do 25,24 $\mu\text{g/ml}$, dok je IC_{50} vrednost za BHT iznosila 9,57 $\mu\text{g/ml}$.

FRAP test je jednostavan i brz metod koji meri redukcionu sposobnost antioksidanasa. FRAP vrednosti ispitivanih ekstrakata kretale su se od 2,10 do 4,85 $\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$. Najveća redukciona sposobnost pokazana je za ekstrakt *V. teucrium* što je u saglasnosti sa njegovim antiradikalnim efektom, dok je najniža aktivnost zabeležena za ekstrakt *V. urticifolia*.

Dobijeni rezultati pokazuju da su ispitivane *Veronica* vrste snažni antioksidantni agensi koji mogu da utiču na sprečavanje slobodnoradikalnih procesa zasnovanih na transferu elektrona.

Tabela 32. Antioksidantna aktivnost ispitivanih *Veronica* vrsta u *in vitro* testovima

Uzorak	DPPH IC ₅₀ vrednost ($\mu\text{g/ml}$)	FRAP vrednosti ($\text{mmol Fe}^{2+}/\text{g}$)
<i>V. jacquinii</i>	25,24	3,74
<i>V. teucrium</i>	12,58	4,85
<i>V. urticifolia</i>	22,70	2,10
BHT	9,57	10,58

Prethodnim ispitivanjima je za pojedine *Veronica* vrste, kao i za neka iz njih izolovana jedinjenja, pokazano da ispoljavaju značajno antioksidantno delovanje. Harput i sar. (2011) pokazali su visoku antiradikalisku aktivnost za vodeni ekstrakt *V. officinalis*, čiji je efekat (IC₅₀ iznosi 40,93 $\mu\text{g/ml}$) uporediv sa efektom ekstrakata testiranih u okviru ove doktorske disertacije. U istom ispitivanju, ekstrakti drugih ispitivanih vrsta pokazali su slabiju antioksidantnu aktivnost (IC₅₀ se kretala od 53,96 do 390,09 $\mu\text{g/ml}$). Osim toga, vodeni ekstrakt nadzemnog dela *V. cuneifolia* subsp. *cuneifolia* u značajnoj meri neutralisao je DPPH radikal (IC₅₀=32,9 $\mu\text{g/ml}$), dok je aktivnost ekstrakta *V. cymbalaria* (IC₅₀=153,6 $\mu\text{g/ml}$) bila znatno niža (Saracoglu i sar., 2011). Snažnu anti-DPPH aktivnost (IC₅₀=14,1 $\mu\text{g/ml}$), uporedivu sa aktivnošću BHT-a (IC₅₀=12,3) ispoljava i *V. polita* (Harput i sar., 2002a).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da su najznačajniji antioksidansi biljnog porekla različiti polifenoli (flavonoidi, fenolkarbonske kiseline i sl.). Iako veoma raznovrsna, ova jedinjenja u osnovi sadrže jednu ili više fenolnih grupa, koje su donori vodonika čime neutrališu slobodne radikale (Kukić-Marković, 2013).

Antioksidantna aktivnost flavonoidnih jedinjenja zavisi od broja i položaja hidroksilnih grupa u prstenovima A, B i C, kao i od prisustva dvostruke veze između položaja C2 i C3 (Balasundram i sar., 2006). Veći broj hidroksilnih grupa (naročito u prstenu B) znači i veću sposobnost flavonoida za hvatanje slobodnih radikala. Lee i Kim (2010) pokazali su da antioksidantna aktivnost opada sledećim redom: flavanoli > flavanoni > flavoni. Visoka antiradikaliska aktivnost kvercetina najvećim delom je posledica prisustva 1,2 dihidroksibenzen (katehol) grupe u prstenu B. Ipak, iako je kvercetin snažan antioksidans, za najveći broj njegovih derivata pokazano je da ispoljavaju nižu aktivnost u poređenju sa slobodnim aglikonom, što je posledica blokiranja hidroksilnih grupa šećernim ili alkoksil substituentima (Materska, 2008). Za hiperozid i izokvercetin, dominantne derivate kvercetina

u vrsti *V. jacquinii*, Sukito i Tachibana (2014) pokazali su veću anti-DPPH aktivnost u odnosu na askorbinsku kiselinu i kvercetin (IC_{50} =21,6 i 27,5 i mM za izokvercitrin i hiperozid i 27,8 i 32,2 mM za askorbinsku kiselinu i kvercetin). Sa druge strane, za glikozilovane kvercetin derivate pokazana je smanjena sposobnost redukcije Fe(III) do Fe(II) jona u FRAP testu (Procházková i sar., 2011).

Na osnovu strukture bajkalina može se pretpostaviti da je aktivan antioksidans. Njegova anti-DPPH aktivnost bila je slabija u odnosu na askorbinsku kiselinu, međutim, snažnija u odnosu na BHT (Peng-Fei i sar., 2013). Srednja IC_{50} vrednost u DPPH testu za bajkalin iznosi 16,4 μ g/ml, dok je FRAP testom utvrđeno da je njegova ukupna redukciona sposobnost snažnija u odnosu na askorbinsku kiselinu i BHT.

Tehnikom elektrospin rezonancije (ESR) određena IC_{50} vrednost izoskutelarein 7-O-[6''-O-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glukopiranozida iznosila je 66 μ g/ml. Anti-DPPH aktivnost ovog jedinjenja bila je veća u odnosu na BHT, odnosno jednaka α -tokoferolu (Saracoglu i sar., 2004a). Visok sadržaj ovog jedinjenja u ekstraktu *V. teucrium* može biti odgovoran za najveću ispoljenu aktivnost među ispitivanim ekstraktima.

Fenolkarbonske kiseline prisutne u ispitivanim vrstama takođe pokazuju snažnu antiradikalnu aktivnost. Hidroksicimetne kiseline, koje su i zastupljenije u analiziranim ekstraktima, ostvaruju snažniju aktivnost u odnosu na odgovarajuće hidroksibenzojeve kiseline zahvaljujući prisustvu bočnog propeinskog lanca. Konjugovana dvostruka veza u ovom lancu može stabilisati fenoksil radikal rezonantnim efektom, na taj način snažeći antioksidantnu aktivnost aromatičnog prstena (Natella i sar., 1999). Efekat hidroksicimetnih kiselina u odnosu na sintetske antioksidanse opada sledećim redom: kafena>hlorogenska> α -tokoferol>ferula>BHT (Chen i Ho, 1997). Za hlorogensku kiselinu IC_{50} vrednost u DPPH testu iznosi 9,3 μ M (Akihisa i sar., 2013), dok je njena FRAP vrednost za 44% veća u odnosu na FRAP vrednost akteozida (Georgiev i sar., 2011).

Različitim *in vitro* testovima pokazano je da fenilpropanoidni glikozidi deluju kao snažni inhibitori oksidacije lipoproteina male gustine putem različitih mehanizama kao što su hvatanje slobodnih radikala i heliranje metalnih jona, a zahvaljujući fenilpropanoidnoj grupi u njihovoj strukturi (López-Munguía i sar., 2011). Za akteozid prisutan u sva tri ispitivana ekstrakta utvrđena je snažna antiaradikalna aktivnost, uporediva sa aktivnošću butilhidroksitoluena (BHT) i značajno veća od aktivnosti α -tokoferola (Kukić-Marković, 2013). Delazar i sar. (2008) pokazali su da IC_{50} akteozida u DPPH testu iznosi 7,9 μ g/ml. U vrstama *Plantago depressa* Willd. i *Plantago media* L., dominantna fenilpropanoidna

jedinjenja akteozid i plantamajozid ujedno su i jedinjenja odgovorna za izraženu antiradikalnu aktivnost ovih biljnih vrsta (Olenikov i sar., 2011). Upravo ova dva jedinjenja dominantni su fenilpropanoidi u ekstraktu vrste *V. teucrium* koji je pokazao i najznačajniji antioksidantni efekat u oba *in vitro* testa.

Sadržaj ukupnih fenola u ispitivanim ekstraktima pokazao je slabu korelaciju sa pokazanom antioksidantnom aktivnošću. Slaba povezanost može biti posledica različitih faktora: npr. samo flavonoidi sa određenom strukturom položajem hidroksil supstituenata u molekulu mogu delovati kao proton donori i ispoljiti antiradikalnu aktivnost. Dodatno, merenje ukupnih fenola primenom Folin-Ciocalteu testa ne mora nužno biti dobar indikator antioksidantne aktivnosti usled mogućnosti interferencije (Ghimre i sar., 2011). Osim toga, još jedan od razloga slabe korelacije može biti i sinergizam polifenolnih jedinjenja međusobno, kao i sinergizam sa drugim komponentama prisutnim u ekstraktu. Prethodna ispitivanja pokazala su da i iridoidi prisutni u *Veronica* vrstama pokazuju snažnu antiradikalnu aktivnost.

3.1.2. *In vivo* ispitivanje antioksidantne aktivnosti

Rezultati dobijeni *in vitro* analizom pokazali su da su ispitivani ekstrakti efikasni antioksidansi. Ipak, ove rezultate neophodno je potvrditi i *in vivo* testovima. Izmene u strukturi polifenolnih jedinjenja tokom metaboličkih procesa mogu značajno uticati na njihovu biološku aktivnost, uključujući i redoks potencijal (Santos i sar., 2008). Osim toga, prooksidantni efekti fenolnih jedinjenja mogu postati značajni u *in vivo* uslovima ukoliko su slobodni tranzicioni metali uključeni u oksidacione procese (Procházková i sar., 2011). Model hepatotoksičnosti indukovane ugljen tetrahloridom (CCl_4) često se koristi za procenu antioksidantnog delovanja biljnih ekstrakata i izolovanih jedinjenja (Kaurinović i sar., 2011).

Mehanizam hepatotoksičnosti CCl_4 je složen i zasnovan je na stvaranju reaktivnih metabolita trihlormetil (CCl_3^*) i trihlormetil peroksi radikala (CCl_3O_2^*) nakon aktivacije enzima citohroma P450. Ove reaktivne vrste su sposobne da se kovalentno vežu za ćelijske makromolekule. Napadom na polinezasićene masne kiseline u ćelijskoj membrani, ovi slobodni radikali započinju proces lipidne peroksidacije i posledičnu lančanu reakciju. Posledice toga su promena permeabilnosti ćelijske membrane, kao i membrana mitohondrija i endoplazmatskog retikuluma. Usled narušenog integriteta membrana dolazi do izlaska

mikrozomalnih enzima i poremećaja sekvestracije kalcijuma i ćelijske homeostaze, što značajno doprinosi oštećenju ćelije (Kukić-Marković, 2013).

Efekat ispitivanih ekstrakata na nekoliko biohemijskih parametara oksidativnog stresa procenjan je u homogenatu jetre pacova tretiranih sa CCl_4 kao generatorem slobodnih radikala. Analizirani su intenzitet lipidne peroksidacije (LPx), sadržaj glutationa (GSH), kao i nivo aktivnosti glutation peroksidaze (GSHPx), glutation reduktaze (GR), peroksidaze (Px), ksantin oksidaze (XOD) i katalaze (CAT). Dobijeni rezultati prikazani su u **Tabelama 33 i 34**. Intraperitonealna primena ekstrakata je odabrana umesto oralne primene kako bi se izbegle moguće hemijske izmene nakon oralne primene ekstrakata. U poređenju sa kontrolnom grupom, kod životinja kod kojih je primenjen CCl_4 pokazana je značajna redukcija CAT, Px i GR aktivnosti, kao i nivoa GSH i LPx. Nije primećena značajna izmena XOD aktivnosti.

Ksantin oksidaza je enzim koji koristi ksantin ili hipoksantin kao supstrat i O_2 kao kofaktor za proizvodnju superoksid jona ($^*\text{O}_2^-$) i mokraćne kiseline (Chung i sar., 1997). Služi kao značajan biološki izvor slobodnih radikala koji doprinose oksidativnom oštećenju živih tkiva. Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije potvrdili su da CCl_4 ne dovodi do izmena u aktivnosti XOD (Ćebović i sar., 2006). Slični rezultati dobijeni su i u grupama životinja tretiranih ispitivanim ekstraktima.

Katalaza katalizuje razgradnju H_2O_2 do vode i kiseonika i štiti ćelije od oksidativnog oštećenja indukovanoog putem H_2O_2 (Preethi i sar., 2006). Kod životinja koje su primile samo ekstrakate nije došlo do statistički značajnih izmena u aktivnosti CAT. Takođe, povećanje koncentracije primenjenog režima nije dovelo do izmena ovog parametra. Nakon primene CCl_4 došlo je do skoro trostrukog pada aktivnosti enzima, dok je kombinovana primena ekstrakata i CCl_4 rezultovala dozno zavisnim povećanjem aktivnosti enzima. Svi ispitivani ekstrakti primenjeni u dozi 100 mg/kg t.m.⁷ značajno su redukovali efekat CCl_4 održavajući aktivnost CAT na fiziološkom nivou zabeleženom u kontrolnoj grupi. Nije pokazana statistički značajna razlika u efektima ekstrakata u zavisnosti od biljne vrste.

Peroksidaza katalizuje redukciju hidroperoksida uljučujući i H_2O_2 i na taj način štiti ćelije od peroksidativnog oštećenja (Sandhir i Gill, 1999). Intraperitonealna primena 2 ml/kg t.m. CCl_4 izazvala je smanjenje aktivnosti Px u homogenatu jetre, što ukazuje na povećanje produkcije H_2O_2 . Svi ispitivani *Veronica* ekstrakti u kombinovanom tretmanu sa CCl_4 doveli

⁷ t.m. – telesna masa

su do dozno zavisnog povećanja aktivnosti Px. Primenjeni u dozi 100 mg/kg značajno su redukovali hepatotoksičnost CCl₄ vraćajući nivo Px na nivo blizak fiziološkom.

Glutation je ćelijski neenzimski antioksidans sa značajnom ulogom u zaštiti ćelija od oksidativnog stresa. Smanjenje nivoa GSH u jetri povezano je sa toksičnošću brojnih hemijskih supstanci, uključujući i CCl₄ (Tirmenstein i sar., 2000). Kod grupe životinja kod koje je primenjen samo CCl₄ došlo je do velikog smanjenja nivoa GSH, što ukazuje na značajno oštećenja ćelija jetre. Ekstrakti *V. jacquinii* i *V. teucrium* primenjeni u dozi 100 mg/kg redukovali su efekat CCl₄ na GSH sadržaj, vraćajući ga na nivo zabeležen u kontrolnoj grupi. Povećanje nivoa GSH u jetri može biti posledica *de novo* GSH sinteze ili GSH regeneracije.

Glutation peroksidaza katalizuje redukciju hidroperoksida putem GSH. Dakle njena glavna funkcija je zaštita ćelija od štetnog efekta endogeno formiranih hidroperoksida (Preethi i sar., 2006). Samostalna primena ekstrakta *V. urticifolia* u dozi 100 mg/kg t.m. značajno je redukovala GSH-Px aktivnost ukazujući na smanjenu produkciju H₂O₂. Tretman životinja sa CCl₄ doveo je povećanja aktivnosti ovog enzima, dok je kombinovana primena sa ekstraktima dozno zavisno smanjila aktivnost GSH-Px u homogenatu jetre. Samo 70%-ni acetonski ekstrakt *V. teucrium* uspeo je da u potpunosti zaštiti hepatocite od prekomerene produkcije slobodnih radikala izazvane primenom CCl₄, što je u saglasnosti sa njegovim efektom na nivo GSH.

Osnovna funkcija glutacione reduktaze je održavanje visokog nivoa GSH i niskog nivoa glutacione disulfida (GSSG) (Kulinsky i Kolesnichenko, 2009). Ovaj enzim redukuje potrebu za GSH sintezom. Nakon pojedinačne doze CCl₄ dolazi do snažnog pada aktivnosti pomenutog enzima. Značajno smanjenje nivoa GSH u korelaciji je sa redukcijom GR aktivnosti. Simultana primena ispitivanih ekstrakata i CCl₄ dovela je do dozno zavisnog povećanja GR aktivnosti, ali i dalje je taj nivo bio statistički značajno različit u odnosu na kontrolni. Iako su odgovarajuće vrednosti ostale niže u poređenju sa bazalnom GR aktivnošću, zaštitni efekat *Veronica* ekstrakata bio je nesumnjiv. Prema našim ispitivanjima nije bilo značajnih razlika u efektu ispitivanih ekstrakata u zavisnosti od biljne vrste.

Pojačana lipidna peroksidacija merilo je membranskog oštećenja, kao i izmene u strukturi i funkciji ćelijske membrane. Smatra se da je jedan od osnovnih uzroka CCl₄ indukovano oksidativnog stresa upravo lipidna peroksidacija putem slobodnih radikala izvedenih iz CCl₄ (Recknagel i sar., 1989). U okviru ove disertacije intenzitet LPx meren je kao nivo formiranja reaktivnih vrsta tiobarbiturine kiseline (TBARS). Ovaj nivo je bio statistički značajno niži kod

grupa životinja koje su primale samo *Veronica* ekstrakte u različitim koncentracijama u odnosu na kontrolnu grupu. Pokazani efekat bio je najizraženiji kod životinja koje su primale *V. jacquinii* ekstrakt. Intraperitonealna primena CCl_4 snažno je indukovala formiranje TBARS u poređenju sa kontrolom. U grupama životinja koje su primale kombinovan tretman, ekstrakti *V. jacquinii* i *V. teucrium* primenjeni u dozi 100 mg/kg smanjili su nivo formiranih TBARS do nivoa zabeleženog u kontrolnoj grupi ispoljivši značajan hepatoprotektivan efekat.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da ispitivani ekstrakti imaju zaštitnu ulogu u oksidativnom stresu. *Veronica* ekstrakti redukovali su nivo slobodnih radikala održavajući fiziološki nivo enzimskih i neenzimskih antioksidanasa, kao i lipidne peroksidacije. Prema rezultatima sadržaja GSH i TBARS nivoa zaključeno je da *V. jacquinii* i *V. teucrium* pokazuju slični antioksidantni efekat koji je nešto izraženiji u odnosu na efekat *V. urticifolia* u oksidativnom stresu. Ovakav rezultat u saglasnosti je sa prethodno prikazanim rezultatima *in vitro* testova.

Prethodna ispitivanja su pokazala da oralna primena alkoholnog ekstrakta herbe *V. officinalis* statistički značajno smanjuje intenzitet lipidne peroksidacije u modelu hepatotoksičnosti indukovane primenom CCl_4 , ali ne ostvaruje efekat na nivo GSH (Kiss i sar., 2009).

O antioksidantnoj aktivnosti jedinjenja prisutnih u ispitivanim taksonima postoje brojni literaturni podaci.

U modelu hepatotoksičnosti indukovane brombenzenom kod miševa, bajkalin je pokazao visok stepen zaštite hepatocita od lipidne peroksidacije. Njegov efekat bio je veći od efekta polifenola zelenog čaja, ili vitamina E. Efekat bajkalina na serumski nivo alanin transaminaze (ALT) kod životinja koje su primile brombenzen potvrdio je hepatoprotektivno delovanje ovog jedinjenja (Zhang i Shen, 1997). Osim toga, za bajkalin je pokazano da ima višestruku ulogu u oksidativnom stresu uključujući hvatanje slobodnih radikala, inhibiciju enzima uključenih u produkciju slobodnih radikala (ksantin i NADPH oksidaza), povećanje aktivnosti enzima koji učestvuju u antioksidantnoj odbrani organizma (SOD), i heliranje metalnih jona (Fe^{2+} i Cu^{2+}) (Cheng i sar., 2013).

Utvrđeno je da su 7-O-(β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozil) derivati 5,8-dihidroksiflavona relativno snažni antioksidansi, čija je aktivnost uporediva sa aktivnošću kvercetina (Kukić-Marković, 2013). Među njima je i izoskutelarein 7-O-[β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glukopiranozil], dominantno jedinjenje u herbi *V. teucrium*.

Hiperozid, jedan od dva dominantna derivata kvercetina u ekstraktu *V. jacquini*, u modelu CCl₄ indukovanog akutnog oštećenja kod miša ispoljio je zaštitni efekat jačanjem antioksidantnih odbrambenih sistema organizma i suprimiranjem inflamatornog odgovora (Choi i sar., 2011). Silva i sar. (2009) pokazali su da izokvercitrin, drugi glikozilovani kvercetin zastupljen u *V. jacquini*, značajno povećava toleranciju eukariotskog mikroorganizma *Saccharomyces cerevisiae* na H₂O₂ i menadion, generatore superoksidnog jona. Snažan antioksidantan efekat izokvercitrin je pokazao i u modelu Cd²⁺ indukovane toksičnosti kod miševa štiteći od lipidne peroksidacije i oksidativnog oštećenja proteina u jetri i bubrezima (Li i sar., 2011).

Za akteozid koji je prisutan u sva tri ispitivana ekstrakta ranije je utvrđeno da ispoljava hepatoprotektivan efekat na modelu CCl₄ indukovanog oštećenja jetre kod miševa (Lee i sar., 2004). Primenjen kao pretretman u koncentraciji 50 mg/kg *i.p.* akteozid vraća nivo GSH nakon intoksikacije CCl₄ na nivo zabeležen u kontrolnoj grupi eksperimentalnih životinja. Osim toga dozno zavisno redukuje nivo lipidne peroksidacije jetre što se ogleda značajnim smanjenjem nivoa malondialdehida u serumu. Akteozid takođe inhibira apoptozu i dalja oštećenja jetre izazavana D-galaktozaminom i LPS-om. Najverovatniji mehanizam je neutralizacija slobodnih radikala čije stvaranje indukuje TNF- α , koji je centralni medijator u ovim modelima hepatotoksičnosti (Xiong i sar., 1999).

Aukubin primenjivan intraperitonealno u dozi 5 mg/kg t.m. tokom 15 dana kod pacova sa streptozocin indukovanim dijabetesom značajno je povećao aktivnost CAT, GPx i SOD (Jin i sar., 2008). U humanoј fibroblastnoj ćelijskoј liniji HS68, pretretman aukubinom (1 μ g/ml) umanjio je produkciju slobodnih radikala u oksidativnom stresu indukovanom UVB zračenjem za 34% (Ho i sar., 2005). Osim toga, u istom istraživanju, aukubin je pokazao značajno smanjenje nivoa lipidne peroksidacije i povećanje sinteze GSH.

Zaštitni efekat hlorogenske kiseline u modelu acetaminofenom indukovanog oštećenja jetre zasnovan je povećanju ekspresije katalitičke jedinice glutamat cistein ligaze (GCLC)⁸, a samim tim i biosinteze GSH (Ji i sar., 2013). Prekursor hlorogenske kiseline, hina kiselina, zastupljena u ekstraktima *V. jacquini* i *V. teucrium*, ostvaruje svoj antioksidantni efekat *in vivo* stimulisanjem sinteze triptofana i nikotinamida u gastrointestinalnom traktu (Pero i sar., 2009).

⁸ Prvi korak u biosintezi GSH katalizovan je enzimom glutamat cistein ligaza (GCL) koji se sastoji iz katalitičke (GCLC) i regulatorne (GCLM) subjedinice (Lu i sar., 2013).

Na osnovu iznetih podataka jasno je da su jedinjenja iz grupe flavonoidnih i fenilpropanoidnih heterozida, kao i fenolkarbonske kiseline nosioci antioksidantnog delovanja ispitivanih biljaka. Obzirom da su ekstrakti vrsta *V. jacquinii* i *V. teucrium* ispoljili nešto viši antioksidantni potencijal, može se zaključiti da su heterozidi izoskutelareina, kvercetina i hlorogenska kiselina bar delom odgovorni za pokazano delovanje.

Tabela 33. Efekat ispitivanih ekstrakata i CCl₄ na aktivnost XOD, CAT i Px u homogenatu jetre pacova

Uzorak	Grupa	XOD	CAT	Px
	Kontrola	1,93 ± 0,17	9,56 ± 2,25	10,77 ± 1,89
	Kontrola + CCl ₄	1,89 ± 0,20	3,35 ± 1,88 ^{a**}	4,92 ± 1,03 ^{a**}
<i>Veronica jacquinii</i>	E ₁	2,02 ± 0,27	9,55 ± 1,97	9,29 ± 0,78
	E ₂	1,79 ± 0,23	10,29 ± 1,92	10,56 ± 1,44
	E ₃	2,03 ± 0,24	10,79 ± 1,74	10,66 ± 1,49
	E ₁ + CCl ₄	1,79 ± 0,14	4,10 ± 2,48 ^{a*}	4,62 ± 0,76 ^{a**}
	E ₂ + CCl ₄	1,93 ± 0,20	6,58 ± 2,16 ^{a*,b*}	7,57 ± 0,97 ^{a*}
	E ₃ + CCl ₄	2,02 ± 0,24	8,34 ± 2,81 ^{b*}	9,93 ± 1,46 ^{b**}
<i>Veronica urticifolia</i>	E ₁	1,87 ± 0,13	9,71 ± 2,00	10,29 ± 2,24
	E ₂	1,99 ± 0,12	11,08 ± 2,77	11,29 ± 1,58
	E ₃	2,02 ± 0,26	10,76 ± 2,17	11,75 ± 3,05
	E ₁ + CCl ₄	1,86 ± 0,03	4,95 ± 2,72 ^{a*}	4,19 ± 1,79 ^{a**}
	E ₂ + CCl ₄	1,78 ± 0,12	5,99 ± 1,66 ^{a*,b*}	6,12 ± 1,42 ^{a**}
	E ₃ + CCl ₄	1,79 ± 0,21	7,54 ± 1,80 ^{b*}	10,56 ± 2,20^{b**}
<i>Veronica teucrium</i>	E ₁	1,94 ± 0,09	9,30 ± 1,97	11,12 ± 2,85
	E ₂	1,81 ± 0,11	10,88 ± 2,37	11,74 ± 1,65
	E ₃	1,77 ± 0,17	10,76 ± 2,22	12,61 ± 2,41
	E ₁ + CCl ₄	1,90 ± 0,12	3,81 ± 2,07 ^{a**}	4,09 ± 0,98 ^{a**}
	E ₂ + CCl ₄	1,79 ± 0,23	5,79 ± 1,62 ^{a*,b*}	4,99 ± 1,46 ^{a**}
	E ₃ + CCl ₄	1,72 ± 0,24	8,98 ± 4,27^{b*}	8,49 ± 2,51 ^{b*}

Legenda: Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. za 6 životinja. Aktivnost XOD, CAT i Px izražena je u nmol/mg proteina min⁻¹. ^aStatistička razlika u odnosu na kontrolnu grupu; ^bStatistička razlika u odnosu na negativnu kontrolnu grupu (+ CCl₄); *p<0,05; **p<0,001.

Tabela 34. Efekat ispitivanih ekstrakata bi CCl₄ na biohemijske parametre u homogenatu jetre pacova (nivo GSH, intenzitet LPx, aktivnost GSHPx i GR)

Uzorak	Grupa	GSH	GSHPx	GR	LPx
	Kontrola	4,97 ± 1,37	8,50 ± 1,27	6,10 ± 1,60	2,98 ± 0,81
	Kontrola + CCl ₄	0,73 ± 0,40 ^{a**}	21,27 ± 6,67 ^{a**}	1,23 ± 0,55 ^{a**}	9,66 ± 1,41 ^{a**}
<i>Veronica jacquinii</i>	E ₁	4,26 ± 0,53	8,43 ± 1,05	6,00 ± 0,35	1,98 ± 0,59 ^{a*}
	E ₂	4,35 ± 0,80	8,64 ± 0,81	6,63 ± 0,69	1,83 ± 0,45 ^{a*}
	E ₃	4,18 ± 0,37	7,26 ± 1,80	6,60 ± 1,24	1,78 ± 0,18 ^{a*}
	E ₁ + CCl ₄	0,70 ± 0,22 ^{a**}	27,28 ± 2,64 ^{a**}	1,24 ± 0,54 ^{a**}	7,18 ± 2,45 ^{a*}
	E ₂ + CCl ₄	1,74 ± 0,50 ^{a**,b*}	22,07 ± 1,96 ^{a**}	2,84 ± 1,07 ^{a**,b*}	4,57 ± 2,09 ^{b**}
	E ₃ + CCl ₄	3,74 ± 0,31 ^{b**}	15,77 ± 1,30 ^{a**}	4,40 ± 1,18^{a*,b**}	2,03 ± 0,89^{b**}
<i>Veronica urticifolia</i>	E ₁	5,67 ± 0,87	8,79 ± 1,11	6,16 ± 1,40	3,10 ± 0,29
	E ₂	6,51 ± 1,11	9,57 ± 1,67	6,88 ± 1,17	2,90 ± 0,48
	E ₃	7,61 ± 0,52 ^{a*}	6,42 ± 1,66 ^{a*}	7,16 ± 1,01	2,83 ± 0,36
	E ₁ + CCl ₄	0,54 ± 0,22 ^{a**}	21,87 ± 2,55 ^{a**}	1,12 ± 0,60 ^{a**}	8,01 ± 0,93 ^{a**,b*}
	E ₂ + CCl ₄	1,73 ± 0,29 ^{a**,b**}	20,07 ± 1,86 ^{a**}	1,17 ± 0,82 ^{a**}	6,21 ± 1,11 ^{a**,b**}
	E ₃ + CCl ₄	3,21 ± 0,69 ^{a*,b**}	14,25 ± 2,40 ^{a**,b*}	2,62 ± 0,76 ^{a**,b*}	4,03 ± 0,78 ^{a*,b**}
<i>Veronica</i>	E ₁	5,11 ± 0,70	8,70 ± 1,04	6,01 ± 1,68	3,01 ± 0,73

<i>teucrium</i>	E ₂	4,57 ± 0,39	7,69 ± 1,57	6,99 ± 0,91	2,93 ± 0,13
	E ₃	3,81 ± 0,75	7,15 ± 1,47	7,14 ± 1,75	2,89 ± 0,21
	E ₁ + CCl ₄	0,51 ± 0,28 ^{a**}	24,08 ± 2,84 ^{a**}	1,20 ± 0,43 ^{a**}	8,19 ± 2,29 ^{a**}
	E ₂ + CCl ₄	1,70 ± 0,34 ^{a**,b*}	20,57 ± 1,98 ^{a**}	2,00 ± 0,97 ^{a**}	5,62 ± 0,56 ^{a**,b**}
	E ₃ + CCl ₄	4,63 ± 0,31^{b**}	9,30 ± 3,13^{b*}	3,62 ± 0,86 ^{a*,b**}	3,11 ± 1,06 ^{b**}

Legenda: Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± S.D. za 6 životinja. Nivo reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (TBA-RS) izražen je u nmol MDA⁹/mg proteina; Sadržaj redukovano glutationa (GSH) izražen je u nmol GSH/mg proteina. Aktivnost GSHPx i GR izražena je u nmol/mg proteina min⁻¹.

^aStatistička razlika u odnosu na kontrolnu grupu; ^bStatistička razlika u odnosu na negativnu kontrolnu grupu (+ CCl₄); * p<0,05; ** p<0,001.

⁹ Malondialdehid

3.2. Ispitivanje neuroprotektivne aktivnosti

Centralni nervni sistem (CNS) je veoma osetljiv na oksidativna oštećenja posredovana reaktivnim oblicima kiseonika i azota zbog velike metaboličke aktivnosti, značajne količine polinezasićenih masnih kiselina, a sa druge strane slabe antioksidantne zaštite (Jovanović, 2011). Pored niske aktivnosti antioksidantnih enzima, krvno-moždana barijera redukuje preuzimanje pojedinih antioksidanasa kao što je vitamin E u neurone i glija ćelije (Shukla i sar., 2011). Usled pojačanog oksidativnog stresa u mozgu se nakupljaju oštećeni biomakromolekuli: karbonilovani i nitrirani proteini, lipidni peroksidi, kao i 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, marker oksidacije DNK molekula (Tovilović, 2012).

Terminom neuroprotektivnost definiše se homeostatski mehanizam unutar centralnog nervnog sistema koji štiti neurone od apoptoze ili degeneracije kao posledice akutnog oštećenja mozga ili hroničnih neurodegenerativnih oboljenja. Terapija neuroprotektivnim agensima danas se koristi kod Parkinsonove i Alchajmerove bolesti i multiple skleroze (Kim, 2010).

Neuroprotektivni efekat acetonsko-vodenih ekstrakata odabranih *Veronica* vrsta ispitivan je testom kisele fosfataze u kulturi humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y. Ova linija se često koristi kao model za ćelije slične neuronima, jer poseduje mnoge biohemijske i funkcionalne osobine neurona (Xie i sar., 2010). Ispitivani ekstrakti su rastvoreni u DMSO, pri čemu je najveća finalna koncentracija ekstrakta pri kojoj DMSO ne ostvaruje uticaj na ćelijsku vijabilnost iznosila 50 µg/ml. Uticaj ekstrakata na preživljavanje ćelija ispitivan je nakon kombinovanog tretmana stresora (1 mM natrijum nitroprusida/100 µM H₂O₂) i najveće pripremljene koncentracije ekstrakata.

Kod neurodegenerativnih oboljenja zapaženo je nakupljanje azot monoksida (NO) koji proizvode aktivirani astrociti i mikroglialne ćelije u koncentracijama višim od fizioloških. Posledica ovoga je nitrozativni stres koji se karakteriše nastankom reaktivnih azotnih vrsta i koji može biti uzrok smrti neurona. Smatra se da ovaj molekul toksične efekte ispoljava inhibicijom komponenti transportnog lanca elektrona u mitohondrijama, što dovodi do gubitka potencijala membrane mitohondrija i oslobađanja citohroma *c* u citosol. Citohrom *c* zatim aktivira kaspaze, koje nizom katalitičkih reakcija razaraju sadržaj ćelija, dovodeći do fragmentacije DNK molekula i smrti neurona apoptozom (Tovilović, 2012). Kao donor NO u ovom ispitivanju primenjen je natrijum nitroprusid (SNP), koji na dozno-zavisani način

smanjuje vijabilnost SH-SY5Y ćelija u kulturi. Lim i sar. (2009) pokazali su da ovaj stresor smanjuje vijabilnost SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma.

Iako je H₂O₂ slab oksidans i lako se neutrališe u prisustvu CAT i GSH-Px, u prisustvu unutarćelijskih metalnih jona kao što su joni Fe i Cu dolazi do formiranja visoko toksičnih hidroksil radikala iz H₂O₂ koji posledično dovode do oštećenja makromolekula uključujući DNK, proteine i lipide membrane (Okuda i sar., 1996).

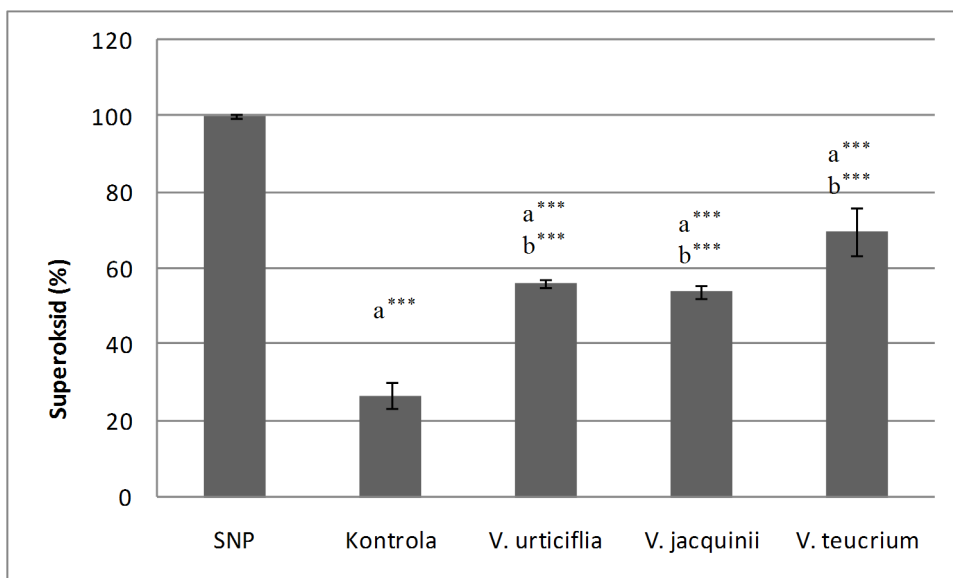
Rezultati ispitivanja neuroprotektivne aktivnosti ekstrakata herbi odabranih taksona roda *Veronica* dati su u **Tabeli 35**. Ekstrakti su ispoljili blagu protektivnu aktivnost što se manifestuje povećanjem preživljavanja ćelija izloženih SNP (9,7-12,0%) ili H₂O₂ (17,0-18,3%). Najjači zaštitini efekat u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om je pokazao ekstrakt *V. jacquinii*, dok je najefikasniji kod ćelija tretiranih sa H₂O₂ bio ekstrakt *V. teucrium*. Prethodna ispitivanja pokazala su da metanolni ekstrakt *V. peregrina* inhibira NO produkciju putem supresije inducibilne azot oksid sintetaze (iNOS) (Jeon, 2012).

Tabela 35. Povećanje SH-SY5Y ćelijske vijabilnosti nakon pretretmana ispitivanim ekstraktima

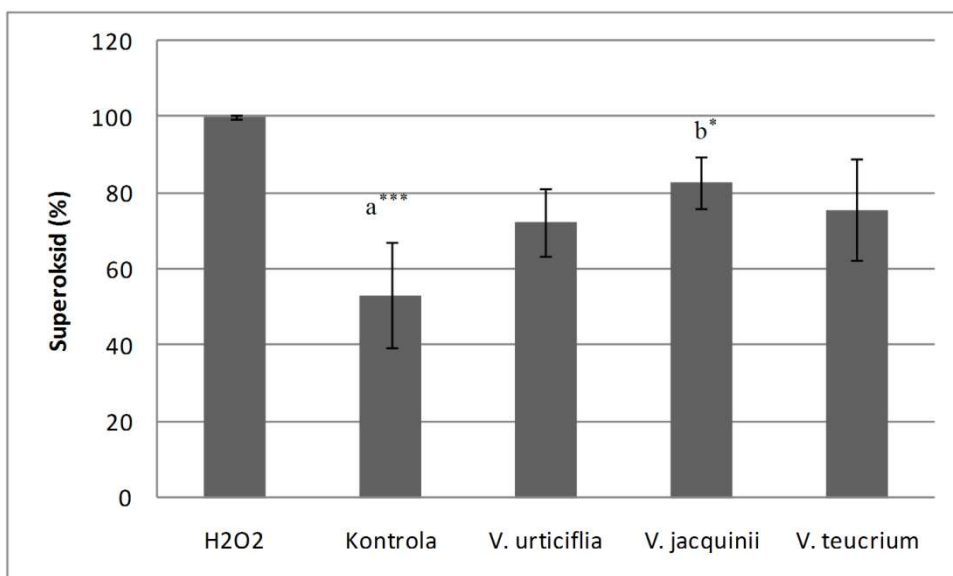
Ekstrakt	<i>Veronica jacquinii</i> 70%-ni acetonski ekstrakt	<i>Veronica teucrium</i> 70%-ni acetonski ekstrakt	<i>Veronica urticifolia</i> 70%-ni acetonski ekstrakt
Povećanje ćelijske vijabilnosti (%) ^a	12,0±2,6	9,7±3,8	11,0±3,5
Povećanje ćelijske vijabilnosti (%) ^b	17,0±4,6	18,3±4,9	17,0±3,6

Testirani ekstrakti primenjivani su kao pretretman, 30 min pre dodatka ^aSNP ili ^bH₂O₂. Povećanje ćelijske vijabilnosti predstavljeno je kao procenat bazalnog nivoa vijabilnosti (100%) primećenog kod netretiranih ćelija. Rezultati su izraženi kao srednja vrednost ± SD tri nezavisna merenja.

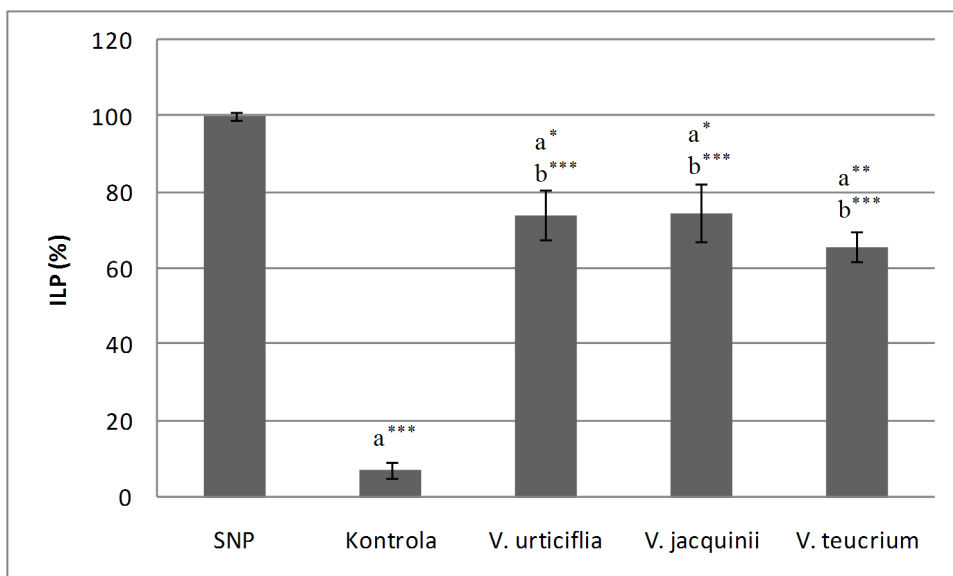
Da bi utvrdili da li mehanizam zaštitnog dejstva ispitivanih ekstrakata uključuje i neutralisanje slobodnih radikala u kulturi neuroblastoma tretiranih stresorima, praćena je i produkcija superoksid jona (O₂^{-*}), kao i intenzitet lipidne peroksidacije.



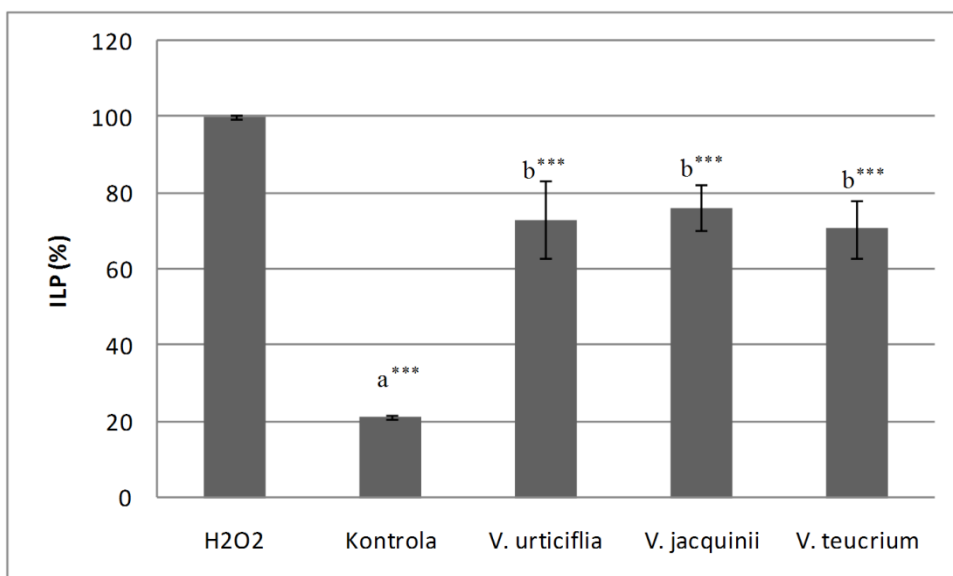
Slika 41. Uticaj ispitivanih ekstrakata na količinu superoksidnog radikala u ćelijama izloženim SNP stresoru



Slika 42. Uticaj ispitivanih ekstrakata na količinu superoksidnog radikala u ćelijama izloženim H₂O₂ kao stresoru



Slika 43. Uticaj ispitivanih ekstrakata na količinu TBARS u ćelijama izloženim SNP kao stresoru



Slika 44. Uticaj ispitivanih ekstrakata na količinu TBARS u ćelijama izloženim H₂O₂ kao stresoru

Intenzitet lipidne peroksidacije kvantifikovan je praćenjem nivoa reaktivnih vrsta tiobarbiturne kiseline (TBARS). Nakon primene stresora SNP i H₂O₂ došlo je do statistički značajnog povećanja nivoa TBARS u odnosu na kontrolu. Preinkubacija ćelija sa ispitivanim ekstraktima značajno je inhibirala produkciju TBARS indukovanu primenom SNP, ali nije ostvaren statistički značajan efekat na nivo TBARS indukovano primenom H₂O₂. Statističkom analizom nije pokazana razlika u efektu ispitivanih ekstrakata u zavisnosti od biljne vrste.

U uslovima primene odabranih stresora zapazili smo da dolazi do povećanja sinteze superoksidnog anjona (O_2^{*-}). Pretretman SH-SY5Y ćelija ispitivanim ekstraktima smanjio je produkciju O_2^{*-} nakon izlaganja SNP, ali nije ostvaren statistički značajan efekat na produkciju ovog radikala indukovanu primenom H_2O_2 kao stresora. Značajniju inhibiciju produkcije superoksidnih jona indukovanu SNP stresorom postigli su acetonsko vodeni ekstrakti nadzemnog dela *V. jacquinii* (54,0%) i *V. urticifolia* (56,3%) čiji je efekat uporediv. Statističkom analizom pokazano je da je u istom testu ispoljena aktivnost vrste *V. teucrium* nešto slabija.

Veću neuroprotektivnu aktivnost ispitivani ekstrakti pokazali su kod oštećenja neurona indukovano oksidativnim u odnosu na nitrozativni stres, pri čemu nema statistički značajnih razlika u efektu ispitivanih vrsta. Dobijeni rezultati svedoče da je za ispoljeno neuroprotektivno delovanje kod primene SNP kao stresora odgovoran mehanizam "hvatanja" slobodnih radikala, dok kod primene H_2O_2 to nije slučaj. Prema mehanizmu delovanja neuroprotektivni agensi mogu biti grupisani u nekoliko kategorija: hvatači slobodnih radikala, antioksidantni agensi, inhibitori apoptoze, neurotrofni agensi i modulatori jonskih kanala (Kim, 2010). Osim toga, moguće je da ovi neuroprotektivni agensi indukuju ushodnu regulaciju endogenih antioksidantnih enzima *in vivo*, i na taj način ostvaruju "indirektan" antioksidantni efekat (Stevenson i Hurst, 2007).

Neuroprotektivni efekat velikog broja polifenolnih jedinjenja rezultat je njihovog prolaska kroz krvno-moždanu barijeru nakon čega direktno učestvuju u hvatanju ROS i RNS, kao i u heliranju tranzicionih metala (Kovacsova i sar., 2010). Najveći broj prirodnih proizvoda sa neuroprotektivnim delovanjem pripada klasi flavonoida i fenilpropanoida (Kim, 2010). Od dominantnih komponenata ispitivanih ekstrakata i vrsta, do sada su akteozid, bajkalin, aukubin, izokvercitrin i hiperozid testirani u pogledu neuroprotektivnog delovanja. Deng i sar. (2008) pokazali su da akteozid antagonizuje apoptozu SH-SY5Y ćelija indukovanu primenom 1-metil-4-fenil-2,3-dihidropiridina (MPP^+). U njihovom ekperimentu, tretman ćelija sa MPP^+ tokom 24h indukovao je porast procenta apoptoze na 38,9%, dok je pretretman akteozidom tokom 12h u koncentracijama 0,1; 1,0 i 10,0 mg/l redukovao ovaj procenat na 29,5; 15,3 i 8,6. Dodatno, akteozid izolovan iz listova *Callicarpa dichotoma* Raeuschel (Verbenaceae) ispoljio je značajan neuroprotektivan efekat u modelu glutatomom indukovane neurotoksičnosti u primarnoj kulturi kortikalnih ćelija pacova (Koo i sar., 2006). Primenjen u koncentracijama 1 i 10 μM redukovao je nivo oslobođenog NO sa 64,9 na 29,2 i 19,3 μM , što je odgovaralo kontrolnom nivou (18,2 μM). Osim toga, u pomenutim koncentracijama redukovao je

formiranje peroksida sa 483,8 na 331,1 i 219,5 arbitrarnih jedinica (AU) (kontrolni nivo iznosio je 217,4 AU). Autori zaključuju da je akteozid smanjio produkciju ROS obnavljanjem antioksidativnog odbrambenog sistema (nivo GSH, aktivnost enzima SOD, GPx i GR) čija je inhibicija indukovana primenom glutamata kao stresora. Akteozid ispoljava neuroprotektivno delovanje i na SH-SY5Y ćelijama kod kojih je oštećenje indukovano primenom β -amiloidnih plakova (Wang i sar., 2009). Primenjen u koncentracijama 20 i 30 $\mu\text{g/ml}$ kao pretretman redukovao je produkciju ROS i indukovanu mitohondrijalnu disfunkciju uključujući smanjen membranski potencijal, povećan odnos proteina Bax/Bcl₂, oslobađanje citohroma c i cepanje kaspaze-3. Akteozid primenjen kao pretretman u koncentraciji 10, 20 i 40 mg/l tokom 6 h statistički značajno je indukovao oslobađanje laktat dehidrogenaze nakon primene rotenona (0,5 $\mu\text{M/l}$) (Gao i Pu, 2007). Esposito i sar. (2010) pokazali su da je u osnovi neuroprotektivnog efekta akteozida nishodna regulacija inflamacije. Preinkubacija akteozidom (10-100 $\mu\text{g/ml}$) u modelu inflamacije CNS-a indukovane primenom bakterijskog endotoksina/citokina (lipopolisaharid/interferon γ) na dozno zavisani način inhibirala je ekspresiju proinflamatornih enzima iNOS i COX-2.

Za brojne flavonoide pokazano je da ispoljavaju neuroprotektivno delovanje u ćelijskim i životinjskim modelima putem različitih mehanizama kao što su ublažavanje oksidativnog stresa, ekscitotoksičnosti i apoptoze neurona. Pojedini flavonoidi inhibiraju enzim acetilholin esterazu, ciljno mesto delovanja u terapiji Alchajmerove bolesti. Flavonoidi inhibiraju i neurinflatorne procese koji doprinose patogenezi neurodegenerativnih oboljenja (Romano i sar., 2013). Xu i sar. (2013) pokazali su da bajkalin, zahvaljujući sposobnosti hvatanja peroksinitrit radikala, ispoljava neuroprotektivno delovanje kod povreda nastalih u cerebralnoj ishemiji. Primenjen u koncentraciji 200 μM , bajkalin je kod H₂O₂ indukovano oštećenja primarnih neurona *in vitro* značajno povećao ćelijsku vijabilnost i aktivnost SOD (Cheng i sar., 2013). Dodatno, pretretman bajkalinom (100 mg/kg, i.p.) inhibirao je povećanje nivoa lipidne peroksidacije, sadržaj NO i smanjenje aktivnosti GSH u modelu epilepsije indukovane pilokarpinom (Liu i sar., 2012a). Gao i sar. (2001) pokazali su da bajkalin u koncentraciji 10 μM značajno štiti SH-SY5Y ćelije od oštećenja indukovanih primenom H₂O₂. Ovaj flavonoid antagonizuje povećanje koncentracije Ca²⁺ unutar ćelije indukovano primenom H₂O₂.

I za glikozilovane derivate kvercetina postoje brojni literaturni podaci koji ukazuju na njihovo neuroprotektivno delovanje. U ćelijskom modelu Parkinsonovog oboljenja indukovano primenom 6-hidroksidopamina u PC12 ćelijama pacovskog feohromocitoma,

primenjen kao pretretman (10 μ M) izokvercitrin je pokazao značajan zaštitni efekat stimulacijom antioksidantnih enzima (SOD, CAT i GPx) i GSH (Magalingam i sar., 2014). Liu i sar. (2012b) pokazali su da hiperozid štiti primarnu kulturu kortikalnih neurona od oštećenja indukovano lišavenjem ćelija kiseonika i glukoze, što je praćeno reperfuzijom. U ovom ispitivanju hiperozid primenjen u koncentraciji 10-100 μ M smanjio je iNOS ekspresiju putem inhibicije NF- κ B aktivacije.

Najsnažniji efekat ekstrakta *V. jacquini* na intenzitet lipidne peroksidacije indukovane primenom SNP, može se objasniti i prisustvom hlorogenske kiseline u najvećem procentu. Oboh i sar. (2013) pokazali su da ova fenolna kiselina značajno redukuje formiranje malondialdehida u mozgu pacova nakon izlaganja SNP-u kao stresoru.

Iridoidi takođe ispoljavaju neuroprotektivno delovanje. Za aukubin je pokazano da ispoljava zaštitnu ulogu kod neurodegenerativnih oboljenja indukovanih oksidativnim stresom. Primenjen u dozama 5 i 10 mg/kg kod pacova sa streptozocin indukovanim dijabetesom, aukubin ostvaruje neuroprotektivno delovanje putem redukovanja sadržaja lipidnih peroksida, kao i regulisanjem aktivnosti antioksidantnih enzima i smanjenjem aktivnosti sintetaze azotnog oksida (NOS) (Xue i sar., 2009). Osim toga, Xue i sar. (2012) pokazali su da pri koncentraciji 0,1 mM aukubin smanjuje procenat apoptoze ćelija linije PC12 pacovskog feohromocitoma tretiranih H₂O₂ sa 31,0 \pm 3,0 na 23,1 \pm 1,1. Aukubin značajno povećava njihovu vijabilnost u poređenju sa netretiranim ćelijama i redukuje oslobađanje (''curenje'') laktat dehidrogenaze iz njih.¹⁰

Za sve ispitivane ekstrakte herbi odabranih taksona pokazano je da deluju antioksidantno, pa se može pretpostaviti da takva njihova aktivnost delom doprinosi i njihovom neuroprotektivnom delovanju. Dok je u modelu neurodegeneracije indukovane nitrozativnim stresom glavni mehanizam neuroprotektivnog delovanja direktno ''hvatanje'' slobodnih radikala, pri čemu je najaktivniji bio ekstrakt *V. jacquini*, u modelu neurodegeneracije indukovane oksidativnim stresom to može biti ushodna regulacija endogenih antioksidantnih enzima. Ovo se naročito odnosi na ekstrakt herbe *V. teucrium* koji među ispitivanim taksonima najsnažnije stimuliše endogene enzime CAT i GSHPx za koje se zna da mogu redukovati H₂O₂ do molekula H₂O, a koji ispoljava i najsnažniji efekat u datom modelu.

¹⁰ Gubitak intracelularne LDH i njeno oslobađanje u medijum sa ćelijama indikator je ireverzibilne ćelijske smrti kao posledice oštećenja ćelijske membrane (Gómez-Lechón i sar., 2002)

3.3. Ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti

Inflamacija se danas smatra glavnim uzrokom većine hroničnih oboljenja kao što su dijabetes, Alchajmerovo oboljenje, astma i ateroskleroza (Ayissi Owona i sar., 2013). Tokom inflamatornog procesa makrofagi i endotelne ćelije stvaraju veliku količinu faktora rasta, citokina i slobodnih radikala (ROS i RNS) koji mogu izazvati oštećenje DNK molekule. Na taj način hronična inflamacija predstavlja i uvod u malignitet (Esquivel-Chirino i sar., 2013). Brojne epidemiološke studije pokazale su da prirodna jedinjenja igraju značajnu ulogu u prevenciji, ublažavanju i lečenju hroničnih inflamatornih oboljenja (Pan i sar., 2010).

Eikozanoidi, uključujući prostanoide i leukotriene, proizvodi su metabolizma arahidonske kiseline i mogu biti snažni medijatori inflamacije. Kao lipidni medijatori oni igraju ključnu ulogu kako u fiziološkim, tako i u patološkim procesima. Familije enzima ciklooksigenaza i lipooksigenaza odgovorne su za metabolizam arahidonske kiseline i proizvodnju prostaglandina i leukotriena. Ovi enzimi predstavljaju ciljno mesto delovanja supstanci koje se koriste u terapiji inflamacije, bola, astme i alergije (Greene i sar., 2011).

Podaci o tradicionalnoj primeni pojedinih *Veronica* vrsta kod različitih zapaljenja kože i sluzokože bili su povod za ispitivanje antiinflamatorne aktivnosti 70%-nih acetonskih ekstrakata tri ispitivana taksona. U cilju određivanja antiinflamatornog potencijala ekstrakata i standardnih jedinjenja aspirina i kvercetina primenjena je prethodno opisana (Lesjak, 2011) *ex vivo* metoda zasnovana na praćenju potencijala inhibicije enzima ciklooksigenaznog (COX-1) i lipooksigenaznog (12-LOX) puta metabolizma arahidonske kiseline. Kao intaktni ćelijski sistem, odnosno izvor COX-1 i 12-LOX enzima korišćeni su humani trombociti, a inflamacija je izazvana dodatkom divalentne kalcijumove jonofore A23184 (kalcimicin) i kalcijum-hlorida. Produkcija metabolita (12-HHT, TXB₂ i PGE₂ kao proizvoda ciklooksigenaznog puta i 12-HETE kao proizvoda lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline) praćena je primenom visoko osetljive i specifične LC-MS/MS metode (Lesjak, 2011). Step en inhibicije određen je na osnovu odnosa površine pikova pomenutih metabolita i internog standarda, a rezultati su prikazani u **Tabeli 36**. Dakle, primenom ove *ex vivo* tehnike, pored podataka o ukupnom antiinflamatornom potencijalu, dobijamo i podatke na osnovu kojih je moguće pretpostaviti mehanizme delovanja ispitivanih ekstrakata.

Standardi kvercetin i aspirin, kao i testirani ekstrakti herbi odabranih *Veronica* vrsta pokazali su dozno zavisnu inhibiciju produkcije četiri praćena metabolita (**Slike 45-47**).

Svi ispitani acetonsko-vodeni ekstrakti herbi odabranih taksona inhibirali su produkciju 12-HHT metabolita postižući IC_{50} vrednosti od 0,4 (*V. urticifolia*) do 2,033 mg/ml (*V. teucrium*). Ove vrednosti bile su veće od vrednosti dobijenih za aspirin ($IC_{50}=0,001$ mg/ml), dok kvercetin u ispitanoj opsegu koncentracija (6.24-200 μ g/ml) nije pokazao inhibitornu aktivnost.

Acetonsko-vodeni ekstrakt vrste *V. urticifolia* jedini je pokazao inhibiciju produkcije PGE_2 metabolita ($IC_{50}=2,279$), dok su druga dva ekstrakta ostala neaktivna pri ispitivanim koncentracijama. Pokazani efekat bio je niži od efekta standardnih jedinjenja aspirina ($IC_{50}=0,004$ mg/mL) i kvercetina ($IC_{50}=0,054$ mg/mL).

Pri inhibiciji produkcije TXB_2 metabolita postignute IC_{50} vrednosti iznosile su od 0,4 (*V. urticifolia*) do 2,779 (*V. teucrium*). Ove vrednosti bile su veće od vrednosti dobijenih za aspirin ($IC_{50}=0,006$ mg/mL) i kvercetin ($IC_{50}=0,013$ mg/mL). Na osnovu pokazanih rezultata zaključeno je da je među ispitivanim taksonima *V. urticifolia* pokazala značajno veći potencijal inhibicije COX-1 enzima. Dobijeni rezultat može biti značajan za buduća ispitivanja, obzirom da je nivo ovog konstitutivnog enzima povećan kod različitih tipova karcinoma, pa njegovi selektivni inhibitori mogu uticati na rast, proliferaciju i apoptozu karcinomskih ćelija. COX-1 enzim može biti ciljno mesto za prevenciju i terapiju epitelijalnog karcinoma jajnika (Daikoku i sar., 2005). Dodatno, redukcija rasta ćelija linija HTB26 i MCF-7 humanog karcinoma dojke u prisustvu katehina pokazala je da ovaj sekundarni metabolit kao i drugi COX-1 inhibitori predstavljaju potencijalne agense za terapiju karcinoma dojke (McFadden i sar., 2006).

Enzim 12-LOX, kao i proizvodi njegove aktivnosti imaju značajnu učlogu u proliferaciji tumorskih ćelija. Značajno veći nivo ovog enzima zabeležen je u malignim u odnosu na benigne ćelije tumora prostate, pankreasa, dojke i pluća (Lesjak, 2011). Osim toga, 12-LOX je uključen u progresiju različitih hroničnih oboljenja kao što su psorijaza, ateroskleroza i reumatoidni artritis (Simin i sar., 2013). Metabolit 12-HETE uključen je u modulisanje proliferacije i apoptoze tumorskih ćelija i jedan je od ključnih parametara koji se odnose na njihov metastaski potencijal (Schneider i Bucar, 2005). Iz navedenih razloga pronalaženje potencijalnih inhibitora 12-LOX danas je veoma aktuelno. Ispitivani ekstrakti su inhibirali i 12-LOX enzim, ali nisu dostigli vrednost kvercetina ($IC_{50}=0,084$ mg/ml). Naj snažniju inhibiciju produkcije 12-HETE metabolita postigao je ekstrakt vrste *V. jacquinii* ($IC_{50}=1,072$ mg/ml), dok je najslabija inhibicija primećena za ekstrakt vrste *V. urticifolia* ($IC_{50}=3,992$ mg/ml).

Za sve ispitivane ekstrakte nadzemnog dela odabranih taksona roda *Veronica* pokazano je da ostvaruju značajnu antioksidantnu aktivnost, pa se može pretpostaviti da ona delom doprinosi ispoljenim antiinflamatornim efektima.

Rezultati dobijeni u okviru ovog ispitivanja u saglasnosti su sa podacima o njihovoj primeni u narodnoj medicini. Iako su *Veronica* vrste često primenjivane u tradicionalnoj, orijentalnoj medicini kod različitih inflamatornih stanja, farmakološki efekti ovih vrsta nisu bili predmet ispitivanja većeg broja studija. Ipak, neki rezultati pokazali su potvrdu ovakvog delovanja. Kūpeli i sar. (2005) ispitivali su antiinflamatorni efekat vodenog i metanolnog ekstrakta vrste *V. anagalis-aquatica*, kao i izolovanih jedinjenja u testu karageninom izazvane inflamacije šape u pacova. Za razliku od vodenog, metanolni ekstrakt ispoljio je značajnu antiinflamatornu aktivnost. U dozi od 500 mg/kg *per os* ovaj ekstrakt suprimirao je inflamatorni odgovor za 38,9%, što je uporedivo sa efektom referentnog NSAIL indometacina koji je u dozi od 5 mg/kg suprimirao inflamaciju za 40,3%. Među izolovanim jedinjenjima, iridoidi verprozid i katalpozid ispoljili su naj snažniju antiinflamatornu aktivnost bez indukovanja vidljive akutne toksičnosti i gastričnog oštećenja.

Metanolni ekstrakt vrste *V. peregrina* inhibirao je lipopolisaharidima (LPS) indukovanu produkciju NO u peritonealnim makrofagama miša (C57BL/6) putem supresije ekspresije inducibilne NO sintaze. Dodatno, ovaj ekstrakt je dozno zavisno umanjio ekspresiju COX-2 (Jeon, 2012). Sličan efekat na NO produkciju pokazali su i Harput i sar. (2002a) za metanolne ekstrakte vrsta *V. cymbalaria*, *V. hederifolia*, *V. pectinata* var. *glandulosa*, *V. persica* i *V. polita*. Ispoljeni antiinflamatorni efekat posledica je sposobnosti neutralizacije slobodnih radikala (NO^{*}) proizvedenih u makrofagama.

Vodeno-etanolni ekstrakt herbe *V. officinalis* značajno snižava citokinima indukovano oslobađanje PGE₂ u humanim epitelnim ćelijama pluća (A549 ćelijama) putem inhibicije ekspresije COX-2 u NF-κB signalnom putu. Kao glavne komponente ovog ekstrakta identifikovani su iridoidni glikozidi verprozid i verminozid (Gründemann i sar., 2013).

Različiti pro-inflamatorni agensi nastaju metabolizmom arahidonske kiseline reakcijama koje podrazumevaju formiranje slobodnih radikala (Smith, 1989). Može se zaključiti da je visok sadržaj fenolnih jedinjenja, za koje je poznato da su hvatači slobodnih radikala, odgovoran za pokazano protivupalno delovanje ispitivanih ekstrakata.

Za pojedine biljne vrste koje se tradicionalno upotrebljavaju kod inflamatornih stanja, pokazano je da kao glavne aktivne sastojke sadrže akteozid i druge feniletanske heterozide (Kukić-Marković, 2013). Akteozid značajno i koncentraciono zavisno inhibira oslobađanje

TXB₂ metabolita u humanim trombocitima, ali ne ispoljava efekat na produkciju PGE₂ u A23187 stimulisanim makrofagama (Diaz i sar., 2004). Postojeći literaturni podaci svedoče o uključenosti različitih mehanizama u antiinflamatorno delovanje akteozida: nishodna regulacija ekspresije intercelularnog adhezionog molekula (ICAM-1)¹¹ na endotelnim ćelijama (Hayashi i sar., 1996), aktivacija neutrofila (Akbay i sar., 2002), influks T limfocita (Hayashi i sar., 1994), inhibicija 5-lipoksigenaze (Kimura i sar., 1987) i inhibicija protein kinaze C (Herbert i sar., 1991). Takođe, akteozid umanjuje produkciju proinflamatornih citokina, interleukina 10 (IL-10), faktora nekroze tumora α (TNF- α), interferona γ (IFN- γ) i granulocitno-makrofagnog faktora rasta kolonije (GM-CSF) i aktivnost mijeloperoksidaze (MPO) kod akutnog i hroničnog kolitisa *in vivo* (Kukić-Marković, 2013).

Jedan od značajnih mehanizama antiinflamatornog delovanja flavonoida jeste inhibicija enzima uključenih u sintezu eikozanoida: fosfolipaze A₂, COX i 5-lipooksigenaze. Delovanjem na COX oni smanjuju sintezu prostaglandina, značajnih medijatora inflamatornog procesa i na taj način moduliraju i sve ćelijske odgovore u kojima prostaglandini učestvuju. Samim tim, ublažavaju se i ostali aspekti inflamacije, kao što su povišena temperatura, bol i oticanje inflamiranog mesta (Popović, 2013). Za izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)- β -alozil-(1'''' \rightarrow 2'''')- β -glukopiranozid pokazana je nešto slabija antiinflamatorna aktivnost u odnosu na akteozid. U modelu PGE₂ indukovano edema šapice miša, primenjen u dozi 100 mg/kg ovaj derivat izoskutelareina pokazao je maksimalnu inhibiciju debljine otoka (23,4%) nakon 15 min, dok je akteozid svoj maksimalni efekat (25,8 %) ispoljio nakon 30 minuta (Güvenc i sar., 2010). Osim toga, Küpeli i sar. (2007) pokazali su da je ovaj derivat izoskutelareina u smeši sa izoskutelarein 7-O-[6'''-O-acetil- β -D-alopiranozil-(1 \rightarrow 2)]-6'''-O-acetil- β -D-glukopiranozid ispoljio značajno antiinflamatorno i antinociceptivno delovanje bez indukovanja gastričnog oštećenja. Xu i sar. (2012) su pokazali da izokvercitrin u LPS-stimulisanim RAW 264,7 makrofagama koncentraciono zavisno inhibira PGE₂ produkciju i COX-2 ekspresiju sa IC₅₀ vrednostima 25 μ M i 65 μ M. Za hiperozid, drugi derivat kvercetina zastupljen u vrsti *V. jacquinii*, pokazano je da u koncentraciji 5 μ M ispoljava snažno antiinflamatorno delovanje u LPS-stimulisanim peritonealnim makrofagama miša putem inhibicije produkcije TNF- α , IL-6 i NO sa maksimalnim stepenom inhibicije 32,31, 41,31 i 30,31% (Kim i sar., 2011). U istom ispitivanju hiperozid je inhibirao i NF- κ B aktivaciju, kao i I κ B- α degradaciju. Lee i sar.

¹¹ Na mestu inflamacije oslobođeni inflamatorni citokini indukuju ispoljavanje ICAM-1 na vaskularnim endotelnim ćelijama, što je neophodan korak u migraciji leukocita na mesto zapaljenja (Selaković i sar., 2002).

(2004) su utvrdili da hiperozid značajno suprimira PGE₂ i NO produkciju *in vitro* sa IC₅₀ vrednostima 24,3 i 32,9 μM.

Tabela 36. Određene IC₅₀ vrednosti za COX-1 i 12-LOX inhibitornu aktivnost ispitivani ekstrakti i standardnih jedinjenja

Ekstrakt	IC ₅₀ (mg/ml)			
	COX-1 inhibicija			12-LOX inhibicija
	12-HHT	PGE ₂	TXB ₂	12-HETE
<i>V. urticifolia</i>	<0,4	2,279±0,154	<0,4	3,992±0,260
<i>V. jacquinii</i>	1,176±0,069	n.d. ^a	1,337±0,046	1,072±0,018
<i>V. teucrium</i>	2,033±0,109	n.d. ^a	2,779±0,232	2,779±0,232
Aspirin	0,001±0,00008	4,98±0,06 × 10 ⁻³	5,58±0,53 × 10 ⁻³	n.d. ^a
Kvercetin	n.d. ^a	53,63±2,47 × 10 ⁻³	12,57±0,26 × 10 ⁻³	0,084±0,007

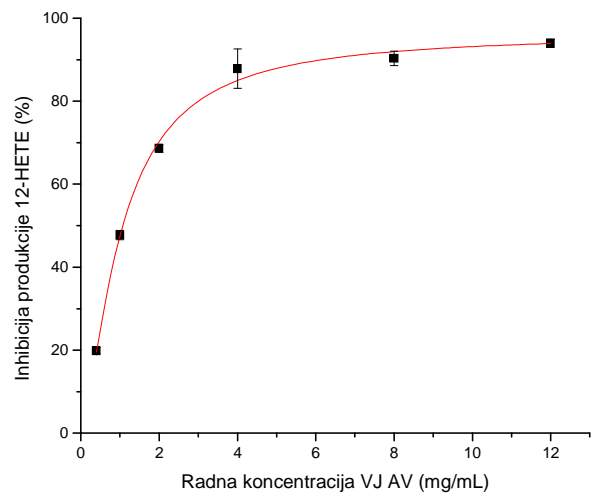
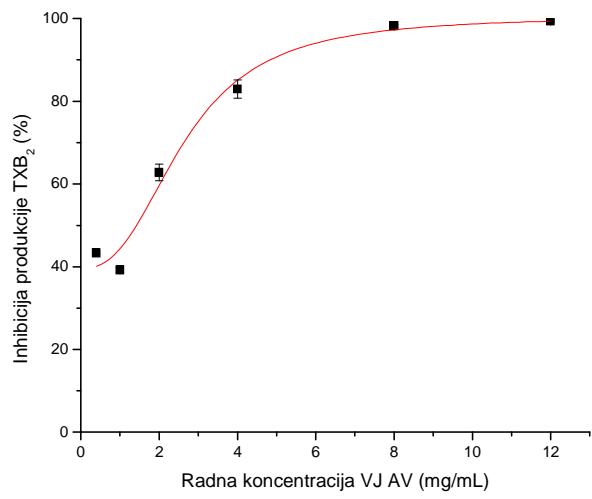
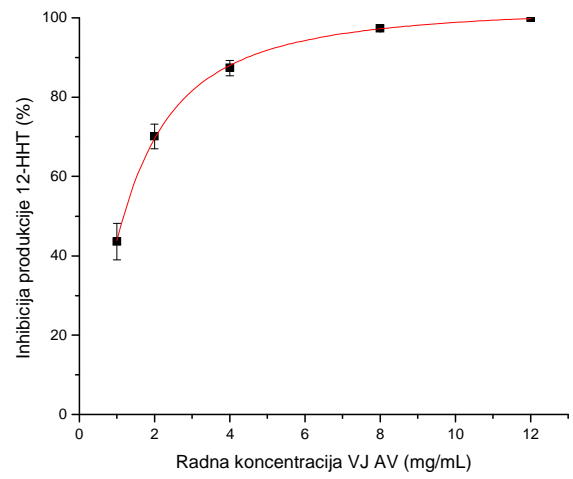
^aNije dostignuta IC₅₀ pri ispitivanim koncentracijama

Budući da je za većinu fenolnih jedinjenja detektovanih i kvantifikovanih u ispitanim *Veronica* vrstama pokazano da su izuzetno potentni antiinflamatorni agensi, urađena je odgovarajuća regresiona analiza u cilju ispitivanja korelacije sadržaja ovih jedinjenja i pokazane antiinflamatorne aktivnosti. Značajna korelacija pokazana je između stepena inhibicije produkcije 12-HHT i sadržaja bajkalina u testiranim ekstraktima. Bajkalin se u Japanu, Kini i Koreji koristi u terapiji inflamatornih stanja kao što su bronhitis, nefritis, hepatitis, astma i atopijski dermatitis (Li i sar., 2000). Njegova antiinflamatorna aktivnost povezuje se sa NF-κB faktorom, što je i pokazano u različitim akutnim i hroničnim inflamatornim modelima (Guo i sar., 2013). Liu i sar. (2006) pokazali su da tretman bajkalinom snižava nivo serumskog TNF-α i IL-6 kod C57BL/6J pacova sa hiperlipidemijom indukovanom dijetom, kod kojih je inflamacija izazvana infekcijom bakterijom *Chlamydomydia pneumoniae*.

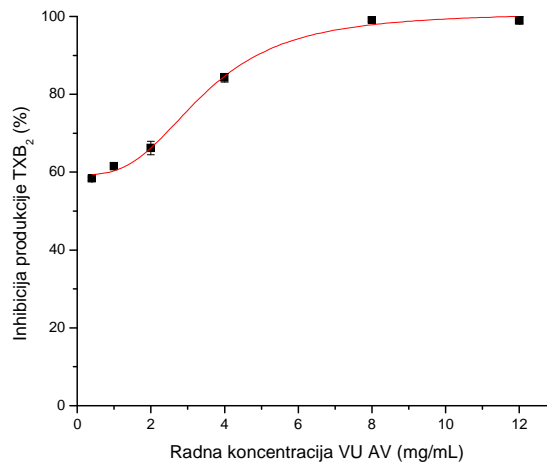
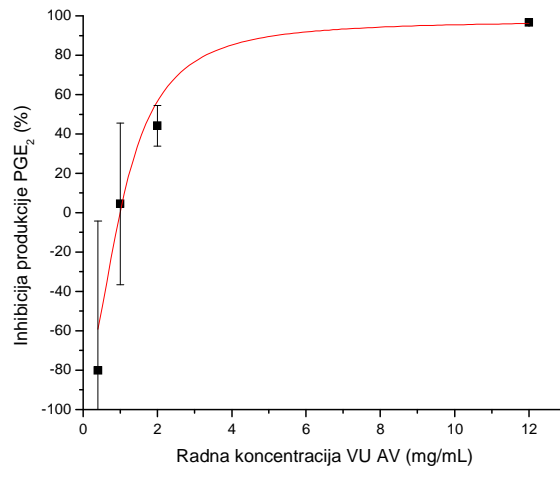
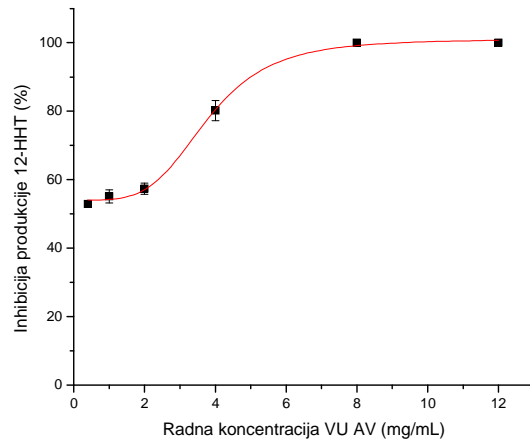
U modelu karageninom indukovano edema šapice pacova hlorogenska kiselina je ispoljila antiedematozno delovanje (Dos Santos i sar., 2006), dok je u LPS-aktiviranim makrofagima regulisala produkciju inflamatornih citokina (Shan i sar., 2009).

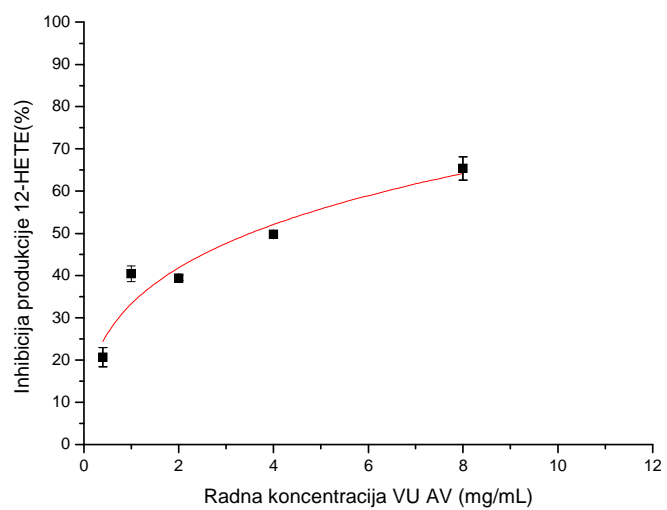
Za brojne iridoide pokazano je da deluju antiinflamatorno putem inhibicije COX i LOX, smanjuju ekspresiju i sintezu TNF- α i IL-6 putem inhibicije NF- κ B (Kukić-Marković, 2013). Biljke koje sadrže aukubin se u orijentalnoj medicini koriste za lečenje reumatskih i drugih zapaljenskih oboljenja. Nakon topikalne primene, aukubin u dozi 0,1 mg u modelu 12-O-tetradekanoliforbol-13-acetatom (TPA) indukovano edema uva miša ispoljava antiinflamatornu aktivnost sličnu indometacinu (83,08 i 71,54% inhibicije edema za indometacin i aukubin, redom) (Carrillo-Ocampo i sar., 2013). Aglikon aukubina pokazuje umerenu inhibiciju enzima COX-2 (IC₅₀=8,83 mM), i znatno nižu inhibiciju enzima COX-1 (IC₅₀=68,90 mM) (Park i sar., 2010). Sam aukubin u istom testu nije ispoljio značajniju aktivnost. Benito i sar. (2000) pokazali su da je inhibicija TX sintaze primarni mehanizam putem kog iridoidna jedinjenja ispoljevaju svoje anti-inflamatorno delovanje. Naime, ispitivani iridoidi, među kojima je i aukubin, značajno su inhibirali oslobađanje TXB₂ iz humanih trombocita stimulisanih jonoforom Ca, sa stepenom inhibicije nešto nižim u odnosu na ibuprofen. Ovaj literaturni podatak u saglasnosti je sa rezultatima dobijenim u okviru ove disertacije, gde je najveću inhibiciju sinteze TXB₂ postigao ekstrakt *V. urticifolia* u kom je jedino detektovano prisustvo aukubina. U istom ispitivanju (Benito i sar., 2000), nijedno od testiranih iridoidnih jedinjenja nije ostvarilo statistički značajan efekat na produkciju PGE₂.

Obzirom da su LOX osetljive na prisustvo antioksidanasa može se zaključiti da pokazano antioksidantno delovanje ispitivanih ekstrakata delom doprinosi i utvrđenom antiinflamatornom delovanju. Antioksidansi inhibiraju formiranje lipidnih hidroperoksida usled hvatanja lipidoksi- ili lipidperoksi- radikala koji nastaju tokom enzimske peroksidacije. Na ovaj način ograničava se raspoloživost lipidnih peroksida kao neophodnog supstrata za katalitički ciklus LOX (Rackova i sar., 2007). Ovo se naročito uočava u slučaju ekstrakata herbi *V. jacquinii* i *V. teucrium* koji su ispoljili snažnu 12-LOX inhibitornu aktivnost, a pritom i najsnažnije antioksidantno delovanje. Sa druge strane, obzirom da je ekstrakt *V. urticifolia* pokazao najsnažniju COX-1 inhibiciju, ali i najslabiju antioksidantnu aktivnost, može se zaključiti da je neki drugi mehanizam u osnovi njegovog antiinflamatornog delovanja.

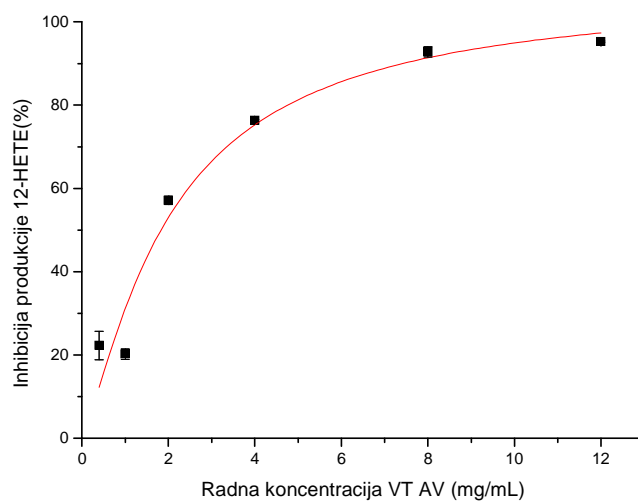
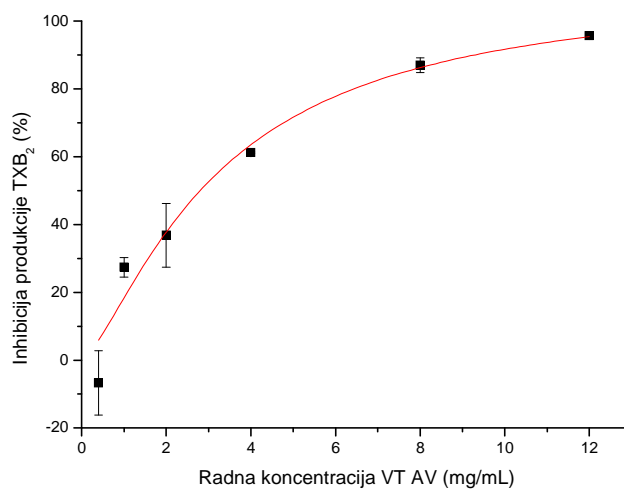
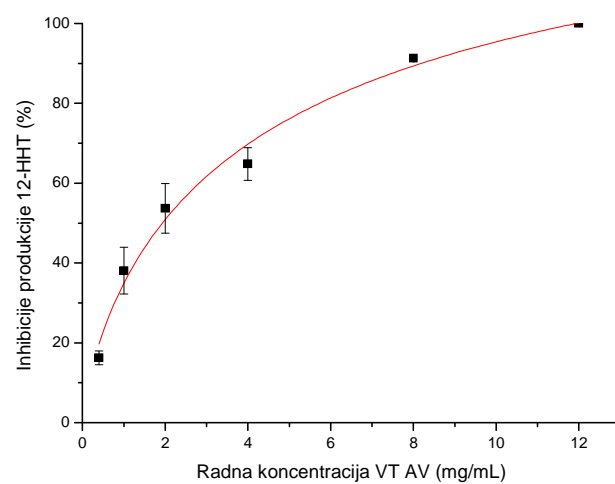


Slika 45. Antiinflamatorni efekat 70%-nog ekstrakta *V. jacquinii* (inhibicija produkcije 12-HHT, 12-HETE i TXB₂)





Slika 46. Antiinflamatorni efekat 70%-nog ekstrakta *V. urticifolia* (inhibicija produkcije 12-HHT, 12-HETE i TXB2)



Slika 47. Antiinflamatorni efekat 70%-nog ekstrakta *V. teucrium* (inhibicija produkcije 12-HHT, 12-HETE i TXB2)

3.4. *In vivo* ispitivanje citotoksične aktivnost (antitumorsko delovanje)

Maligna oboljenja su pored kardiovaskularnih bolesti vodeći uzrok smrti širom sveta. Pod karcinomom se podrazumeva grupa od preko 100 različitih oboljenja okarakterisanih nekontrolisanim ćelijskim rastom, lokalnom invazijom tkiva i udaljenim metastazama (Madhusudan i Middleton, 2005). Proces transformacije normalne ćelije u tumorsku (karcinogeneza) je višefazan proces. Prva faza, faza inicijacije, dešava se kada genom ćelije pretrpi promene koje nakon toga ostaju neispravljene, ili bivaju pogrešno ispravljene. Veći broj mutacija potreban je za transformaciju normalne ćelije u malignu, što obično zahteva i duži vremenski period. U fazi promocije, oštećena ćelija se deli, tako formirajući premaligni tumor. Pod dejstvom različitih faktora tumor prelazi u poslednju, ireverzibilnu fazu progresije. Nastaju ćelije – klonovi sa povećanim kapacitetom proliferacije, invazivnošću i sposobnošću metastaziranja. Postepeno dolazi i do morfoloških promena u tkivu (Orčić, 2010). Jedinjenja izolovana iz biljaka imaju važnu ulogu u otkrivanju i razvoju novih hemioterapijskih agenasa. Jedan od pristupa pri identifikaciji antikancerogenih agenasa prirodnog porekla je izbor biljnih vrsta zasnovan na etnomedicinskim podacima, i njihovo testiranje modernim naučnim metodama. Obzirom da se u tradicionalnoj medicini zemalja Azije pojedine *Veronica* vrste primenjuju u terapiji karcinoma (Harput i sar., 2002a), u okviru ove disertacije ispitivan je efekat odabranih vrsta kod životinja sa Erlihovim ascitnim karcinomom (EAC).

Ovaj karcinom je inicijalno opisan kao spontani adenokarcinom glodara. U pitanju je brzorastući karcinom veoma agresivnog ponašanja. Njegova implantacija indukuje lokalnu inflamatornu reakciju, uz povećanje ascitne zapremine i broja ćelija, što je u vezi sa povećanjem peritonealne vaskularne permeabilnosti (Gomes i sar., 2008).

Uključenost slobodnih radikala u razvoj tumora je dobro dokumentovana. Prethodna ispitivanja su pokazala da su miševi sa EAC pod većim oksidativnim stresom u odnosu na kontrolne životinje, što za posledicu ima povećanu oksidaciju proteina i lipida, kao i redukovanje endogenih antioksidanasa u jetri (Al Abdan, 2012). Ukoliko je oksidativni stres uključen u nastanak EAC, odgovarajuća terapija antioksidansom treba da zaštiti od ovog oštećenja. Kako bi ispitali hipotezu da je rast tumorskih ćelija posledica izmene antioksidantnog statusa u EAC ćelijama, kao pozitivna kontrola korišćen je tiolni antioksidans i prekursor glutationa N-acetil-L-cistein (NALC) (Ćebović, 2008).

Antitumorska svojstva ispitivanih ekstraktata i NALC procenjavana su praćenjem parametara kao što su zapremina ascitesa, broj tumorskih ćelija i njihova vijabilnost.

Ascitna tečnost esencijalna je za rast tumora jer predstavlja izvor hrane za rast tumorskih ćelija (Agrawal i sar., 2011). U kliničkim situacijama se formiranje ascitesa često primećuje kod pacijenata sa uznapređovanim karcinomom. Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije pokazuju da primena NACL značajno redukuje ascitnu zapreminu kod miševa sa implantiranim EAC. Takođe, primenjeni ekstrakti su statistički značajno smanjili zapreminu ascitesa, i to ekstrakti *V. teucrium* i *V. urticifolia* jednako efikasno kao NACL, dok je ekstrakt *V. jacquinii* ostvario nešto slabiji efekat.

Tabela 37. Uticaj ispitivanih ekstraktata i NALC na parametre EAC

Grupa	Broj ćelija/mm ³	Zapremina ascitesa (ml)	Vijabilnost ćelija (%)
EAC kontrolna grupa	120500 ± 10609	7,24 ± 0,48	8,74 ± 1,71
NALC grupa	110000 ± 2280	3,78 ± 0,56	9,87 ± 1,39
<i>V. jacquinii</i>	137750 ± 20934 ^{**}	5,75 ± 0,54 ^{*,**}	7,85 ± 3,09
<i>V. teucrium</i>	119583 ± 19595	3,50 ± 1,47 [*]	7,47 ± 2,42
<i>V. urticifolia</i>	107833 ± 15512	3,87 ± 0,85 [*]	6,35 ± 0,73 ^{*,**}

Akumulacija ascitne tečnosti dešava se paralelno sa proliferacijom tumorskih ćelija (Ozaslan i sar., 2011). Citotoksična aktivnost može se odrediti kao smanjenje broja ćelija usled ćelijske smrti, dok citostatska ili aktivnost inhibicije ćelijskog rasta može biti određena kao supresija povećanja ćelijskog broja, bez indukovanja ćelijske smrti. Primena NALC i ispitivanih ekstraktata dovela je do blage redukcije (bez statističkog značaja) broja tumorskih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom, ukazujući na njihov onkostatski efekat. ANOVA testom nije pokazana statistički značajna razlika u efektu ispitivanih ekstraktata na broj tumorskih ćelija.

Primena NALC nije pokazala efekat na vijabilnost tumorskih ćelija. U grupama životinja koje su primale ekstrakte, statistički značajno smanjenje ćelijske vijabilnosti primećeno je samo nakon aplikacije *V. urticifolia* ekstrakta.

Pretraživanjem literature nisu nađeni podaci o *in vivo* ispitivanju antitumorske aktivnosti *Veronica* vrsta, ali su u prethodnim ispitivanjima biljke ovog roda pokazale snažnu

citotoksičnu aktivnost na različitim ćelijskim linijama. Metanolni ekstrakt vrste *V. americana* ispoljio je citotoksičnu aktivnost prema HF-6 i PC-3 ćelijskim linijama humanih karcinoma kolona i prostate, redom (Moreno-Escobar i sar., 2013). Iridoidna jedinjenja izolovana iz ove vrste 4 β -hidroksi-6-O-(p-hidroksibenzoil)-tetrahidrolinarid i 10-O-protokatehuil-katalpol pokazala su aktivnost veću od aktivnosti kamptotecina koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Osim toga, Saracoglu i Harput (2012) utvrdili su da iridoidi prisutni u *Veronica* vrstama, u zavisnosti od strukture, deluju citostatski ili citotoksično na ćelijskoj liniji humanog epidermoidnog karcinoma (Hep-2), humanog rabdiosarkoma (RD), kao i na ćelijskoj liniji transgenih murinskih L-ćelija (L-20B). Testirana jedinjenja nisu ispoljila citotoksičnost na nekanceranoj ćelijskoj liniji bubrežnih ćelija afričkog zelenog majmuna (Vero). U pomenutom ispitivanju aukubin primenjen u koncentraciji 0-200 μ g/ml nije pokazao efekat na rast karcinomskih ćelija.

Metanolni ekstrakti vrsta *V. persica*, *V. polita*, *V. hederifolia*, *V. pectinata* var. *glandulosa* i *V. cymbalaria* ispoljili su dozno-zavisnu citotoksičnost prema KB i B16 ćelijskim linijama. Frakcionisanjem je pokazano da su jedinjenja odgovorna za pokazanu aktivnost prisutna u nepolarnoj, hloroformskoj frakciji ekstrakta (Harput i sar., 2002a).

Malo je podataka o *in vivo* ispitivanju antitumorske aktivnosti jedinjenja prisutnih u vrstama ispitivanim u okviru ove disertacije, ali su izvršena brojna *in vitro* ispitivanja sa njima. Akteozid primenjen i.p. u koncentraciji 50 mg/kg kod C57BL/6 miševa kao pretretman tokom 13 dana pre injektovanja B16 melanomskih ćelija statistički značajno je povećao preživljavanje bolesnih životinja (Ohno i sar., 2002). Osim toga, u *in vitro* ispitivanjima akteozid je pokazao snažno citotoksično delovanje prema sledećim tumorskim linijama: dRLh-84 ćelijama hepatoma pacova, S-180 ćelijama sarkoma, P-388/D1 ćelijama limfoidnih neoplazmi miša, HL-60 ćelijama humanog promijelocitnog limfoma i HeLa ćelijskoj liniji humanog epitelijalnog karcinoma (Saracoglu i sar., 1995).

Bajkalin, prisutan u ekstraktima vrsta *V. urticifolia* i *V. jacquini*, inhibirao je rast inokuliranih SW620 ćelija kolorektalnog karcinoma kod miša (Chen i sar., 2012). Nakon 28 dana terapije primenjen u dozi 50 mg/kg bajkalin je inhibirao rast tumora za 55%. U *in vitro* uslovima ovo jedinjenje ispoljava dozno i vremenski zavisnu inhibiciju rasta humanih mukoepidermoidnih Mc3 karcinomskih ćelija (Chiu i sar., 2011).

Literaturni podaci svedoče o značajnoj antitumorskoj aktivnosti iridoidnih jedinjenja kod životinja sa EAC. Naime, Pikroliv, smeša iridoidnih glikozida, primenjen *per os* u dozi 375 mg/kg tokom deset dana dovodi do značajnog produžetka života životinja sa inokuliranim

EAC, kao i do značajne redukcije ascitne zapremine (Rajeshkumar i sar., 2001). Za aukubin prisutan u vrsti *V. urticifolia* nema podataka o *in vivo* testovima, ali su Gálvez i sar. (2005) pokazali *in vitro* da aukubin antitumorski efekat ostvaruje putem inhibicije topoizomeraze I. Ovaj enzim kontroliše izmene u DNK strukturi katalizom prekidanja i spajanja fosfodiesterne osnove DNK lanaca tokom normalnog ćelijskog ciklusa. Smatra se da inhibitori topoizomeraze blokiraju fazu ligacije čime se generišu jedno i dvolančani DNK prekidi, što dalje narušava integritet genoma. Nastanak tih prekida naknadno dovodi do apoptoze (Kümmler i sar., 2013).

Navedeni podaci ukazuju da su jedinjenja iz grupe flavonoidnih, feniletanskih heterozida i iridoidnih sekundarnih metabolita nosioci pokazane onkostatske aktivnosti ispitivanih ekstrakata. Ekstrakt herbe *V. urticifolia* koji sadrži i najveći procenat akteozida, aukubina i bajkaleina ispoljio je najbolji antitumorski efekat. Ovakav rezultat nije u saglasnosti sa rezultatima antioksidantnih testova, što ukazuje da u osnovi pokazanog onkostatskog delovanja leže neki drugi mehanizmi.

3.5. Ispitivanje antibakterijske aktivnosti

Neracionalna primena antibiotika dovela je do pojave rezistencije pojedinih bakterijskih sojeva na njihovo delovanje. U skladu sa tim, pronalazak novih lekova sa antibakterijskim delovanjem jedna je od značajnijih oblasti istraživanja danas. Prirodni proizvodi su bogat izvor antimikrobnih agenasa niske toksičnosti, širokog spektra delovanja i zadovoljavajuće farmakokinetike (Cushnie i sar., 2003).

Prema dostupnim literaturnim podacima, odabrane vrste roda *Veronica* do sada nisu ispitivane u pogledu antimikrobne aktivnosti.

Antibakterijska aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi *V. jacquinii*, *V. teucrium* i *V. urticifolia* testirana je bujon mikrodilucionim testom prema Gram (+) bakterijama *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus cereus* humani izolat, *Micrococcus flavus* ATCC 10240, *Listeria monocytogenes* NCTC 7973, i Gram (-) bakterijama *Escherichia coli* ATCC 35210, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterobacter cloacae* humani izolat. Rezultati antibakterijskog delovanja dati su u **Tabeli 38**. Ispitivani ekstrakti su ispoljili umerenu do slabu aktivnost prema svim testiranim sojevima bakterija. Izuzev u slučaju soja *Enterobacter cloacae*, najizraženiji efekat prema primenjenim sojevima ispoljio je ekstrakt herbe *V. teucrium*. Primećeno je da su G (+) sojevi generalno osetljiviji na

delovanje ovog ekstrakta u odnosu na G (-) bakterije. Najizraženiji je bio efekat prema *S. aureus*, *B. cereus* i *L. monocytogenes* (MIK 7,5 mg/ml), dok je najslabiju aktivnost ovaj ekstrakt pokazao prema *P. aeruginosa* (MIK 22,5 mg/ml). U odnosu na ostale ekstrakte herbi, ovaj ekstrakt ima veći sadržaj derivata izoskutelareina i hrizoeriola. Nema dostupnih literaturnih podataka o antibakterijskom delovanju dominantnog jedinjenja izoskutelarein 7-O-(6''-O-acetil)- β -alozil (1'' \rightarrow 2'')- β -glukozida. Najizraženiji efekat ekstrakt *V. urticifolia* pokazao je u odnosu na *S. aureus*, dok je najosetljiviji na dejstvo *V. jacquinii* bio soj *E. cloacae*.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije u skladu su sa rezultatima ispitivanja antibakterijske aktivnosti metanolnog ekstrakta vrste *V. montana* gde je pokazano da je rast testiranih mikroorganizama potpuno inhibiran pri koncentracijama od 7,5 do 22,5 mg/ml, pri čemu je najveća aktivnost ispoljena prema *S. aureus* (Stojković i sar., 2013). Sa druge strane, Abu Ziada i sar. (2008) su pokazali agar difuzionom metodom da metanolni ekstrakt herbe *V. anagallis-aquatica* ima najjači efekat na *Bacillus subtilis*, dok je manje efikasan prema soju *S. aureus*.

O antimikrobnoj aktivnosti jedinjenja prisutnih u ispitivanim taksonima postoje literaturni podaci. Za akteozid koji je prisutan u sva tri ispitivana ekstrakta je ranije pokazano da ispoljava umereno antimikrobno delovanje. Njegova antibakterijska aktivnost prema *S. aureus* je posledica inhibicije preuzimanja leucina, pri čemu se inhibira sinteza proteina (Avila i sar., 1999). Vrednost MIK akteozida za *S. aureus* iznosi 65 μ g/ml (Pendota i sar., 2013). Za bajkalin koji je prisutan u ekstraktima *V. urticifolia* i *V. jacquinii* je pokazan sinergistički efekat sa tetraciklinom i oksitetraciklinom u terapiji infekcija izazvanih visoko rezistentnim sojevima *S. aureus* (Novy i sar., 2011). Sa druge strane, rastvoren u 0,05%-nom rastvoru natrijum karbonata (w/v) ili 0,1%-nom amonijum hidroksidu (v/v) i primenjen samostalno u koncentraciji od 100 μ l nije pokazao efekat na rast *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* (Cushnie i sar., 2003). Za hlorogensku kiselinu utvrđeno je da ne deluje na G (+) bakterije (Kukić-Marković, 2013).

Tabela 38. Antibakterijska aktivnost odabranih *Veronica* vrsta

Bakterija	<i>V. jacquini</i>	<i>V. urticifolia</i>	<i>V. teucrium</i>	Streptomycin
	MIC MBC	MIC MBC	MIC MBC	MIC MBC
<i>Staphylococcus aureus</i>	22,5	7,5	7,5	0,030
	22,5	7,5	7,5	0,060
<i>Bacillus cereus</i>	22,5	22,5	7,5	0,010
	22,5	45,0	22,5	0,030
<i>Micrococcus flavus</i>	22,5	22,5	15,0	0,006
	22,5	37,5	22,5	0,030
<i>Listeria monocytogenes</i>	15,0	37,5	7,5	0,010
	22,5	45,0	15,0	0,030
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22,5	22,5	22,5	0,050
	22,5	37,5	22,5	0,100
<i>Escherichia coli</i>	15,0	22,5	15,0	0,100
	15,0	37,5	15,0	0,200
<i>Enterococcus faecalis</i>	7,5	15,0	15,0	0,050
	15,0	22,5	22,5	0,100

ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. U okviru doktorske disertacije izvršeno je morfološko, hemijsko i farmakološko ispitivanje tri taksona roda *Veronica* L.: *V. urticifolia* Jacq., *V. jacquinii* Baumg., *V. teucrium* L., široko rasprostranjenih na teritoriji Srbije. Ove vrste su do sada samo delimično hemijski ispitivane, dok nema podataka o njihovom farmakološkom delovanju.
2. Sa ciljem utvrđivanja mikromorfoloških obeležja, kao i anatomske građe, sprovedena je mikroskopska analiza sprašene herbe i poprečnih preseka lista i stabla odabranih *Veronica* vrsta. Analizom sprašenog biljnog materijala uočeno je prisustvo sledećih zajedničkih karakteristika: stoma anomocitnog tipa u epidermisu, nežlezdanih, višecelijskih dlaka i žlezdanih dlaka kapitatnog tipa. Mikroskopskom analizom poprečnog preseka lista primećene su jasne razlike samo na nivou broja slojeva palisadnog tkiva. Dok je u listu vrsta *V. urticifolia* i *V. teucrium* prisutan jednoslojni palisadni parenhim, u listu vrste *V. jacquinii* on je višeslojan. Kod svih ispitivanih vrsta pokazano je da su ćelije epidermisa lica krupnije od ćelija epidermisa naličja. Analiza poprečnog preseka stabla pokazala je da je ono primarne građe i da pripada tipu stabla bez provodnih snopića. Rezultati histohemijske analize ukazali su na prisustvo lipida, alkaloida, skroba i fenolnih jedinjenja u analiziranim taksonima. Fluorescentnom mikroskopijom utvrđeno je da su fenolna jedinjenja lokalizovana u kutikularnom sloju, trihomima i lignificiranim ćelijskim zidovima ksilema listova i stabla.
3. Analiza sadržaja teških metala primenom FAAS i GF-AAS u biljnim uzorcima nije pokazala značajne razlike između testiranih *Veronica* vrsta sa istog lokaliteta, ukazujući na to da obrazac preuzimanja teških metala nije karakteristika vrste. Na osnovu sadržaja Cr u herbi vrsta *V. jacquinii* i *V. urticifolia* raslih na serpentinskom zemljištu, zaključeno je da one predstavljaju potencijalne hiperakumulatore ovog

teškog metala. Sadržaj određivanih metala u uzorcima zemljišta bio je u očekivanom opsegu za odgovarajuću geološku podlogu.

4. U okviru preliminarne hemijske analize u metanolnim, vodenim i 70%-nim acetonskim ekstraktima ispitivanih *Veronica* vrsta određen je sadržaj ukupnih polifenola, fenilpropanoida i iridoida primenom kolorimetrijskih tehnika.

a) Sadržaj ukupnih fenola varirao je od 116,0 do 201,0 mg GAE/g suvog ekstrakta, pri čemu je najveći sadržaj zabeležen u ekstraktima herbe *V. jacquinii*.

b) Sadržaj ukupnih fenilpropanoida varirao je od 11,2 do 38,0 mg akteozida/g suvog ekstrakta. Uzorci vrste *V. teucrium* bili su najbogatiji ovom klasom jedinjenja.

c) Sadržaj ukupnih iridoida kretao se od 94,3 do 322,9 mg aukubina/g suvog ekstrakta. Najveći sadržaj zabeležen je u ekstraktima vrste *V. urticifolia*.

Obzirom da je spektrofotometrijska analiza izdvojila 70%-ne acetonske ekstrakte kao najbogatije pomenutim klasama jedinjenja, oni su odabrani za dalju hemijsku i farmakološku analizu.

5. HPLC-DAD i HPTLC tehnikama, uz korišćenje standardnih supstanci, određen je sadržaj aukubina i akteozida u 70%-nim acetonskim ekstraktima ispitivanih taksona. Dok je sadržaj akteozida u ekstraktu herbe *V. urticifolia* bio približno tri puta veći u odnosu na njegov sadržaj u herbama vrsta *V. jacquinii* i *V. teucrium*, za aukubin je pokazano da je prisutan samo u ekstraktu herbe *V. urticifolia*. Primećena razlika u sadržaju jedinjenja određenih primenom HPLC-DAD i HPTLC tehnika nije imala statističku značajnost.

6. Kvalitativna i kvantitativna analiza ispitivanih taksona roda *Veronica* izvršena je primenom LC-DAD/ESI-MS tehnike.

a) U ekstraktu herbe *V. urticifolia* glavnu frakciju činili su flavoni (derivati apigenina i luteolina), a pored njih su bili prisutni i derivati hidroksicimetnih kiselina (kafene i *p*-kumarinske kiseline). Dominantna jedinjenja u ispitivanom ekstraktu bila su

akteozid (14,92 mg/g suvog ekstrakta) i luteolin-7-O-glukuronid (14,22 mg/g suvog ekstrakta).

- b) U ekstraktu herbe *V. teucrium* glavnu frakciju činili su flavoni (derivati apigenina i izoskutelareina), a pored njih su bili prisutni i derivati hidroksicimetnih kiselina (kafene i protokatehinske kiseline). Dominantno jedinjenje u ispitivanom ekstraktu je bio izoskutelarein 7-O-(6'''-O-acetil)- β -alozil-(1''' \rightarrow 2''')- β -glukopiranozid (26,33 mg/g suvog ekstrakta).
- c) U ekstraktu herbe *V. jacquinii* glavnu frakciju činili su derivati fenolkarbonskih kiselina, kafene i protokatehinske kiseline. Osim njih su bili prisutni i flavonoli (derivati kvercetina) i flavoni (derivati luteolina i izoskutelareina). Dominantno jedinjenje u ekstraktu *V. jacquinii* bio je feniletanoid akteozid (5,00 mg/g suvog ekstrakta).

7. Dodatna saznanja o hemijskom sastavu herbi ispitivanih taksona dobijena su kvantifikacijom odabranih fenolnih jedinjenja (14 fenolnih kiselina, 25 flavonoida, 3 kumarina i 2 lignana) i hina kiseline u 70%-nim acetonskim ekstraktima primenom visoko selektivne i specifične LC-MS/MS tehnike sa trostrukim kvadrupolom masenim spektrometrom sa elektrosprej jonizacijom. Fenolne komponente koje se nalaze u značajnijoj količini u ekstraktima odabranih *Veronica* vrsta su hlorogenska kiselina (*V. teucrium*), bajkalin (*V. urticifolia* i *V. teucrium*), izokvercitrin (*V. jacquinii*) i hiperozid (*V. jacquinii*), kao i derivat cikloheksana hinka kiselina (*V. jacquinii* i *V. teucrium*). Iako u tragovima, genistein je po prvi put identifikovan u familiji Plantaginaceae. Takođe, novina je i prisustvo tri kumarina (umbeliferona, skopoletina i eskuletina) u *Veronica* vrstama.

8. *In vitro* antioksidantna aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi odabranih *Veronica* vrsta određena je spektrofotometrijski, primenom FRAP testa (ukupna antioksidantna aktivnost) i DPPH testa (neutralizacija DPPH radikala). U oba testa ispitivani ekstrakti pokazali su značajnu dozno-zavisnu aktivnost. Najveća redukciona sposobnost i antiradikalni efekat pokazani su za ekstrakt herbe *V. teucrium*, dok je najniža aktivnost zabeležena za ekstrakt herbe *V. urticifolia*.

9. *In vivo* antioksidantna aktivnost je ispitivana na modelu hepatotoksičnosti indukovane primenom CCl_4 kod pacova. Praćenjem biohemijskih parametara oksidativnog stresa pokazano je da ispitivani ekstrakti imaju zaštitnu ulogu. Održavajući fiziološki nivo enzimskih i neenzimskih antioksidanasa, kao i lipidne peroksidacije, primenjeni u dozi 100 mg/kg t.m. redukovali su nivo slobodnih radikala. Prema rezultatima sadržaja GSH i TBARS nivoa zaključeno je da u oksidativnom stresu vrste *V. jacquinii* i *V. teucrium* pokazuju slični antioksidantni efekat koji je nešto izraženiji od efekta vrste *V. urticifolia*, što je u saglasnosti sa rezultatima *in vitro* testova.

10. Neuroprotektivni efekat 70%-nih acetonskih ekstrakata odabranih *Veronica* vrsta ispitivan je u kulturi humane neuroblastomske ćelijske linije SH-SY5Y gde je testom kisele fosfataze praćen uticaj ekstrakata na preživljavanje ovih ćelija nakon njihovog kombinovanog tretmana sa stresorom (SNP ili H_2O_2). Ispitivani ekstrakti su ispoljili blagu protektivnu aktivnost što se manifestovalo povećanjem preživljavanja ćelija izloženih SNP (9,7-12,0%) ili H_2O_2 (17,0-18,3%). Najjači zaštitni efekat u kulturi SH-SY5Y ćelija tretiranih SNP-om je pokazao ekstrakt vrste *V. jacquinii*, dok je najefikasniji u preživljavanju ćelija tretiranih sa H_2O_2 bio ekstrakt vrste *V. teucrium*. Praćenjem produkcije superoksid jona ($\text{O}_2^{\cdot-}$), kao i intenziteta lipidne peroksidacije zaključeno je da je za ispoljeno neuroprotektivno delovanje ekstrakata kod primene SNP kao stresora odgovoran mehanizam "hvatanja" slobodnih radikala, dok kod primene H_2O_2 to nije slučaj.

11. Antiinflamatorni efekat 70%-nih acetonskih ekstrakata određen je primenom *ex vivo* metode zasnovane na praćenju produkcije metabolita 12-HHT, TXB_2 i PGE_2 kao proizvoda ciklooksigenaznog puta i 12-HETE kao proizvoda lipooksigenaznog puta metabolizma arahidonske kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata zaključeno je da je među ispitivanim taksonima *V. urticifolia* pokazala značajno veći potencijal inhibicije COX-1 enzima ($\text{IC}_{50} < 0,40$ mg/ml), dok je najsnažniju inhibiciju produkcije 12-HETE metabolita postigao ekstrakt vrste *V. jacquinii* ($\text{IC}_{50} = 1,07$ mg/ml). Obzirom da svi ispitivani ekstrakti pokazuju značajnu antioksidantnu aktivnost, može se pretpostaviti da takva njihova aktivnost delom doprinosi ispoljenom antiinflamatornom efektu.

12. Antitumorska svojstva ispitivanih ekstraktata procenjivana su kod miševa sa Erlihovim ascitnim tumorom praćenjem parametara kao što su zapremina ascitesa, broj tumorskih ćelija i njihova vijabilnost. U dozi od 100 mg/kg primenjeni ekstrakti su statistički značajno smanjili zapreminu ascitesa, i to ekstrakti vrsta *V. teucrium* i *V. urticifolia* jednako efikasno kao pozitivna kontrola NaCl, dok je ekstrakt vrste *V. jacquinii* ostvario nešto slabiji efekat. Takođe, u grupama životinja koje su primale ekstrakte došlo je do blage redukcije (bez statističkog značaja) broja tumorskih ćelija u poređenju sa kontrolnom grupom, što ukazuje na njihov onkostatki efekat, dok je statistički značajno smanjenje ćelijske vijabilnosti primećeno samo nakon aplikacije *V. urticifolia* ekstrakta.

13. Antibakterijska aktivnost 70%-nih acetonskih ekstrakata herbi *V. jacquinii*, *V. teucrium* i *V. urticifolia* testirana je bujon mikrodilucionim testom prema četiri Gram (+) i tri Gram (-) bakterije. Ispitivani ekstrakti su ispoljili umerenu do slabu aktivnost prema svim testiranim sojevima bakterija. Primećeno je da su G (+) sojevi generalno osetljiviji na delovanje ovog ekstrakta u odnosu na G (-) bakterije. Izuzev u slučaju soja *Enterococcus faecalis*, najizraženiji antibakterijski efekat ispoljio je ekstrakt herbe *V. teucrium*. On je najveću aktivnost pokazao prema bakterijama *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes* (MIK 7,5 mg/ml). U slučaju delovanja ekstrakta vrste *V. urticifolia* najosetljiviji soj je bio *S. aureus*, dok je kod ekstrakta vrste *V. jacquinii* to bio soj *E. cloacae*.

14. Može se zaključiti da doktorska disertacija daje doprinos poznavanju sekundarnih metabolita prisutnih u herbi tri vrste roda *Veronica* (*V. urticifolia*, *V. jacquinii* i *V. teucrium*) što može biti od značaja za dalja hemotaksonomska ispitivanja kako samog roda *Veronica*, tako i familije Plantaginaceae. Pokazana antioksidantna, antiinflamatorna, neuroprotektivna i antitumorska aktivnost ispitivanih taksona otvara put daljim istraživanjima u cilju primene ispitivanih vrsta u fitoterapiji kao prirodnih lekovitih sirovina.

LITERATURA

1. Abu-Ziada ME, Mashaly IA, El-Monem MA, Torky M. Economic potentialities of some aquatic plants growing in North East Nile Delta, Egypt. *J Appl Sci.* 2008; 8: 1395-1405.
2. Adriano DC. *Trace Elements in the Terrestrial Environment.* New York: Springer; 1986.
3. Agelet A, Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part I. General results and new or very rare medicinal plants. *J Ethnopharmacol.* 2001; 77: 57-70.
4. Agrawal SS, Saraswati S, Mathur R, Pandey M. Antitumor properties of boswellic acid against Ehrlich ascites cell bearing mouse. *Food Chem Toxicol.* 2011; 49: 1924-1934.
5. Akbay P, Calis I, İndeger İ, Basaran N, Ahmet Basaran A. In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L. *Phytother Res.* 2002; 16: 593-595.
6. Akihisa T, Kawashima K, Orido M, Akazawa H, Matsumoto M, Yamamoto A, Ogihara E, Fukatsu M, Tokuda H, Fuji J. Antioxidative and melanogenesis-inhibitory activities of caffeoylquinic acids and other compounds from Moxa. *Chem Biodivers.* 2013; 10: 313-327.
7. Al Abdan M. Alfa-lipoic acid controls tumor growth and modulates hepatic redox state in Ehrlich-ascites carcinoma bearing mice. *Sci World J.* 2012; article ID 509838.
8. Albach DC, Chase MW. Paraphyly of *Veronica* (Veroniceae; Scrophulariaceae): Evidence from the internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. *J Plant Res.* 2001; 114: 9-18.
9. Albach DC, Grayer RJ, Jensen SR, Zgħke F, Veitch NC. Acylated flavone glycosides from *Veronica*. *Phytochem.* 2003; 64: 1295-1301.
10. Albach DC, Martínez-Ortega MM, Fischer MA, Chase MW. A new classification of the tribe Veroniceae – problems and a possible solution. *Taxon.* 2004; 53: 429-452.
11. Albach DC, Meudt HM, Oxelman B. Piecing together the "new" Plantaginaceae. *Am J Bot.* 2005a; 92: 297-315.
12. Albach DC, Grayer RJ, Kite GC, Jensen SR. *Veronica*: Acylated flavone glycosides as chemosystematic markers, *Biochem Syst Ecol.* 2005b; 33: 1167-1177.

13. Albach DC, Meudt HM. Phylogeny of *Veronica* in the Southern and Northern Hemispheres based on plastid, nuclear ribosomal and nuclear low-copy DNA. *Mol Phyl Evol.* 2010; 54: 457-471.
14. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Wolter P. *Molecular Biology of the Cell.* New York: Garland Science. 2002.
15. Ali H, Khan E, Anwar Sajad M. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. *Chemosphere.* 2013a; 91: 869-881.
16. Ali S, Farooq MA, Jahangir MM, Abbas F, Bharwana SA, Zhang CP. Effects of chromium and nitrogen form on photosynthesis and anti-oxidative system in barley. *Biol Plant.* 2013b; 57: 758-763.
17. Allaway WH. Agronomic controls over the environmental cycling of trace elements. *Adv Agron.* 1968; 20: 235-274.
18. Altundag E, Ozturk M. Ethnomedicinal studies on the plant resources of east Anatolia, Turkey. *Procedia Soc Behav Sci.* 2011; 19: 765-777.
19. Anand P, Singh B. Flavonoids as lead compounds modulating the enzyme targets in Alzheimer's disease. *Med Chem Res.* 2013; 22: 3061-3075.
20. Angiosperm Phylogeny Group (APG). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc.* 2003; 141: 399-436.
21. Argyropoulou C, Akoumianaki-Ioannidou A, Christodoulakis NS, Fasseas C. Leaf anatomy and histochemistry of *Lippia citriodora* (Verbenaceae). *Aust J Bot.* 2010; 58: 398-409.
22. Avila JG, De Liverant JG, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, De Viavar AR. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 66: 75-78.
23. Ayissi Owona B, Njayou NF, Laufer S, Moundipa PF, Schluesener HJ. A fraction of stem bark extract of *Entoda africana* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells. *J Ethnopharmacol.* 2013; 149: 162-168.
24. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006; 99: 191-203.

25. Barreira JCM, Dias MI, Živković J, Stojković D, Soković M, Santos-Buelga C, Ferreira ICFR. Phenolic profiling of *Veronica* spp. grown in mountain, urban and sandy soil environments. *Food Chem.* 2014; 163: 275-283.
26. Bayoumi TA. Bioaccumulation of ¹³⁷Cs and ⁶⁰Co from radioactive waste streams using *Veronica anagallis-aquatica*. *BioTech Ind J.* 2012; 6: 282-288.
27. Beara I. Fitohemijski skrining i procena antioksidantnog i antiinflamatornog potencijala sekundarnih biomolekula u vrstama roda *Plantago* L. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu; Prirodno-matematički fakultet; 2010.
28. Beers RFJ, Sizer JW. Spectrophotometric method for measuring of break down of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem.* 1950; 195: 133-140.
29. Belanović S, Knežević M, Miličić B, Čorović M. Odnos teških metala i mikroflora u nekim zemljištima Stare planine. *Glasnik šumarskog fakulteta.* 2004; 89: 53-61.
30. Benito PB, Lanza AMD, Sen AMS, Galindez JDS, Matellano LF, Gómez AS, Martínez MJA. Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med.* 2000; 66: 324-328.
31. Bergmayer UH. *Methods of enzymatic analysis.* Weinheim: Verlag Chemie; 1970.
32. Beuthler E, Duron O, Kelly B. Improved methods for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med.* 1983; 61: 882-889.
33. Biringanine G, Chiarelli MT, Faes M, Duez P. A validation protocol for the HPTLC standardization of herbal products: Application to the determination of acteoside in leaves of *Plantago palmata* Hook. f.s. *Talanta.* 2006; 69: 418-424.
34. Buege AL, Aust DS. Microsomal lipid peroxidation. U: Fleisher S, Parker L, urednici. *Methods in Enzymology.* New York: Academic Press; 1978.
35. Carrillo-Ocampo D, Bazaldúa-Gómez S, Bonilla-Barbosa JR, Aburto-Amar R, Rodríguez-Lopez V. Anti-inflammatory activity of iridoids and verbascoside isolated from *Castilleja tenuiflora*. *Molecules.* 2013; 18: 12109-12118.
36. Cadenas E, Davies KJA. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Rad Biol Med.* 2000; 29: 222-230.
37. Chaney RL, Malik M, Li YM, Brown SL, Brewer EP, Angle JS, Baker AJM. Phytoremediation of soil metals. *Current Opin Bitech.* 1997; 8: 279-284.
38. Chari VM, Grayer-Barkmeijer RJ, Harborne JB, Österdahlk BG. An acylated allose-containing 8-hydroxyflavone glycoside from *Veronica filliformis*. *Phytochem.* 1981; 20: 1977-1979.

39. Chen JH, Ho CT. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J Agric Food Chem.* 1997; 45: 2374-2378.
40. Chen WC, Kuo TH, Tzeng YS, Tsai YC. Baicalin induces apoptosis in SW620 human colorectal carcinoma cells *in vitro* and suppresses tumor growth *in vivo*. *Molecules.* 2012; 17: 3844-3857.
41. Cheng F, Lu Y, Zhong X, Song W, Wang X, Sun X, Qin J, Guo S, Wang Q. Baicalin therapeutic time window of neuroprotection during transient focal cerebral ischemia and its antioxidative effects *in vitro* and *in vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; article ID 120261.
42. Chin PTY, Stults FH, Tappel AL. Purification of rat lung soluble glutathione peroxidase. *Biochem Biophys Acta.* 1976; 445: 558-660.
43. Chiu YW, Lin TH, Huang WS, Teng CY, Lion YS, Kuo WH, Lin WL, Huang HI, Tung JN, Huang CY, Lin JY, Wang WH, Hwang JM, Kuo HC. Baicalein inhibits the migration and invasive properties of human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011; 255: 316-326.
44. Choi JH, Kim DW, Yun N, Choi JS, Islam MdN, Kim YS, Lee SM. Protective effects of hyperoside against carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *J Nat Prod.* 2011; 74: 1055-1060.
45. Choppala G, Bolan N, Lamb D, Kunhikrishnan A. Comparative sorption and mobility of Cr(III) and Cr(VI) species in a range of soils: Implications to bioavailability. *Water Air Soil Poll.* 2013; 224: 1-12.
46. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age.* 1997; 20: 127-140.
47. Clark G. Staining procedures. Williams&Wilkins, Baltimore; 1981.
48. Clifford MN, Knight S, Kuhnert A. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 3821-3832.
49. Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J. Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem.* 1986; 152: 136-140.
50. Crişan G, Tămas M, Miclăuş V, Krusz T, Sandor V. A comparative study of some *Veronica* species. *Rev Med Sci Med Natur Iasi.* 2007; 111: 280-284.

51. Crişan G, Vlase L, Balica G, Muntean D, Ştefănescu C, Păltinean R, Tămas M, Leucuta S. LC/MS analysis of aucubin and catalpol in some *Veronica* species. *Farmacia*. 2010; 58: 237-242.
52. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helv Chim Acta*. 1997; 80: 1144-1152.
53. Cushnie TPT, Hamilton VES, Lamb AJ. Assessment of the antibacterial activity of selected flavonoids and consideration of discrepancies between previous reports. *Microbiol Res*. 2003; 158: 281-289.
54. Ćebović T, Spasić S, Popović M, Borota J, Leposavić G. The European mistletoe (*Viscum album* L.) grown on plums extract inhibits CCl₄-induced liver damage in rats. *Fresenius Environ Bull*. 2006; 15: 393-400.
55. Ćebović T. Uticaj ekstrakata imele (*Viscum album* L.) sa različitih domaćina na stvaranje slobodnih radikala kiseonika i aktivnost antioksidantnih enzima. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 2008.
56. Čajkanović V. Rečnik srpskih narodnih verovanja o biljkama. Đurić V. (rukopis priredio i dopunio). Beograd: Srpska književna zadruga; 1985.
57. Daikoku T, Wang D, Tranguch S, Morrow JD, Orsulic S, DuBois RN, Dey SK. Cyclooxygenase-1 is a potential target for prevention and treatment of ovarian epithelial cancer. *Cancer Res*. 2005; 65: 3735-3744.
58. DalCorso G, Manara A, Furini A. An overview of heavy metal challenge in plants: from roots to shoots. *Metallomics*. 2013; 5: 1117-1132.
59. Da Silva MMB, Santana ASCO, Pimentel RMM, Silva FCL, Randau KP, Soares LAL. Anatomy of leaf and stem of *Erythrina velutina*. *Braz J Pharmacog*. 2013; 23: 200-206.
60. Datta K, Sinha S, Chattopadhyay P. Reactive oxygen species in health and disease. *Natl Med J India*. 2000; 13: 304-310.
61. Dawoud GT, El-Morsy TH. Phytochemical and microbiological studies of *Petrea volubilies* L. *J Am Sci*. 2012; 8: 202-208.
62. De Beer JJJ, Van Wyk BE. An ethnobotanical survey of the Agter-Hantam, Northern Cape Province, South Africa. *S Afr J Bot*. 2011; 77: 741-754.

63. Deepak M, Handa SS. Quantitative determination of the major constituents of *Verbena officinalis* using high performance thin layer chromatography and high pressure liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 2000; 11: 351-355.
64. Delazar A, Sabzevari A, Mojarrab M, Nazemiyeh H, Esuaashari S, Nahar L, Razavi SM, Sarker SD. Free-radical-scavenging principles from *Phlomis caucasica*. *J Nat Med.* 2008; 62: 464-466.
65. Del Bubba M, Ancillotti C, Checchini L, Ciofi L, Fibbi D, Gonnelli C, Mosti S. Chromium accumulation and changes in plant growth, selected phenolics and sugars of wild type and genetically modified *Nicotiana langsdorfii*. *J Hazard Mater.* 2013; 262: 394-403.
66. De Natale A, Pollio A. Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *J Ethnopharmacol.* 2007; 109: 295-303.
67. Deng M, ju XD, Fan DS, Tu PF, Zhang J, ShenY. Verbascoside rescues the SH-SY5Y neuronal cells from MPP⁺ - induced apoptosis. *Chinese Pharm Bull.* 2008; 24: 1297-1301.
68. Diaz AM, Abad MJ, Fernandez L, Silvan AM, De Santos J, Bermejo P. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: *in vitro* anti-inflammatory activity. *Life Sci.* 2004; 74: 2515-2526.
69. Diklić N. *Veronica* L. U: Josifović M, urednik. *Flora SR Srbije*, Vol. 6. Beograd: Srpska akademija nauka i umetnosti; 1974. str. 175-220.
70. Dinda B, Debnath S, Harigaya Y. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chem Pharm Bull.* 2007; 55: 689-728.
71. Dos Santos MD, Almeida MC, Lopes NP, De Souza GEP. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29: 2236-2240.
72. Dudić B, Rakić T, Šinžar-Sekulić J, Atanacković V, Stevanović B. Differences of metal concentrations and morpho-anatomical adaptations between obligate and facultative serpentinophytes from Western Serbia. *Arch Biol Sci.* 2007; 59: 341-349.
73. Đukić MM. Oksidativni stres: slobodni radikali, prooksidansi, antioksidansi. Beograd: Mono i Manjana. 2008.
74. Emam SS. Glycosides of *Verbascum letourneuxii* asch. and its antioxidant activity. *Aust J Basic Appl Sci.* 2010; 4: 5038-5050.

75. Emerit J, Edeas M, Bricaire F. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomed Pharmacother.* 2004; 58: 39-46.
76. Esposito E, Dal Toso R, Pressi G, Bramanti P, Meli R, Cuzzocrea S. Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2010; 381: 93-105.
77. Esquivel-Chirino C, Esquivel-Soto J, Morales-González JA, Sánchez DM, Ventura-Gallegos JV, Hernandez-Mora LE, Zentella-Dehesa A. Inflammatory, Environmental, Oxidative Stress in Tumoral Progression. U: Morales-González JA, urednik. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases – a role for antioxidants*; 2013. str. 187-209.
78. Etuk EU, Ugwah MO, Ajagbonna OP, Onyeyilli PA. Ethnobotanical survey and preliminary evaluation of medicinal plants with antidiarrhoea properties in Sokoto state, Nigeria. *J Med Plant Res.* 2009; 3: 763-766.
79. Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM. Redox signalling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol.* 2008; 152: 415-422.
80. Ferreres F, Llorach R, Gil-Izquierdo A. Characterization of the interglycosidic linkage in di-, tri-, tetra- and pentaglycosylated flavonoids and differentiation of positional isomers by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom.* 2004; 39: 312-321.
81. Furr M, Mahlberg PG. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *J Nat Prod (Lloydia).* 1981; 44: 153-159.
82. Gálvez M, Martín-Cardero C, Jesús Ayuso M. Iridoids as DNA topoisomerase I poisons. *J Enz Inhib Med Chem.* 2005; 20: 389-392.
83. Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide – induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. *Pharmacol Res.* 2001; 43: 173-178.
84. Gao Y, Pu XP. Neuroprotective effect of acteoside against rotenone-induced damage of SH-SY5Y cells and its possible mechanism. *Chin Pharmacol Bull.* 2007; 23: 161-165.
85. Georgiev M, Alipieva K, Orhan I, Abrashev R, Denev P, Angelova M. Antioxidant and cholinesterases inhibitory activities of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. and its phenylethanoid glycosides. *Food Chem.* 2011; 128: 100-105.

86. Ghimre BK, Seong ES, Kim EH, Ghimeray AK, Yu CY, Ghimire BK, Chung IM. A comparative evaluation of the antioxidant activity of some medicinal plants popularly used in Nepal. *J Med Plants Res.* 2011; 5: 1884-1891.
87. Goldberg DM, Spooner RJ. Glutathione reductase. U: Bergmayer HU, urednik. *Methods of Enzymatic Analysis.* Basel: Weinheim; 1983.
88. Gomes NJM, Rezende CDM, Fontes SP, Hovell AMC, Landgraf RG, Matheus ME, Pinto ADC, Fernandes PD. Antineoplastic activity of *Capaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 119: 179-184.
89. Gómez-Lechón MJ, O'Connor E, Castell JV, Jover R. Sensitive markers used to identify compounds that trigger apoptosis in cultured hepatocytes. *Tox Sci.* 2002; 65: 299-308.
90. Grayer RJ, Kite GC, Aou-Zaid M, Archer LJ. The application of atmospheric pressure chemical ionisation liquid chromatography – mass spectrometry in the chemotaxonomic study of flavonoids: characterisation of flavonoids from *Ocimum gratissimum* var. *gratissimum*. *Phytochem Anal.* 2000; 11: 257-267.
91. Grayer-Barkmeijer RJ. A chemosystematic study of *Veronica*: iridoid glucosides. *Biochem Syst Ecol.* 1973; 1: 101-110.
92. Grayer-Barkmeijer RJ. Flavonoids in *Parahebe* and *Veronica*: A chemosystematic study. *Biochem Syst Ecol.* 1978; 6: 131-137.
93. Greene ER, Huang S, Serhan CN, Panigrahy D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoides. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2011; 96: 27-36.
94. Gründemann C, Garcia-Käufer M, Sauer B, Stangenberg E, Könczöl M, Merfort I, Zehl M, Huber R. Traditionally used *Veronica officinalis* inhibits proinflammatory mediators via the NF- κ B signalling pathway in a human lung cell line. *J Ethnopharmacol.* 2013; 145: 118-126.
95. Guerin HP, Delaveau PG, Paris RR. Localisation histochemiques 11: procedes simples de localisation de pigments Bavoniques. Application a quelques Phanerogames. *Bull Soc Bot France.* 1971; 118: 29-36.
96. Guo M, Zhang N, Li D, Liang D, Liu Z, Li F, Fu Y, Cao Y, Deng X, Yang Z. Baicalin plays an anti-inflammatory role through reducing nuclear factor- κ B and p38 phosphorylation in *S. aureus* – induced mastitis. *Int. Immunopharmacol.* 2013; 16: 125-130.

97. Gusev NF, Glumov GA, Teslov SV. Flavonoids of *Veronica officinalis*. *Chem Nat Comp*. 1975; 11: 259.
98. Gusev NF, Glumov GA, Guseva NM, Teslov SV. Flavonoids of *Veronica spicata*. *Chem Nat Comp*. 1978; 13: 588-589.
99. Gusev NF, Nemereshina ON. On the study of flavonoids *Veronica incana* L. *Urals. Bulletin of the Orenburg State University*. 2005; 12: 96-99.
100. Gusev NF, Nemereshina ON, Petrova GV, Sychev MV. Evaluation of antibacterial activity and biologically active substances of herbal drugs from *Veronica* L. *Russ J Biopharm*. 2012; 4: 17-22.
101. Güvenc A, Okada Y, Küpeli Akkol E, Duma H, Okuyama T, Çalış I. Investigations of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and aldose reductase inhibitory activities of phenolic compounds from *Sideritis brevibracteata*. *Food Chem*. 2010; 118: 686-692.
102. Hajimehdipoor H, Shekardi M, Hamedami MP, Abedi Z, Zahedi H, Gohari AR. A validated HPTLC-densitometric method for assay of aucubin in *Vitex agnus-castus* L. 2011; 10: 705-710.
103. Hänsch R, Mendel RR. Physiological function of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr Opin Plant Biol*. 2009; 12: 259-266.
104. Hanel H, Raether W. A more sophisticated method of determining the fungicidal effect of water-insoluble preparations with a cell harvester, using miconazole as an example. *Mycoses*. 1988; 31: 148-154.
105. Hardman R, Sofowora EA. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin in plant tissues. *Stain Technol*. 1972; 47: 205-208.
106. Harput US, Saracoglu I, Inoue M, Ogihara I. Anti-inflammatory and cytotoxic activities of five *Veronica* species. *Biol Pharm Bull*. 2002a; 25: 483-486.
107. Harput US, Saracoglu I, Inoue M, Ogihara Y. Phenylethanoid and iridoid glycosides from *Veronica persica*. *Chem Pharm Bull*. 2002b; 50: 869-871.
108. Harput US, Saracoglu I, Nagatsu A, Ogihara Y. Iridoid glucosides from *Veronica hederifolia*. *Chem Pharm Bull*. 2002c; 50: 1106-1108.
109. Harput US, Nagatsu A, Ogihara Y, Saracoglu I. Iridoid glucosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa*. *Z Naturforsch C*. 2003; 58: 481-484.

110. Harput US, Varel M, Nagatsu A, Saracoglu I. Acylated iridoid glucosides from *Veronica anagallis-aquatica*. *Phytochem.* 2004; 65: 2135-2139.
111. Harput US, GençY, Khan N, Saracoglu I. Radical scavenging effects of different *Veronica* species. *Rec Nat Prod.* 2011; 5: 100-107.
112. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Hattori T, Suzuki Y. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (2): Effect of acteoside on leukocyte accumulation in the glomeruli of nephritic rats. *Jpn J Pharmacol.* 1994; 66: 47-51.
113. Hayashi K, Nagamatsu T, Ito M, Yagita H, Suzuki Y. Acteoside, a component of *Stachys sieboldii* MIQ, may be a promising antinephritic agent (3): Effect of acteoside on expression of intercellular adhesion molecule-1 in experimental nephritic glomeruli in rats and cultured endothelial cells. *Jpn J Pharmacol.* 1996; 70: 157-168.
114. Herbert JM, Maffrand JP, Taoubi K, Augerean JM, Fourastle I, Gleye J. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. *J Nat Prod;* 1991; 54: 1595-1600.
115. Ho JN, Jee YH, Park JS, Jun WJ, Kim HK, Hong BS, Shin DH, Cho HY. Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. *Biol Pharm Bull.* 2005; 28: 1244-1248.
116. Hultin E, Torssell K. Alkaloid-screening of Swedish plants. *Phytochem.* 1965; 4: 425-433.
117. Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler JP. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot.* 1998; 49: 953-965.
118. Innocenti M, La Marca G, Malvagia S, Giaccherini C, Vincieri FF, Mulinacci N. Electrospray ionisation tandem mass spectrometric investigation of phenylpropanoids and secoiridoids from solid olive residue. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2006; 20: 2013-2022.
119. Jakšić SP, Vučković SM, Vasiljević SL, Grahovac NL, Popović VM, Šunjka DB, Dozet GK. Akumulacija teških metala u *Medicago sativa* L. i *Trifolium pratense* L. na kontaminiranom fluvisolu. *Hem Ind.* 2013; 67: 95-101.
120. Janković T, Menković N, Zdunić G, Beara I, Balog K, Šavikin K, Mimica-Dukić N. Quantitative determination of aucubin in seven *Plantago* species using HPLC, HPTLC, and LC-ESI-MS methods. *Analyt Chem.* 2010; 43: 2487-2495.

121. Janković T, Zdunić G, Beara I, Balog K, Pljevljakušić D, Stešević D, Šavikin K. Comparative study of some polyphenols in *Plantago* species. *Biochem Syst Ecol.* 2012; 42: 69-74.
122. Jarić S, Popović Z, Mačunković-Jocić M, Đurđević L, Mijatović M, Kradžić B, Mitrović M, Pavlović P. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Saerbia). *J Ethnopharmacol.* 2007; 111: 160-175.
123. Jensen SR, Albach DC, Ohno T, Grayer RJ. *Veronica*: iridoids and cornoside as chemosystematic markers. *Biochem Syst Ecol.* 2005; 33: 1031-1047.
124. Jensen SR, Gotfredsen CH, Grayer RJ. Unusual iridoid glycosides in *Veronica* sects. *Hebe* and *Labiatoides*. *Biochem Syst Ecol.* 2008; 36: 207-215.
125. Jensen SR, Gotfredsen CH, Harput US, Saracoglu I. Chlorinated iridoid glucosides from *Veronica longifolia* and their antioxidant activity. *J Nat Prod.* 2010; 73: 1593-1596.
126. Jensen SR, Wieland Opitz SE, Gotfredsen CH. A new phenylethanoid triglycoside in *Veronica beccabunga* L. *Biochem Syst Ecol.* 2011; 39: 193-197.
127. Jeon H. Anti-inflammatory activity of *Veronica peregrina*. *Nat Prod Sci.* 2012; 17: 142-146.
128. Ji L, Jiang P, Lu B, Sheng Y, Wang X, Wang Z. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol protects acetaminophen – induced liver injury and its mechanism. *J Nutr Biochem.* 2013; 24: 1911-1919.
129. Jin L, Xue HY, Jin LJ, Li SY, Xu YP. Antioxidant and pancreas-protective effect of aucubin on rats with streptozotocin-induced diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2008; 582: 162-167.
130. Johansen DA. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, London. 1940.
131. Johansen M, Larsen TS, Mettebjerg MA, Gotfredsen CH, Jensen SR. Chemical markers in *Veronica* sect. *Hebe*. *BiochemSyst Ecol.* 2007; 35: 614-620.
132. Jovanović Z. Oksidativni stres u patogenezi neurodegenerativnih oboljenja. *Med čas.* 2011; 45: 16-23.
133. Kabata-Pendias A, Pendias H. *Trace elements in soil and plants*. Boca Raton: CRC Press; 2001.
134. Kadović R, Košanin O, Belanović S, Knežević M. Teški metali u organskom sloju zemljišta bukovih šuma Srbije. *Bull Fac Forestry.* 2005; 92: 55-67.

135. Karioti A, Bolognesi L, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis of the constituents of aqueous preparations of *Stachys recta* by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2010; 53: 15-23.
136. Kaurinović B, Popović M, Vlasisavljević S, Rašeta M. Antioxidant activities of *Melittitis melissophyllum* L. (Lamiaceae). *Molecules.* 2011; 16: 3152-3167.
137. Kazakou E, Dimitrakopoulos PG, Baker AJM, Reeves AP, Troumbis AY. Hypothesis, mechanisms and trade-offs of tolerance and adaptation to serpentine soils: From species to ecosystem level. *Biol Rev.* 2008; 83: 495-508.
138. Khansari N, Shakiba Y, Mahmoudi M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Rec Pat Inflammation Allergy Drug Discov.* 2009; 3: 73-80.
139. Kim YC. Neuroprotective phenolics in medicinal plants. *Arch Pharma Res.* 2010; 33: 1611-1632.
140. Kim SJ, Um JY, Hong SH, Lee JY. Antiinflammatory activity of hyperoside through the suppression of nuclear factor- κ B activation in mouse peritoneal macrophages. *Am J Chin Med.* 2011; 39: 171-181.
141. Kimura Y, Okuda H, Nishibe S, Arichi S. Effects of caffeoyl glycosides on arachidonate metabolism in leukocytes. *Planta Med.* 1987; 53: 148-153.
142. Kiss B, Popa DS, Crişan G, Bojită M, Loghin F. The evaluation of antioxidant potential of *Veronica officinalis* and *Rosmarinus officinalis* extracts by monitoring malondialdehyde and glutathione levels in rats. *Farmacia.* 2009; 57: 432-440.
143. Konjević R, Tatić B. Rečnik naziva biljaka. Beograd: NNK Internacional; 2006.
144. Koo KA, Kim SH, Oh TH, Kim YC. Acteoside and its aglycones protect primary cultures of rat cortical cells from glutamate – induced excitotoxicity. *Life Sci.* 2006; 79: 709-716.
145. Kostadinova EP, Alipieva KI, Kokubun T, Taskova RM, Handjieva NV. Phenylethanoids, iridoids and a spirostanol saponin from *Veronica turrilliana*. *Phytochem.* 2007; 68: 1321-1326.
146. Kovacsova M, Barta A, Parohova J, Vrankova S, Pechanova O. Neuroprotective mechanisms of natural polyphenolic compounds. *Act Nerv Super Rediviva.* 2010; 52: 181-186.
147. Kovačević N. Osnovi farmakognozije. Beograd: Srpska školska knjiga; 2000.

148. Kukić-Marković J. Hemijska i farmakološka karakterizacija *Stachys anisochila*, *S. beckeana*, *S. plumosa* i *S. alpina* subsp. *dinarica* (Lamiaceae). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 2013.
149. Kulinsky VI, Kolesnichenko LS. The glutathione system. II. Other enzymes, thiol – disulfide metabolism, inflammation, and immunity, functions. *Biochem (Mosc) Suppl Ser B: Biomed Chem.* 2009; 3: 211-220.
150. Kümler I, Brünner N, Stenvang J, Balsvlev E, Nielsen DL. A systematic review on topoisomerase I inhibition in the treatment of metastatic breast cancer. *Breast Canc Res Treat.* 2013; 138: 347-358.
151. Kuntić V, Brborić J, Holclajtner-Antunović I, Uskoković-Marković S. Evaluating the bioactive effects of flavonoid hesperidin – A new literature data survey. *Vojnosanit Pregl.* 2014; 71: 60-65.
152. Küpeli E, Harput US, Varel M, Yesilada E, Saracoglu I. Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102: 170-176.
153. Küpeli E, Şahin EP, Yeşilada E, Çaliş I, Ezer N. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity evaluation of phenolic compounds from *Sideritis stricta*. *Z Naturforsch.* 2007; 62c: 519-529.
154. Kwak JH, Kim JH, Lee KH, Kang Sc, Zee OP. Antioxidative iridoid glycosides and phenolic compounds from *Veronica peregrina*. *Arch Pharm Res.* 2009; 32: 207-213.
155. Lee HH, Yang LL, Wang CC, Hu SY, Ghang SF, Lee YH. Differential effects of natural polyphenols on neuronal survival in primary cultured central neurons against glutamate- and glucose deprivation-induced neuronal death. *Brain Res.* 2003; 986: 103-113.
156. Lee S, Sang HJ, Yeon SL, Yamada M, Kim BK, Ohuchi K, Kuk HS. Antiinflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. *Arch Pharma Res.* 2004; 27: 628-632.
157. Lee KJ, Woo ER, Choi CY, Shin DW, Lee DG, You HJ, Jeong HG. Protective effect of acteoside on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. *Life Sci.* 2004; 74: 1051-1064.
158. Lee JH, Kim GH. Evaluation of antioxidant and inhibitory activities of different subclasses flavonoids on enzymes for rheumatoid arthritis. *J Food Sci.* 2010; 75: 212-217.

159. Leporatti ML, Ivancheva S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. *J Ethnopharmacol.* 2003; 87: 123-142.
160. Lesjak M. Biopotencijal i hemijska karakterizacija ekstrakata i etarskih ulja vrsta roda *Juniperus* L. (Cupressaceae). Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu; Prirodno-matematički fakultet; 2011.
161. Li X, Chapple C. Understanding lignification: challenges beyond monolignol biosynthesis. *Plant Physiol.* 2010; 154: 449-452.
162. Li BQ, Fu T, Gong WH, Dunlop N, Kung HF, Yan Y, Kang J, Wang JM. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacol.* 2000; 49: 295-306.
163. Li J, Huang X, Lai D, Li J, Sun W. Simultaneous determination of four major iridoid glycosides in *Scrophularia ningpoensis* by CE. *Chromatographia.* 2008; 63: 989-993.
164. Li L, Tsao R, Liu Z, Liu S, Yang R, Young JC, Zhu H, Deng Z, Xie M, Fu Z. Isolation and purification of acteoside and isoacteoside from *Plantago psyllium* L. by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A.* 2005; 1063: 161-169.
165. Li L, Tsao R, Yang R, Liu C, Young JC, Zhu H. Isolation and purification of phenylethanoid glycosides from *Cistanche deserticola* by high-speed counter-current chromatography. *Food Chem.* 2008; 108: 702-710.
166. Li R, Yuan C, Dong C, Shuang S, Choi MMF. *In vivo* antioxidative effect of isoquercitrin on cadmium-induced oxidative damage to mouse liver and kidney. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.* 2011; 383: 437-445.
167. Li Z, Tang T, Liang S, Ning X, Bai M, Wu H. The synthesis and storage sites of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea*. *Am J Plant Sci.* 2012; 3: 551-558.
168. Lim W, Kim JH, Gook E, Kim J, Ko Y, Kim I, Kwon H, Lim H, Jung B, Yang K, Choi N, Kim M, Kim S, Choi H, Kim O. Inhibition of mitochondria – dependent apoptosis by 635 – nm irradiation in sodium nitroprusside – treated SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47: 850-857.
169. Lindsay WL, Schwab AP. The chemistry of iron in soils and its availability to plants. *J Plant Nutr.* 1982; 5: 821-840.
170. Lison : Histochemie et cytochemie animales: principes et methodes. Gauthier-Villars, Paris; 1960.

171. Liu Y, Wu W, Wang S, Kuang Z, Li R, Huang Y. The influence of CP_n infection on the formation and stability of atherosclerosis plaque and the intervention of baicalin. *Lishizhen Med Mat Med Res.* 2006; 17: 2377-2379.
172. Liu YF, Gao F, Li XW, Jia RH, Meng XD, Zhao R, Jing YY, Wang Y, Jiang W. The anticonvulsant and neuroprotective effects of baicalin on pilocarpine induced epileptic model in rats. *Neurochem Res.* 2012a; 1670-1680.
173. Liu MQ, Liu JF. Structure and histochemistry of the glandular trichomes on the leaves of *Isodon rubescens* (Lamiaceae). *Afr J Biotechnol.* 2012; 11: 4069-4078.
174. Liu RL, Xiong QJ, Shu Q, Wu WN, Cheng J, Fu H, Wang F, Chen JG, Hu ZL. Hyperoside protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via nitric oxide signal pathway. *Brain Res.* 2012b; 1469: 164-173.
175. López-Munguía A, Hernández-Romero Y, Pedraza-Chaverri J, Miranda-Molina A, Regla I, Martínez A, Castillo E. Phenylpropanoid glycoside analogues: enzymatic synthesis, antioxidant activity and theoretical study of their free radical scavenger mechanism. *PLoS One.* 2011; 6: e20115.
176. Lu SC. Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta Gen Subjects.* 2013; 1830: 3143-3153.
177. Luo X, Ma M, Chen B, Yao S, Wan Z, Yang D, Hang H. Analysis of nine bioactive compounds in *Eucommia ulmoides* Oliv. and their preparation by HPLC-photodiode array detection and mass spectrometry. *J Liq Chromatogr R T.* 2004; 27: 63-81.
178. Mackova Z, Kablovska R, Lapcik O. Distribution of isoflavonoids in non-leguminous taxa – an update. *Phytochem.* 2006; 67: 849-855.
179. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2005; 31: 603-617.
180. Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N. Protective effects of flavonol isoquercitrin, against 6-hydroxy dopamine (6-OHDA)-induced toxicity in PC12 cells. *BMC Res Notes.* 2014; 7:2-8.
181. Maggi A, Taskova R, Gotfredsen CH, Bianco A, Jensen SR. Chemical markers in *Veronica* sect. *Hebe* III. *Biochem Syst Ecol.* 2009; 37: 731-736.
182. Mallick S, Sinam G, Kumar Mishra R, Sinha S. Interactive effects of Cr and Fe treatments on plants growth, nutrition and oxidative status in *Zea mays* L. *Ecotox Environ Saf.* 2010; 73: 987-995.

183. Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV-radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Rad Biol Med.* 2006; 40: 1603-1614.
184. Marchenko A, Kintya P, Wyrzykiewicz B, Gorincioi E. Steroidal glycosides from *Veronica chamaedrys* L. Part I. The structures of chamaedrosides C, C1, C2, E, E1 and E2. *Nat Prod Comm.* 2012; 7: 565-568.
185. Marin PD. Biohemijska i molekularna sistematika biljaka. NNK Internacional, Beograd. 2003.
186. Marković B, Obradinović Z, Veselinović M, Anđelković J, Stevanović P, Rakić M. Osnovna geološka karta SFRJ, 1:100 000. Beograd: Savremeni geološki zavod; 1984.
187. Materska M. Quercetin and its derivatives: Chemical structure and bioactivity – a review. *Pol J Food Nutr Sci.* 2008; 58: 407-413.
188. McFadden DW, Riggs DR, Jackson BJ, Cunningham C. Additive effects of COX-1 and COX-2 inhibition on breast cancer *in vitro*. *Int J Oncol.* 2006; 29: 1019-1023.
189. Mehrvarz SS, Mahmoodi NO, Asadian R, Khamki GB. Iridoid and flavonoid patterns of the genus *Veronica* sect. *Alsinebe* subsect. *Agrestis* (Benth.) Stroh (Lamiales) and their systematic significance. *Aust J Crop Sci.* 2008; 1: 1-5.
190. Menković N, Šavikin K, Tasić S, Zdunić G, Stešević D, Milosavljević S, Vinček D. Ethnobotanical study on traditional uses of wild medicinal plants in Prokletije Mountains (Montenegro). *J Ethnopharmacol.* 2011; 133: 97-107.
191. Mezyk Z, Wieckowski SK. Studies of trace element content in selected medical herbs. *Pol J Environ Sci.* 1999; 8: 129-130.
192. Moreno-Escobar JA, Alvarez L, Rodríguez-López V, Bahena SM. Cytotoxic glucosydic iridoids from *Veronica americana*. *Phytochem Lett.* 2013; 6: 610-613.
193. Mori M, Kondo T, Yoshida K. Anthocyanin components and mechanism for color development in blue *Veronica* flowers. *Biosci Biotech Biochem.* 2009; 73: 2329-2331.
194. Mosaddegh M, Naghibi F, Moazzeni H, Pirani A, Esmaili S. Ethnobotanical survey of herbal remedies traditionally used in Kohghiluyeh va Boyer Ahmad province of Iran. *J Ethnopharmacol.* 2012; 141: 80-95.
195. Moure A, Cruz JM, Franco D, Dominguez JM, Siherio J, Dominguez H. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem.* 2001; 72: 145-171.
196. Natella F, Nardini M, Di Felica M, Scaccini C. Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: Structure-activity relation. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 1453-1459.

197. Nikolova M, Berkov S, Ivancheva S. Determination of apigenin content in some Bulgarian *Veronica* species. 7th Symposium on Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions. 2002; Proceedings: 77-81.
198. Nikolova MT, Taskova RM, Peev DR. Exudate flavonoid aglycones of *Veronica*: Ecological and systematic implications. *Biochem Syst Ecol.* 2005; 33: 1258-1268.
199. Nikolova M. Screening of radical scavenging activity and polyphenol content of Bulgarian plant species. *Phcog Res.* 2011; 3: 256-259.
200. Novy P, Urban J, Leuner O, Vadlejch J, Kokoska L. *In vitro* synergistic effects of baicalin with oxytetracycline and tetracycline against *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1298-1300.
201. Oboh G, Agunloye OM, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO, Adefegha SA. Comparative study on the inhibitory effect of caffeic and chlorogenic acids on key enzymes linked to Alzheimer's disease and some pro-oxidant induced oxidative stress in rats brain in-vitro. *Neurochem Res.* 2013; 38: 413-419.
202. Obratov-Petković D, Bjedov I, Belanović S. Teški metali u listovima *Hypericum perforatum* L. na serpentinskim zemljištima Srbije. *Bull Fac Forestry.* 2008; 98: 143-154.
203. Ohno I, Inoue M, Ogihara Y, Saracoglu I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biol Pharm Bull.* 2002; 25: 666-668.
204. Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. Hydrogen peroxide-mediated neuronal cell death induced by an endogenous neurotoxin, 3-hydroxykynurenine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 12553-12558.
205. Olennikov DN, Tankhaeva LM, Stolbikova AV, Petrov EV. Phenylpropanoids and polysaccharides from *Plantago depressa* and *P. media* growing in Buryatia. *Chem Nat Compd.* 2011; 47; 165-169.
206. Olmstead RG, De Pamphilis C, Wolfe AD, Young ND, Elisons WJ, Reeves PA. Disintegration of the Scrophulariaceae. *Am J Bot.* 2001; 88: 348-361.
207. Ono E, Ruike M, Iwashita T, Nomoto K, Fukui Y. Co-pigmentation and flavonoid glycosyltransferases in blue *Veronica persica* flowers. *Phytochem.* 2010; 71: 726-735.
208. Orčić D. Vrste tribusa Scandiceae (Apiaceae Lindley 1836, subfam. Apioideae). Potencijalni izvor biološki i farmakološki aktivnih sekundarnih biomolekula. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu; Prirodno – matematički fakultet. 2010.

209. Ozaslan M, Karagoz ID, Kilic IH, Guldur ME. Ehrlich ascites carcinoma. *Afr J Biotech.* 2011; 10: 2375-2378.
210. Ozipek M, Saracoglu I, Kojima K, Ogihara Y, Calis I. Fuhsioside, a new phenylethanoid glucoside from *Veronica fuhsii*. *Chem Pharm Bull.* 1999; 47: 561-562.
211. Ozipek M, Saracoglu I, Ogihara Y, Çaliş I. Nautigenin-type steroidal saponins from *Veronica fuhsii* and *V. multifida*. *Z Naturforsch.* 2002; 57: 603-608.
212. Pan MH, Lai CS, Ho CT. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* 2010; 1: 15-31.
213. Pardo De Santayana M, Blanco E, Morales R. Plants known as t  in Spain: An ethnopharmacobotanical review. *J Ethnopharmacol.* 2005; 98: 1-19.
214. Park KS, Kim BH, Chang IM. Inhibitory potencies of several iridoids on cyclooxygenase-1, cyclooxygenase-2 enzymes activities, tumor necrosis factor- α and nitric oxide production *in vitro*. *Evid Based Complement Altern Med.* 2010; 7: 41-45.
215. Pavlović M. Proučavanje sastojaka *Anthemis triumfetti* (Asteraceae) i poređenje sa drugim vrstama podroda *Cota*. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Farmaceutski fakultet; 2008.
216. Pedersen P, Gotfredsen CH, Wagstaff SJ, Jensen SR. Chemical markers in *Veronica* sect. *Hebe* II. *Biochem Syst Ecol.* 2007; 35: 777-784.
217. Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J Nutr.* 2003; 133: 2812-2819.
218. Pendota SC, Aderagba MA, Ndhala AR, Van Staden J. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salvifolia* (L.) Lam. leaf extract and isolated compounds. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 148: 515-520.
219. Peng-Fei L., Fu-gen H., Bin-bin D., Tian-sheng D., Xiang-lin H., Ming-qin Z. Purification and antioxidant activities of baicalin isolated from the root of huangqin (*Scutellaria baicalin* gcorsi). *J Food Sci Technol.* 2013; 50: 615-619.
220. Pereira OR, Domingues MRM, Silva AMS, Cardoso SM. Phenolic constituents of *Lamium album*: Focus on isoscutellarein derivatives. *Food Res Int.* 2012; 48: 330-335.
221. Petreska J, Stefova M, Ferreres F, Moreno DA, Tomás-Barberán FA, Stefkov G, Kulevanova S, Gil-Izquierdo A. Potential bioactive phenolics of Macedonian *Sideritis* species used for medicinal ‘‘Mountain Tea’’. *Food Chem.* 2011; 125: 13-20.

222. Pero RW, Lund H, Leanderson T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. *Phytother Res.* 2009; 23: 335-346.
223. Ph. Eur. 6.0. European Pharmacopoeia, 6th edition, Strasbourg: Council of Europe (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), 2007.
224. Ph. Eur. 7.0. European Pharmacopoeia, 7th edition, Strasbourg: Council of Europe (COE) – European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), 2011.
225. Pieroni A, Quave CL, Santoro RF. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. *J Ethnopharmacol.* 2004; 95: 373-384.
226. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013; art. no. 956792.
227. Popović V. Analiza sekundarnih metabolita i ispitivanje farmakološke aktivnosti odabranih vrsta roda *Laserpitium* L. (Apiaceae). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu; Farmaceutski fakultet. 2013.
228. Prasad MNV, Hagemeyer J. Heavy Metal Stress in Plants. Berlin: Springer-Verlag; 1999.
229. Preethi KC, Kuttan G, Kuttan R. Antioxidant potential of an extract of *Calendula officinalis* flowers *in vitro* and *in vivo*. *Pharmaceut Biol.* 2006; 44: 691-697.
230. Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011; 82: 513-523.
231. Qi M, Xiong A, Geng F, Yang L, Wang Z. A novel strategy for target profiling analysis of bioactive phenylethanoid glycosides in *Plantago* medicinal plants using ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem quadrupole mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2012; 35: 1470-1478.
232. Quirantes-Piné, Funes R, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a lemon verbena extract. *J Chromatogr A.* 2009; 1216: 5391-5397.
233. Rackova L, Oblozinsky M, Kostalova D, Kettmann V, Bezakova L. Free radical scavenging activity and lipoxygenase inhibition of *Mahonia aquifolium* extract and isoquinoline alkaloids. *J Inflamm.* 2007; 4: 1-7.

234. Rajeshkumar NV, Kuttan R. Protective effect of Picroliv, the active constituent of *Picrorhiza kurroa* against chemical carcinogenesis in mice. *Teratogen Carcin Mut.* 2001; 21: 303-313.
235. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*. Beograd: Data Status; 2004.
236. Ražić S, Đogo S. Determination of chromium in *Mentha piperita* L. and soil by graphite furnace atomic absorption spectrometry after sequential extraction and microwave-assisted acid digestion to assess potential bioavailability. *Chemosphere.* 2010; 70: 451-456.
237. Recknagel RO, Glende JEA, Ugazio G. Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeut.* 1989; 43: 139-154.
238. Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjo BK. Peroxidative damages in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation *in vitro*. *J Neurochem.* 1980; 34: 1630-1638.
239. Rigat M, Bonet MA, Garcia S, Garnatje T, Vallès J. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol.* 2007; 28: 267-277.
240. Rigat M, Vallès J, Iglesias J, Garnatje T. Traditional and alternative natural therapeutic products used in the treatment of respiratory infectious diseases in the Eastern Catalan Pyrenees (Iberian Peninsula). *J Ethnopharmacol.* 2013; 148: 411-422.
241. Rischer M, Adamczyk M, Ratz H, Hose S, Marchesan M, Paper DH, Franz G, Wolf-Heuss E, Engel J. Quantitative determination of the iridoid glycosides aucubin and catalpol in *Plantago lanceolata* L. extracts by HPTLC and HPLC. *J Planar Chromat.* 1998; 11: 374-378.
242. Romano B, Pagano E, Montanaro V, Fortunato AL, Milić N, Borrelli F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytother Res.* 2013; 27: 1588-1596.
243. Ruzin SE. *Plant microtechnique and microscopy*. New York: Oxford University Press; 1999.
244. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *J Ethnopharmacol.* 2000; 71: 1-21.
245. Sandhir R, Gill KD. Hepatoprotective effects of LIV-52 on ethanol induced liver damage in rats. *Indian J Exp Biol.* 1999; 37: 762-766.

246. Santos MR, Rodríguez-Gómez MJ, Justino GC, Charra N, Florencio MH, Mira L. Influence of the metabolic profile on the in vivo antioxidant activity of quercetin under a low dosage oral regimen in rats. *Br J Pharmacol.* 2008; 153: 1750-1761.
247. Saracoglu I, Inoue M, Calis I, Ogihara Y. Studies on constituents with cytotoxic and cytostatic activity of two Turkish medicinal plants *Phlomis armeniaca* and *Scutellaria salviifolia*. *Biol Pharm Bull.* 1995; 18: 1396-1400.
248. Saracoglu I, Harput US, Inoue M, Ogihara Y. New phenylethanoid glycosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa* and their free radical scavenging activities. *Chem Pharm Bull.* 2002; 50: 665-668.
249. Saracoglu I, Harput US, Ogihara Y. Acylated flavone glycosides from *Veronica pectinata* var. *glandulosa* and *Veronica persica*. *Phytochem.* 2004a; 65: 2379-2385.
250. Saracoglu I, Varel M, Harput US, Nagatsu A. Acylated flavonoids and phenol glycosides from *Veronica thymoides* subsp. *pseudocinerea*. *Phytochem.* 2004b; 65: 2379-2385.
251. Saracoglu I, Oztunca FH, Nagatsu A, Harput US. Iridoid content and biological activities of *Veronica cuneifolia* subsp. *cuneifolia* and *V. cymbalaria*. *Pharm Biol.* 2011; 49: 1150-1157.
252. Saracoglu I, Harput S. *In vitro* cytotoxic activity and structure activity relationships of iridoid glucosides derived from *Veronica* species. *Phytother Res.* 2012; 26: 148-152.
253. Schneider I, Bucar F. Lipxygenase inhibitors from natural plant sources. Part 2: Medicinal plants with inhibitory activity on arachidonate, 12-lipoxygenase, 15-lipoxygenase and leukotriene receptor antagonists. *Phytother Res.* 2005; 19: 263-272.
254. Selaković V, Čolić M, Milosavljević P. Inflammatory reaction and atezijski molekuli u ishemijski mozga. *Vojnosanit Pregl.* 2002; 59: 661-667.
255. Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L, Yin Z. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- κ B and JNK/AP-1 activation. *Int Immunopharmacol.* 2009; 9: 1042-1048.
256. Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharm Sci.* 2011; 2011: article ID 572634.
257. Shuya C, Shengda Q, Xingguo C, Zhide H. Identification and determination of effective components in *Euphrasia regelii* by capillary zone electrophoresis. *Biomed Chromatogr.* 2004; 18: 857-861.

258. Silva CG, Raulino RJ, Cerqueira DM, Mannarino SC, Pereira MD, Panek AD, Silva JFM, Menezes FS, Eleutherio ECA. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine*. 2009; 16: 761-767.
259. Simin N, Orčić D, Četojević-Simin D, Mimica-Dukić N, Anackov G, Beara I, Mitić-Ćulafić D, Božin B. Phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. subsp. *flavum*, Alliaceae). *LWT Food Sci Techn*. 2013; 54: 139-146.
260. Simon LM, Fatrai Z, Jonas DJ, Matkovics B. Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*. *Biochem Physiol Pfl*. 1974; 166: 389-393.
261. Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J*. 1989; 259: 315-324.
262. Song JX, Lin X, Wong RN, Sze SC, Tong Y, Show PC, Zhang YB. Protective effects of dibenzo cyclooctadiene lignans from *Schisandra chinensis* against beta-amyloid and homocysteine neurotoxicity in PC12 cells. *Phytother Res*. 2011; 25: 435-443.
263. Srivastava MM. U: Srivastava MM, urednik,. *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*. Springer-Verlag, Berlin. 2011.
264. Stevanović BM, Janković M. *Ekologija biljaka sa osnovama fiziološke ekologije biljaka*. Beograd: NNK International; 2001.
265. Stevenson DE, Hurst RD. Polyphenolic phytochemicals – just antioxidants or much more? *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 2900-2916.
266. Stojković DS, Živković J, Soković M, Glamočlija J, Ferreira ICFR, Janković T, Maksimović Z. Antibacterial activity of *Veronica montana* L. extract and of protocatechuic acid incorporated in a food system. *Food Chem Toxicol*. 2013; 55: 209-213.
267. Sukito A, Tachibana S. Isolation of hyperoside and isoquercitrin from *Camellia sasanqua* as antioxidant agents. *Pak J Biol Sci*. 2014; 17: 999-1006.
268. Sundaram RS, Gowtham L, Nayak BS. The role of excitatory neurotransmitter glutamate in brain physiology and pathology. *Asian J Pharm Clin Res*. 2012; 5: 1-7.
269. Suomi J, Siren H, Hartonene K, Riekkala ML. Extraction of iridoid glycosides and their determination by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr A*. 2000; 868: 76-83.

270. Suomi J, Wiedmer SK, Jussila M, Riekkola ML. Determination of iridoid glycosides by micellar electrokinetic capillary chromatography-mass spectrometry with use of the partial filling technique. *Electrophoresis*. 2001; 22: 2580-2587.
271. Šarić-Kundalić B, Dobeš C, Klatte-Asselmeyer V, Saukel J. Ethnobotanical survey of traditionally used plants in human therapy of east, north and north-east Bosnia and Herzegovina. *J Ethnopharmacol*. 2011; 133: 1051-1076.
272. Taskova R, Handjieva N, Peev D, Popov S. Iridoid glucosides from three *Veronica* species. *Phytochem*. 1998; 49: 1323-1327.
273. Taskova R, Peev D, Handjieva N. Iridoid glucosides of the genus *Veronica* s.l. and their systematic significance. *Plant Syst Evol*. 2002; 231: 1-17.
274. Taskova RM, Albach DC, Grayer RJ. Phylogeny of *Veronica* – a combination of molecular and chemical evidence. *Plant Biol*. 2004; 6: 673-682.
275. Taskova RM, Gotfredsen CH, Jensen SR. Chemotaxonomy of Veroniceae and its allies in the Plantaginaceae. *Phytochem*. 2006; 67: 286-301.
276. Taskova RM, Kokubun T, Grayer RJ, Ryan KG, Garnock-Jones PJ. Flavonoid profiles in the Heliohebe group of New Zealand *Veronica* (Plantaginaceae). *Biochem Syst Ecol*. 2008; 36: 110-116.
277. Taskova RM, Kokubun T, Ryan KG, Garnock-Jones PJ, Jensen SR. Phenylethanoid and iridoid glycosides in the New Zealand snow hebes (*Veronica*, Plantaginaceae). *Chem Pharm Bull*. 2010; 58: 703-711.
278. Taskova RM, Kokubun T, Ryan KG, Garnock-Jones PJ, Jensen SR. Iridoid and phenylethanoid glucosides from *Veronica lavaudiana*. *J Nat Prod*. 2011; 74: 1477-1483.
279. Taskova RM, Kokubun T, Garnock-Jones PJ, Jensen SR. Iridoid and phenylethanoid glycosides in the New Zealand sun hebes (*Veronica*, Plantaginaceae). *Phytochem*. 2012; 77: 209-217.
280. Tirmenstein MA, Nicholls-Grzemeski FA, Zhang GJ, Fariss MW. Glutathione depletion and the production of reactive oxygen species in isolated hepatocyte suspensions. *Chem Biol Interact*. 2000; 127: 201-217.
281. Todorović A. Ekspresija antioksidativnih enzima i transkripcionog faktora Nrf2 kod pacijentkinja sa benigno, premaligno i maligno transformisanim endometrijumom. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu; Biološki fakultet; 2013.

282. Tomás-Barberán FA, Grayer-Barkmeijer RJ, Gil MI, Harborne JB. Distribution of 6-hydroxy, 6-methoxy and 8-hydroxyflavone glycosides in the labiatae, the schrophulariaceae and related families. *Phytochem.* 1988; 27: 2631-2645.
283. Tovilović G. Mehanizam zaštitnog dejstva arilpiperazinskih liganada za dopaminske D2 receptore u azot monoksidom i 6-hidroksidopaminom izazvanoj smrti SH-SY5Y ćelija humanog neuroblastoma. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet; 2012.
284. Ubavić M, Bogdanović D. *Agrohemija*. Novi Sad: Poljoprivredni fakultet; 1995.
285. Umek A, Rupert A, Mlinarič A, Kac J. HPTLC method for determination of acteoside in ribwort plantain (*Plantago lanceolata* L.). *J Planar Chromat Modern TLC.* 2005; 18: 147-150.
286. Valletta A, Santamaria AR, Canini A, Canuti L, Pasqua G. Trichomes in *Camptotheca acuminata* Decaisne (Nyssaceae): Morphology, distribution, structure and secretion. *Plant Biosyst.* 2013; 147: 548-556.
287. Valyova M, Hadjimitova V, Stoyanov S, Ganeva Y, Petrov T, Petrov I. Free radicals scavenging activity of extracts from Bulgarian *Veronica officinalis* L. and GC-MS analysis of ethanol extract. *Inter J Aesth Antiag Med.* 2009; 2 (1).
288. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem.* 1998; 46: 4113-4117.
289. Vogl S, Picker P, Mihaly-Bison J, Fakhrudin N, Atanasov AG, Heiss EH, Wawrosch C, Reznicek G, Dirsch VM, Saukel J, Kopp B. 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.* 2013; 149: 750-771.
290. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. U: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, urednici. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida; 2011. str. 3-13.
291. Walters SM, Webb DA. *Veronica* L. U: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA, urednici. *Flora Europaea*, Vol. III. Cambridge: University Press. 1972; str. 242-251.
292. Wang G, Wang L, Li Z, Ding J, Lin D. Characteristics of accumulation and content of heavy metals of weeds. *Chin J Ecol.* 2005; 24: 639-643.

293. Wang H, Xu Y, Yan J, Zhao X, Sun X, Zhang Y, Guo J, Zhu C. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β amyloid – induced cell injury. *Brain Res.* 2009; 1283: 139-147.
294. Wang Z, Li Y, Sarkar FH. Signaling mechanis(s) of reactive oxygen species in epithelial-mesenchymal transition reminiscent of cancer stem cells in tumor progression. *Current Stem Cell Research & Therapy.* 2010; 5: 74-80.
295. Wangchuk P, Keller PA, Pyne SG, Taweechotipatr M, Tonsomboon A, Rattanajak R, Kamchonwongpaisan S. Evaluation of an ethnopharmacologically selected Bhutanese medicinal plants for their major classes of phytochemicals and biological activities. *J Ethnopharmacol.* 2011; 137: 730-742.
296. Weckerle CS, Ineichen R, Huber FK, Yang Y. Mao's heritage: medicinal plant knowledge among the Bai in Shaxi, China, at a crossroads between distinct local and common widespread practice. *J Ethnopharmacol.* 2009; 123: 213-228.
297. Wong MH. Ecological restoration of mine degraded soils, with emphasis on metal contaminated soils. *Chemosphere.* 2003; 50: 775-780.
298. Wood EJ. *Practical biochemistry for colleges.* Oxford: Pergamon Press; 1989.
299. Wu YT, Lin LC, Sung JS, Tsai TH. Determination of acteoside in *Cistanche deserticola* and *Boschniakia rossica* and its pharmacokinetics in freely-moving rats using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006; 844: 89-95.
300. Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line in vitro cell made of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 2010; 123: 1086-1092.
301. Xiong Q, Hase K, Tezuka Y, Namba T, Kadota S. Acteoside inhibits apoptosis in D-galactosamine and lipopolysaccharide-induced liver injury. *Life Sci.* 1999; 65: 421-430.
302. Xu W, Deng Z, Guo H, Ling P. A rapid and sensitive determination of aucubin in rat plasma by liquid chromatography – tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic application. *Biomed Chromtogr.* 2012; 26: 1066-1070.
303. Xu Y, Wang C, Wu L, Li Z, Chen M, Wang Y, Li F, Luo C. Comparison of inhibitory effects of nine flavonoids on prostaglandin E₂ production and COX-2 expression in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Proceedings of the 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology.* 2012: 981-984.

304. Xu M, Chen X, Gu Y, Peng T, Yang D, Chang RCC, So KF, Liu K, Shen J. Baicalin can scavenge peroxynitrate and ameliorate endogenous peroxynitrite – mediated neurotoxicity in cerebral ischemia – reperfusion injury. *J Ethnopharmacol.* 2013; 150: 116-124.
305. Xue HY, Jin L, Jin LJ, Li XY, Zhang P, Ma YS, Lu YN, Xia YQ, Xu YP. Aucubin prevents loss of hippocampal neurons and regulates antioxidative activity in diabetic encephalopathy rats. *Phytother Res.* 2009; 23: 980-986.
306. Xue HY, Gao GZ, Lin QY, Jin LJ, Xu YP. Protective effects of aucubin on H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells. *Phytother Res.* 2012; 26: 369-374.
307. Zador E, Jones D. The Biosynthesis of a novel nicotine alkaloid in the trichomes of *Nicotiana stocktonii*. *Plant Physiol.* 1986; 82: 479-484.
308. Zhang J, Shen X. Antioxidant activities of baicalin, green tea polyphenols and alizarin in vitro and in vivo. *J Nutr Environ Med.* 1997; 7: 79-89.
309. Zou Y, Lu Y, Wei D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 5032-5039.
310. Zurayk R, Sukkariyah B, Baalbaki R. Common hydrophytes as bioindicators of nickel, chromium and cadmium pollution. *Water Air Soil Pollut.* 2001; 127: 373-388.