



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта :

ИСПИТИВАЊЕ ХЕМИЈСКОГ САСТАВА, АНТИМИКРОБНЕ, АНТИОКСИДАНТНЕ И ЦИТОТОКСИЧНЕ АКТИВНОСТИ ЛЕКОВИТИХ БИЉНИХ ВРСТА РОДА *DAPHNE*

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

У досадашњим истраживањима биљних врста рода *Daphne* потврђено је присуство кумаринских, тритерпенских, лигнанских и флавоноидних једињења. Подаци о фитохемији и биолошкој активности великог броја биљних врста из овог рода, нарочито ендемских, су оскудни. Пошто је у појединим биљним врстама рода *Daphne* утврђено присуство хемијских једињења која поседују фармаколошку активност, утврђивање фитохемије биљних врста *Daphne*, које нису истражене, је од нарочитог значаја због могућег присуства нових активних биомолекула. Екстракцијом биљног материјала одговарајућим растварачем и анализом добијених екстраката комбинацијом различитих хроматографско-спектроскопских метода (*HPLC*, *TLC*, и *IR* спектроскопија) указаће се на присуство хемијских једињења која су одговорна за биолошку активност испитиваних екстраката. Хроматографијом на колони могуће је изоловање чистих једињења из екстраката, њихова структурна анализа, као и испитивање њихове антимикробне, антиоксидантне и цитотоксичне активности. На тај начин, доћи ће се до сазнања о значају и могућој употреби испитиваних врста у медицини и фармацији.

Циљ истраживања

Утврђивање квалитативног и квантитативног хемијског састава екстраката биљних врста *Daphne*, међу којима су и неке ендемске врсте, као и испитивање антимикробне, антиоксидативне и антитуморске активности добијених екстраката.

Актуелност истраживања

Проналажење нових фармацеутских форми у облику екстраката или изоловање чистих супстанци даје допринос у презентовању ефикаснијих, економичнијих или једноставнијих



фармацеутских облика. Са аспекта фитохемије и биолошке активности род *Daphne* је недовољно истражен. То се посебно односи на неке ендемске врсте које расту у Србији а које су до данас неистражене. *Daphne malyana* Блечић (малијев ликовац), фамилија *Thymeleaceae*, је ендемска врста распрострањена у планинским областима, кањонима и клисурама северне Црне Горе, источне Босне и западне Србије. Присуство ове врсте је недавно потврђено за подручје Србије. Биљна врста је детерминисана, али не постоје научне референце о хемијском саставу и биоактивним једињењима који се налазе у биљци. Досадашњим истраживањима осталих биљних врста рода *Daphne*- *Daphne oleides*, *Daphne laureola* и *Daphne blagayana*, показано је присуство кумаринских, тритерпенских и флавоноидних деривата, али је мало референци које се односе на проучавање њихове активности. Од нарочитог значаја било би проналажење нових биоактивних молекула у испитиваним врстама и указивање на потенцијалну антимикуробну, антиоксидантну или антитуморску активност, као и примену екстраката или чистих изолованих једињења у фармацији.

Предмет и опис истраживања, задаци, методологија, очекивани резултати:

Истраживање ће обухватити следеће биљне врсте:

- *Daphne malyana*
- *Daphne oleides*
- *Daphne laureola*
- *Daphne blagayana*
- *Daphne alpina*
- *Daphne košanini*

У првој фази истраживања ће се сакупљати биљне врсте које ће се користити у истраживању. Припрема биљног материјала обухватиће одвајање од нечистоћа, сушење и уситњавање. Екстракти ће се добити класичним методама екстракције (мацерација, екстракција у Soxhlet-овом екстрактору, перколација) на собним и повишеним температурама. Као раствараче у процесу добијања екстраката испитиваних биљних врста користиће се метанол, етил-ацетат, хлороформ. Упаравање растварача, по завршеној екстракцији, вршиће се помоћу ротационог вакуум упаривача. Суви остатак ће бити подвргнут прелиминарним хроматографским испитивањима методом хроматографије на танком слоју силика гела (*TLC*). Изоловање биоактивних метаболита вршиће се помоћу хроматографске методе на колони применом одговарајућих растварача. Идентификација активних састојака вршиће се методама високоефикасне течне хроматографије под високим притиском (*High Performance Liquid*



Chromatography- HPLC), *UV-VIS* и *IC* (инфрацрвене) спектроскопије, и другим спектроскопским методама. Након идентификације активних састојака вршиће се испитивање активности добијених екстраката и изолованих метаболита. Испитивање антимикробне активности вршиће се на културама патолошких бактерија диск дилуционом методом уз одређивање минималне инхибиторне концентрације (*MIC*). Цитотоксична активност ће се испитивати на “*HeLa*” ћелијама. Антиоксидантна активност биће испитивана методом одређивања способности екстраката испитиваних биљних врста да неутралишу слободни радикал примењеног реагенса DPPH (2,2-дифенил-1-пикрил хидразил) и поређењем са стандардом. Степен антиоксидантне активности одређиваће се на основу промене апсорбације раствора колориметријском методом.

Очекивани резултати

С обзиром да биљне врсте из испитиваног рода садрже метаболите из група једињења за која се зна да поседују фармаколошку активност, очекује се да тестирани екстракти испоље висок ниво биолошке активности. Испитивањем биљних врста, нарочито ендемских, очекујемо проналазак нових и специфичних природних производа, чијом би даљом анализом и испитивањем активности дошли до проналажења активних молекула и њихове примене у фармацији и медицини.

Очекивани закључак

Резултати ових лабораторијских испитивања ће довести до сазнања о комплетној фитохемији испитиваних врста, као и њиховој потенцијалној антитуморској, антиоксидативној и антимикробној активности.

Временски оквир:

Уколико би се сва неопходна средства за реализацију ове студије, обезбедила у 2011. год., истраживања би се обавила до краја 2012 год. Међутим, у зависности од добијених резултата, ова студија би могла да траје две до три године.

Литература

1. Јушковић, М., Васиљевић, П., Рајковић, Ј., Стевановић, Б., Стевановић, В. Морфолошке карактеристике епидермиса листа балканске ендемичне врсте *Daphne genkwa* Блечић (*Thymelaeaceae*), 10. Симпозијум о флори југоисточне Србије и суседних региона, Власинско језеро 17.-20. јун 2010., књига апстраката;
2. N.Ullah, S. Ahmed, P.Mohammad, H.Rabnawaz, A. Malik, Chemical constituents of daphne oleides, *Fitoterapia* 1999; 70: 214-215



3. Baquar, S. R. Medicinal and Poisonous Plants of Pakistan. Printas press Karachi, Pakistan 1989 p.161
4. Nisar Ullah, Saeed Ahmed, Pir Muhammad, Zaheer Ahmed, Hafiz Rab Hawaz, Abdul Malik, Coumarinolignoid glycoside from *Daphne oleoides*, *Phytochemistry* 1999; 51: 103-105
5. Yeşilada E, Taninaka H, Takaishi Y, Honda G, Sezik E, Momota H, Ohmoto Y, Taki T. In vitro inhibitory effects of *Daphne oleoides* ssp. *oleoides* on inflammatory cytokines and activity-guided isolation of active constituents. *Cytokine*. 2001; 13: 359-64.