

Ispitivanje protuupalne aktivnosti odabranih biljnih vrsta

Lovrić, Nikolina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:978200>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Nikolina Lovrić

**Ispitivanje protuupalne aktivnosti
odabranih biljnih vrsta**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmakognozija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i izrađen je na Zavodu za farmakognoziju pod stručnim vodstvom prof .dr. sc.Marijane Zovko Končić. Istraživanja provedena u ovom radu sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2018-01-6504.

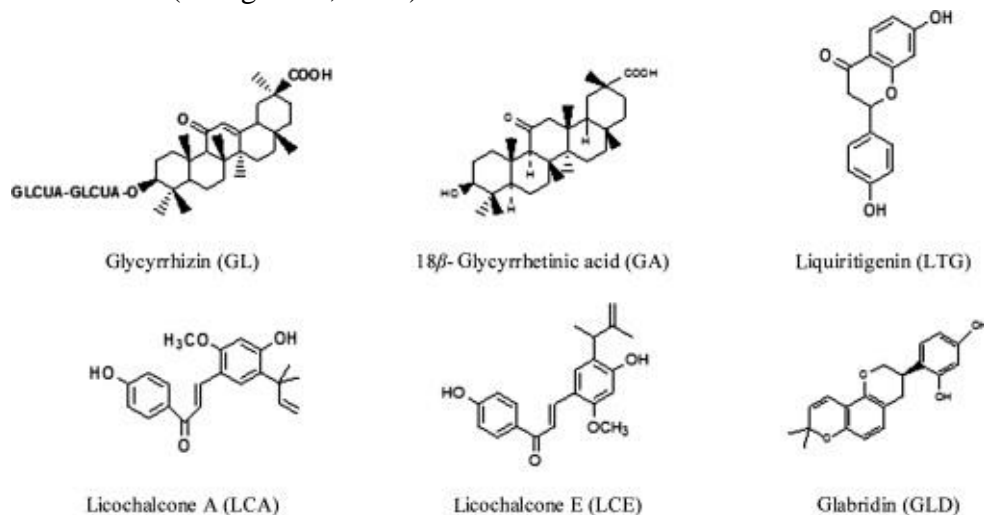
SADRŽAJ

1. UVOD	Error! Bookmark not defined.
1.1. <i>Glycyrrhiza glabra</i>	Error! Bookmark not defined.
1.2. <i>Berberis vulgaris</i>	Error! Bookmark not defined.
1.3. <i>Sylibum marianum</i>	Error! Bookmark not defined.
1.4. <i>Ehinacea purpurea</i>	6
1.5. Flavonoidi.....	7
1.6. Upala u procesu starenja kože	9
1.7. Glicerol.....	9
2. OBRAZLOŽENJE TEME	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. Materijali	13
3.1.1. Biljni materijal.....	13
3.1.2. Kemikalije	13
3.1.3. Uređaji.....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Izrada glicerolskih ekstrakata ispitivanih droga	13
3.2.2. Ispitivanje protuupalnog djelovanja	15
3.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida	15
3.2.4. Statistička obrada.....	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	16
4.1. Ispitivanje protuupalnog djelovanja ekstrakata	17
4.2. Određivanje ukupnih flavonoida	22
5. ZAKLJUČAK	26
6. LITERATURA.....	28
7. SAŽETAK / SUMMARY	32
7.1. Sažetak.....	33
7.2. Summary	34
8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	35

1. UVOD

1.1. *Glycyrrhiza glabra*

Sladić (*Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae) je višegodišnja biljka perasto razdijeljenih listova. Kao biljna droga koristi se osušeni oguljeni ili neoguljeni korijen. Ljekovita svojstva sladića potječu od smjese spojeva različite strukture. Najzastupljeniji spojevi su triterpenski saponini, od kojih je najvažniji glicirizin, kalijeva ili kalcijeva sol glicirizinske kiseline. Ostali prisutni triterpeni su glabrolid, izoglabrolid i drugi. Druga važna skupina prisutna u korijenu sladića su flavonoidi, uglavnom favononi i kalkoni. Oni su odgovorni za žutu boju korijena sladića, a neki od najvažnijih su: likokalkon A, likokalkon E, likviritin, likviritigenin, izolikviritigenin, glabridin i neolikviritigenin (Slika 1). Biljna droga sadrži još i kumarine, od kojih su najzastupljeniji likokumarin, glabrokumarin i umebeliferon. Sadržaj drugih bioaktivnih spojeva, kao što su masne kiseline, fenoli i polisaharidi, značajno je manji od prethodno navedenih (Wang i sur., 2015).

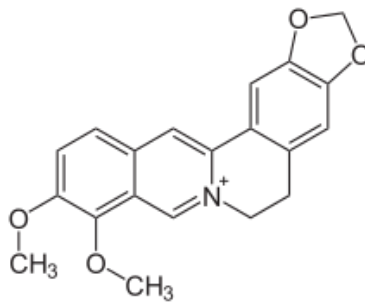


Slika 1. Struktura flavonoida korijena sladića (Wang i sur., 2015)

Biološki aktivne sastavnice korijena sladića pokazuju brojna djelovanja. Poznat je po svojim protuupalnim svojstvima koja se temelje na redukciji sinteze dušikovog oksida (NO) i prostaglandina E2 te ciklooksigenaza (COX), kao i sprječavanju otpuštanja proupalnih citokina. Također indirektno djeluje na agregaciju trombocita (Damle, 2014). Dokazan je učinak kod akutnih i kroničnih upalnih stanja, uključujući reumatoidni artritis. Uz protuupalno djelovanje bitna je i antimikrobna, antioksidativna i antiaterogena aktivnost. U tradicionalnoj medicini najviše se koristi zbog svoje antiulcerozne aktivnosti, u liječenju ulkusa i ulceroznog kolitisa (Yang i sur., 2017).

1.2. *Berberis vulgaris*

Obična žutika (*Berberis vulgaris* L., Berberidaceae) višegodišnji je bodljikavi grm, ovalnih kožastih listova i grozdastih visećih žutih cvatova, te crvenih plodova koji se koriste kao hrana. Kao biljna droga koristi se kora osušenog korijena obične žutike. Znanstvenim ispitivanjima dokazani su brojni biološki učinci te biljne droge, koji se najviše mogu pripisati izokinolinskim alkaloidima: berberinu (Slika 2), palmatinu, berbaminu i jatrorizinu. Uz izokinolinske alkaloidne biljna droga sadrži i brojne fenole, triterpene te askorbinsku kiselinu i vitamin K (Rahimi-Madiseh i sur. 2017).

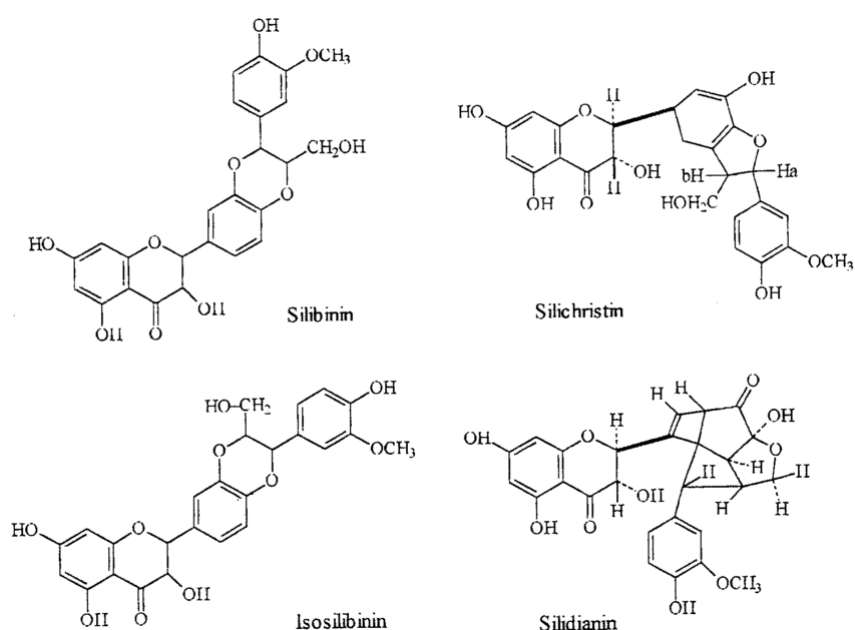


Slika 2. Struktura berberina (<https://en.wikipedia.org/wiki/Berberine>)

Poznata su različita farmakološka djelovanja obične žutike, kao što su hipoglikemijsko djelovanje i regulacija metabolizma ugljikohidrata. Alkaloidi žutike djeluju protektivno na Langerhansove otočice gušterače te pozitivno djeluju na razinu kolesterola u krvi. Neka istraživanja pokazuju učinak žutike na razinu interleukin 6 (IL-6), što se očituje protuupalnim i antihipertenzivnim djelovanjem kod pacijenata koji boluju od dijabetesa tipa 2. Također je istraživano antibakterijsko djelovanje korijena žutike na niz bakterijskih vrsta. Osim kore korijena žutike, brojne biološke učinke pokazuje i plod, koji zahvaljujući vitaminima koje sadrži, od kojih je najvažnija askorbinska kiselina, ima neuroprotektivna svojstva (Imanshahidi i sur., 2008).

1.3. *Silybum marianum*

Sikavica (*Silybum marianum* L., Asteraceae) je dvogodišnja zeljasta biljka velikih, nazubljenih listova koji su prošarani bijelim prugama. Kao ljekovita droga koriste se zreli, od papusa očišćeni plodovi sikavice (European Pharmacopoeia, 2020). Ljekovita svojstva plodova sikavice potječu od kompleksa silimarina koji je smjesa flavonolignana: silibinina, silikristina, silidianina i izosilibinina (Slika 3). Od kojih svi, osim silidianina, postoje u dvije diastereoizomerne forme A i B. Najveću biološku aktivnost pokazuje silibinin. Uz flavonolignane koji su derivati flavonoida taksifolina, plod sikavice sadrži i razne masne kiseline, sterole, proteine te tokoferol.



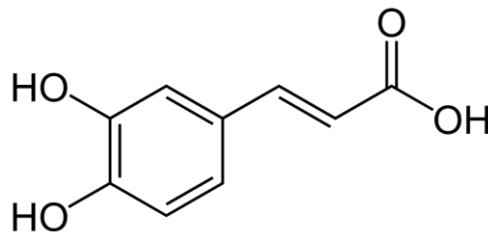
Slika 3. Strukture flavonoida ploda sikavice (Sonnenbichler i sur., 1999).

Studije provedene u *in vivo* i *in vitro* uvjetima dokazuju antioksidativno djelovanje silimarina koje se temelji na sposobnosti inhibicije nekoliko enzima koji sudjeluju u stvaranju radikala, kao i njegovu sposobnost sinteze fosfolipida i obnavljanja funkcije stanične membrane. Upravo zbog tih svojstava se silimarina koristi u terapiji toksičnog oštećenja jetre (primjerice paracetamolom ili amantinom). Pokazuje sposobnost stimulacije ribosomalne sinteze proteina i stimulira regenerativnu sposobnost jetre uz nastanak novih hepatocita. Pokazuje i antikancerogeno djelovanje inhibirajući proliferaciju stanica u hepatičkoj fibrozi te u stanicama nekoliko tipova karcinoma. Dokazano je njegovo protuupalno djelovanje koje se temelji na interakciji s COX i lipooksigenazom (LOX), proteinima bitni za sintezu

arahidonske kiseline (AA) i leukotriena. Uz to inhibira i nastanak NO. Pokazuje i značajno antidijabetsko, hipolipidemično, kardioprotektivno i neuroprotektivno djelovanje (Gopal Ramawat i sur., 2008).

1.4. *Echinacea purpurea*

Ehinaceja ili purpurna rudbekija (*Echinacea purpurea* L., Asteraceae) je višegodišnja biljka velikih ljubičastih cvjetova. Zelen ehinaceje jedna je od najkorištenijih biljnih droga u liječenju prehlade, a koristi se i u drugim indikacijama. Ljekovita svojstva potječu od niza spojeva, od kojih su najzastupljeniji derivati kavene kiseline (Slika 4), kao što su cikorična i kaftarna kiselina. Nadalje, iz zeleni ehinaceje su izolirani i brojni drugi spojevi, alkamidi, polisaharidi, lipoproteini te ulja koja sadržavaju brojne hlapljive komponente (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/herbal/echinaceae-purpureae-herba>).

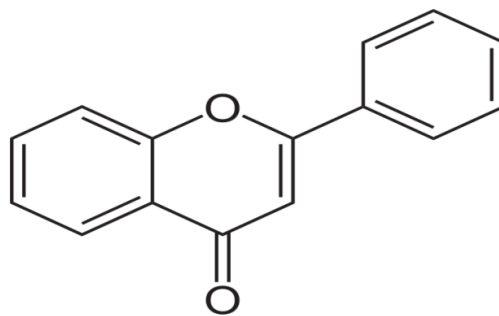


Slika 4. Struktura kavene kiseline (https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid)

Zahvaljujući svom fitokemijskom sastavu, zelen ehinaceje ima široku primjenu, te se osim u liječenju prehlade koristi i kao prevencija respiratornih infekcija pacijenata na kemoterapiji, kod zubobolje, bolova u intestinalnom traku i dr. Svaka od navedenih ljekovitih komponenti doprinosi različitom biološkom djelovanju droge. Tako su polisaharidi odgovorni za imunomodulatorno djelovanje, dok se protuupalno djelovanje pripisuje alkamidima. Polisaharidi su odgovorni za povećano lučenje proupalnih interleukina (IL-1, IL-6) te aktivaciju makrofaga i povećanu fagocitozu, dok alkamidi doprinose inhibiciji COX-1 i COX-2, te uz cikoričnu kiselinu smanjenju koncentraciju proupalnog genskog transkriptora NF-κB. Osim navedenih svojstava droga pokazuje i antibakterijsko te antioksidativno djelovanje (Manayi i sur., 2015).

1.5. Flavonoidi

Flavonoidi pripadaju velikoj skupini polifenolnih spojeva, koji su prisutni u mnogim biljkama. Najrašireniji su spojevi nastali sekundarnim metabolizmom biljaka. Smatraju se derivatima benzo- γ -pirona ili benzo- γ -pirana. Osnovna flavonoidna struktura (Slika 5) može biti i hidroksilirana, metilirana i glikozidirana, a često može imati vezane i acilne skupine. Glavne skupine flavonoida su flavoni, flavonoli, flavani, flavanoni, flavanonoli, kalkoni, izoflavoni i antocijani (Kazazić, 2004).



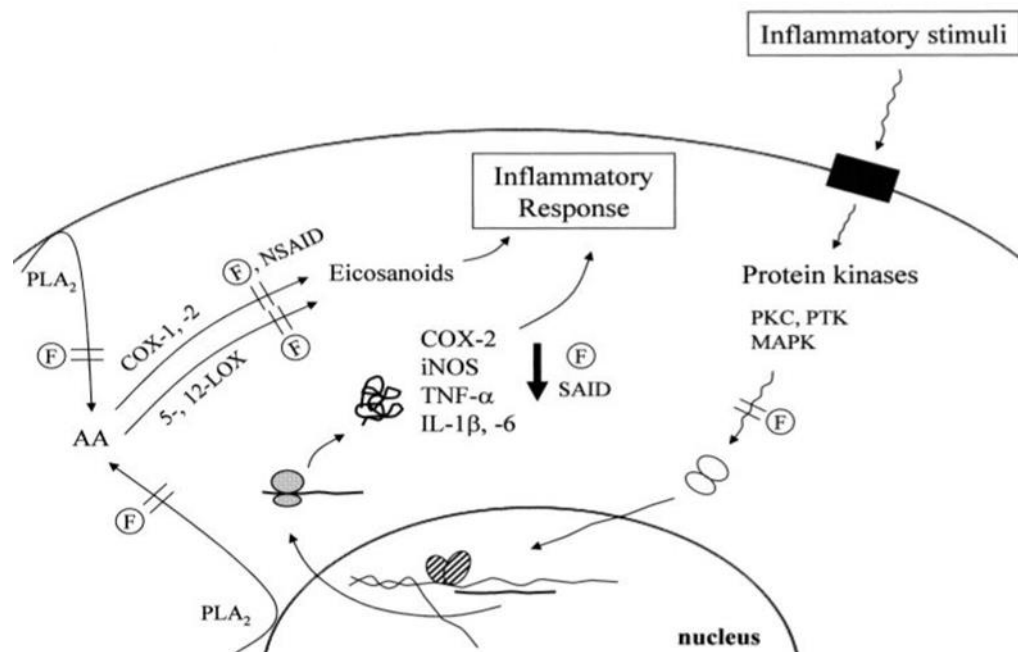
Slika 5. Osnovna struktura flavonoida (<https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid>)

Flavonoidi su poznati kao prirodni spojevi s mnogim farmakološkim učincima, uključujući antitumorsko, antioksidativno, protuupalno, antimikrobno, antitrombotsko te imunomodulatorno djelovanje. Upravo zbog svojih svojstava već se dugi niz godina koriste u tradicionalnoj medicini, kao i kozmetičkoj industriji (Nijveldt i sur., 2001).

U mnogim ispitivanjima *in vitro*, kao i na animalnim modelima dokazano je protuupalno djelovanje flavonoida, na način da aktiviraju obrambene komponente imunskog sustava. Zbog toga bi flavonoidi mogli pronaći svoju farmakološku primjenu u bolestima u kojima je prisutna upala, kao što su ateroskleroza, dijabetes, pretilost, neurodegenerativne bolesti te karcinomi (García-Lafuente i sur., 2009).

Postoji nekoliko pretpostavljenih mehanizama protuupalnog djelovanja flavonoida. Uz antioksidativno djelovanje, mogu regulirati aktivnost imunoloških stanica kao što su makrofagi, mast stanice, limfociti i neutrofili. Inhibiraju otpuštanje histamina iz mast stanica, degranulaciju neutrofila, kao i proliferaciju T limfocita. Na molekularnoj razini (Slika 6)

utječu i na mnoge enzime uključene u sintezu arahidonske kiseline (AA), fosfolipaze A (PLA₂), COX, LOX i NO. Upravo djelovanje na te enzime smatra se najbitnijim mehanizmom protuupalnog djelovanja flavonoida. Dokazano je da flavonoidi djeluju i na protein kinaze (PKC, PTK i MAPK), te na taj način supresivno djeluju na ekspresiju proinflamatornih gena (Pyo Kim i sur., 2004).



Slika 6. Mehanizam protuupalnog djelovanja flavonoida (Pyo Kim i sur., 2004)

1.6. Uloga upale u starenju kože

Starenje kože kompleksan je proces koji obuhvaća intrinzičke, genetički uvjetovane procese u organizmu, ali i utjecaj okolišnih čimbenika. Najznačajniji okolišni učinci pripisuju se izloženosti kože ultraljubičastom zračenju, te polutantima prisutnim u okolišu. Svi oni uz genetičke čimbenike doprinose stvaranju slobodnih kisikovih i dušikovih radikala koji stimuliraju nastanak upale u organizmu. Uz nastanak reaktivnih spojeva koji oštećuju proteine i lipide, značajno je i smanjenje djelovanja antioksidativnih protektivnih mehanizama, što dovodi do oštećenja DNA i otpuštanja proinflamatornih medijatora. Svi ti procesi dovode do povećane permeabilnosti kapilara u koži te aktivacije neutrofila i ostalih fagocita. Nastala upala dovodi do aktivacije raznih enzima (elastaza, proteinaza, matriks metaloproteinaza) koji razgrađuju izvanstanični matriks te dovode do nakupljanja njegovih abnormalnih i nefunkcionalnih komponenta. Svi navedeni procesi uzrokuju fotostarenje kože, koje se očituje kroz hiperpigmentaciju, dehidrataciju i smanjenu elastičnost kože (Jenkins, 2002; Pillai, 2005).

1.7. Glicerol

Glicerol je ekološki prihvatljivo netoksično i biorazgradivo otapalo, dobiveno iz obnovljivih izvora, te kao takvo može zamijeniti uobičajena nevodena otapala koja se koriste u postupcima sinteze i ekstrakcije. Kao polarno organsko otapalo, zahvaljujući svojim kemijskim i fizikalnim karakteristikama, omogućava otapanje anorganskih kiselina, baza i soli, kao i organskih fitospojeva koje su inače netopljivi u vodi, čime pridonosi postupku ekstrakcije (Wolfson i sur., 2007). Zbog navedenih svojstava i dokazane netoksičnosti, glicerol je uobičajeni sastojak kozmetike, te se koristi kao humektans za kožu, ali i u pripravcima namijenjenim za oralnu njegu i njegu kose. Iako je glicerol široko primjenjivan, malo je ispitana njegova primjena u ekstrakcijama biljnih droga, gdje je do sada najčešće korišten etanol kao otapalo. Zbog štetnog djelovanja etanola na kožu, kao što je isušivanje i iritacija, te njegove neprikladnosti za primjenu kod određenih dobnih i društvenih skupina, kao što su pedijatrijska populacija i pripadnici određenih religija, sve je više istraživanja vezanih uz zamjenu etanola glicerolom. Uporabom glicerola u ekstrakciji skratio bi se proizvodni proces, jer je u današnjim proizvodnim procesima potrebno uklanjane etanola iz kozmetičkih pripravaka i pripravaka za djecu (Becker i sur., 2019; Dulić i sur., 2019).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

2. Obrazloženje teme

Iako upalu ponajprije vezujemo za stanja koja uzrokuju biološki uzročnici kao što su mikroorganizmi te kemijski i fizikalni agensi koji štete organizmu., upalni proces uobičajena je popratna pojava brojnih patoloških stanja kao što su dijabetes, pretilost, ateroskleroza te ostalih akutnih i kroničnih bolesti. Upala prati i starenje kože uzrokovano genetskim, ali i vanjskim čimbenicima. Unatoč brojnim protuupalnim lijekovima, sve se više istražuju biljne droge koje potencijalno pokazuju slično djelovanje uz manje nuspojave. Pri tome je poželjno da su te sastavnice otopljene u otapalu koje ne iritira kožu poput glicerola.

Stoga je cilj ovoga rada bio prirediti i ispitati protuupalnu aktivnost glicerolnih ekstrakata biljnih vrsta *Glycyrrhiza glabra*, *Berberis vulgaris*, *Silybum marianum* i *Echinacea purpurea*. Također se ispitala povezanost protuupalnog djelovanja biljnih droga sa sadržajem flavonoida.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1 Biljni materijal

Ispitivane su biljne droge: Glycyrrhizae radix, Berberidis radice cortex, Silybi mariani fructus i Ehinaceae purpureae herba.

3.1.2 Kemikalije

U ispitivanju su korištene kemikalije: destilirana voda, diklofenak natrij, natrijev klorid, kalijev klorid, natrijev hidrogenfosfat, kalijev dihidrogenfosfat, glicerol, otopina albumina, aluminijski klorid heksahidrat, kvercetin, metanol, natrijev hidroksid (Sigma Aldrich, SAD).

3.1.3 Instrumenti

U ispitivanjima su korišteni uređaji: centrifuga (Tehtnica železniki, Slovenija); sušionik (Instrumentaria, Zagreb); precizna vaga (Mettler Toledo, Švicarska); ultrazvučna kupelj (Bandelin Sonorex digital 10P, Bandelin electronic, Njemačka); UV/VIS spektrofotometar (Perkinelmer, SAD); čitač mikrotitarskih pločica (Awareness technology inc., SAD).

3.2. METODE

3.2.1 Izrada glicerolskih ekstrakata ispitivanih droga

Biljne droge (Tablica 1) su usitnjene i propuštene kroz sito. Dobiveni praškasti materijal je suspendiran u 10 g odgovarajućeg otapala (10-90% glicerol u vodi, w/w) u Erlenmeyerovoj tikvici od 50 mL. Ekstrakcija je provedena u ultrazvučnoj kupelji (Bandelin Sonorex® Digital 10P, Berlin, Njemačka) kod ultrazvuka snage 360 W i frekvencije 35 Hz tijekom 20 min uz kontrolu temperature (20-70°C). Nakon ekstrakcija, dobivene smjese su filtrirane. Svi ekstrakti su pohranjeni na -20°C u mraku (Ciganović i sur., 2019).

Tablica 1.: Glicerolni ekstrakti korišteni u ispitivanju:

Oznaka	Udio glicerola (w/w)	Biljna droga
TP-opt	18%	Glycyrrhizae radix
Tpy-opt	34%	Glycyrrhizae radix
G-I-opt	85%	Glycyrrhizae radix
B-opt	50%	Berberidis radice cortex
RSA-opt	40%	Berberidis radice cortex
Silimarin-opt	40%	Silybi mariani fructus
RSA-S-opt	80%	Silybi mariani fructus
Mac-S-1D	50%	Silybi mariani fructus
KKC-opt	70%	Ehinaceae purpureae herba
RSA-E-opt	50%	Ehinaceae purpureae herba
Mac-C-1D	90%	Ehinaceae purpureae herba
Mac-C-3D	90%	Ehinaceae purpureae herba

3.2.2 Ispitivanje protuupalnog djelovanja

Ispitivanje protuupalnog djelovanja ekstrakata provedeno je na otopini albumina pri fiziološkim uvjetima pH. U svaku epruvetu je dodano 400 μL otopine albumina, 2800 μL fosfatnog pufera (PBS, pH 7,4), 500 μL ekstrakta i 1500 μL destilirane vode. Navedene smjese su inkubirane 15 min na 37°C te potom 5 min na 70°C. Nakon toga izmjerena je apsorbancija na 660 nm. Kao negativna kontrola korištena je destilirana voda, a postotak inhibicije koagulacije albumina izračunat je pomoću formule:

$$\text{Inhibicija koagulacije albumina(\%)} = \frac{A(\text{neg. kontrola}) - A(\text{uzorak})}{A(\text{neg. kontrola})}$$

Kao pozitivna kontrola prilikom ispitivanja korišten je nesteroidni protuupalni lijek diklofenak natrij, a kao negativna destilirana voda (Chandra i sur., 2012).

3.2.3. Određivanje flavonoida

U 120 μL otopine ekstrakta dodano je 120 μL 0,2%-tne metanolne otopine AlCl_3 . Za svaki uzorak pripremljena je slijepa proba koja se sastojala od 120 μL ekstrakta nadopunjenih sa 120 μL metanola. Uzorci ispitivanih biljnih ekstrakata su odstajali 1 sat na tamnom mjestu, pri sobnoj temperaturi, te im je potom izmjerena apsorbancija na 405 nm.

Sadržaj flavonoida u ekstraktima određen je pomoću baždarnog pravca kvercetin dihidrata. Sadržaj ukupnih flavonoida izražen je kao miligrami flavonoida po mililitru ekstrakta (mg/mL) (Pečkal i sur., 2014).

3.2.4 Statistička obrada:

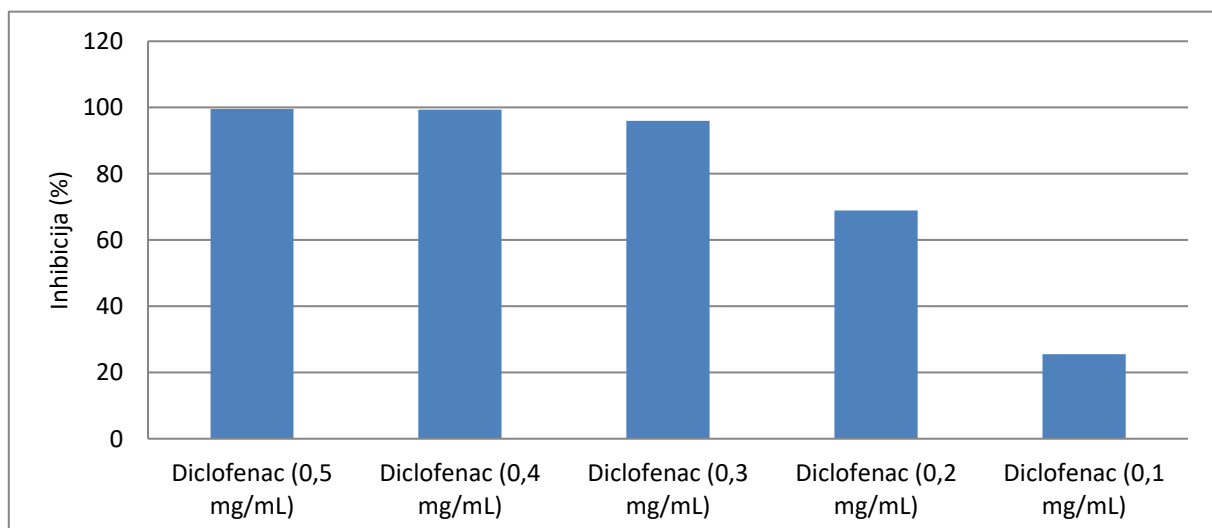
Sva ispitivanja su provedena u triplikatu. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija (SD).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje protuupalnog djelovanja ekstrakata

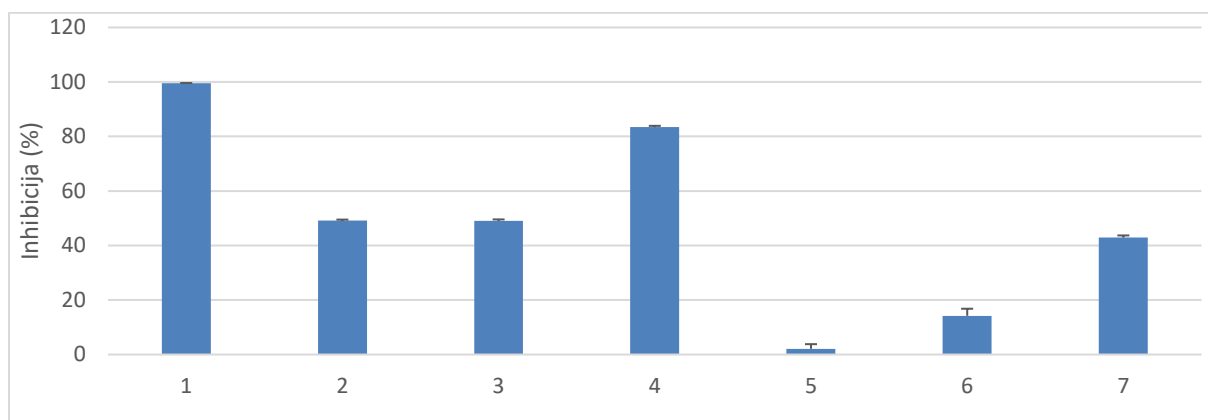
Protuupalno djelovanje glicerolnih ekstrakata ispitano je korištenjem metode stimulacije upalnog stanja, indukcijom koagulacije albumina inkubiranog na višim temperaturama. Ispitivanjem je dokazano da nesteroidni protuupalni lijekovi, u određenoj koncentraciji, inhibiraju koagulaciju proteina pri povišenoj temperaturi (Slika 7)(Grant i sur., 1970). Stoga je povedeno istraživanje protuupalnog djelovanja ekstrakata biljnih droga kako bi se ispitalo mogu li izazvati isti učinak kao sintetizirani lijekovi. Protuupalno djelovanje ispitivanih glicerolnih ekstrakata određeno je temeljem mjerenja apsorbancije nastalog замуćenja bijele boje, u odnosu na apsorbanciju uzoraka s diklofenak natrijem. Smjese albumina, pufera PBS i ispitivanog ekstrakta su inkubirane 15°C na fiziološkoj temperaturi od 37 , te potom podvrgnute temperaturi od 70°C tijekom 5 min. Apsorbancija je mjerena na 660 nm (Chandra i sur., 2012).

Kako bih se otklonila moguća interferencija glicerola kao otapala koje je korišteno u pripravi ekstrakata, pri samom ispitivanju uzoraka, ispitalo se djelovanje glicerola, kako bi se spriječilo dobivanje lažno pozitivnih rezultata. Rezultati određivanja protuupalnog djelovanja prikazani su na slikama. Iz Slika 8.-11. možemo primijetiti da različita koncentracija ekstrakcijskog otapala utječe na protuupalno djelovanje, kao i da ekstrakti pokazuju različitu sposobnost protuupalnog djelovanja.



Slika 7. Protuupalno djelovanje diklofenak natrija u različitim koncentracijama

4.1.1 Protuupalna aktivnost ekstrakata korijena sladića

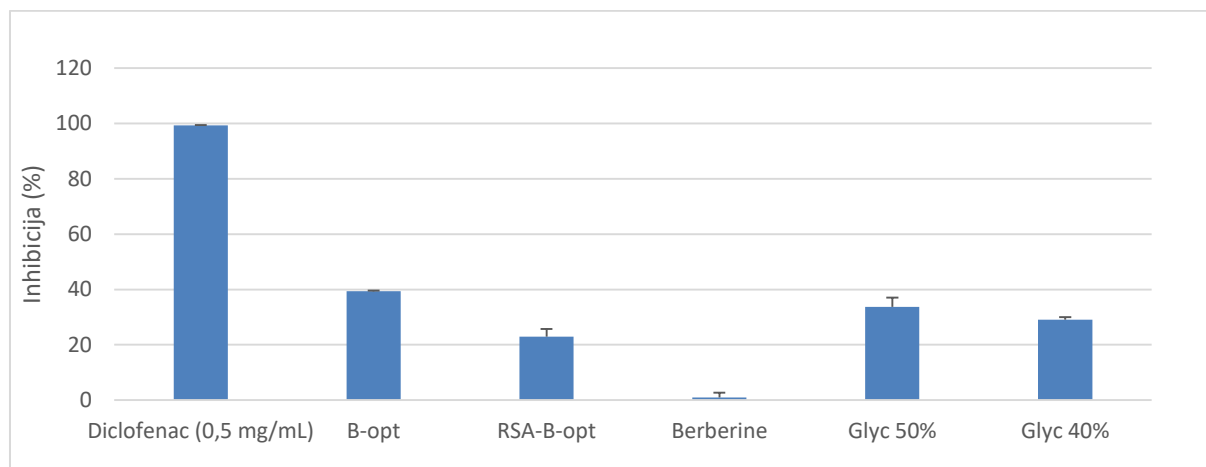


Slika 8. Protuupalna aktivnost glicerolnih ekstrakata korijena sladića

Svi ekstrakti korijena sladića (Slika 8) su pokazali protuupalnu aktivnost, s tim da je najveću inhibiciju koagulacije pokazao ekstrakt G-I-opt (83% inhibicije), koji je optimiziran na izolikviritigenin. Druga dva ekstrakta optimizirana na fenole, TP-opt i Tpy-opt pokazuju inhibiciju koagulacije oko 50%. Pošto je ispitan učinak i samog glicerola na koagulaciju proteina, iz dobivenih podataka vidljivo je da učinak raste s porastom koncentracije, ali isto tako i da je zanemariv u odnosu na učinak ekstrakata i da sama biljna droga ispoljava protuupalnu aktivnost.

S obzirom da je istraživanje povedeno na ekstraktima korijena sladića, a ne na izoliranim fitokemijskim sastavnicama biljne droge, ne možemo nedvojbeno pripisati protuupalnu aktivnost određenom spoju, ali prema podacima iz literature, možemo pretpostaviti da je za aktivnost odgovoran izolikviritigenin. Dobiveni rezultati slažu se sa znanstvenim radom koji je ispitaio protuupalno djelovanje izoliranog izolikviritigenina u koncentraciji 4 μ M (Zhou i sur., 2019). Kao i s rezultatima ispitivanja djelovanja bioloških sastavnica sladića (Thiyagarajan i sur., 2011), koje upućuje da se protuupalno djelovanje može pripisati flavonoidima izolikviritigeninu i glabridinu, ali ne i triterpenskom saponinu glicirizinu. U odnosu na rezultate istraživanja protuupalnog djelovanja vodeno-alkoholnih ekstrakata korijena sladića koji pokazuju aktivnost (Herold i sur., 2003), vidljivo je da zamjena etanola glicerolom ne inhibira protuupalnu aktivnost ekstrakta korijena sladića.

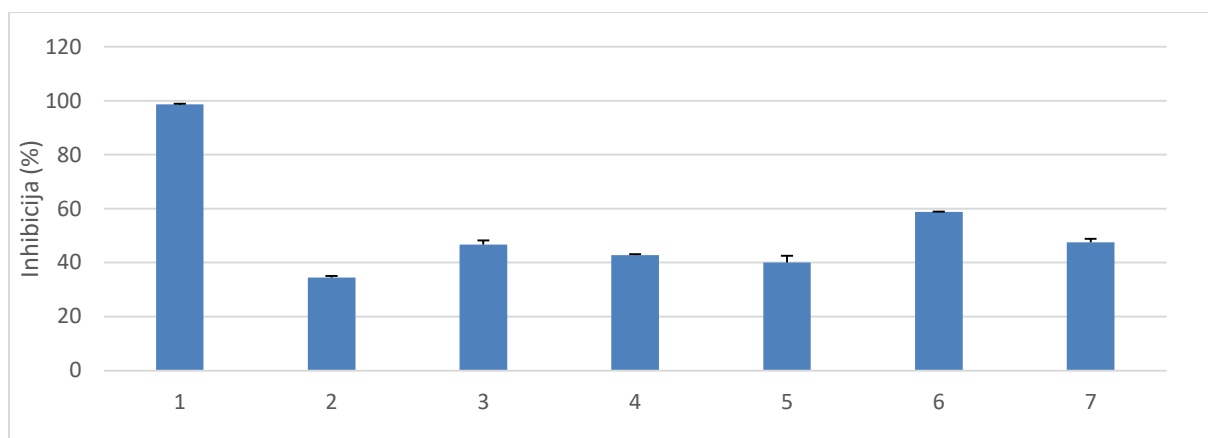
4.1.2. Protuupalna aktivnost ekstrakata kore korijena obične žutike



Slika 9. Protuupalna aktivnost glicerolnih ekstrakata kore korijena obične žutike

Iz dobivenih rezultata (Slika 9) vidljivo je da ekstrakt B-opt, optimiziran na berberin, pokazuje neznatno veću protuupalnu aktivnost (40% inhibicije) od 50% otopine glicerola u kojoj je pripremljen, dok drugi ekstrakt RSA-B-opt pokazuje manju protuupalnu aktivnost od same 40% otopine glicerola u kojoj je pripremljen. Visoka aktivnost ispitivanih otopina glicerola u ovom ispitivanju ukazuje na to da je u protuupalnom djelovanju ispitivanih ekstrakata žutike ključnu ulogu igra ekstrakcijsko otapalo. Iz slike je vidljivo da je učinak berberina zanemariv te se učinak ekstrakata u ovom testu ne može pripisati tom fitokemijskom spoju. S obzirom na rezultate ispitivanja iz literature možemo pretpostaviti da je berberin kao spoj odgovoran za blago protuupalno djelovanje, te da zbog alkaloidne strukture ima veliki potencijal kao spoj uzor pri sintezi potentnijih supstanci (Zou i sur., 2017), ali rezultati ovog istraživanja upućuju na to da se njegov učinak temelji na drugim mehanizmima. To se može potkrijepiti literaturnim podacima koji upućuju na to da ekstrakti pripremljeni u etanolu, ali ispitani drugom metodom, pokazuju protuupalnu aktivnost (Ivanovska, 1996).

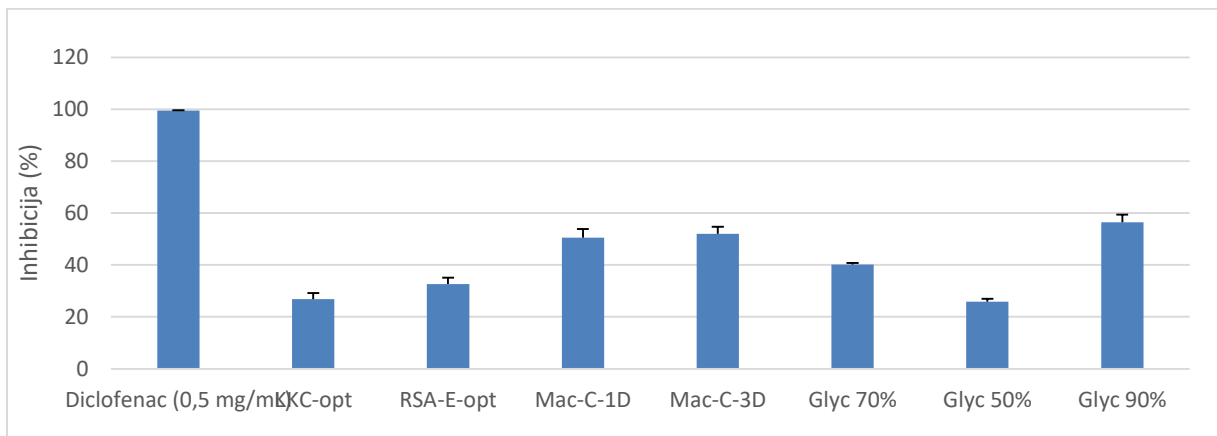
4.1.3. Protuupalna aktivnost ekstrakata ploda sikavice



Slika 10. Protuupalno djelovanje glicerolnih ekstrakata ploda sikavice

Dobiveni rezultati (Slika 10) protuupalnog djelovanja ekstrakata plodova sikavice (Silimarín-opt, RSA-S-opt, Mac-S-opt) ukazuju da u postavljenim uvjetima ispitivanja oni nemaju značajnu aktivnost. Same otopine glicerola pokazuju čak i veću inhibiciju koagulacije od ekstrakata biljne droge. Rezultati nisu u skladu s očekivanjima i već provedenim istraživanjima protuupalne aktivnosti ploda sikavice, koja upućuju na sposobnost silimarina da suprimira upalu na razini stanice, kao i da potiče signaliziranje za njezin oporavak (Lovelace i sur, 2016). Stoga se može zaključiti da se protuupalni učinak ploda sikavice ne temelji na inhibiciji koagulacije proteina

4.1.4. Protuupalna aktivnost ekstrakata zeleni ehinaceje



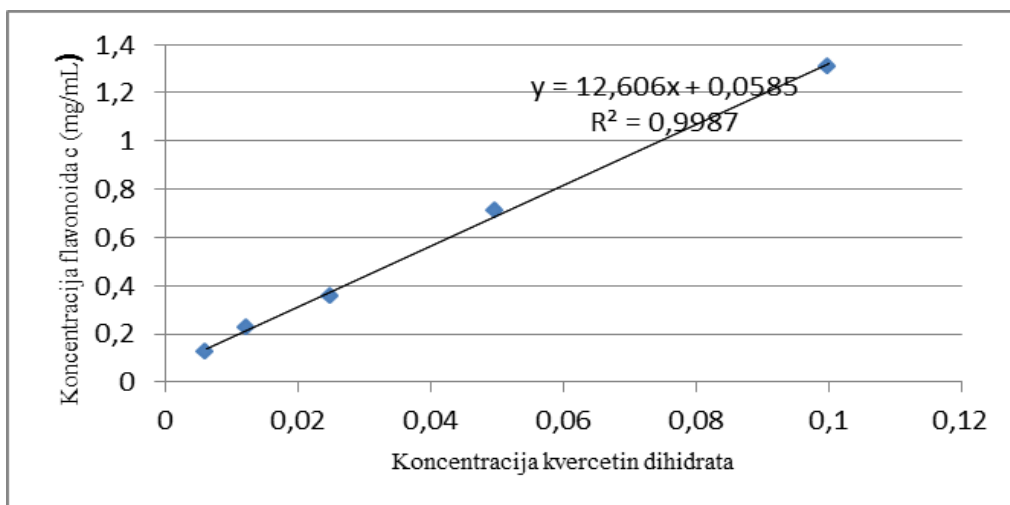
Slika 11. Protuupalno djelovanje glicerolnih ekstrakata zeleni ehinaceje

Rezultati (Slika 11) dobiveni ispitivanjem protuupalnog djelovanja ekstrakta zeleni vrste *Echinacea purpurea* (KKC-opt, Rsa-E-opt, Mac-C-1D, Mac-C-3D) ukazuju na slabo protuupalno djelovanje, jer se dobivene vrijednosti inhibicije koagulacije proteina gotovo u cijelosti mogu pripisati učinku otopina glicerola u kojem su ekstrakti pripremljeni. Literaturni podaci ukazuju na određeni protuupalni učinak (Raso i sur., 2010), ali on se, prema rezultatima provedenim u okviru ovog diplomskog rada, ne temelji na inhibiciji koagulacije proteina.

4.2. Određivanje ukupnih flavonoida

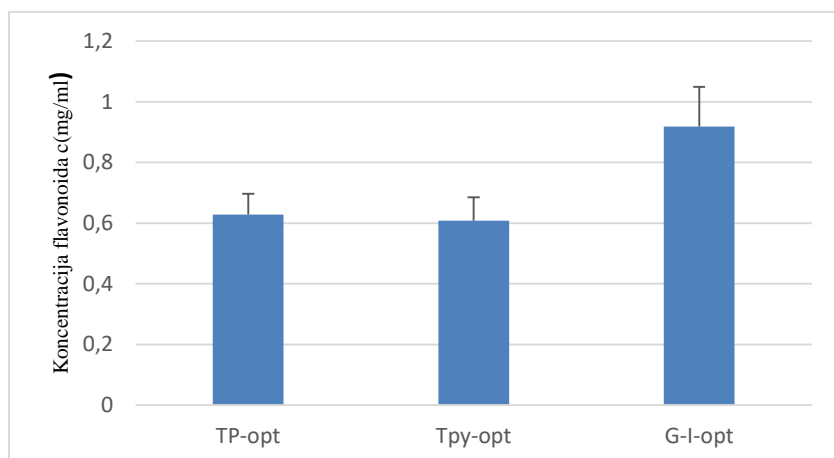
Kao nastavka na ispitivanje protuupalnog djelovanja glicerolnih ekstrakata, dobivene vrijednosti protuupalnog djelovanja su stavljene u odnos s ukupnim sadržajem flavonoida u ispitivanim ekstraktima. U određivanju flavonoida korištena je reakcija stvaranja kompleksa između flavona i flavonola s aluminijevim ionima iz Folin-Ciocalteutovog reagensa uz stvaranje kelata koji reakcijsku smjesu boje žutom bojom. Reakcija aluminijevih iona moguća je samo s flavonima, flavonolima te pojedinim izoflavonima zbog prisutnosti dvostruke veze u središnjem heterocikličkom prstenu, dok se s ostalim flavonoidima ista reakcija ne odvija. Koncentracija flavona i flavonola određena je mjerenjem apsorbancije novonastalih žuto obojenih kelata na 405 nm (Pečkal i sur., 2014).

Sadržaj ukupnih flavona i flavonola u glicerolskim ekstraktima određen je iz vrijednosti apsorbancija uzoraka koristeći baždarni pravac (Slika 12), kvercetin dihidrata. Sadržaj ukupnih flavonoida izražena je kao miligram flavonoida po mililitru ekstrakta (mg/mL).



Slika 12. Baždarni pravac kvercetin dihidrata

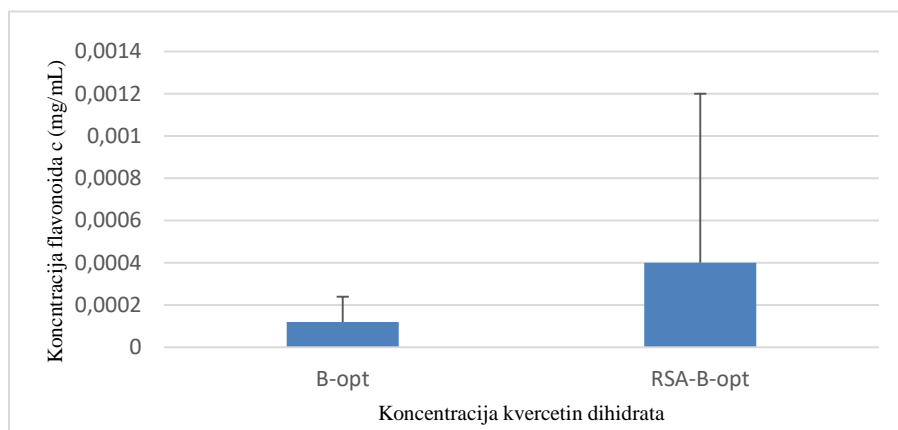
4.2.1. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima korijena sladića



Slika 13 Sadržaj flavonoida u ekstraktima korijena sladića

Ekstrakti korijena sladića (Slika 13) pokazuju visoku koncentraciju flavona i flavonola, izraženu u odnosu na baždarni pravac (Graf 1.). To je i očekivano zbog velikog broja izoliranih fitokemijskih spojeva flavonoidne strukture iz sladića: glabridina, likokalkona A, glicirizinske kiseline i izolikviritigenina (Wang i sur., 2015). Upravo ekstrakt G-I-opt, optimiziran na sadržaj izolikviritigenina, pokazuje najveći sadržaj flavonoida, ali i najveće protuupalno djelovanje. Stoga se sadržaj flavonoida može izravno povezati s protuupalnim djelovanjem korijena sladića.

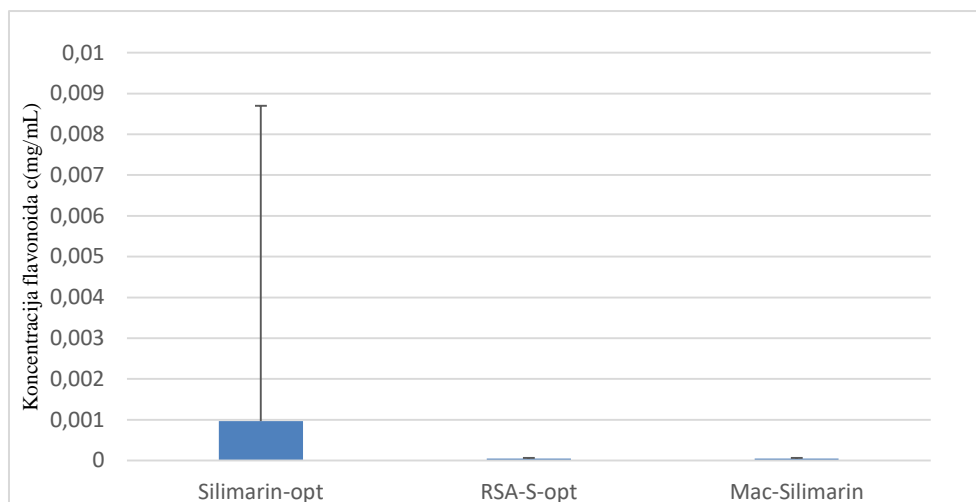
4.2.2. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima kore korijena obične žutike



Slika 14. Sadržaj flavonoida u ekstraktima kore korijena žutike

Uzorci glicerolski ekstrakata obične žutike (Slika 14) pokazuju zanemariv sadržaj flavonoida u biljnoj drogi. Stoga se može zaključiti da njihova prisutnost nije odgovorna za djelovanje biljne droge (Rahimi-Madiseh i sur. 2017).

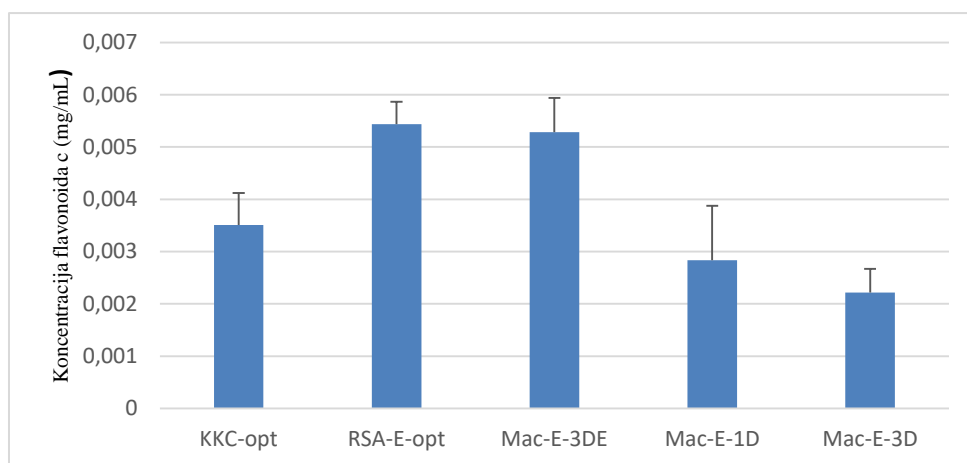
4.2.3. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima ploda sikavice



Slika 15. Sadržaj flavonoida u ekstraktima ploda sikavice

Ekstrakti sikavice pokazuju sadržaj flavonoida na razini statističke pogreške (Slika 15). Iako je sikavica kao biljna droga poznata po značajnom sadržaju flavonoida, korištenom tehnikom za određivanje sadržaja flavonoida nije moguće odrediti većinu flavonoida prisutnih u ekstraktu plodova sikavice, silibinin, silikristin, silidianin i izosilibinin. Oni su po svojoj strukturi flavanonoli te zbog nedostatka dvostruke veze u središnjem heterocikličkom prstenu, koja je potrebna za reakciju, ne mogu tvoriti komplekse s aluminijevim ionima.

4.2.4. Određivanje ukupnih flavonoida u ekstraktima zeleni purpurne ehinaceje



Slika 16. Sadržaj flavonoida u ekstraktima zeleni ehinaceje

Ekstrakti zeleni ehinaceje sadržavaju zanemarive razine flavonoida (Slika 16). Takvi rezultati su i očekivani s obzirom da se ne očekuje veći udio flavonoida u smjesi različitih spojeva koje droga zeleni ehinaceje sadrži (Manayi i sur., 2015).

Dobiveni rezultati ukazuju da bi se protuupalna aktivnostu provedenim testovima mogla povezati sa sadržajem flavonoida u ekstraktima, jer su ekstrakti koji su pokazali protuupalnu aktivnost, imali i najveći sadržaj flavonoida. No potrebne su detaljne studije s izoliranim sastavnicama kako bi se ova pretpostavka i potvrdila.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovoga rada bio je ispitati protuupalnu aktivnost glicerolnih ekstrakata četiri različite biljne vrste primjenom metode inhibicije koagulacije albumina pri visokoj temperaturi. Ispitan je sadržaj flavonoida u odabranim biljnim vrstama te istražen utjecaj otopina glicerola na protuupalnu aktivnost kako bih se ustvrdila povezanost protuupalne aktivnosti i sadržaja flavonoida, odnosno prisutnosti glicerola u ekstraktima..

Ispitivanjem protuupalnog djelovanja utvrđena je najveća aktivnost glicerolnih ekstrakata korijena sladića, i to ponajviše uzorka optimiziranog na izolikviritigenin. S obzirom na visoke rezultate dobivene prilikom određivanja flavonoida na istim ekstraktima, protuupalnu aktivnost možemo pripisati upravo flavonoidima. Ekstrakti ostalih ispitivanih vrsta, pokazali su blago (korijen žutike) ili pak neznatno protuupalno djelovanje (plod sikavice i zelen ehinaceje), ali i neznatan sadržaj flavonoida. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da glicerolni ekstrakti korijena sladića imaju potencijal kako za topikalnu primjenu u pripravcima protiv starenja kože, tako i za internu uporabu.

6. LITERATURA

Becker L, Bergfeld W, Belsito D, Hill R, Klaassen C, Liebler D, Marks J, Shank R, Slaga T, Snyder P, Gill L, Heldreth B. Safety assessment of glycerin as used in cosmetics. *Int J Toxicol*, 2019, 38, 6-22.

Berberine, <https://en.wikipedia.org/wiki/Berberine>. pristupljeno 19. Travanj 2020.

Caffeic acid, https://en.wikipedia.org/wiki/Caffeic_acid. pristupljeno 2. svibanj 2020.

Chandra S, Chatterjee P, Dey P, Bhattacharya S. Evaluation of in vitro anti-inflammatory activity of coffee against the denaturation of protein. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2012, 1(1), 178-80.

Ciganović P, Jakimiuk K, Tomczyk M, Končić MZ. Glycerolic licorice extracts as active cosmeceutical. *Antioxidants*, 2019, 8(10), 445.

Damle M. Glycyrrhiza glabra (liquorice) - a potent medicinal herb. *Int J Herb Med*, 2014, 2(2), 132-36.

Dulić M, Ciganović P, Vujčić L, Končić MZ. Antidiabetic and cosmeceutical potential of common barbery (*berberis vulgaris* L.) root bark extracts. obtained by optimization of 'green'ultrasound-assisted extraction. *Molecules*, 2019, 24, 3613.

European Pharmacopoeia Vol. 10.2. Strasbourg, France: Council of Europe; 2020. *Silybi mariani fructus*; p. 1539-40.

Flavonoid, <https://en.wikipedia.org/wiki/Flavonoid>, pristupljeno 21. Travanj 2020.

García-Lafuente A, Guillamón E, Villares A, Rostagno M, Martínez JA. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res*, 2009, 58(9), 537-52.

Gopal Ramawat K, Mérillon JM. Bioactive molecules and medicinal plants. New Delhi, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008, str. 136-40.

Grant N, Alburn H, Kryzanasuskas C. Stabilization of serum albumin by anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol*, 1970, 19(3), 715-22.

Herold A, Cremer L, Călugaru A, Tamaş V, Ionescu F, Manea S, Szegli G. Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Rom Arch Microbiol Immunol*, 2003, 62(1-2), 117-29.

Imanshahidi M, Hosseinzadeh H. Pharmacological and therapeutic effects of berberis vulgaris and its active constituent, berberine. *Phytother Res*, 2008, 22(8), 999-2012.

Ivanovska N, Philipov S. Study on the anti-inflammatory action of berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int Immunopharmacol*, 1996, 18(10), 553-61.

Jenkins G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech Ageing Dev*, 2002, 123 (7), 801-10.

Kazazić, SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55, 279-90.

Lovelace ES, Wagoner J, MacDonald J, Bammler T, Bruckner J, Brownell J, Beyer R, Zink EM, Kim YM, Kyle JE, Webb-Robertson BJ, Waters KM, Metz TO, Farin F, Oberlies NH, Polyak SJ. Silymarin suppresses cellular inflammation by inducing reparative stress signaling. *J Nat Prod*, 2016, 78(8), 1990–2000.

Manayi A, Vazirian M, Saeidnia S. Echinacea purpurea: pharmacology, phytochemistry and analysis methods. *Pharmacogn Rev*, 2015, 9, 63-72.

Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr*, 2001, 74(4), 418-25.

Pękal A, Pyrzynska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal Methods*, 2014, 7, 1776-82.

Pillai S, Oresajo C, Hayward J. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation. *Int J Cosmet Sci*, 2005, 27(1), 17-34.

Pyo Kim H, Ho Son K, Wook Chang H, Sik Kang S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci*, 2004, 96(3), 229-45.

Rahimi-Madiseh M, Lorigoini Z, Zamani-Gharaghoshi H, Rafieian-Kopaei M. Berberis vulgaris: specifications and traditional uses. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20(5), 569-87.

Raso GM, Pacilio M, Di Carlo G, Esposito E, Pinto L, Meli R. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of echinacea purpurea and hypericum perforatum. *J Pharm Pharmacol*, 2010, 54(10), 1379-83.

Sonnenbichler J, Scalera F, Sonnenbichler I, Weyhenmeyer R. Stimulatory effects of silibinin and silicristin from the milk thistle *silybum marianum* on kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 290(30), 1375-83.

The Committee on Herbal Medicinal Products. Assessment report on *echinacea purpurea* (L.). Moench, EMA, 2014, str. 22-32.

Thiyagarajan P, Chandrasekaran CV, Deepak HB, Agarwal A. Modulation of lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory mediators by an extract of *glycyrrhiza glabra* and its phytoconstituents. *Inflammopharmacology*, 2011, 19(4), 235-41.

Wang L, Yang R, Yuan B, Liu Y, Liu C. The antiviral and antimicrobial activities of licorice, a widely-used chinese herb. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5(4), 310-15.

Wolfson A, Dlugy C, Shotland Y. Glycerol as a green solvent for high product yields and selectivities. *Environ Chem Lett*, 2007, 5, 67-71.

Yang R, Yuan BC, Ma YS, Zhou S, Liu Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used chinese herb. *Pharm Biol*, 2017, 55(1), 5-18.

Zhou JX, Wink M. Evidence for anti-inflammatory activity of isoliquiritigenin, 18 β glycyrrhetic acid, ursolic acid, and the traditional chinese medicine plants *glycyrrhiza glabra* and *eriobotrya japonica*, at the molecular level. *Medicines*, 2019, 6(2), 55.

Zou K, Li Z, Zhang Y, Zhang HY, Li B, Zhu WL, Shi JY, Jia Q, Li YM. Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(2), 157-67.

7.SAŽETAK

7.1. Sažetak:

U ovome diplomskom radu istražena je protuupalna aktivnost ekstrakata biljnih droga *Glycyrrhizae radix*, *Berberidis radice cortex*, *Sylbi maiani fructus* i *Ehinaceae purpureae herba*. Ekstrakti biljnih droga pripremljeni su u netkosičnom biorazgradivom glicerolu. Ispitana je povezanost dobivenih rezultata protuupalnog djelovanja sa sadržajem glicerola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima. Rezultati ispitivanja pokazali su znatnu protuupalnu aktivnost biljne droge *Glycyrrhizae radix* u odnosu na pozitivnu kontrolu, te se to djelovanje može povezati sa sadržajem flavonoida. Preostali biljni ekstrakti pokazali su blago ili pak neznatno djelovanje te nizak sadržaj flavonoida.

7.2. Summary:

In this work, anti-inflammatory activity of extracts of herbal drugs *Glycyrrhizae radix*, *Berberidis radice cortex*, *Silybi mariani fructus* and *Echinaceae purpureae herba* was investigated. Herbal drug extracts were prepared in a non-toxic biodegradable solvent glycerol. The correlation of the anti-inflammatory action and flavonoid content in the extracts was investigated. The results show that *Glycyrrhizae radix* demonstrated significant anti-inflammatory activity in relation to the positive control, and that this action can be associated with the content of flavonoids. The remaining plant extracts showed a slight or insignificant effect and a low content of flavonoids.

**8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmakognoziju
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ISPITIVANJE PROTUUPALNE AKTIVNOSTI ODABRANIH BILJNIH VRSTA

Nikolina Lovrić

SAŽETAK

U ovome diplomskom radu istražena je protuupalna aktivnost ekstrakata biljnih droga *Glycyrrhizae radix*, *Berberidis radice cortex*, *Sylbi maiani fructus* i *Ehinaceae purpureae herba*. Ekstrakti biljnih droga pripremljeni su u netkosičnom biorazgradivom glicerolu. Ispitana je povezanost dobivenih rezultata protuupalnog djelovanja sa sadržajem glicerola i flavonoida u ispitivanim ekstraktima. Rezultati ispitivanja pokazali su znatnu protuupalnu aktivnost biljne droge *Glycyrrhizae radix* u odnosu na pozitivnu kontrolu, te se to djelovanje može povezati sa sadržajem flavonoida. Preostali biljni ekstrakti pokazali su blago ili pak nezatno djelovanje te nizak sadržaj flavonoida.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 31 stranica, 16 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 33 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Sladić, Žutika, Sikavica, Ehinacea, Flavonoidi, Protuupalna aktivnost

Mentor: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Marijana Zovko Končić**, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Maja Bival Štefan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Jasna Jablan, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: Rujan, 2020.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacognosy
Marulićev trg 20/II, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

EXAMINATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF SELECTED PLANT SPECIES

Nikolina Lovrić

SUMMARY

In this work, anti-inflammatory activity of extracts of herbal drugs *Glycyrrhizae radix*, *Berberidis radice cortex*, *Silybi mariani fructus* and *Echinaceae purpureae herba* was investigated. Herbal drug extracts were prepared in a non-toxic biodegradable solvent glycerol. The correlation of the anti-inflammatory action and flavonoid content in the extracts was investigated. The results show that *Glycyrrhizae radix* demonstrated significant anti-inflammatory activity in relation to the positive control, and that this action can be associated with the content of flavonoids. The remaining plant extracts showed a slight or insignificant effect and a low content of flavonoids.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 31 pages, 16 figures, 1 table and 33 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Liquorice, Barberry, Silymarin, Echinacea, Anti-inflammatory activity

Mentor: **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers : **Marijana Zovko Končić, Ph.D.** *Full Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Maja Bival Štefan, Ph.D. *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Jasna Jablan, Ph.D. *Assistant Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2020.