



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ljiljana A. Jelenković

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA
AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH
ENZIMA U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU
*IN VITRO***

Текст ове докторске дисертације ставља се на увид јавности,
у складу са чланом 30., став 8. Закона о високом образовању
("Сл. гласник РС", бр. 76/2005, 100/2007 – аутентично тумачење, 97/2008, 44/2010,
93/2012, 89/2013 и 99/2014)

НАПОМЕНА О АУТОРСКИМ ПРАВИМА:

Овај текст сматра се рукописом и само се саопштава јавности (члан 7. Закона о
ауторским и сродним правима, "Сл. гласник РС", бр. 104/2009, 99/2011 и 119/2012).

**Ниједан део ове докторске дисертације не сме се користити ни у какве сврхе,
осим за упознавање са њеним садржајем пре одбране дисертације.**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERZITET U NIŠU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Ljiljana A. Jelenković

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA
AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH
ENZIMA U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU
*IN VITRO***

DOKTORSKA DISERTACIJA

Niš, 2016.



UNIVERSITY OF NIŠ
FACULTY OF SCIENCE AND MATHEMATICS



Ljiljana A. Jelenković

**INFLUENCE OF SELECTED MONOTERPENES ON
ACTIVITY OF DIAGNOSTICALLY
IMPORTANT ENZYMES IN HUMAN SERUM
*IN VITRO***

DOCTORAL DISSERTATION

Niš, 2016.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

MENTORI:

- dr Ivan Palić, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju
- dr Vesna Stankov Jovanović, redovni profesor, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju

ČLANOVI KOMISIJE:

- dr Violeta Mitić, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju
- dr Tatjana Jevtović-Stoimenov, vanredni profesor, Univerzitet u Nišu, Medicinski fakultet
- dr Milanka Radulović, docent, Državni univerzitet u Novom Pazaru, Departman za biomedicinske nauke



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАЦИЈА

Редни број, РБР:	
Идентификациони број, ИБР:	
Тип документације, ТД:	монографска
Тип записа, ТЗ:	текстуални / графички
Врста рада, ВР:	докторска дисертација
Аутор, АУ:	Љиљана А. Јеленковић
Ментор, МН:	Иван Палић и Весна Станков Јовановић
Наслов рада, НР:	Утицај одабраних монотерпена на активност дијагностички значајнијих ензима у контролном хуманом серуму <i>in vitro</i>
Језик публикације, ЈП:	српски
Језик извода, ЈИ:	енглески
Земља публикавања, ЗП:	Србија
Уже географско подручје, УГП:	Србија
Година, ГО:	2016.
Издавач, ИЗ:	ауторски репринт
Место и адреса, МА:	Ниш, Вишеградска 33.
Физички опис рада, ФО: (поглавља/страна/ цитата/табела/слика/графика/прилога)	11 поглавља/ 186 страна/ 152 референце/ 66 табела/ 44 слике/ 3 прилога
Научна област, НО:	хемија
Научна дисциплина, НД:	органска хемија и биохемија
Предметна одредница/Кључне речи, ПО:	инхибиција, ензимска активност, клинички ензими, терпени, серум, карвакрол, линалол, нерол, гераниол
УДК	547.596 : (612.128 + 612.15 + 58.085)
Чува се, ЧУ:	библиотека
Важна напомена, ВН:	Практични део ове докторске дисертације урађен је у биохемијској лабораторији Дома здравља у Нишу

Извод, ИЗ:	<p>У циљу утврђивања ефекта терпена на активност ензима, проучаван је утицај водених (припремљених ручним (I_1) или ултразвучним (I_2) мешањем) и ДМСО (диметилсулфоксид) раствора терпена (карвакрол, линалол, нерол и гераниол) на активност креатин киназе, лактат дехидрогеназе, алкалне фосфатазе, гама-глутамил трансферазе, аспартат аминотрансферазе и аланин аминотрансферазе, као и утицај истих врста раствора терпена (карвакрол, линалол, нерол, гераниол, β-пинен, мирцен, цитрал, еукалиптол, терпинеол и еугенол) на активност амилазе у контролним серумима (са референтном (N) и повећаном (H) активношћу састојака). Мерење активности вршено је након инкубације узорка серума од 10 минута и водених раствора терпена припремљених као I_1 или као I_2, или раствора терпена у ДМСО у четири концентрације. Сви раствори терпена су испољили инхибиторни ефекат који зависи од различитих параметара: врсте серума (већи проценти инхибиције у N него у H-серуму), врсте растварача (водени I_2 раствори и ДМСО раствори показују приближно једнаке проценте инхибиције у обе врсте серума), начина припреме водених раствора (већи проценат инхибиције у N-серуму имају I_2 док у H-серуму имају I_1 водени раствори терпена), као и од врсте терпена односно ензима. Статистичка обрада података код свих раствора терпена (са делимичним изузетком нерола и гераниола) потврдила је груписање или по врсти серума или по врсти растварача или по начину припреме водених раствора.</p>
Датум прихватања теме, ДП:	06.04. 2015. године
Датум одбране, ДО:	}
Чланови комисије, КО:	<p>Председник: Виолета Митић</p> <p>Члан: Татјана Јевтовић-Стоименов</p> <p>Миланка Радуловић</p> <p>Члан, ментор: Иван Палић</p> <p>Весна Станков Јовановић</p>

Образац **Q4.09.13** - Издање 1



**ПРИРОДНО - МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
НИШ**

KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number, ANO :	
Identification number, INO :	
Document type, DT :	monograph
Type of record, TR :	textual / graphic
Contents code, CC :	doctoral dissertation
Author, AU :	Ljiljana A. Jelenković
Mentor, MN :	Ivan Palić and Vesna Stankov Jovanović
Title, TI :	Influence of selected monoterpenes on activity of diagnostically important enzymes in human serum <i>in vitro</i>
Language of text, LT :	Serbian
Language of abstract, LA :	English
Country of publication, CP :	Serbia
Locality of publication, LP :	Serbia
Publication year, PY :	2016.
Publisher, PB :	author's reprint
Publication place, PP :	Niš, Višegradska 33.
Physical description, PD : (chapters/pages/ref./tables/pictures/graphs/appendixes)	11 chapters/ 186 pages/ 152 references/ 66 tables/ 44 figures/ 3 annex
Scientific field, SF :	chemistry
Scientific discipline, SD :	organic chemistry and biochemistry
Subject/Key words, S/KW :	inhibition, enzyme activity, clinical enzymes, terpenes, serum, carvacrol, linalool, nerol, geraniol
UC	547.596 : (612.128 + 612.15 + 58.085)
Holding data, HD :	library
Note, N :	Practical part of this doctoral thesis was done in Biochemical laboratory of Health Center in Nis

Abstract, AB :	<p>In order to determine the terpenes effect on enzyme activity is been studied the impact of aqueous (prepared manually (I1) or ultrasound (I2) mixing) and DMSO (dimethyl sulfoxide) terpenes solution (carvacrol, linalool, nerol and geraniol) on the activity of creatine kinase, lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase, gamma-glutamyl transferase, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase,as well as the impact of the same type of terpenes solution (carvacrol, linalool, nerol, geraniol, β-pinene, myrcene, citral, eucalyptol, terpineol, and eugenol) on the activity of amylase in the control sera (with the normal (N) and increased (H) activity of the ingredients. Measurement of activity was conducted after incubation of the serum sample from the 10 minutes and aqueous solutions of terpenes prepared as I1 or as I2, or solutions of terpenes in DMSO at four concentrations. All the terpenes solutions have demonstrated that the inhibitory effect depends on various parameters: kinds of serum (higher percentage of inhibition in N than the H serum), the type of solvent (the aqueous solution as I2 and DMSO solutions showed approximately the same percentage of inhibition in both types of serum) and way of preparing the aqueous solutions (a higher percentage of inhibition have the aqueous solution of terpenes as I2 in N serum and as I1 in H serum), as well as on the type of terpenes or enzymes. Statistical data processing all terpenes solution (with the partial exception of neroli and geraniol) confirmed the grouping or by type of serum or by type of solvent or the method of preparation of aqueous solution</p>						
Accepted by the Scientific Board on, ASB :	06.04.2015.						
Defended on, DE :							
Defended Board, DB :	<table border="0"> <tr> <td data-bbox="399 840 611 907">President:</td> <td data-bbox="611 840 1465 907">Violeta Mitić</td> </tr> <tr> <td data-bbox="399 907 611 1041">Member:</td> <td data-bbox="611 907 1465 1041">Tatjana Jevtović-Stoimenov Milanka Radulović</td> </tr> <tr> <td data-bbox="399 1041 611 1162">Member, Mentor:</td> <td data-bbox="611 1041 1465 1162">Ivan Palić Vesna Stankov Jovanović</td> </tr> </table>	President:	Violeta Mitić	Member:	Tatjana Jevtović-Stoimenov Milanka Radulović	Member, Mentor:	Ivan Palić Vesna Stankov Jovanović
President:	Violeta Mitić						
Member:	Tatjana Jevtović-Stoimenov Milanka Radulović						
Member, Mentor:	Ivan Palić Vesna Stankov Jovanović						

Образац **Q4.09.13** - Издање 1

Praktični deo istraživanja u okviru ove doktorske disertacije urađen je u biohemijskoj laboratoriji Doma zdravlja u Nišu, pa se zahvaljujem dr Radmili Vučković, spec. med. biohemije, koja je omogućila saradnju sa laboratorijom, kao i dr Jeleni Milovanović, spec. med. biohemije, Ljiljani Dimitrijević, višem lab. tehničaru i Svetlani Mladenović, lab. tehničaru, za pruženu pomoć u radu u laboratoriji pri održivanju enzimske aktivnosti.

Najiskrenije se zahvaljujem mojim mentorima, prof. dr Ivanu Paliću i prof. dr Vesni Stankov Jovanović, koji su rukovodili izradom disertacije i nesebično mi pomagali u svim fazama njenog oblikovanja.

Prof. dr Violeti Mitić dugujem zahvalnost za pomoć i veoma korisne sugestije i savete kod izvođenja i analize statističkih podataka.

Takođe, zahvaljujem i prof. dr Tatjani Jevtović-Stoimenov i dr Milanki Radulović, docentu, na korisnim sugestijama u završnoj fazi izrade ove disertacije, čime su uticale na njen kvalitet.

Posebnu zahvalnost za ljubav, podršku, strpljenje i razumevanje za nepovratno vreme provedeno za računarom dugujem svojim sinovima, suprugu i roditeljima.

OZNAKE I SKRAĆENICE

-NOMENKLATURA-

ATP	Adenozin trifosfat
ADP	Adenozin difosfat
AMP	Adenozin monofosfat
NAD	Nikotinamin adenin dinukleotid
NADH	Nikotinamin adenin dinukleotid – redukovani oblik
NADP	Nikotinamin adenin dinukleotid fosfat
NADPH	Nikotinamin adenin dinukleotid – redukovani oblik
FMN	Flavin mononukleotid
FAD	Flavin adenin dinukleotid
Q₁₀	Koenzim ku 10
TPP	Tiaminpirofosfat
PLP	Piridoksalfosfat
CoA	Koenzim A
AcCoA	Adenozin kobaltamin
H₄folat	Tetrahidrofolna kiselina
EC	Enzyme commission
G-6-P	Glukoza-6-fosfat
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
RNK	Ribonukleinska kiselina
Cys	Cistein
L.	Taksonomija biljaka
E	Entgegen (stereodeskriptor)
Z	Zusammen (stereodeskriptor)
L	Laevus
D	Dexter
(-)	levorotatorni
(+)	desnorotatorni
p	para

-ENZIMI-

AST	Aspartat aminotransferaza
ALT	Alanin aminotransferaza
ALP	Alkalna fosfataza
AMY	Amilaza
ACP	Kisela fosfataza
AChE	Acetilholinesteraza
CK	Kreatin kinaza
GGT	Gama-glutamil transferaza
LDH	Laktat dehidrogenaza

MDH	Malat dehidrogenaza
COX	Ciklooksigenaza
G-6-PDH	Glukoza-6-fosfodehidrogenaza

-REAGENSI I RASTVORI-

DMSO	Dimetilsulfoksid
NAC	N-acetil-L-cistein
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
pNPP	para-nitrofenilfosfat
CNPG3	2-hloro-4-nitrofenil- α -D-maltotriozid
CPNP	2-hloro-4-nitrofenol
CNPG2	2-hloro-4-nitrofenil- α -D-maltozid
HCl	Hlorovodonična kiselina
N-serum	Serum referentne enzimske aktivnosti
H-serum	Serum povećane enzimske aktivnosti
I₁	Inhibitor pripremljen ručnim mešanjem
I₂	Inhibitor pripremljen ultrazvučnim mešanjem
K	Rastvor karvakrola
L	Rastvor linalola
N	Rastvor nerola
G	Rastvor geraniola

-FIZIČKO-HEMIJSKI PARAMETRI-

K_m	Mihaelis-Mentenova konstanta
pH	Potentia Hydrogeni
pI	Izoelektrična tačka
C	Koncentracija rastvora
p.a.	Pro analysis

-STATISTIČKA ANALIZA-

ANOVA	Analysis of variance – Jednosmerna analiza varijanse
PCA	Principal component analysis – Analiza glavne komponente
HCA	Hierarchical cluster analysis – Hijerarhijska klaster analiza
SD	Standard deviation – Standardna devijacija
p	Pertinence – važnost, značajnost

-MERNE JEDINICE-

SI	International system of units
°C	Celzijusov stepen
h	sat

min	minut
s	sekund
IU ili U	Internacionalna jedinica enzimске aktivnosti
kat	katal
L	litar
dm³	decimetar kubni
cm³	centimetar kubni
n	nano
μ	mikro
m	mili
kg	kilogram
g	gram

-OSTALO-

WHO-SZO	World health organisation-Svetska zdravstvena organizacija
IUB	International union of biochemistry
IFCC	Internaciona federation of clinical chemistry
IFCC 37⁰C	Dozvoljena samo metoda I
IFCC (EPS) 37⁰C	Dozvoljena i II metoda sa blokiranim oligosaharidnim supstratima
IFCC P-5'-P 37⁰C	Dozvoljena i II metoda sa piridoksal fosfatom
IUBMB	Internacional union of biochemistry and molecular biology
HIV	Human immunodeficiency virus
WHMIS	Workplace hazardous materials information system
CNS	Centralni nervni sistem
RES	Retikuloendotelni sistem
DT	Digestivni trakt
TT	Telesna težina

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPŠTI DEO	5
2.1. Enzimi kao biokatalizatori	6
2.1.1. Struktura enzima	6
2.1.2. Osobine enzimskih molekula	9
2.1.3. Nomenklatura i klasifikacija enzima	10
2.1.4. Faktori koji utiču na aktivnost enzima	11
2.1.5. inhibicija enzima	12
2.1.6. Uloga enzima u organizmu	13
2.1.7. Klinički značaj određivanja enzima	14
2.1.7.1. Kreatin kinaza– CK – Adenozin trifosfat: kreatin fosfotransferaza EC 2.7.3.2.	17
2.1.7.2. Laktat dehidrogenaza– LDH - L-laktat: NAD-oksidoireduktaza EC 1.1.1.2.	19
2.1.7.3. Alkalna fosfataza– ALP – Ortofosfat-monoestar fosfohidrolaza EC 3.1.3.1.	21
2.1.7.4. γ -glutamil transferaza– GGT – 5-glutamilpeptid: aminoacil 5-glutamil transferaza EC 2.3.2.2.	22
2.1.7.5. Aspartat amino transferaza– AST – L-aspartat: 2-oksoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.1. (Glutamat oksalacetat transaminaza - GOT)	24
2.1.7.6. Alanin amino transferaza– ALT – L-alanin: 2-oksoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.2. (Glutamat piruvat transaminaza – GPT)	26
2.1.7.7. Amilaza – AMY – α -1 \rightarrow 4-glukan: 4-glukanohidrolaza EC3.2.1.1.	27
2.1.8. Metode za određivanje enzimske aktivnosti	28
2.1.8.1. Jedinice za izražavanje enzimske aktivnosti	30
2.1.8.2. Faktori koji utiču na koncentraciju enzima u serumu	30
2.2. Etarska ulja	31
2.2.1. Opšte karakteristike etarskih ulja	31
2.2.2. Hemijski sastav etarskih ulja	32
2.2.3. Uloga etarskih ulja	33
2.2.3.1. Farmakološka uloga etarskih ulja	33
2.2.3.2. Toksičnost etarskih ulja	34
2.3. Terpeni	35
2.3.1. Opšte karakteristike terpena	35
2.3.1.1. Mircen	37
2.3.1.2. β -pinen	37
2.3.1.3. Karvakrol	38
2.3.1.4. Linalol	39

2.3.1.5. Nerol	40
2.3.1.6. Geraniol	40
2.3.1.7. Citral	41
2.3.1.8. Eukaliptol	42
2.3.1.9. Terpeneol	42
2.3.1.10. Eugenol	43
2.3.2. Terpeni i etarska ulja u istraživanjima	44
2.4. Statistička analiza	46
2.4.1. Analiza glavnih komponenata	46
2.4.2. Klaster analiza	47
2.4.2.1. Hijerarhijska metoda	48
2.4.2.2. Nehijerarhijska metoda ili metoda raščlanjenja	50
3. EKSPERIMENTALNI DEO	51
3.1. Priprema uzoraka seruma	52
3.2. Priprema rastvora terpena	52
3.3. Merenje aktivnosti enzima u komercijalnom kontrolnom humanom serumu	54
3.3.1. Merenje aktivnosti enzima kreatin kinaze	57
3.3.2. Merenje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze	58
3.3.3. Merenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze	59
3.3.4. Merenje aktivnosti enzima γ -glutamil transferaze	60
3.3.5. Merenje aktivnosti enzima aspartat aminotransferaze	61
3.3.6. Merenje aktivnosti enzima alanin aminotransferaze	61
3.3.7. Merenje aktivnosti enzima amilaze	62
3.4. Obrada rezultata	63
4. REZULTATI I DISKUSIJA	64
4.1. Aktivnost kliničkih enzima	65
4.1.1. Uticaj rastvora terpena na aktivnost kreatin kinaze (CK)	67
4.1.2. Uticaj rastvora terpena na aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH)	71
4.1.3. Uticaj rastvora terpena na aktivnost alkalne fosfataze (ALP)	74
4.1.4. Uticaj rastvora terpena na aktivnost γ -glutamil transferaze (GGT)	78
4.1.5. Uticaj rastvora terpena na aktivnost aspartat aminotransferaze (AST)	81
4.1.6. Uticaj rastvora terpena na aktivnost alanin aminotransferaze (ALT)	85
4.1.7. Uticaj rastvora terpena na aktivnost amilaze (AMY)	88
4.2. Statistički testovi	97
4.2.1. Uticaj vodenih i DMSO rastvora karvakrola na aktivnost ispitivanih enzima	97
4.2.2. Uticaj vodenih i DMSO rastvora linalola na aktivnost ispitivanih enzima	105

4.2.3. Uticaj vodenih i DMSO rastvora nerola na aktivnost ispitivanih enzima	113
4.2.4. Uticaj vodenih i DMSO rastvora geraniola na aktivnost ispitivanih enzima	120
4.2.5. Zajednički uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, nerola, linalola i geraniola na aktivnost kliničkih enzima	127
4.2.6. Zajednički uticaja vodenih rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na aktivnost amilaze	138
5. ZAKLJUČAK	147
6. SUMMARY	151
7. LITERATURA	156
8. PRILOZI	169
9. BIOGRAFIJA AUTORA	176
10. BIBLIOGRAFIJA	178
11. IZJAVE AUTORA	182

UVOD

Flora ima veliki značaj za opstanak živog sveta na planeti prvenstveno zbog autotrofije a zatim i zbog mogućnosti upotrebe u različitim aspektima života faune, uključujući i čoveka. U novije vreme biljni prirodni proizvodi dobijaju prvenstvo u odnosu na upotrebu sintetičkih, polusintetičkih i njihovih derivatizovanih proizvoda, a time flora dobija i značajan privredni potencijal. Jedan od vrlo rasprostranjenih načina primene biljnih proizvoda je aromaterapija koja može da se definiše kao upotreba etarskih ulja biljaka u terapijske svrhe (Jakovljević et al., 1996; Tiserand, 1980; Imanishi et al., 2009). Iako reč "aroma" asocira na to da se ulja udišu, ona mogu da se primenjuju respiracijom, perkutano ili *per os*. Bez obzira na način primene etarska ulja pobuđuju sve veću pažnju kao alternativni tretman lečenja, naročito kod stresa, infekcija, kao i drugih zdravstvenih problema. Razloge treba tražiti u savremenom načinu života u razvijenom svetu, koji ne ostavlja puno vremena zaposlenom pojedincu, kao i u poštovanju tradicije u manje razvijenim zemljama. Prvi, zbog nedostatka vremena, a drugi, zbog poštovanja iskustva, posežu za biljkama i njihovim proizvodima, kao nečemu što ne može da šteti, a može da koristi, što predstavlja veoma rasprostranjeno mišljenje koje se uopšte ne dovodi u sumnju iz vizure prosečnog stanovnika planete. U prilog ovakvoj tvrdnji govore i podaci da se svake godine povećava potrošnja lekovitih i aromatičnih biljaka i njihovih proizvoda na svetskom tržištu. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) procenjuje da oko 80% populacije u svetu koristi biljne preparate u lečenju (WHO, 2002).

Naučni dokazi za ekspanziju eksploatacije etarskih ulja potvrđuju mnoge pozitivne efekte etarskih ulja na živi organizam, kao npr. antibakterijsko, antianafilaktično, antihistaminično, antidijabetično, antioksidantno, antikancerogeno, antigenotoksično, neuroprotektivno, kardioprotektivno, radioprotektivno, hepatoprotektivno, imunološko, kontraceptivno, enzim-inhibitorno i dr (Kovačević, 2004; Budhiraja et al., 1999; Lorenzetti et al., 1991; Schilcher, 1984; Wagner & Wolf, 1977). Međutim, ustanovljeno je da neka ulja imaju štetan uticaj, uključujući hepatotoksičnost, alergijske reakcije, depresivno delovanje i drugo (Schilcher, 1984; Matlawska & Bylka, 2001; Newall et al., 1996; PDR for herbal medicines, 2001; Bertram et al., 2001).

Različita istraživanja pokazala su, da efekat koji etarska ulja imaju na živi organizam, najčešće predstavlja posledicu delovanja terpena, kao dominantnih sastojaka ulja (El-Hawary et al., 2013; Da Silveira et al., 2013; Edris, 2007).

Uzimajući u obzir prethodno kao i činjenicu da se etarska ulja primenjuju najčešće samoinicijativno, sa ubeđenjem u isključivo pozitivno delovanje, mogućnost zloupotrebe je

izuzetno velika. Vrednosti aktivnosti enzima u serumu, kao najvažnijih biohemijskih pokazatelja stanja u tkivima, organima i organizmu se veoma često koriste u kliničkoj praksi u dijagnostičke svrhe, te je od suštinske važnosti da su dobijeni rezultati isključivo posledica stanja u organizmu. Nekonrolisana primena preparata na bazi biljaka može potencijalno uticati na aktivnost dijagnostički značajnih enzima u serumu, i na taj način stvoriti donekle izmenjenu sliku stvarnog stanja u organizmu. Kako je u literaturi poznat uticaj nekih etarskih ulja na aktivnost enzimaza istraživanje u okviru ove doktorske disertacije odabrani su terpeni koji su dominantni sastojci u etarskim uljima koja se koriste u svakodnevnom životu, kako u kulinarstvu tako i u kozmetici ili u aromaterapiji: geraniol (geranium), nerol (narandža), linalol (lavanda) i karvakrol (bosiljak, origano) sa ciljem utvrđivanja njihovog eventualnog uticaja na aktivnost dijagnostički značajnih enzima u humanom serumu *in vitro*. Enzimi za koje je ispitivan efekat navedenih terpena aktivnošću ukazuju na sledeća stanja: kreatin /fosfo/ kinaza (CK, CPK) –infarkt miokarda, hipotiroidizam, malignu hipotermiju, cerebralni infarkt, akutnu psihozu, trovanje alkoholom i sedativima, šok, neke hematološke bolesti i dr.; laktat dehidrogenaza (LDH) –infarkt miokarda, infektivnu mononukleozu, neke forme leukemije, hepatobilijarne bolesti, metastaze (naročito jetre) i dr.; amilaza (AMY) – bolesti pankreasa, žučnih puteva, perforacije čira, intestinalne opstrukcije, trombozu unutrašnjih vena, uremiju, postoperativna stanja, upale, dijabet sa ketoacidozom, opekotine, kancer pluća, jajnika i druge tipove kancera; alkalna fosfataza (ALP) –bolesti jetre, žučnih puteva, bolesti kostiju, osteomalacija, rahitis, hiperparatiroidizam, kancer kostiju, metastaze na kostima i dr; γ – glutamil transferaza (GGT) –akutni i hronični hepatitis, cirozu, žuticu i dr; aspartat aminotransferaza (AST) – bolesti jetre i srca; i alanin aminotransferaza (ALT) –bolesti žučnih puteva, akutni infektivni hepatitis, akutni i hronični pankreatitis i dr.

Kako je inhibicija amilaze dejstvom terpena jedan od savremenijih pristupa (Melzig & Funke, 2007; Grover et al., 2002; Mukherjee et al., 2006) u tretmanu dijabetesa tip 2, najzastupljenije nezarazne bolesti na planeti prema podacima WHO (WHO, 2008), testiran je uticaj još dodatnih šest terpena na njenu aktivnost: β -pinen (kim), mircen (bosiljak), citral (citrusi), eukaliptol (eukaliptus), terpineol (bor) i eugenol (muskatni orah).

S obzirom da ne postoji dovoljno podataka o uticaju terpena na aktivnost kliničkih značajnih enzima odlučili smo da u *in vitro* uslovima ispitamo:

-uticaj vodenih rastvora terpena (karvakrol, linalol, nerol i geraniol) na aktivnost kliničkih enzima (CK, LDH, ALP, GGT, AST, ALT i AMY) u serumima sa referentnom i povećanom aktivnošću enzima,

-uticaj načina pripreme vodenih rastvora terpena (ručnim ili ultrazvučnim mešanjem) na aktivnost klinički značajnijih enzima,

-uticaj vrste rastvarača (voda i dimetilsulfoksid-DMSO) koji se koristi za pripremu rastvora terpena na aktivnost klinički značajnijih enzima,

-uticaj DMSO i vodenih rastvora terpena (karvakrol, linalol, nerol, geraniol, β -pinen, mircen, citral, eukaliptol, terpineol i eugenol) pripremljenih na dva načina (ručnim i ultrazvučnim mešanjem) na aktivnost enzima AMY i

-povezanost dobijenih rezultata primenom metoda statističke analize.

OPŠTI DEO

2.1. Enzimi kao biokatalizatori

Hemijske reakcije u biološkim sistemima retko kada se odigravaju bez učešća katalizatora. Enzimi ili fermenti su biološki katalizatori. Naziv enzim potiče od grčkih reči *en zyme* što znači „u kvascu“, dok naziv ferment potiče od latinske reči *fermentum* koja ima isto značenje. Enzimi u živim sistemima imaju prvenstveno katalitičku ulogu. Naime, uslovi u živim organizmima nisu pogodni za postizanje optimalne brzine hemijske reakcije (u ljudskom organizmu je temperature 37° C, pritisak konstantan, koncentracija raktanata promenljiva, pH najčešće u rasponu od 4-8 dok su reagujuće čestice najčešće organski molekuli). Zbog toga, enzimi svojim delovanjem ubrzavaju reakcije nekoliko miliona puta čineći metaboličke reakcije mogućim u datim uslovima, čime, na višem nivou, omogućavaju nesmetano odvijanje metabolizma živih bića. Osim osnovne katalitičke uloge, enzimi imaju i regulatorsku ulogu u metabolizmu, odnosno, oni prvi reaguju na promenu uslova odvijanja reakcije i adaptiraju sistem na novonastale uslove dok se i hormoni (metabolički regulatori) ne prilagode izmenjenim uslovima sredine (Chock et al., 1980).

Enzimi se sintetišu u ćeliji, a biološku aktivnost ispoljavaju u ćeliji u kojoj su sintetisani (endo enzimi) ili se iz nje izlučuju pa deluju na različitim mestima u organizmu (egzo enzimi). To znači da je njihova količina u organizmu srazmerna metaboličkoj aktivnosti ćelija i tkiva.

2.1.1. Struktura enzima

Enzimi su po hemijskom sastavu proteini, pa je njihova funkcija određena strukturom. Prema složenosti strukture enzima razlikujemo:

- a) proste, odnosno, protein-enzyme, koji hidrolizom daju samo amino kiseline, a inaktivacija se postiže denaturacijom i
- b) složene, odnosno, proteid-enzyme, koji hidrolizom daju proteinski deo enzima ili apoenzim, a on daljom hidrolizom amino kiseline, i neproteinski deo enzima ili kofaktor. Aktivnost holoenzima zavisi od kofaktora zbog toga što on direktno učestvuje u vezivanju supstrata, a inaktivacija se postiže uklanjanjem kofaktora (Murray et al., 2003).

Kofaktor, neproteinski deo molekula enzima, može biti metalni jon ili organski molekul. Kofaktor metalni jon je najčešće iz grupe esencijalnih ili mikro elemenata ili elemenata u tragovima (npr. Cu, Zn, Mn, Se, Co i dr.) i on se koordinativnim vezama vezuje

za apoenzim, čime holoenzim postaje biološki aktivan. Enzimi koji kao kofaktor sadrže metalne jone se često nazivaju i metalo enzimima. Kofaktori organski molekuli mogu biti ili prostetična grupa ili koenzim. Međusobno se razlikuju po načinu vezivanja za apoenzim. Prostetična grupa se jakim vezama vezuje za apoenzim i teško se od njega odvaja, dok se koenzim slabim vezama vezuje za enzim i lako se odvaja od njega. Druga razlika između koenzima i prostetičnih grupa kao kofaktora holoenzima je i u načinu katalitičkog dejstva. Prostetične grupe direktno stupaju u reakciju, u njoj se menjaju i tek u sekundarnoj fazi vraćaju u prvobitni oblik, dok koenzimi služe kao „most“ za prenos vodonika, elektrona ili funkcionalnih grupa između najmanje dva apoenzima (Murray et al., 2003).

Bez obzira da li su u pitanju prostetične grupe ili koenzimi, prema ulozi koju imaju u organizmu možemo razlikovati:

- a) prenosioce vodonika: nikotinamidadenin dinukleotid (NAD), nikotinamidadenin dinukleotid fosfat (NADP), flavin mononukleotid (FMN), flavinadenin dinukleotid (FAD), ku deset (Q_{10}), biotin i dr. (npr. prostetične grupe su FMN, FAD i biotin, ostali su koenzimi);
- b) prenosioce funkcionalnih grupa: tiamin pirofosfat (TPP), piridoksal fosfat (PLP), adenzin trifosfat (ATP), koenzim A (CoA), tetrahidrofolna kiselina (H_4 folat), adenzilkobalt amin (ACoA) i dr. (npr. prostetične grupe su TPP i ACoA, ostali su koenzimi).

Proteinski deo enzima strukturno je organizovan kao i svi proteini, kroz nekoliko nivoa:

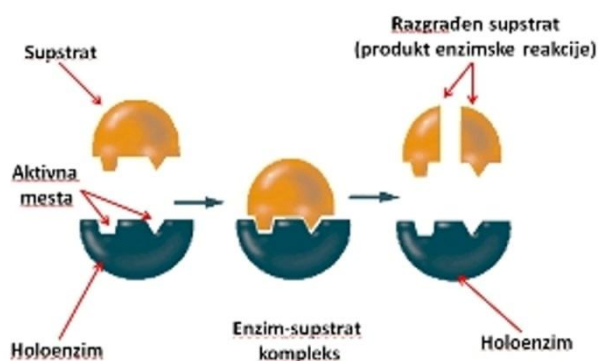
1. primarna struktura (1^0), odnosno, redosled amino kiselina u polipeptidnom lancu,
2. sekundarna struktura (2^0) koja predstavlja strukturne oblike nastale kao posledica međusobne interakcije amidnih veza u polipeptidnom lancu, a koji se manje ili više ponavljaju u ukupnoj strukturi molekula,
3. tercijarna struktura (3^0) koja predstavlja konformaciju molekula u prostoru, nastalu kao posledicu interakcija R-ostataka aminokiselina koje grade polipeptidni lanac
4. kvaternarna struktura (4^0) predstavlja konformaciju molekula u prostoru formiranu usled interakcija tercijarnih struktura dva ili više polipeptidna lanaca.

Specifičnost u strukturi enzima čini katalitičko mesto, odnosno aktivni centar enzima. To je mesto za koje se vezuje supstrat. Aktivni centar je na specifičan način organizovana

tercijarna struktura polipeptidnog lanca enzima koji čini do 5% mase enzima. Supstrat se u aktivni centar ne vezuje celom površinom, već slabim kovalentnim vezama u nekoliko tačaka na dva načina:

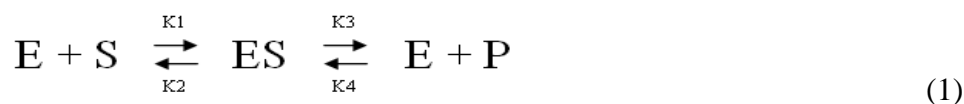
- mehanizam ključ-brava – kada supstrat po strukturi odgovara strukturi aktivnog centra enzima;
- mehanizam prilagođavanja – kada supstrat ne odgovara strukturi aktivnog centra enzima, tada se aktivni centar enzima, koji nije kruta konformacija, menja u toku procesa vezivanja i prilagođava strukturi supstrata.

Na osnovu načina na koji se vezuju enzim i supstrat može se zaključiti da je jedini mogući mehanizam enzimske katalize preko stvaranja prelaznog kompleksa (Slika 1.):

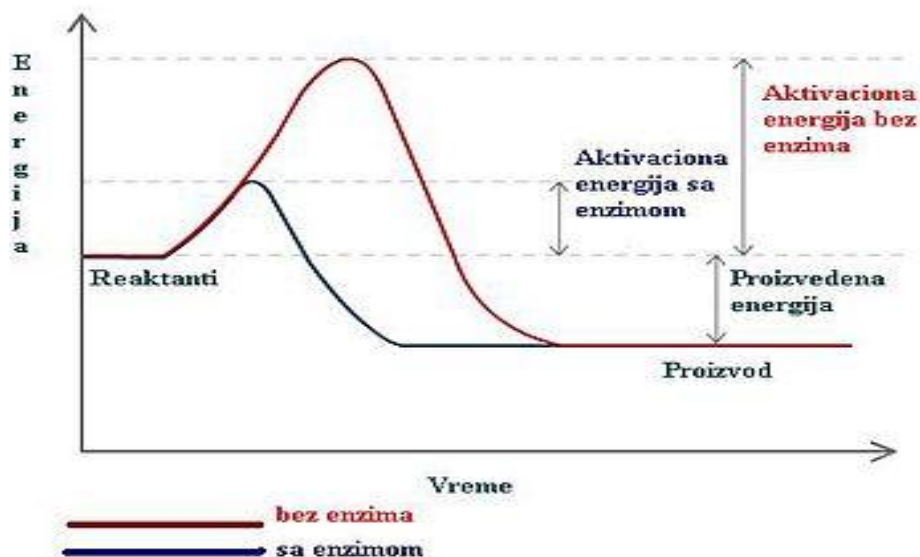


Slika 1. Mehanizam enzimske katalize

što može da se predstavi sledećom jednačinom (jednačina 1):



Pri tome, enzimi ubrzavaju reakcije stvaranja i razgradnje prelaznog kompleksa podjednako, što znači da pri enzimskoj katalizi ne dolazi do pomeranja hemijske ravnoteže ni u levo ni u desno već se sama ravnoteža uspostavlja u vrlo kratkom vremenskom intervalu, dok bi bez enzima uspostavljanje ravnoteže trajalo znatno duže. Enzimi ubrzavaju reakcije smanjivanjem energije aktivacije (Slika 2.):



Slika 2. Grafička zavisnost promene energije sa vremenom za katalizovanu i nekatalizovanu reakciju

2.1.2. Osobine enzimskih molekula

Dominantno proteinska struktura enzima uslovljava da enzimi, odnosno, proteini sa specifičnom katalitičkom ulogom u organizmu, imaju sve karakteristične osobine proteina, kao što su npr:

- * hidroliza – raskidanje primarne strukture, odnosno amidne veze između amino kiselina, čime se narušavaju i svi ostali oblici strukture molekula. Odvija se pod uticajem kiselina ili baza i predstavlja nepovratan proces pri čemu se gubi biološka aktivnost,
- * denaturacija – raskidanje interakcija između bočnih nizova amino kiselina zbog čega se narušavaju 2°, 3° i 4° struktura proteina, dok 1° ostaje nenarušena. Izazivaju je toplota, zračenja, kiseline, baze, toksini i dr., i takođe, predstavlja nepovratan proces, odnosno uzrokuje gubitak biološke aktivnosti,
- * taloženje i rastvorljivost – direktno uzrokovane vrednošću izoelektrične tačke (pI) proteina/enzima, a koja je posledica sposobnosti bočnih nizova amino kiselina da vežu ili otpuste proton, čime dovode do pojave naelektrisanja u enzimskom molekulu. Izoelektrična tačka predstavlja onu vrednost pH na kojoj je molekul proteina/enzima prisutan kao bipolaran jon, kada je odbijanje između molekula najmanje, pa se grade agregati i enzim taloži. Ukoliko je pH u rastvoru različito od pI enzima, on je prisutan u obliku pozitivnog ili negativnog jona što uslovljava njihovu rastvorljivost i izuzetno je važno za ispoljavanje enzimske aktivnosti.

Osim ovih osobina, karakterističnih za sve proteine, enzimi imaju i dve osobine koje su svojstvene samo njima i to:

- * velika efikasnost delovanja – koja se ogleda u višestrukom ubrzavanju hemijskih reakcija u organizmu, čime one od vrlo sporih reakcija postaju veoma brze i na taj način metabolički iskoristive (Stryer et al., 1991);
- * velika specifičnost delovanja – enzim katalizuje jednu vrstu reakcija na malom broju supstrata. Ovako izražena specifičnost za posledicu ima mnogobrojnost enzima – smatra se da u ljudskom organizmu ima između 3000-5000 enzima, a da bez oko 2000 život ne bi bio moguć. Prema izraženoj specifičnosti enzimi mogu da se podele u četiri osnovne grupe:
 - a. apsolutno specifični – koji katalizuju samo jednu reakciju;
 - b. grupno specifični – koji katalizuju reakcije samo određene funkcionalne grupe;
 - c. enzimi koji osim određene funkcionalne grupe imaju još specifičniji uslov – ako su u pitanju proteaze, enzimi koji razgrađuju peptidne veze, njima nije dovoljno da je to samo peptidna veza, već je potrebno da su je nagradile određene amino kiseline i
 - d. stereospecifični enzimi – enzimi koji katalizuju reakcije samo određenog stereoizomernog oblika supstrata.

2.1.3. Nomenklatura i klasifikacija enzima

Prvi enzimi koji su otkriveni dobijali su trivijalne nazive, npr. pepsin, tripsin, trombin i dr., a početkom XX veka postala je praksa da se enzimi imenuju tako što se na ime supstrata na koji deluju ili na hemijsku grupu u supstratu doda nastavak „aza“ – npr. amilaza, fosfataza, ureaza itd. (Tietz, 1997). Međutim, kako se nauka o enzimima dalje razvijala, postojeća nomenklatura nije bila zadovoljavajuća. Zato je formiran standardizovani sistem koji predstavlja rezultat rada *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* (IUB, 1964). Prema ovom sistemu, svakom enzimu dodeljena su po dva naziva:

1. sistemski – koji se sastoji iz imena i numeričkog koda. Prema njemu, ime enzima izvodi se iz imena supstrata na koji deluje enzim, vrste veze koja se katalizuje, vrste katalizovane reakcije i sufiksa „aza“. Ispred numeričkog koda piše se prefiks EC (Enzym Commission), a zatim kod od četiri broja međusobno odvojena tačkom, kod kojih je prvi broj broj glavne enzimske klase, drugi je broj grupe i bliže određuje vezu na koju deluje enzim, treći broj je broj podgrupe i bliže

određuje vrstu jedinjenja, dok je četvrti broj individualni broj unutar podgrupe, koji se dobija najčešće po redu otkrivanja/definisanja (npr. Acetilholin acetilhidrolaza EC 3.1.1.7. ili Acilholin acilhidrolaza EC 3.1.1.8.),

2. trivijalni ili uobičajeni naziv koji može biti i isti kao sistemski, što najčešće nije slučaj, već je naziv znatno uprošćen i pogodan za svakodnevno korišćenje. Za kliničku hemiju karakteristična praksa je i da se trivijalni nazivi skrate na skraćenice od dva ili tri velika slova (Holinesteraza ili CHE).

Klasifikacija enzima se može izvršiti na različite načine, ali samo je jedna direktno povezana sa nomenklaturom. Prema njoj su enzimi podeljeni prema vrsti reakcija koje katalizuju na šest glavnih klasa, gde je broj glavne enzimske klase, ustvari, prvi broj u numeričkom kodu nomenklature enzima. U pitanju su sledeće klase:

1. oksidoreduktaze – enzimi koji katalizuju reakcije oksidacije i redukcije,
2. transferaze – enzimi koji katalizuju reakcije prenosa delova molekula između molekula supstrata,
3. hidrolaze – enzimi koji katalizuju reakcije sa vodom,
4. liaze – enzimi koji katalizuju reakcije adicije i eliminacije hemijskih grupa,
5. izomeraze – enzimi koji katalizuju reakcije izomerizacije i
6. ligaze ili sintetaze – enzimi koji katalizuju stvaranje novih molekula

2.1.4. Faktori koji utiču na aktivnost enzima

S obzirom da su enzimi po hemijskom sastavu najčešće proteini, na njihovu aktivnost, a samim tim i na metabolizam uopšte, mogu da utiču mnogi, kako hemijski, tako i fizički faktori. Neki od njih, koji utiču i na protein i na proteid-enzime su:

- * **koncentracija enzima** - koja predstavlja količinu enzima u jedinici zapremine ili na jedinicu mase, a direktno zavisi od biosinteze i perioda poluživota enzima;
- * **koncentracija supstrata** - ona koncentracija supstrata pri kojoj se postiže polovina maksimalne brzine enzimske reakcije naziva se Mihaelis-Mentenova konstanta (K_m). Pri povećanju koncentracije enzima (a sa nepromenjenim ostalim uslovima) povećava se maksimalna brzina reakcije, ali K_m ostaje nepromenjena, što znači da je ovaj parametar stalan za određeni enzim i određeni supstrat. Recipročna vrednost K_m u praksi se definiše kao afinitet enzima prema supstratu. Što je vrednost Mihaelis-Mentenove konstante manja enzim ima veću katalitičku

moć, odnosno afinitet prema supstratu. U fiziološkim uslovima koncentracija supstrata je najčešće bliska K_m vrednosti za dati enzim (Roberts, 1977);

- * **temperatura** - enzimi su maksimalno aktivni samo na optimalnoj temperaturi, a to je temperatura organizma iz koga potiče enzim. Zbog toga, opseg optimalne temperature za živi svet iznosi od 18-40⁰ C, dok je za čoveka to temperatura od 37⁰ C,
- * **pH sredine** – enzimi su maksimalno aktivni samo na određenoj pH. Za većinu enzima ljudskog organizma ona iznosi od 4-8 pH skale, sa izuzetkom digestivnih enzima (u želudačnom lumenupri pH od 1-3 i u tankom crevu od 8-10 pH skale).

Navedena četiri uslova važe za sve enzime. Osim njih postoje i faktori koji se odnose samo na određene grupe enzima a oni su:

- * **prisustvo metalnih jona** - važno je za aktivnost samo holoenzima čiji su oni kofaktori, što znači da bez njih ti metaloenzimi ne bi bili biološki aktivni,
- * **alosterična regulacija** - karakteristična je samo za one holoenzime koji imaju sposobnost da van aktivnog centra vežu molekule koji se nazivaju efektori. Efektori mogu da povećaju ili da smanje aktivnost enzima prema supstratu,
- * **građenje disulfidnih veza** - karakteristično je samo za molekule enzima koji u aktivnom centru imaju amino kiselinu cistein (Cys) koja gradi disulfidnu vezu kao uslov za vezivanje supstrata,
- * **sinteza enzima u neaktivnom obliku** (proenzimskom ili zimogenom) - oblik enzima koji ima višak polipeptidnog lanca koji prekriva aktivni centar i ne dozvoljava vezivanje supstrata sve dok enzim ne stigne do mesta u organizmu gde ispoljava katalitičku aktivnost, kada se višak lanca hidrolizom odvaja i oslobađa aktivni centar za koji sada može da se veže supstrat.

2.1.5. Inhibicija enzima

Inhibicija je proces usporavanja ili zaustavljanja enzimom katalizovane reakcije. Inhibitori mogu biti fizički (temperatura, toplota, zračenja i dr.) i hemijski (kiseline, baze, deterđenti, toksini i dr.) agensi. Ako se reakcija zaustavi, inhibicija je ireverzibilan, trajan proces i jednom ireverzibilno inhibirani enzim nikada više ne može da bude biološki aktivan. Ako se reakcija uspori, inhibicija je reverzibilna, što znači da enzim ponovo može da bude biološki aktivan u punom kapacitetu. Reverzibilna inhibicija može biti:

- a. kompetitivna – kada supstrat i inhibitor imaju sličnu strukturu pa se za aktivni centar enzima vezuje onaj koga ima u većoj koncentraciji,
- b. nekompetitivna – kada supstrat i inhibitor nemaju sličnu strukturu, pa se inhibitor vezuje van aktivnog centra dovodeći do narušavanja strukture aktivnog centra enzima, čime otežava vezivanje supstrata. Kod ove vrste inhibicije enzim može biti ponovo potpuno biološki aktivan kada se inhibitor ukloni nekom pogodnom metodom,
- c. akompetitivna – kod koje se inhibitor ne može vezati za slobodan enzim, nego samo za kompleks enzima i supstrata, pa je zato ovaj tip inhibicije najefektivniji pri visokim koncentracijama supstrata. U prisustvu inhibitora, kompleks enzima i supstrata je neaktivan,
- d. mešovita – kod koje se inhibitor vezuje za alosterično mesto, pa vezivanje supstrata i inhibitora utiče jedno na drugo, zbog čega enzimska funkcija bude redukovana ali se ne eliminiše vezivanjem inhibitora. Ovaj tip inhibicije ne sledi Mihaelis-Mentenovu jednačinu (Cornish-Bowden, 1986; Price, 1979; Cornish-Bowden, 2004).

2.1.6. Uloga enzima u organizmu

Uloga enzima u organizmima živih bića je prvenstveno katalitička, mada postoje i druge, isto tako značajne uloge koje enzimi ostvaruju u živim sistemima, koja je kod čoveka regulatorska. Naime, metabolizam treba da ispuni dva osnovna zadatka:

1. obezbeđivanje međuproizvoda potrebnih za sintetisanje specifičnih supstanci karakterističnih za organizam,
2. obezbeđivanje hemijske energije u obliku ATP-a koja je neophodna za procese sinteze, za održavanje komplikovanih struktura, kao i za specifične vrste rada u organizmu.

Ove zadatke metabolizam rešava uz kvalitativno i kvantitativno vrlo promenjivu količinu hrane. Zbog toga je jasno da su sve aktivnosti u metabolizmu efikasno regulisane, odnosno, kontrolisane. To podrazumeva prvenstveno kontrolisani prostorni raspored enzimskih reakcija u ćeliji, da ne bi dolazilo do praznog hoda i beskorisnog rasipanja energije, odnosno postojanje tzv. podeljenih prostora, što znači da se procesi koji imaju deo istih ili sličnih međuproizvoda odvijaju u različitim delovima ćelije, odnosno u različitim organelama. Zatim, procesi koji se sastoje iz većeg broja reakcija imaju tzv. „pace-maker“

enzime koji služe za održavanje „ritma“ tog procesa, a što se postiže aktivacijom ili inhibicijom „pace-maker“ enzima. Takođe, Mihaelisova kinetika omogućava da se stacionarnim koncentracijama enzima, koje se za najveći broj enzima nalaze u području Mihaelisovih konstanti, obezbedi, mada ne potpuno delotvorna, i samoregulacija metabolizma. Regulacija je moguća i onda kada neki metabolit ograničava ukupan protok supstance u procesu, zatim procesi alosterične regulacije, kada molekuli efektor aktiviraju ili inhibiraju afinitet enzima prema supstratu. Kao najprisutniji mehanizam kontrole je, svakako, mehanizam negativne povratne sprege, koja je vrlo često prisutna, a koja se zasniva na principu da konačni proizvod, ili bilo koji drugi međuproizvod nekog procesa, svojom koncentracijom utiče na početne ili prethodne međuproizvode tog procesa (Hommes, 1982).

U suštini, jasno je, da je kontrola metabolizma zasnovana na enzimima trenutna i da je u stanju da momentalno odgovori na promenu uslova u kojima se jedan metabolički proces odvija. Za razliku od enzimske, hormonskoj kontroli je potrebno određeno vreme da se prilagodi na izmenjene uslove odvijanja metabolizma. Zbog toga je izuzetno veliki značaj enzimske kontrole u organizmu živog bića, jer omogućava prilagođavanje na izmenjene uslove sredine s jedne strane, kao i „davanje“ vremena hormonima da se adaptiraju na novo nastale uslove sredine (Karlson, 1989) s druge.

2.1.7. Klinički značaj određivanja enzima

Poslednjih 20-30 godina XX veka, unutar enzimologije, razvila se posebna grana koja se naziva kliničkom ili medicinskom enzimologijom i koja koristi podatke o aktivnosti enzima u dijagnostičke svrhe. Do danas je poznato preko 3.000 enzima i za mnoge od njih postoje procedure za određivanje aktivnosti, što je u svakodnevnoj kliničkoj praksi unapredilo dijagnostiku mnogih bolesti (Wilkinson, 1976). Danas se određivanje aktivnosti enzima koristi za dijagnostiku sledećih stanja i poremećaja (Štraus, 1992):

- * bolesti koje zbog potpunog ili delimičnog nedostatka nekog enzima menjaju normalan tok metaboličkih procesa. Ova grupa bolesti se naziva i urođene greške metabolizma. To su takozvani primarni (urođeni, nasledni, genetski) defekti, odnosno prave enzimopatije, zbog toga što im je uzrok nedostatak samog enzima ili promena njegovog dejstva, drugim rečima greška na samom enzimu,
- * bolesti koje nastaju zbog sekundarnih (stečenih) defekata na enzimima, a koji su posledice neadekvatnog načina života,

- * različita patološka stanja u kojima dolazi do oštećenja, odnosno lezije ćelija, zbog čega enzimi iz ćelijske prelaze u vanćelijsku tečnost gde im raste koncentracija, odnosno aktivnost, čime ukazuju na prisustvo lezije, dok je sam enzim po svojim karakteristikama potpuno normalan.

Povećanje aktivnosti i ćelijskih i sekretornih enzima u serumu može biti pokazatelj veće lezije ćelija. Osim lezije ćelija, razlozi za povećanu aktivnost enzima u serumu mogu biti i (Štraus, 1992):

- * povećana sinteza enzima – npr. kod rahitisa ili hiperparatiroidizma u većoj količini se sintetise enzim alkalna fosfataza (ALP) iz kostiju, što znači da veća količina ovog enzima od uobičajene prelazi u cirkulaciju,
- * poremećaj propustljivosti ćelijske membrane – kod upalnih procesa sa oštećivanjem ćelijske membrane veća količina enzima iz citoplazme prelazi u cirkulaciju kao što je to slučaj u ranoj fazi akutnog hepatitisa kada se povećavaju aktivnosti transaminaza (AST i ALT) u serumu ili povećanje amilaze (AMY) i lipaze kod lakših oblika pankreatitisa,
- * nekroza ćelija – proces pri kome dolazi do potpune dezintegracije ćelije tako da se povećava nivo ne samo enzima iz citoplazme u serumu već i enzima iz svih organela ćelije, kao što je to slučaj kod infarkta miokarda,
- * smetnje u sekreciji - zbog čega se dešava da se veća količina enzima koji su u sastavu sekreta nađe u cirkulaciji, što je npr. slučaj kod karcinoma prostate sa aktivnošću kisele fosfataze (ACP) i
- * smetnje u eliminaciji enzima iz cirkulacije – s obzirom da se jedan broj enzima izlučuje putem urina, a da manji broj njih ima male molekule koji mogu nesmetano da prolaze kroz glomerule, povećanje aktivnosti enzima u serumu može da ukaže i na eventualne poremećaje u izlučivanju urina, odnosno oliguriju i anuriju.

Smanjena aktivnost enzima u serumu može biti značajan pokazatelj u dijagnostici mnogih bolesti, a najčešće se javlja kao posledica:

- * smanjene sinteze enzima,
- * povećano uklanjanje iz organizma i
- * degradacija enzima (Boyer, 1983).

Vreme koje je potrebno da aktivnost enzima u cirkulaciji opadne na polovinu početne aktivnosti naziva se poluživot enzima i u zavisnosti od enzima iznosi od nekoliko sati do

nekoliko dana (Štraus, 1992). Period poluživota enzima, čija aktivnost se najčešće određuje u kliničkoj praksi prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Period poluživota ispitivanih kliničkih enzima u serumu

Enzim	Poluživot enzima
Kreatin kinaza – CK	oko 15 h
Laktat dehidrogenaza – LDH	8 – 12 h
Amilaza – AMY	3 – 6 h
Alkalna fosfataza – ALP	3 – 7 dana
Gama glutamiltransferaza – GGT	3 – 4 dana
Aspartat aminotransferaza – AST	12 – 22 h
Alanin aminotransferaza – ALT	37 – 57 h

Poseban klinički značaj za određivanje aktivnosti enzima u biološkom materijalu pokazuje određivanje aktivnosti izoenzima i tkivnih markera. Izoenzimi predstavljaju enzime različitog hemijskog sastava koji katalizuju iste metaboličke reakcije na različitim mestima u organizmu. Metode za analiziranje smeša proteina u poslednjih par desetina godina pokazuju da izmerena aktivnost enzima najčešće postoji kao zbir aktivnosti više različitih formi jednog enzima, nego samo jedne vrste molekula (Moss, 1982). Ovakve enzimske varijacije mogu se naći unutar jedne vrste, jednog organa ili čak unutar jedne vrste ćelija, a mogu se razdvojiti na osnovu različitih fizičkih ili hemijskih karakteristika. Postojanje ovakvih formi u humanim tkivima, zbog različitih osobina koje imaju u različitim organima, pomaže razumevanju specifičnih metaboličkih osobina tih organa, zatim, različite senzitivnosti prema lekovima, naslednih bolesti metabolizma, drugim rečima, pružaju velike mogućnosti za povećanje dijagnostičke specifičnosti i senzitivnosti enzimskih analiza koje se rade u različitim vrstama biološkog materijala (Tietz & Finley, 1983). S druge strane, pod pojmom tkivni markeri podrazumevaju se enzimi čija se aktivnost nedvosmisleno može povezati za funkciju nekog organa ili tkiva. U Tabeli 2. prikazani su najznačajniji enzimi, njihova tkivna specifičnost i klinička primena (Tietz, 1997).

Tabela 2. Enzimi sa tkivnom specifičnošću i kliničkom primenom

Enzim	Poreklo (tkivna specifičnost)	Glavne kliničke primene
Kisela fosfataza	Prostata, eritrociti	Karcinom prostate
Aldolaza	Skeletni mišići, srce	Mišićna oboljenja
Holinesteraza	Jetra	Trovanja organofosfatnim insekticidima, osetljivost na suksametonijum, parenhimalna oboljenja jetre
Glutamat dehidrogenaza	Jetra	Parenhimalna oboljenja jetre
5' - nukleotidaza	Hepatobilijarni trakt	Hepatobilijarna oboljenja
Sorbitol dehidrogenaza	Jetra	Parenhimalna oboljenja jetre
Tripsin(ogen)	Pankreas	Oboljenja pankreasa
Kreatin kinaza	Skeletni mišići, mozak, srce, glatki mišići	Infarkt miokarda, mišićna oboljenja
Laktat dehidrogenaza	Srce, jetra, skeletni mišići, eritrociti, trombociti, limfne žlezde	Infarkt miokarda, hemoliza, parenhimalna oboljenja jetre
Amilaza	Pljuvačne žlezde, pankreas	Bolesti pankreasa
Alkalna fosfataza	Jetra, kosti, intestinalna mukoza, placenta, bubreg	Bolesti kostiju, bolesti hepatobilijarnog trakta
γ-glutamilttransferaza	Jetra, bubreg	Hepatobilijarna oboljenja, alkoholizam
Aspartat aminotransferaza	Jetra, skeletni mišići, srce, bubreg, eritrociti	Infarkt miokarda, parenhimalna oboljenja jetre, mišićna oboljenja
Alanin aminotransferaza	Skeletni mišići, srce	Parenhimalna oboljenja jetre

2.1.7.1. Kreatin kinaza – CK – Adenozin trifosfat: kreatin fosfotransferaza

EC 2.7.3.2.

Kreatin kinaza (CK) katalizuje povratnu fosforilaciju kreatina koristeći adenozin trifosfat (ATP) što prikazuje jednačina (2) (Lang, 1981).

Ovaj enzim ima veliki značaj za mišićno i nervno tkivo zbog toga što se kreatin fosfat, pod uticajem CK lako prevodi u ATP, koji ćelije koriste kao najčešći izvor energije. Koncentracija ATP-a u ćelijama je veoma mala, pa kreatin fosfat predstavlja rezervu za brzu resintezu ATP-a. Joni Mg^{+2} u malim koncentracijama deluju na CK kao aktivatori, a u većim

- * posle infarkta miokarda značajno je povećana aktivnost CK u serumu, što je u kliničkoj hemiji najznačajnija primena merenja aktivnosti CK i izoenzima MB. Druga oboljenja srca (angina pectoris, tahikardija, miokarditis ili kongestivna slabost srca) obično ne dovode do povećanja aktivnosti ovog enzima i njegovog izoenzima,
- * kod oboljenja centralnog nervnog sistema (CNS) povećava se vrednost CK – kod Rejevog sindroma čak i do 70 puta, dok u ostalim slučajevima (cerebralna ishemija, akutno cerebrovaskularno oboljenje ili povrede glave) povećane aktivnosti postoji ali nije tako dramatično,
- * preko 60% pacijenata sa hipotireozom pokazuje povećanje aktivnosti CK za oko pet puta uz izoenzim MM, dok kod hipertireoze aktivnost CK je na donjoj granici referentnih vrednosti.

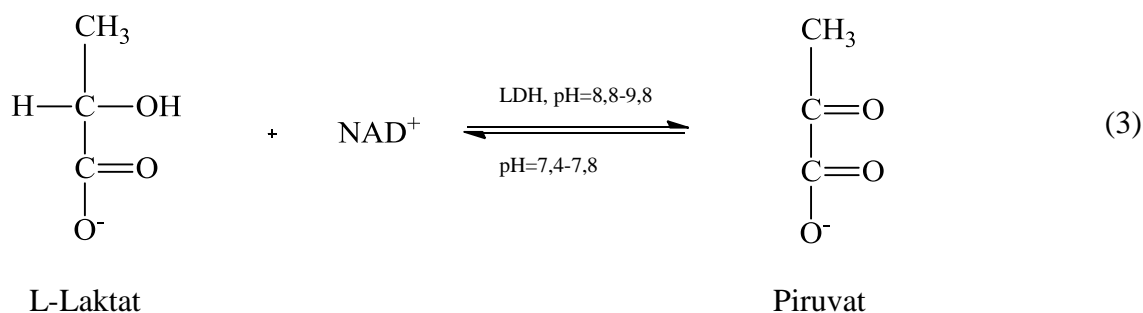
CK je vrlo nestabilan enzim koji dozvoljava da se uzorci seruma čuvaju na sobnoj temperaturi do 4 h, u frižideru 8-10 h, a zamrznuti 2-3 dana. Kako različiti antikoagulansi (citrati, fluoridi, EDTA i dr.) inhibiraju ovaj enzim, za određivanje u krvi koriste se ili serum ili heperinizirana plazma. Bez obzira što u eritrocitima nije izražena aktivnost CK, hemolizovani serumi ne bi trebalo da se koriste za određivanje ovog enzima, zbog indirektnog uticaja na aktivnost preko ADP, ATP, glukozo – 6 – fosfata (G-6-P) i dr.

Ako se razblažuju serumi sa povećanom aktivnošću CK, nastupa dodatno povećanje enzimске aktivnosti. Zato treba izbegavati razblaživanje, naročito vodom ili fiziološkim rastvorom, jer je tada porast aktivnosti još izraženiji. Ovaj fenomen se objašnjava time da u serumu postoje inhibitori CK i da se razblaživanjem seruma njihova koncentracija smanjuje, pa samim time i uticaj na enzim, zbog čega on povećava svoju aktivnost (Koraćević i dr., 1996).

2.1.7.2. Laktat dehidrogenaza – LDH - L-laktat: NAD-oksidoireduktaza

EC 1.1.1.2.

Laktat dehidrogenaza je enzim koji prenosi vodonik i katalizuje reakciju oksidacije L-laktata u piruvat u prisustvu koenzima NAD koji je akceptor jona vodonika. Reakcija je reverzibilna a ravnoteža je pomerená u smeru redukcije piruvata u laktat (Mc Comb et al. 1976), koja se odvija u anaerobnim uslovima, za razliku od suprotne reakcije, odnosno, transformacije laktata u piruvat koja se odvija u aerobnim uslovima, a što je prikazano jednačinom (3):



Enzim LDH je vrlo rasprostranjen u različitim tkivima organizma čoveka, a najviše je prisutan (računajući po gramu tkiva) u bubrezima, miokardu, skeletnim mišićima i jetri (Koraćević i dr., 1996). Takođe, velika aktivnost ovog enzima beleži se i u eritrocitima, pa se zato ne može koristiti hemolizovani serum za određivanje ovog enzima u dijagnostičke svrhe.

Enzim LDH se, takođe javlja u izoenzimskim oblicima – ćelije sintetišu dva različita peptidna lanca: H (*heart*) ili B i M (*muscle*) ili A, koji se onda udružuju da bi izgradili aktivnu formu ovog enzima, a koja se javlja kroz sledeće izoenzimske oblike: LDH₁ - (H₄), LDH₂ - (H₃M), LDH₃ - (H₂M₂), LDH₄ - (HM₃), LDH₅ - (M₄). Svaki izoenzimski oblik je tetramer, a u tkivima se nalaze one forme izoenzima u zavisnosti od tipa metabolizma koji preovladava u ćelijama – npr. forma LDH₁ dominira u tkivima u kojima preovladava aerobni metabolizam ugljenih hidrata (miokard, mozak, kora bubrega, eritrociti), dok se forma LDH₅ pretežno nalazi u tkivima kod kojih je pretežno prisutna anaerobna razgradnja šećera, odnosno, glikoliza (jetra, skeletni mišići, leukociti, koža, bubrežni kanalići). LDH₂, LDH₃ i LDH₄ ili tzv. heterogeni izoenzimi, zastupljeni su u plućima, glatkim mišićima, placenti i limfnim žlezdama (Koraćević i dr., 1996).

Dijagnostički značaj određivanja aktivnosti LDH u serumu kao i ispitivanje profila izoenzima ogleda se kod sledećih stanja (Wilkinson, 1976):

- * infarkt miokarada je najčešće praćen 3-6 puta povećanom aktivnošću LDH u serumu, mada mogu da se jave i 10 puta povećane vrednosti. Umereno se povećava aktivnost LDH kod miokarditisa i srčane slabosti, a aktivnost je referentna kod angine pektoris i perikarditisa;
- * kod megaloblastne anemije koja je uzrokovana nedostatkom folne kiseline ili vitamina B₁₂, zbog smanjene eritropoeze, aktivnost LDH može da se poveća i do 50 puta u serumu;

- * kod oboljenja jetre takođe, može da se poveća aktivnost LDH, s tim što povećanje nije ni blizu povećanja koja u takvim stanjima beleže transaminaze. Kod toksičnog hepatitisa praćenog žuticom može da se poveća aktivnost LDH i do 10 puta; malo povećanje aktivnosti se sreće kod virusnog hepatitisa ili kod infektivne mononukleoze, a aktivnost je normalna ili najviše dvostruko povećana kod ciroze jetre ili u opstruktivnoj žutici;
- * aktivnost LDH u serumu povećava se i kod malignih oboljenja;
- * kod progresivne mišićne distrofije u ranom i srednjem stadijumu bolesti povećava se vrednost LDH u serumu, kao i kod trauma i zapaljenskih procesa u skeletnim mišićima;
- * povećanje aktivnosti LDH u serumu beleži se i kod infarkta pluća i akutne pneumonije.

Aktivnost LDH treba ispitivati u serumu ili heparinizovanoj plazmi, koje je potrebno odvojiti odmah nakon centrifugiranja. Ne treba koristiti plazmu uzetu sa oksalatima kao antikoagulansom zbog njihovog inhibitornog dejstva na LDH. Serum može da se čuva 2-3 dana na sobnoj temperaturi bez gubitka aktivnosti, za duži period treba ga čuvati u frižideru uz dodatak NAD-a i glutationa, a ne treba ga čuvati u zamrzivaču. Inhibiciju enzima mogu da izazovu joni žive, *p*-hloromerkuribenzoat, borati, višak piruvata i EDTA.

2.1.7.3. Alkalna fosfataza – ALP – Ortofosfat-monoestar fosfohidrolaza

EC 3.1.3.1.

Alkalna fosfataza je nespecifična fosfomonoesteraza koja u baznoj sredini, uz učešće molekula vode, razlaže monoestre fosforne kiseline, uz oslobađanje fosfata. Po hemijskom sastavu, enzim je glikoprotein i spada u enzime koji čine integralni deo ćelijske membrane-enzimski molekul je svojim karboksilnim krajem peptidnog lanca vezan za glikozil-fosfatidilinozitol čiji je deo (1,2-diacilglicerol) ugrađen u lipidni dvosloj ćelijske membrane, a pošto se aktivni centar enzima nalazi na spoljašnjoj površini membrane, ALP se ubraja u egzoenzime (Kim, 1989). Za aktivnost enzima neophodan je optimalan odnos jona Mg^{+2}/Zn^{+2} jona, 1:2, zbog toga što dvovalentni joni Mg^{2+} , Co^{2+} i Mn^{2+} deluju kao aktivatori enzima, dok Zn^{+2} ulazi u sastav enzima (Mc Comb et al. 1979), što ukazuje da je i ALP metaloenzim, što su u suštini svi holoenzimi iz treće glavne enzimske grupe. Enzimski molekuli se iz membranskih struktura oslobađaju pomoću endogenih fosfolipaza.

ALP postoji praktično u svim tkivima i organima, a u posebno velikoj količini nalazi se u tankom crevu, bubrezima, kostima, jetri i placenti. Tačna metabolička uloga ovog enzima još nije poznata, ali je nesporno da učestvuje u procesu kalcifikacije kostiju. U serumu, ALP dominantno potiče iz kostiju u toku fizičkog rasta, a kada se on završi dominira enzim iz jetre (oko 60 % aktivnosti). Frakcija iz bubrega se ne nalazi u serumu ni u fiziološkim ni u patološkim stanjima, dok frakcija iz tankog creva, koja limfom dospeva do krvi, vrlo brzo nestaje, tako da se teško detektuje u fiziološkim uslovima, osim kod osoba koje imaju „O“ i „B“ krvnu grupu, i ne prelazi 10 % ukupne ALP. U toku trudnoće, posle 16. nedelje, u serumu trudnica pojavljuje se placentalni izoenzim ALP i do kraja trudnoće može da čini i do 50 % aktivnosti enzima, da bi posle 3-6 dana nakon porođaja ovaj izoenzim potpuno nestao (Hirano et al., 1987; Moss, 1982; Kuwana & Rasalki, 1990).

Najznačajnije kliničko tumačenje aktivnosti ALP je kod bolesti kostiju i hepatobilijarnog sistema. Aktivnost enzima je uvećana kod rahitisa i osteomalacije, dok je kod osteoporoze u granicama referentnih vrednosti. Fiziološkim uvećanjem aktivnosti ovog enzima smatra se period posle fraktura, kada uvećanje aktivnosti ukazuje da se stvara kalus kod pacijenta, a ako izostane uvećanje aktivnosti to ukazuje na neadekvatno stvaranje kalusa. Porast aktivnosti ALP od 20-40 puta veće od referentnih javlja se kod Pedžetove bolesti, kod osteosarkoma ili meta promenama na kostima kod primarnog karcinoma prostate, dok je kod benignih tumora na kostima aktivnost ALP u okviru referentnih vrednosti. Osteodistrofija, koja se javlja kod oboljenja bubrega, daje uvećanje aktivnosti enzima, kao i period posle dijalize, s obzirom da urea izaziva inhibiciju enzima, kao i fosfati, borati, oksalati i cijanidi (Haris, 1989).

Oboljenja jetre i žučnih kanala dovode do uvećanja aktivnosti enzima ALP, odnosno, sva stanja koja dovode do smetnji u protoku žuči, zatim opstruktivna žutica, primarna bilijarna ciroza jetre, rak glave pankreasa, tumor ili tuberkuloza jetre i dr. (Štraus, 1992; Kaplan, 1986).

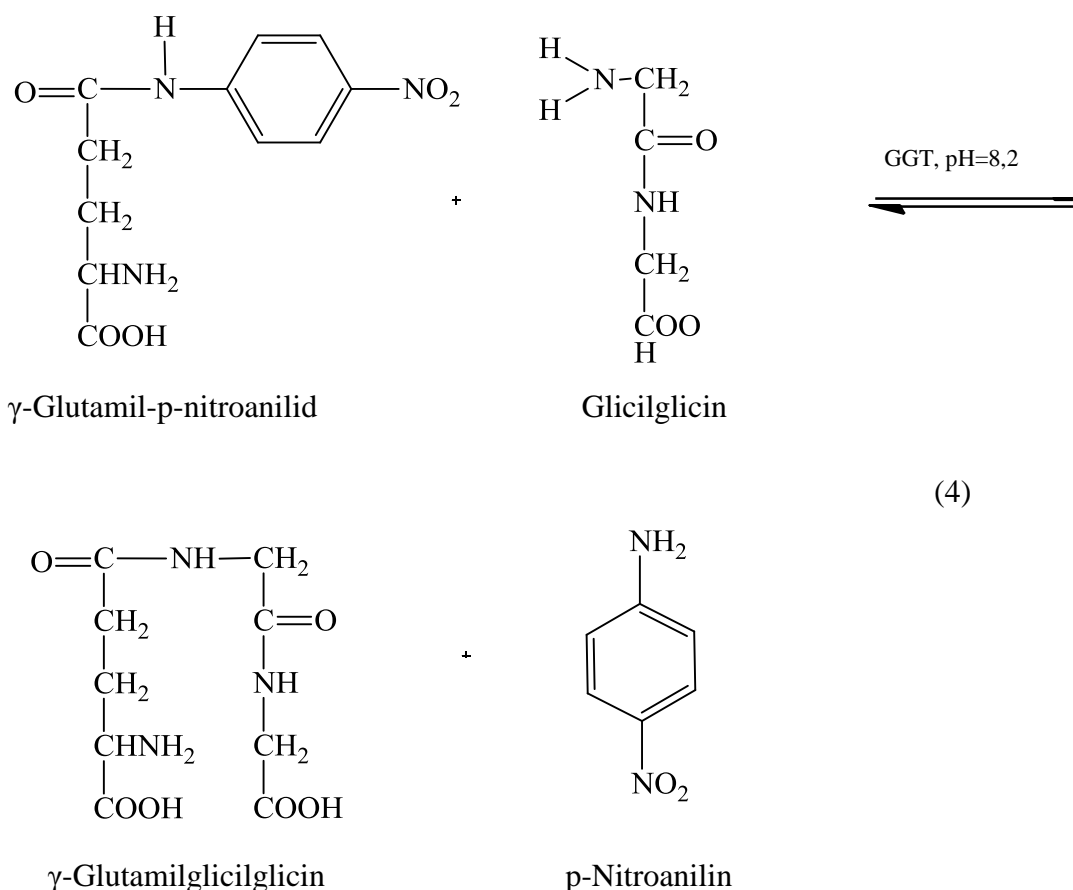
2.1.7.4. γ -glutamilttransferaza – GGT – 5-glutamiltpeptid: aminoacil 5-glutamilttransferaza EC 2.3.2.2.

γ -glutamilt transferaza je enzim iz grupe peptidaza (Goldberg, 1980; Rosalki, 1975) koji katalizuje tri tipa reakcija (Štraus, 1992):

- * hidrolizu – hidrolitički odvaja glutaminsku kiselinu iz jedinjenja sa nekim peptidom, amino kiselinom ili aminom,

- * eksterna transpeptidacija – hidrolizom odvojeni ostatak glutaminske kiseline se prenosi na neku amino kiselinu ili peptid koji deluju kao akceptor i
- * interna transpeptidacija – oslobođeni ostaci glutaminske kiseline vežu se i stvaraju γ -glutamilglutaminske peptide.

Enzimi ove grupe deluju samo na peptide ili peptidima slična jedinjenja koja na terminalnom kraju imaju glutamatni ostatak povezan sa ostatkom jedinjenja pomoću terminalne (5- ili γ -) karboksilne grupe, što prikazuje jednačina (4), a čija reakcija može da se koristi za merenje aktivnosti enzima (Goldberg, 1980; Rosalki, 1975):



Po hemijskom sastavu, ovaj enzim je glikoprotein, kod koga je šećerna komponenta sastavljena od neutralnih amino šećera i sijalinske kiseline. Enzim je prisutan u serumu i u svim ćelijama u organizmu, sa izuzetkom mišićnih ćelija. Inhibiciju GGT-a mogu da proizvedu joni Cu^{+2} , kao i neki organski molekuli (Štraus, 1992).

Elektroforezom je otkriveno više izoenzima GGT, ali se kod zdravih osoba javljaju samo dva oblika: GGT_1 , koji se nalazi između albumina i α_1 globulina i GGT_2 , koji se nalazi između α_1 i α_2 globulina, do j je npr. GGT_0 je izoenzimska forma koja se javlja isključivo u

lipemičnom serumu i predstavlja kompleks GGT-a sa hilomikronima, a koji nestaje iz seruma kada se hilomikroni uklone. U suštini, smatra se da osim dve forme koje se javljaju kod zdravih osoba, svi drugi izoenzimski oblici GGT-a nisu pravi izoenzimi jer nastaju posttranslacijskim modifikacijama (Wenham et al., 1985).

Aktivnost GGT-a u serumu primarno potiče iz hepatobilijarnog sistema (Goldberg, 1980; Putzki et al. 1989), što znači da je aktivnost GGT-a povećana kod svih oboljenja jetre, pa je ovaj enzim značajan za postavljanje dijagnoze i diferencijalne dijagnoze oboljenja hepatobilijarnog sistema – tzv. tkivni marker. Zajedno sa ALP spada u enzime markere sindroma holestaze – kod oboljenja kostiju vrednosti GGT u serumu su u granicama referentnih vrednosti, pa je uvećanje ALP-a tada pokazatelj bolesti kostiju.

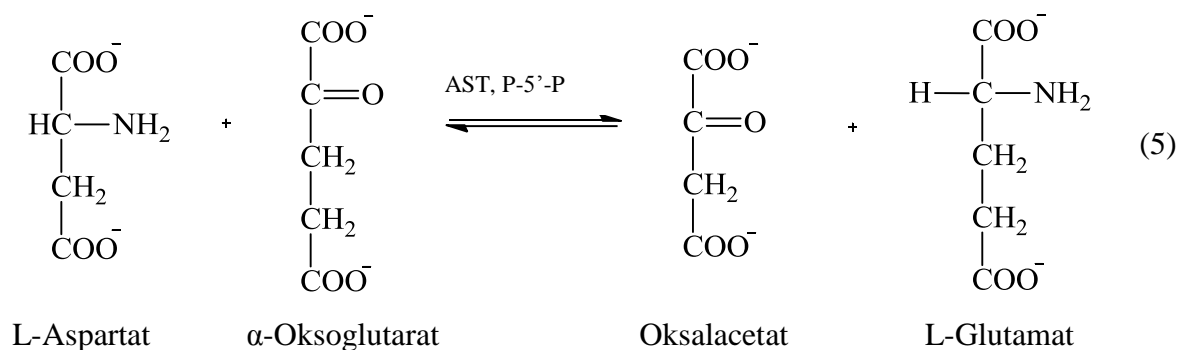
Najveći porast aktivnosti GGT-a u serumu beleži se kod primarnog karcinoma jetre ili kod metastaza na jetri. Kod meta promena na jetri, aktivnost GGT-a se povećava u serumu pre nego što se primarni karcinom može verifikovati scintigrafijom. Kod opstruktivne žutice aktivnost GGT-a u serumu se povećava 10-20 puta, dok je kod infektivne povećana 2-5 puta. Kod masne degeneracije jetre aktivnost je takođe povećana 2-5 puta, što se takođe dešava i kod intoksikacije lekovima. Kod bolesti pankreasa, akutnog ili hroničnog pankreatita ili karcinoma pankreasa, aktivnost se uvećava 5-15 puta (Rosalki, 1975).

Povećanje GGT-a u serumu karakteristično je i za osobe koje puno konzumiraju alkohol (2-3 puta), dok je kod alkoholičara sa oštećenjima jetre čiji je uzrok alkohol, povećanje aktivnosti 10-20 puta. Prestankom konzumiranja alkohola, već za dve nedelje, aktivnost GGT-a se značajno smanjuje, tako da se ovaj enzim koristi i za kontrolu apstinencije, kao i za otkrivanje hroničnih alkoholičara (Braun & Fernet, 1982; Sacchetti et al., 1988; Wenham et al., 1984).

2.1.7.5. Aspartat aminotransferaza – AST – L-aspartat: 2-oksoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.1. (Glutamat oksalacetat transaminaza - GOT)

Aminotransferaze ili transaminaze su enzimi iz grupe transferaza koji katalizuju reverzibilni prenos amino grupe između amino i keto kiselina, pri čemu nastaje nova amino kiselina. To su holoenzimi čiji je kofaktor koenzim piridoksal fosfat (PLP) i koji su izuzetno važni za proces transaminacije neesencijalnih amino kiselina u ljudskom organizmu (Štraus, 1992). U organizmu čoveka postoji više različitih vrsta transaminaza, međutim, samo su dve dijagnostički važne, a to su AST i ALT.

AST katalizuje reakciju prikazanu jednačinom (5) (Tietz, 1997), gde supstratni par α -oksoglutarat i L-glutamat ima ulogu u isto vreme i kao akceptor i kao donor u svim reakcijama prenosa amino grupa. Ovom reakcijom transaminacije keto kiseline prelaze u amino kiseline, što znači da se time povezuju metabolizmi ugljenih hidrata i azotnih jedinjenja čime je uloga AST u intermedijalnom metabolizmu velika:



AST se nalazi u mnogim tkivima i karakteristično je da je njegova aktivnost veća u svim tkivima u odnosu na ALT (Koraćević et al., 1996). AST se najviše nalazi u jetri, srčanom mišiću i skeletnim mišićima, manje u mozgu, bubrezima, pankreasu i plućima, a nema ga u kostima i zubnoj gleđi. Enzim se nalazi u ćeliji u dva izoenzimskih oblika, koji su zastupljeni oko 40 % u citoplazmi (AST₁) i oko 60 % u mitohondrijama (AST₂), a međusobno se razlikuju po pokretljivosti pri elektroforezi, termostabilnosti i otpornosti na promenu pH (Štraus, 1992). Kod zdravih osoba u serumu je prisutna samo AST iz citoplazme. S obzirom da je aktivnost AST mnogo veća u tkivima nego u serumu, kod procesa kod kojih dolazi do lezije tkiva bogatih AST-om, enzim prelazi u cirkulaciju, pa je prisutna njegova povećana aktivnost u serumu. Dijagnostički je značajano njegovo određivanje kod bolesti srca (Štraus, 1992) i jetre (Štraus, 1992; Vanderlinde, 1986).

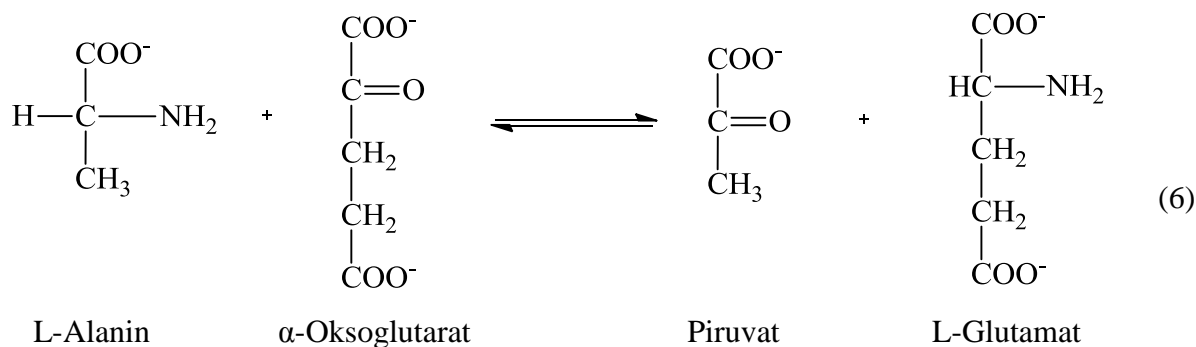
Nakon infarkta miokarda aktivnost AST-a raste već oko 6 h posle infarkta, maksimum dostiže posle 24-48 h, iz cirkulacije se povlači za 3-5 dana, a porast aktivnosti je proporcionalan masi miokarda zahvaćenog infarktoma. Kod angine pektoris, nivo AST-a ostaje referentan, dok je kod miokarditisa ili perikarditisa blago povišen u dužem vremenskom intervalu. U patološkom stanju, ako je u pitanju mišićna distrofija, aktivnost AST-a je izrazito povećana, kod miozitisa je blago povišena, dok je kod mijastenije referentna. Takođe, plućna embolija može da poveća aktivnost AST-a 2-3 puta.

Kod bolesti jetre i žučnih puteva važno je odrediti aktivnost obe transaminaze, jer se iz njihovog odnosa aktivnosti dobijaju dijagnostički važni parametri. Odnos aktivnosti

AST/ALT nazvan je De Ritisov (*Fernando De Ritis*) koeficijent i kod zdravih osoba je jedan ili veći od jedan, što znači da aktivnost AST-a treba da bude veća od aktivnosti ALT-a. Kod akutnog infektivnog hepatitisa vrednost koeficijenta je manja od jedan. Ukoliko virusni hepatitis nema povoljan tok, već se javi nekrotičan oblik, vrednosti transaminaza u serumu rastu i sam koeficijent raste. Kod infektivne mononukleoze, koeficijent je, takođe, manji od jedan. Kod toksičnih hepatitisa, izazvanih hemijskim agensima, toksinima iz hrane ili toksičnim dozama lekova, vrednost koeficijenta zavisi od mnogo faktora, kao što su: priroda toksina, njihove biotransformacije, vrsta metaboličkog procesa na koji deluje, veličina lezije, kao i da li je oštećenje akutno ili ima hroničan tok, pa u zavisnosti od prethodno navedenih karakteristika može biti i manji i veći od jedan (Koraćević et al., 1996). Kod alkoholičara, kod pojave „masne“ jetre, u trudnoći, kod opstruktivne žutice, koeficijent je veći od jedan (Štraus, 1992) Smanjenje aktivnosti AST-a beleži se kod hipovitaminoze vitamina B₆.

2.1.7.6. Alanin aminotransferaza – ALT – L-alanin: 2-oksoglutarat aminotransferaza EC 2.6.1.2. (Glutamat piruvat transaminaza – GPT)

ALT katalizuje reakciju analognu sa reakcijom prikazanom u jednačini (5). U obe reakcije, koje su povratne, ravnoteža je pomerena u levo, odnosno ka stvaranju aspartata (jednačina 5) i alanina (jednačina 6) (Tietz, 1997):



ALT, kao i AST, ima vrlo važnu ulogu u metabolizmu amino kiselina, proteina i ugljenih hidrata. Nalazi se u mnogim tkivima, osim kostiju i zubne gleđi, a najviše ga ima u jetri, skeletnim mišićima, srcu, bubrezima, pankreasu, eritrocitima i dr. Međutim, ako se uporede njihove aktivnosti u tkivima razlike su uočljive. Iako AST ima više u svim tkivima u odnosu na ALT, smatra se da je ALT mnogo specifičniji za dijagnostiku bolesti jetre (Štraus, 1992). Razlozi za to su da je u jetri mnogo prisutniji nego u drugim organima, kao i da je

enzim iz citoplazme, što znači da i najmanje promene koje uzrokuju povećanu propustljivost membrane u spoljašnju sredinu dovode do povećanja aktivnosti ovog enzima u serumu.

Kod akutnog infektivnog hepatitisa zabeležen je najveći porast aktivnosti, 70-100 puta, smanjuje se De Ritisov koeficijent ispod 1, zajedno sa AST-om može da se uveća i do 3 nedelje pre prvih kliničkih simptoma bolesti, a tokom bolesti opada zajedno sa koncentracijom bilirubina. Međutim, kod hroničnog hepatitisa vrednost ALT je referentna ili blago povišena. Ako je u pitanju ciroza jetre, aktivnost ALT-a se povećava 5-6 puta, dok je kod opstruktivne žutice povećanje umereno i manje od povećanja AST-a (Štraus, 1992).

Kod bolesti pankreasa, povećanje aktivnosti ALT-a može biti zbog oštećenja pankreasa, ali, takođe, može poticati i iz jetre, zbog sekundarnog uticaja koje bolesti pankreasa imaju na jetru. Kod infarkta miokarda, porast aktivnosti ALT prisutan je samo kada je infarktom zahvaćena velika masa srca, tako da je klinički važan prognostički parametar kod infarkta miokarda (Štraus, 1992).

Na osnovu navedenog može se zaključiti da se aktivnost serumskih transaminaza povećava kod svih oštećenja hepatocita, a da njihove vrednosti zavise od vrste bolesti. (Koraćević et al., 1996).

2.1.7.7. Amilaza – AMY – α -1 \rightarrow 4-glukan: 4-glukanohidrolaza EC3.2.1.1.

Amilaze predstavljaju grupu hidrolitičkih enzima koje raskidaju komplekse ugljenih hidrata sastavljenih od jedinica α -D-glukopiranoze međusobno povezanih α (1 \rightarrow 4) glikozidnim vezama. Iz linearnih struktura ovih molekula (amiloza) kao proizvod delovanja nastaje maltoza i malo glukoze, dok dekstrini nastaju iz razgranatih lanaca (amilopektin) jer se veze za račvanje, odnosno, α (1 \rightarrow 6) glikozidne veze, ne mogu razložiti delovanjem amilaza. Inače, poznate su α , β i γ amilaze koje se međusobno razlikuju po mestu glikozidnih veza koje razgrađuju u molekulu supstrata i po fizičko hemijskim osobinama: α -amilaze su endoamilaze jer razlažu unutrašnje α (1 \rightarrow 4) glikozidne veze, β -amilaze se nalaze samo u biljkama, dok su γ -amilaze egzoamilaze i razlažu spoljašnje α (1 \rightarrow 4) glikozidne veze u molekulima polisaharida (Majkić-Singh, 1993).

Ispitivanje γ -amilaze, za sada, nema dijagnostičku vrednost u praksi, što znači da je klinički važno određivanje aktivnosti samo α -amilaze. Amilaza ima najveću aktivnost u pankreasu, pa se može smatrati markerom za bolesti pankreasa. Takođe, pljuvačne žlezde luče vrlo aktivnu amilazu koja služi da započne razlaganje ugljenih hidrata još u ustima, a

aktivnost joj se inhibira pod dejstvom HCl-a u želucu. U manjoj količini, amilaza može da se nađe i u bubrežima, testisima, ovarijumu, plućima, mišićima i masnom tkivu.

Bez obzira odakle potiče, amilaza ima skoro identičnu sekvencu amino kiselina u polipeptidnom lancu, ne sadrži prostetičnu grupu, ali je za njenu aktivnost vrlo važno prisustvo metalnog jona, jona kalcijuma (Štraus, 1992), što znači da je amilaza metaloenzim. Optimalna pH za aktivnost je 6,9-7,0 pH skale, što znači da u srednjim i donjim delovima tankog creva na nju hidrolitički deluju proteaze – prvo tripsin (pH= 8,0-9,0) pa onda himotripsin (pH=9,0-10,0). Amilaza se javlja u dva izoenzimska oblika, kao amilaza I ili S (salivarna) i kao amilaza II ili P (pankreasna). Oba oblika su slična po supstratnoj specifičnosti, što amilaza I pokazuje veći afinitet prema škrobu, a amilaza II prema glikogenu. Malo se razlikuju i po molekularnoj masi, koja je nešto veća kod amilaze I, koja takođe ima svoju pI u slabo kiseloj sredini, dok je za amilazu II ona takođe u slabo kiseloj ali do neutralne pH. U serumu su zastupljene obe vrste izoenzima i fiziološki odnos salivarne prema pankreasnoj amilazi je $1,71 \pm 1,1$, dok je u urinu taj odnos $0,7 \pm 0,1$ (Štraus, 1992), a kod nekih bolesti se taj odnos menja.

Istorijski je značajno određivanje amilaze u serumu koje je 1908.godine uveo Volgemut (*Wohlgemuth*), što je bilo prvi put da se izmerena aktivnost nekog enzima koristi u dijagnostičke svrhe (Štraus, 1992).

2.1.8. Metode za određivanje enzimске aktivnosti

Sve metode za merenje enzimске aktivnosti, u suštini se zasnivaju na istom principu – enzim deluje na svoj specifični supstrat, posle čega se najčešće meri koncentracija nastalog proizvoda reakcije ili, ređe, smanjenje koncentracije supstrata, a retko, (npr. kod kisele fosfataze) i koncentracija samog enzima. Merenjem koncentracije nastalog proizvoda, određuje se, zapravo, brzina enzimске reakcije, odnosno, kako se uobičajeno naziva, aktivnost enzima ili katalitička koncentracija (Štraus, 1992). S obzirom da se određuje brzina reakcije, a nju uvek definišu uslovi pod kojima se ona odvija, svaka metoda za određivanje enzima ima tačno definisane: vrstu, koncentraciju i pH pufera, koncentraciju supstrata, količinu uzorka enzima i radnu temperaturu na kojoj se vrši inkubacija.

Metode za određivanje enzimске aktivnosti su uglavnom kinetičke. Ranije metode, podrazumevale su da se uzorak koji sadrži enzim inkubira određeno vreme sa supstratom, a onda se inkubacija prekida dodatkom reagensa koji inaktivira enzim, pa se meri količina proizvoda enzimске reakcije. Kako se merenje vrši samo jednom, posle određenog vremena

inkubacije, ovakve metode se nazivaju metodama jedne tačke (zbog određivanja slepe probe, pre inkubacije, neki ih nazivaju i metodama dve tačke) ili diskontinualne metode. Savremenije metode, koje se danas uglavnom koriste, predstavljaju metode kontinuiranog merenja u određenom vremenskom intervalu. Ovo je postalo moguće sintezom različitih supstrata koji su svojim oslobađanjem bojili reakcionu smešu, a sam test se naziva optički test (Štraus, 1992).

S obzirom da su enzimske reakcije uglavnom reverzibilne, pri merenju brzine enzimskih reakcija *in vitro*, koristi se visoka koncentracija supstrata (10-20 K_m vrednosti), pa reverzibilnost postaje zanemarljiva. Takođe, kao puferi se uvek biraju one smeše u kojima ne postoje komponente koje bi dovele do inhibicije enzima. Sve hemikalije koje se koriste za enzimska određivanja moraju biti analitičkog stepena čistoće (p.a.), a voda mora biti sveže redestilovana ili dejonizovana. Najčešća radna temperatura za određivanje aktivnosti po preporuci IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*) je 30⁰ C. Uzorak, odnosno, različite vrste biološkog materijala, takođe, treba da zadovolje određene kriterijume: da su uzeti na propisani način, da su adekvatno pripremljeni za analizu, da se adekvatno čuvaju i dr. Kao uzorak iz koga se može odrediti aktivnost enzima koriste se različite vrste biološkog materijala (krv, odnosno, plazma ili serum, likvor, urin, pljuvačka, želučani sok i dr.), a uobičajena praksa u svakodnevnom laboratorijskom radu je određivanje iz krvi, tačnije iz seruma.

Plazma i serum su derivati krvi, koji se dobijaju centrifugiranjem venske krvi, stim što je za plazmu potrebno krv uzeti sa, a za serum bez antikoagulansa (heparin, EDTA soli Na i K, oksalat, citrat i dr.), pa je osnovna razlika između plazme i seruma u prisustvu fibrinogena koga sadrži samo plazma. S obzirom da neka antikoagulaturna sredstva mogu da dovedu do inhibicije enzima (npr. CK - citrati i EDTA, LDH – oksalati, itd.), za određivanje aktivnosti enzima iz krvi koristi se serum. Uzeta krv se mora najduže 30 minuta od uzimanja od pacijenta centrifugirati, a zatim, najduže 30 minuta od centrifugiranja krvi, serum se mora odvojiti od nataloženih krvnih elemenata. Ako se serum ne analizira odmah nakon dobijanja, čuva se na +4⁰ C u frižideru do 24 h. Fiziološki, serum je bistra bleožuta tečnost, a može biti i:

- * hemolizovan – crvenkaste boje, kao posledica grešaka kod uzimanja ili obrade krvi,
- * lipemičan – beličaste boje zbog kapljica masti, kao posledica uzimanja krvi neposredno posle obroka ili kod poremećaja metabolizma ugljenih hidrata i lipida,

* ikteričan – jako žute boje, kao posledica hiperbilirubinemije.

Kada je nemoguće od pacijenta dobiti fiziološki serum, zbog poremećaja koji ima, određivanje enzima se ne vrši po standardnim, već po modifikovanim procedurama.

2.1.8.1. Jedinice za izražavanje enzimske aktivnosti

Katalitička aktivnost enzima izražava se međunarodnim jedinicama (U) ili katalima (kat). Internacionalna unija za biohemiju i molekularnu biologiju - IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) je 1964. godine preporučila uvođenje internacionalne jedinice (IU ili U), koja po definiciji predstavlja onu količinu enzima koja je potrebna za transformaciju 1 μmol supstrata u jednom minutu, i izražava se u jednom litru, odnosno po dm^3 . Uvođenjem SI sistema jedinica (*International System of Units*) i u enzimologiju je uvedena nova jedinica koja je nazvana katal i po definiciji je ista kao i internacionalna jedinica, samo što prati promenu supstrata u jednoj sekundi (Štraus, 1992). Za preračunavanje U/L u kat/L koristi se sledeća jednačina (7):

$$U = \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} = \frac{1}{60} \frac{\mu\text{mol}}{\text{s}} = \frac{1}{60} \mu\text{kat} = 16,67 \text{nkat} \quad (7)$$

Katalitička koncentracija enzima, osim po jedinici zapremine, može da se izrazi i po jedinici mase – na gram svežeg tkiva, na sadržaj DNK, na ceo organ, ukupni azot, sadržaj proteina i dr., stim što se najčešće izražava na sadržaj proteina s obzirom da je to najmanje promenjiva veličina u tkivima (Koraćević i dr., 1996)

2.1.8.2. Faktori koji utiču na koncentraciju enzima u serumu

Izmerena aktivnost nekog enzima u krvi predstavlja ravnotežu između brzine kojom taj enzim dospeva u cirkulaciju iz ćelija koje su ga sintetisale i brzine kojom se kao inaktivisani eliminiše iz cirkulacije, što znači da postoji niz novih faktora, u odnosu na već pomenute, koji imaju uticaj. Najvažniji su oni koji utiču na brzinu kojom enzim dospeva u cirkulaciju iz ćelija koje su ga sintetisale.

Jedan od razloga za pojavu endoenzima u cirkulaciji je završetak poluživota ćelije kada njen sadržaj završava u cirkulaciji, pa srednje vrednosti hemijskih ćelijskih konstituenata kod zdravih osoba predstavljaju referentne vrednosti tih parametara. Zbog toga je završetak poluživota ćelije jedini fiziološki parametar koji utiče na pojavu enzima u cirkulaciji, dok svi ostali predstavljaju određene poremećaje. Osim oštećenja ili umiranja

ćelije na količinu enzima u cirkulaciji utiče i način izlučivanja nakon završetka poluživota. Samo manji broj enzima sa malom molekulskom masom izlučuje se preko bubrega - npr. povećanje aktivnosti amilaze u serumu ima za posledicu i povećanu ekskreciju amilaze urinom. Enzimi sa većom i velikom molekulskom masom inaktiviraju se u plazmi i eliminišu preuzimanjem od strane ćelija retikuloendotelno sistema (Friedel et al., 1979; Kristensen & Horder, 1983).

2.1. Etarska ulja

Etarska ulja, koja se vrlo često nazivaju i mirisnim kompozicijama, vrlo su rasprostranjena u biljnom svetu i izolovana su iz oko 2.500 biljnih vrsta svrstanih u 60 familija (Gašić, 1992). Ona predstavljaju kompleksne smeše isparljivih jedinjenja koja su proizvodi sekundarnog metabolizma biljaka, odnosno, nemaju energetski značaj, hemijski su raznovrsna, i pokazuju veliku biološku i farmakološku aktivnost. Etarska ulja se nalaze u specijalnim sekretornim strukturama biljaka (Hegnauer, 1982), iz kojih se mogu dobiti destilacijom vodenom parom, zatim presovanjem ili na neki drugi pogodan način (Pekić, 1983). Sekretorne strukture mogu da se nađu u svim delovima biljke: korenu, rizomu, stablu, kori, semenu, listu, cvetu i plodu (Kovačević, 2004; Gašić, 1985).

2.2.1. Opšte karakteristike etarskih ulja

Biljke u kojima su glavni sastojci isparljivi mirisni proizvodi, odnosno etarska ulja, nazivaju se aromatične biljke (Kovačević, 2004). One su veoma rasprostranjene u prirodi. Mnoge od ovih biljaka su samonikle, ali se veliki broj gaji radi proizvodnje droga, začina i etarskih ulja. U zavisnosti od sadržaja etarskog ulja, koji se kreće od 0,05 do 20 %, aromatične biljke se svrstavaju u grupe: siromašne ili bogate etarskim uljima, s tim što količina ulja u različitim delovima biljke može da varira.

Najčešće, etarska ulja se nalaze u slobodnom stanju, u podzemnim i nadzemnim organima biljaka i to:

- egzogeno, u žlezdama, žlezdastim ljuspama i žlezdastim dlakama i
- endogeno, u sekretornim ćelijama, intercelularnim šizogenim šupljinama i intercelularnim šizogenim i lizigenim rezervoarima.

Postoje i izuzeci kod kojih su ulja vezana u obliku heterozida, bez mirisa, iz kojih se oslobađaju pod uticajem specifičnih enzima u prisustvu vode, pri čemu nastaju isparljivi mirisni sastojci – aglikoni (Kovačević, 2004; Scheider, 1975). Pored aromatičnosti, uljaste

konzistencije i velike isparljivosti, koja se kod nekih javlja već na sobnoj temperaturi, etarska ulja su i bistre, lako pokretljive bezbojne ili žućkaste tečnosti. Izuzetak predstavljaju ulja cimeta (*Cinnamomum Zeylanicum*) i karanfilića (*Syzygium aromaticum*) koja imaju smeđe-crvenu boju kao i ulja sa azulenima koja mogu biti plava, zelena ili ljubičasta, npr. ulje kamilice (*Matricaria chamomilla*) je plave boje. Karakteriše ih intenzivni miris koji potiče, uglavnom, od jedinjenja sa kiseoničnim funkcionalnim grupama. Koncentrovana etarska ulja imaju oštar, nadražujući ukus koji pali, a razblaživanjem on postaje prijatan. Veoma su rastvorna u nepolarnim rastvaračima, dok se u vodi, kao polarnom rastvaraču, vrlo malo rastvaraju. Spadaju u grupu optički aktivnih smeša (*Pharmacopoeia Jugoslavica* IV, 1984). S obzirom skoro svako etarsko ulje predstavlja veoma složenu smešu jedinjenja, ulja nemaju određenu tačku ključanja, već se one kreću u opsegu od 150 do 280° C. Iz tog razloga se pojedine komponente iz etarskih ulja mogu odvojiti frakcionom destilacijom. Etarska ulja nemaju dug vek trajanja zbog čega se čuvaju na hladnom, u tamnim staklenim ili porcelanskim bocama, sa brušenim staklenim ili silikonskim poklopcima ili pomešana sa etanolom, čime se smanjuje brzina razgradnje jedinjenja prisutnih u etarskom ulju (Jelenković, 2010).

Etarskim uljima naročito su bogate biljke iz familija *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Lauraceae*, *Zingiberaceae*, *Myrthaceae*, *Rutaceae*, *Apiaceae*, *Pinaceae* i dr. Od industrijskog značaja, naročito za farmaceutsku industriju, su one biljke, odnosno droge, koje destilacijom vodenom parom daju preko 0,01% etarskog ulja. To znači da veliki broj od oko 35.000 vrsta biljaka, koje ubrajamo u lekovite i aromatične, a koje sadrže etarska ulja, predstavljaju potencijalni industrijski resurs – sirovinu. Kako su terpeni dominantne komponente ulja, smatra se da su oni odgovorni za efekat koji etarsko ulje ostvaruje na živi organizam, i na tome se zasniva njihova eksploatacija u industriji (El-Hawary et al., 2013).

2.2.2. Hemijski sastav etarskih ulja

Hemijskom analizom etarskih ulja utvrđeno je da su ona kompleksne smeše terpena različite složenosti, a da ostalih grupa jedinjenja ima u mnogo manjoj količini. Pored terpena u etarski uljima se nalaze i druga isparljiva jedinjenja kao što su:

- * alifatična jedinjenja (tipa dodekana, tridekana, tetradekana, dekanola, metil-dodekana i dr.) koja su odgovorna za „voćne mirise“,
- * aromatična jedinjenja (derivati benzojeve kiseline, kao npr. vanilin, metilsalicilat i dr, zatim kumarin, eugenol, safrol, miristicin, koniferil-alkohol, apoiol i fenilpropanoidi,

odnosno, cimetna kiselina i p-kumarinska kiselina, stim što se fenilpropanoidi u biljkama nalaze najčešće kao glikozidi, nisu isparljivi, ali pri obradi biljnog materijala podležu hidrolizi i daju isparljive sastojke),

- * azotna jedinjenja (neprijatnog mirisa, najčešće derivati indola ili alifatični amini, mirisa na ribu) i
- * sumporna jedinjenja (najčešće izosulfocijanati i organski disulfidi, ljutog, neprijatnog mirisa, u neisparljivom glikozidnom obliku koji se oslobađa tek pri usitnjavanju dejstvom specifičnih enzimskih sistema) (Harborne & Turner, 1984).

2.2.3. Uloga etarskih ulja

Dokazano da etarska ulja aktivno učestvuju u metabolizmu biljke (fiziološka uloga) i da su veoma značajna za adaptaciju biljke na uslove sredine (ekološka funkcija). Terpeni nisu prisutni u svakoj biljci, pa se sa sigurnošću ne može tvrditi da imaju i hormonsku ulogu (Jančić i dr., 1995). Sa druge strane, monoterpene održavaju enzimske sisteme biljaka u aktivnom stanju i za vreme perioda dormacije biljaka, što ukazuje da ipak postoji određeno regulatorno dejstvo terpena u onim biljkama koje ih sintetišu (Mimica-Dukić & Jančić, 1998). Terpeni, takođe, predstavljaju i potencijalni izvor energije u oksidaciono-redukcionim procesima, odnosno, predstavljaju donore vodonika u redoks hidrosilacijama (Hill, 1952).

2.2.3.1. Farmakološka uloga etarskih ulja

Etarska ulja i njihove komponente nalaze široku primenu u farmaceutskoj industriji. Mogu da se primenjuju za spoljašnju i unutrašnju upotrebu. To je moguće zahvaljujući njihovim lipoidnim svojstvima koja im omogućavaju resorpciju kroz kožu ili sluzokožu (usta, nos, disajni putevi, digestivni trakt, uši, oči, genitalni trakt).

Aromaterapija je najstariji postupak lečenja etarskim uljima (Jakovljević i dr., 1996; Tisserand, 1980; Imanishi 2009) i predstavlja upotrebu etarskih ulja biljaka za lečenje. Pored udisanja ona takođe mogu da se masiraju u kožu ili - ređe - uzimaju *per os*. Bez obzira da li se udišu ili nanose na kožu, etarska ulja privlače pažnju kao alternativni tretman za mnoge zdravstvene probleme. Smatra se da sastojci etarskih ulja deluju tako što ostvaruju interakciju u krvi sa hormonima ili enzimima (University of Maryland Medical Center, 2011).

Zvanična terapijska upotreba etarskih ulja zasnovana je na prisustvu određenih sastojaka u njima i obuhvata sledeća delovanja: antiseptičko, analgetičko, antiinflamatorno, antiflogističko, antioksidativno, anestetičko, antivirusno, antibakterijsko, antihelmitično,

diuretično, ekspektorano, karminativno, sedativno, spazmolitičko, fungicidno, hiperemično, holeretičko i dr (Kovačević, 2004; Budhiraja et al., 1999; Lorenzetti et al., 1991; Schilcher, 1984; Wagner & Wolf, 1977). Ove dokazane efekte na ljudski organizam ispoljavaju sledeće komponente etarskih ulja:

- * terpeni, koji pokazuju blago antiseptično, antiupalno i antibakterijsko dejstvo, zatim i analgetičko, sedativno, stimulatívno i ekspektorantsko dejstvo. Takođe, usporavaju akumulaciju toksina u ljudskom organizmu i pomažu izlučivanje nagomilanih toksičnih materija iz bubrega i jetre, a deluju i kao spazmolitici (Lorenzetti et al. 1991);
- * estri kao jaki fungicidi i sedativi, a pojedini deluju analgetički, spazmolitički, sedativno, ekspektorano, antivirusno i antiseptičko (Budhiraja et al., 1999);
- * alkoholi imaju antiseptičko, antibakterijsko, antivirusno, sedativno, anestetičko (lokalno) i ekspektoransko dejstvo. U celini, alkoholi poboljšavaju kvalitet ulja i ne iritiraju kožu;
- * Fenoli su odgovorni za prijatan miris ulja i poboljšavaju njegov kvalitet, a deluju kao antiseptici, stimulansi i imaju antibakterijsko dejstvo. Od svih kiseoničnih jedinjenja koja ulaze u sastav etarskih ulja fenoli su najkorisniji za imunitet čoveka (Budhiraja et al., 1999);
- * Organske kiseline deluju sedativno, antiflogistički, spazmolitički i fungicidno, a pomažu i kod zarastanja rana (Lorenzetti et al. 1991);
- * Oksidi su najčešće sredstva za izbacivanje sluzi ili imaju antiupalno dejstvo.

2.2.3.2. Toksičnost etarskih ulja

Neka etarska ulja sadrže jedinjenja koja štetno deluju na organizam čoveka i životinja, te je njihovo korišćenje ograničeno zbog mogućih komplikacija u smislu fitotoksičnog efekta, alergijskih reakcija i dr. Takođe, i nekontrolisana upotreba etarskih ulja u terapiji može da izazove neželjene efekte, koji se ispoljavaju pre svega u obilju alergijskih reakcija. Manji broj etarskih ulja može ispoljiti i genotoksično, nekrotično, abortívno, nefrotično, depresívno, narkotično, hepatotoksično, kancerogeno delovanje, štetno dejstvo na centralni nervni sistem, na rad srca, na disanje, kao i da iritira kožu (Schilcher, 1984; Matlawska & Bylka, 2001; Nevall et al., 1996; PDR for herbal medicine, 2001; Bertram et al. 2001).

2.3. Terpeni

Bez obzira na različite sastave etarskih ulja različitih biljnih vrsta terpeni su uvek njihove dominantne komponente. Strukturno, oni su najraznovrsnija klasa prirodnih biljnih proizvoda (sa preko 30 000 različitih struktura), a svrstavaju se u klasu prostih lipida. Ime terpen ili terpenoid izvedeno je iz činjenice da su prvi članovi ove klase izolovani iz terpentina (*Balsamum terebinthinae*), isparljivog ulja dobijenog iz drveta bora (*Pinaceae*), tzv. smole borovog drveta, a kamforima (*Cinnamomum camphora*) su nazvane kristalne supstance terpenoidnog karaktera koje sadrže kiseonik (timol- *Thymus vulgaris*, kamfor, mentol - *Mentha piperitai* dr.). Da bi se međusobno razlikovala terpenoidna jedinjenja, uvodi se tzv. empirijsko izoprensko pravilo prema kome se većina terpenoida sintetiše kondenzacijom izoprenskih jedinica po mehanizmu „rep-glava“. Međutim, viši terpeni se ne pokoravaju ovom pravilu (kondenzuju se i „rep-rep“ i „rep-sredina“), pa je predloženo biogenetsko izoprensko pravilo po kome se biosinteza terpenoidnih jedinjenja odvija iz odgovarajućeg prekursora. Danas se zna da su terpeni polimeri izoprena. Terpeni se mogu dobiti izolovanjem iz etarskog ulja biljaka ili kao proizvodi sintetisani u laboratoriji.

2.3.1. Opšte karakteristike terpena

Terpeni su klasifikovani na osnovu izoprenskog pravila, odnosno broja izoprenskih jedinica u molekulu na nekoliko klasa, gde prva klasa ima jednu, a svaka naredna za jednu izoprensku jedinicu više, osim poslednje klase u koju se ubrajaju svi terpeni sa preko 40 ugljenikovih atoma: hemiterpeni (C_5H_8)₁, monoterpeni (C_5H_8)₂, seskviterpeni (C_5H_8)₃, diterpeni (C_5H_8)₄, sesterterpeni (C_5H_8)₅, triterpeni (C_5H_8)₆, tetraterpeni (karotinoidi) (C_5H_8)₈ i politerpeni – više od 8 terpenskih jedinica, odnosno od 40 C atoma. U etarskim uljima prevladavaju dve klase terpena: monoterpeni, sa dve izoprenske jedinice (C_{10}) i seskviterpeni sa tri izoprenske jedinice (C_{15}).

Do sada je identifikovano oko hiljadu monoterpena, koji se mogu svesti na tridesetak osnovnih struktura, dok se broj identifikovanih seskviterpena kreće i do nekoliko hiljada, a predstavljaju varijacije oko 200 osnovnih struktura (Devon & Scott, 1972). Obe navedene klase terpena mogu postojati u acikličnoj, cikličnoj i bicikličnoj formi (seskviterpeni se javljaju i u tricikličnoj formi), a u zavisnosti od prisustva funkcionalne grupe mogu biti

zasićeni i nezasićeni ugljovodonici, alkoholi, aldehidi, ketoni, kiseline, estri, laktoni i fenoli. Monoterpeni su bezbojna, u vodi nerastvorna jedinjenja, intenzivnog i prijatnog mirisa.

Tabela 3. Osnovne fizičko-hemijske karakteristike nekih terpena

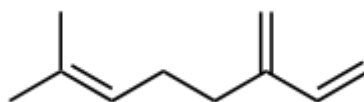
Trivijalno ime	Ime po IUPAC-u	Klasa terpena	Molekulska formula	Molska masa g/mol	Gustina g/cm ³
Mircen	7-metil-3-metilen-1,6-octadien	M*	C ₁₀ H ₁₆	136,23	0,7940
β-pinen	6,6-dimetil-2-metilen-biciklo [3.1.1]heptan	M*	C ₁₀ H ₁₆	136,23	0,8720
Karvakrol	5-izopropil-2-metilfenol	MO†	C ₁₀ H ₁₄ O	150,22	0,9772
Linalol	3,7-dimetil-octa-1,6-dien-3-ol	MO†	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	0,8580- 0,8680
Nerol	Z-3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol	MO†	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	0,8810
Geraniol	E-3,7-dimetil-octa-2,6-dien-1-ol	MO†	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	0,8890
Citral	3,7-dimetil-2,6-octadienal Z i E izomer	MO†	C ₁₀ H ₁₆ O	152,24	0,8930
Eukaliptol	1,3,3-trimetil-2-oksa-biciklo [2.2.2]loktan	MO†	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	0,9225
Terpineol	2-(4-metil-1-cikloheks-3-enil)propan-2-ol	MO†	C ₁₀ H ₁₈ O	154,25	0,9340
Eugenol	4-aliil-2-metoksifenol	MO†	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164,20	1,0600

*M – monoterpen; †MO – oksigenovani monoterpen

Sa porastom molekulske mase i broja funkcionalnih grupa, kao i kod svih klasa organskih molekula i kod terpena raste tačka ključanja, pa se u isparljivim frakcijama nalaze uglavnom niži monoterpeni kao i jednostavniji seskviterpeni, dok se polioksidovani seskviterpeni i diterpeni nalaze u teže isparljivim frakcijama i smolama biljaka. Glavne fizičko-hemijske karakteristike nekih terpena prikazane su u Tabeli 3.

2.3.1.1. Mircen

Mircen (Slika 3.) je prvi put izolovan iz lišća lovora (*Laurus nobilis*), ali je nađen i u mnogim drugim etarskim uljima. On je ugljovodonični monoterpen, i nalazi se u vrlo visokim koncentracijama u bosiljku (*Ocimum basilicum*), hmelju (*Humulus lupulus*), majčinoj dušici (*Thymus serpyllum*), peršunu (*Petroselinum crispum*), mangu (*Mangifera indica* L.) i marihuani (*Cannabis*). Mircen je dobio ime iz *Myrcia sphaerocarpa*, lekovitog žbuna iz Brazila koji sadrži vrlo visoke koncentracije mircena u svom etarskom ulju, a koji se tamo vekovima koristi kao narodni lek za dijabetes, dizenteriju, dijareju, i hipertenziju. Komercijalno se danas proizvodi pirolizom β -pinena dobijenog iz terpentina (Behr & Johnen, 2009).



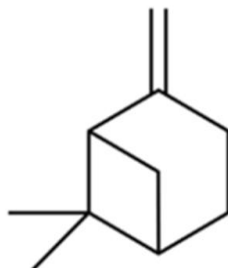
Slika 3. Strukturna formula mircena

Mircen se koristi u industriji parfema jer ima prijatan miris, ali se retko koristi direktno, već kao važan intermedijer za dobijanje jedinjenja koja uslovljavaju ukus i miris, kao što su mentol, citral, citronelal, citronelol, geraniol, nerol, linalol. Farmaceutska istraživanja su pokazala da mircen menja propustljivost ćelijske membrane čime omogućava veću apsorpciju kanabinoida u mozgu. Mircen se u terapeutske svrhe koristi zbog svog analgetičkog, antibakterijskog, antidijabetičkog, antiinflamatornog, antipsihotičnog, antispazmotičnog, antiproliferativnog i antimutagenog delovanja (Do Vale et al., 2002; Wichtl, 2004).

2.3.1.2. β -pinen

β -pinen (Slika 4.) je jedan od dva izomera pinena. To je bezbojna tečnost rastvorna u alkoholu, a vrlo malo u vodi. Ima miris sličan boru. Jedno je od najzastupljenijih jedinjenja

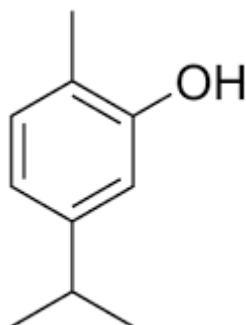
četinarskog drveća, a nalazi se i u kuminu (*Cuminum cyminum*) i hmelju. U terapijske svrhe može da se koristi kao dobro antimikotičko i antibakterijsko sredstvo (Da Silva et al., 2012, Leite et al., 2007).



Slika 4. Strukturna formula β -pinena

2.3.1.3. Karvakrol

Karvakrol (Slika 5.) je oksigenovani monoterpen iz grupe fenola. U prirodi se nalazi u etarskim uljima origana (*Origanum vulgare*), timijana, majorana (*Origanum majorana*), čubrice (*Satureja hortensis*), agave (*Agava Americana*) i dr (De Vincenzi et al., 2004; Toncer et al., 2009, De Falco et al., 2013). Proizvodi se sintetički ili izoluje iz prirodnih proizvoda.

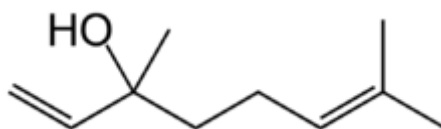


Slika 5. Strukturna formula karvakrola

Ima nisku toksičnost koja zajedno sa prijatnim mirisom i ukusom omogućava njegovu primenu kao dodatak hrani da bi se sprečila bakterijska kontaminacija (Cristani et al., 2007). Opisana farmakološka uloga karvakrola odnosi se uglavnom na njegova antibakterijska i antimikotička dejstva (*E. coli*, *B. cereus*, *P. aeruginosa*, *C. herbarum*, *P. glabrum*, *F. moniliforme*, *R. solani*, *S. sclerotium*, i *P. capisci*). Takođe, opisana su i antiinflamatorna i antioksidativna dejstva karvakrola (Da Silveira et al., 2013; Ozgan & Erdogan, 2011).

2.3.1.4. Linalol

Linalol (Slika 6.) je oksigenovani monoterpen iz grupe alkohola koji se u prirodi nalazi u cveću i začinskim biljkama i ima vrlo prijatan miris. Preko 200 vrsta biljaka koje sadrže linalol u značajnim količinama, uglavnom pripadaju familijama *Lamiaceae* (lavanda - *Lavandula officinalis*), *Lauraceae* (lovor, cimet, sandalovo drvo - *Santalum album*) i *Rutaceae* (agrumi), ali i u drvetu breze (*Betula*) i drugim biljkama. Takođe je nađen i u nekim gljivama (Pengelly, 2004).



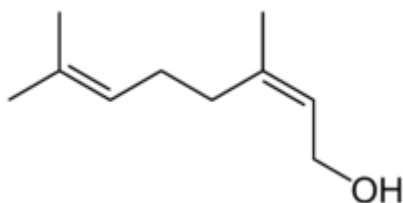
Slika 6. Strukturna formula linalola

Linalol se javlja u dva stereoizomerna oblika: (R) - (-) - linalol ili licareol, L-konfiguracije i (S) - (+) - linalol ili koriandrol, D-konfiguracije. Oba enantiomerna oblika se nalaze u prirodi: (S) - linalol se nalazi kao glavni sastojak etarskih ulja koriandera (*Coriandrum sativum*), palmarose (*Cymbopogon martinii*) i slatke narandže (*Citrus sinensis*), dok je (R) - linalool prisutan u lavandi, lovoru i slatkom bosiljku. Svaki enantiomer izaziva različite nervne odgovore kod ljudi, pa se zbog toga klasifikuju kao različiti mirisi: (S) oblik se smatra slatkim i cvetnim, dok se (R) oblik klasifikuje više kao drvenasti, odnosno, lavandin miris (Casabianca et al., 1998). Zbog toga se linalol i koristi kao mirisna komponenta u 60-80% mirisnih higijenskih proizvoda i sredstava za čišćenje, uključujući sapune, deterdžente, šampone i losione. Linalol se postepeno razgrađuje u kontaktu sa kiseonikom, formirajući oksidovane međuproizvode koji mogu izazvati alergijske reakcije kao što su ekcemi kod osetljivih pojedinaca (Christensson et al., 2009). Linalol se vrlo često koristi i kao insekticid.

Farmakološki efekat linalola dokazan je u mnogim studijama, pa se zna da udisanje linalola smanjuje stres eksperimentalnim životinjama (Nakamura et al., 2010; Leite et al., 2008; Sayorwan et al., 2012; Tankam & Ito, 2014). Takođe, dokazano je antiinflamatorno, kao i druga biološka dejstva (Da Silveira et al., 2013; Fahlbusch et al., 2002).

2.3.1.5. Nerol

Nerol (Slika 7.) je oksigenovani monoterpen iz klase alkohola. Može se izolovati iz mnogih etarskih ulja, poput limunske trave (*Cymbopogon*) ili hmelja, dok je izvorno izolovan iz neroli ulja (*Citrus aurantium ssp. amara*). To je bezbojna tečnost koja se najviše koristi u industriji parfema. Nerol ima slatki miris ruža (De Falco et al., 2013).

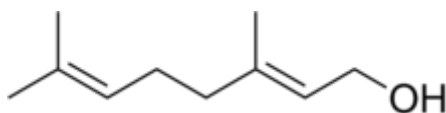


Slika 7. Strukturna formula nerola

Nerol je geometrijski izomer sa geraniolom, stim što je nerol Z, a geraniol E konfiguracije. Nerol lako gubi vodu, a sintetiše se pirolizom iz β -pinena. Ima dokazanu antioksidativnu i još neke biološke uloge (Jumepaeng et al., 2013).

2.3.1.6. Geraniol

Geraniol (Slika 8.) je oksigenovani monoterpen alkoholnog tipa. Predstavlja glavni sastojak ružinog ulja (*Rosa damascene*), palmarosa ulja i ulja citronele (*Cymbopogon winterianus*). Takođe, u malim količinama se pojavljuje etarskom ulju zdravca (*Geranium macrorrhizum*), limuna (*Citrus limon*) i mnogim drugim. To je bledo žuto ulje koje je slabo rastvorno u vodi, a dobro rastvorno u većini organskih rastvarača.



Slika 8. Strukturna formula geraniola

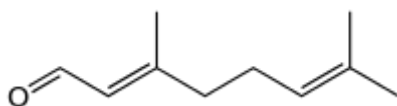
Ima miris nalik ruži i obično se koristi za proizvodnju parfema. Koristi se i za ukuse, kao što su breskva (*Prunus persica*), malina (*Rubus idaeus*), grejpfrut (*Citrus paradise*), crvena jabuka (*Pyrus malus* L), šljiva (*Prunus domestica*), narandža (*Citrus sinensis* L), limun, lubenica (*Citrullus lanatus*), ananas (*Ananas comosus*) i borovnica (*Vaccinium*

myrtillus). Zbog svog mirisa odbija komarce, ali privlači pčele (Barnard & Xue, 2004). Dodaje se, od 1999. godine, kao jedan od 600 sastojaka koji poboljšavaju ukus cigaretama.

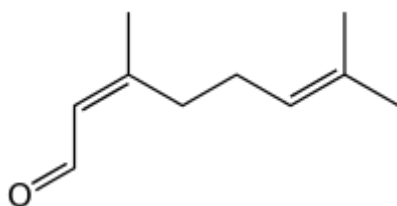
Geraniol je klasifikovan kao otrovna supstanca koja dovodi do drugih efekata. Za rukovanje geraniolom treba koristiti informacije o radu sa opasnim materijama (*Workplace Hazardous Materials Information System - WHMIS*), zbog toga što ozbiljno iritira oči i umereno iritira kožu. Pored dokazanih štetnih dejstava, dokazana su i korisna farmakološka dejstava kao što je npr. antioksidativna moć (Fahlbusch et al., 2002; Ismail et al., 2009; Carnesecchi et al. 2001).

2.3.1.7. Citral

Citral je oksigenovani monoterpenoidni aldehid koji se javlja kao smeša svoja dva geometrijska izomera: E-izomer (geranial ili citral A) (Slika 9.) i Z-izomer (neral ili citral B) (Slika 10.).



Slika 9. Strukturna formula citrala A ili geraniala



Slika 10. Strukturna formula citrala B ili nerala

Citral je prisutan u etarskim uljima različitih biljaka - limunove trave, bosiljka, citronovca (*Aloysia citrodora*), gorke narandže (*Citrus aurantium*), eukaliptusa (*Eucalyptus globules*), matičnjaka (*Melissa officinalis*), limuna, narandže i drugih (Fenaroli et al., 1975).

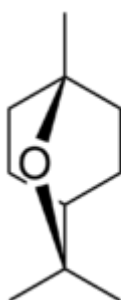
Citral A (geranial) ima jak miris limuna, dok citral B (neral) ima manje intenzivan ali slađi mirisi. Ovakve karakteristike omogućile su njegovu upotrebu u industriji parfema, ali i kao arome u prehrambenoj industriji, za sintezu vitamina A, kao insekticida (Robacker & Hendray, 1977), ali jedinjenja sa dokazanim antimikrobnim karakteristikama (Onawunmi, 1989). Ima dokazan alergijski efekat na čoveka, pa se zbog toga preporučuje da se u mirisima kombinuje samo sa jedinjenjima koja sprečavaju senzitivizaciju. Ne ispoljava genotoksično i

kancerogeno delovanje, ali u zavisnosti od doze, može da se javi negativan efekat na bubrege (Andersen et al., 2006). Ima dokazan antidijabetični efekat na eksperimentalne životinje (Najafijan et al., 2011), kao i efekat na smanjenje telesne mase (Tamound & Abhilash, 2011).

2.3.1.8. Eukaliptol

Eukaliptol (Slika 11.) je bezbojna tečnost mirisa na kamfor. Po hemijskom sastavu je oksigenovani monoterpen iz grupe cikličnih etara. Ima mnogo sinonima (1,8-cineol, 1,8-epoksi-p-mentan, 1,8-oksido-p-mentan, cineol i dr). U značajnom procentu prisutan je u etarskom ulju eukaliptusa pa je moguće da se iz njega izoluje frakcionom destilacijom sa čistoćom od 99,6-99,8 % u velikim količinama. Nalazi se u biljkama eukaliptusa, kanabisa, kamfora, aromatičnog đumbira (*Zingiber officinalis*), lovora, čajevca (*Melaleuca alternifolia*), kadulje (*Salvia officinalis*), damiane (*Turnera diffusa* L.), kalifornijskog lovora, đumbira i dr. (Boland et al. 1991).

Koristi se kao začim i kao lekovita supstanca. Zbog prijatnog mirisa i arome koristi se u kozmetičkoj industriji u niskoj koncentraciji (0,002%), kao začim u raznim proizvodima, uključujući pekarske, poslastičarske, meso i piće, a takođe je i na popisu kao jedan od 600 aditiva u cigaretama.



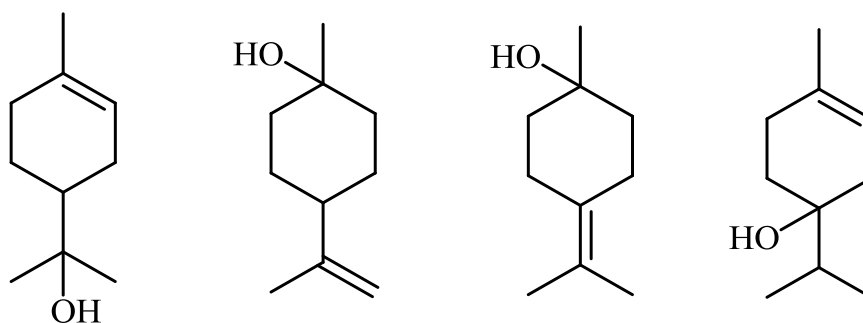
Slika 11. Strukturna formula eukaliptola

Eukaliptol se koristi i kao insekticid (Sfara et al., 2009), u farmaceutskoj industriji u sastavu sirupa za kašalj, za inhalaciju, kao i za smanjenje upale i bola kada se primenjuje lokalno (Juergens et al., 2003).

2.3.1.9. Terpeneol

Terpeneol (Slika 12.) je prirodni monoterpenoidni alkohol koji može da se izoluje iz različitih izvora kao što su biljka čajevac, bor ili listovi gorke narandže. Javlja se u četiri izomerna oblika, kao alfa-(α) ili beta-(β) ili gama-(γ) terpeneol ili terpinen-4 ol, β - i γ -

terpineol razlikuju samo po položaju dvostruke veze. Terpineol je najčešće smeša tih izomera s α -terpineolom kao glavnim komponentom.

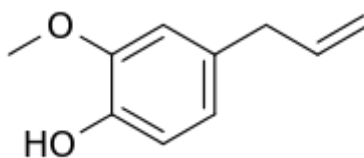


Slika 12. Strukturne formule izomera terpineola: α , β , γ terpinen i terpinen 4-ol

Terpineol ima prijatan miris, vrlo sličan jorgovanu (*Syringa*), pa je čest sastojak u parfemima, kozmetičkim i prehrambenim proizvodima. Može da se izoluje iz prirodnih proizvoda, ali se češće sintetiše iz α -pinena (Yoshifumi & Yoko, 2006).

2.3.1.10. Eugenol

Eugenol (Slika 13.) je oksidovani monoterpen iz grupe fenilpropena. On je bezbojna do bleđožuta tečnost koja se izoluje iz etarskih ulja klinčića, muskatnog oraščića (*Myristica fragrans*), cimeta, bosiljka, lovorovog lista, vanile (*Vanilla planifolia*), matičnjaka i pelina (*Artemisia absinthium*) (Barnes et al., 2007).



Slika 13. Strukturna formula eugenola

Eugenol se koristi u industriji parfema, a u medicini kao lokalni antiseptik i anestetik. Ako se kombinuje sa oksidom cinka dobija se cinkov oksid eugenola koji se koristi u stomatologiji (Jadhav et al, 2004). Neka istraživanja pokazuju da ubija određene ljudske ćelijske vrste zahvaćene karcinomom kolona *in vitro* (Jaganatham & Supriyanto, 2012). Međutim, eugenol je i hepatotoksičan, a ako se konzumira u prekomernim količinama javljaju se dijareja, mučnina, nesvestica, vrtoglavica, konvulzije ili lupanje srca. Iz tih razloga

je ograničena njegova upotreba u industriji parfema zbog moguće osetljivosti pojedinih ljudi (Fujusava et al., 2002).

2.3.2. Terpeni i etarska ulja u istraživanjima

Uticaj koji etarska ulja imaju na živi svet i na čoveka, jesu razlog za veliki broj istraživanja koja se bave proučavanjem njihovog efekta na organizam. Međutim, malo njih na osnovu dostupnih podataka, utvrđuje koje supstance iz etarskih ulja ostvaruju opisani efekat na organizam, ili je zapravo taj efekat posledica sinergije, aditivnosti ili antagonizma svih komponenta ulja. Sam efekat zavisi kako od vrste etarskog ulja, tako i od količine koja je u određenom vremenskom intervalu primenjivana na ispitivanom organizmu (El-Hawary et al., 2013; Da Silveira et al., 2013).

Najčešći oblik primene etarskih ulja, pa samim tim i terpena je u obliku vodenih rastvora (Zhang, 2002; Muley et al., 2009; Rahman et al., 2011). Izbor vode kao ratsvarača je opravdan bez obzira na slabu ratsvorljivost terpena u njoj. Ako se terpeni mučkaju sa vodom (ručno mešanje) dobijaju se rastvori koji odgovaraju unosu terpena kroz začinske biljke ili neke terapijske formulacije pripremljene u kućnim uslovima, što je vrlo rasprostranjena praksa prema podacima SZO (Azaizeh et al., 2003; Rivera et al., 2013; Wirth et al., 2005). Ako se terpeni mešaju ultrazvučno, dobijeni rastvori odgovaraju njihovim galenskim formama. Priprema rastvora terpena, ili etarskih ulja, za primenu u istraživanjima *in vivo* i *in vitro* zavisi od cilja samog istraživanja, pa se za te namene mogu koristiti rastvori (Nafisi et al., 2004), suspenzije (Rahman et al., 2011; Godwin & Michniak, 1999) ili emulzije (Rahman et al., 2011). Vodeni rastvori se najčešće koriste u studijama koje razmatraju udisanje etarskih ulja/terpena (Inouye et al., 2001; Gedney et al., 2004, Edris, 2007), a sva tri nabrojana oblika mogu da se koriste kada se etarska ulja/terpeni masiraju u kožu (Edris, 2007), uzimaju *per os* (Leite et al., 2011) ili injektuju (direktno u cirkulaciju ili muskularno) eksperimentalnim životinjama (El-Hawary et al., 2013; Suanarunsawat et al., 2010; Ahmadvand et al., 2012; Sebai et al., 2013).

Terapeutski potencijal etarskih ulja i njihovih aromatičnih isparljivih sastojaka u sprečavanju ili lečenju bolesti (Edris, 2007) dokazan je kroz pozitivan efekat etarskih ulja kod: aromaterapije i masaže, transdermalne terapije, kroz antidijabetični, antioksidativni, antivirusni, antibakterijski kao i pozitivan efekat na kardiovaskularne i kancerogene bolesti. Terpeneol, karvakrol, linalol, citral i mircen, bioaktivni monoterpene imaju dokazani protivupalni efekat (Da Silveira et al., 2013). Kod miševa koji imaju poremećaje u funkciji mišića

davanjem etarskog ulje *Citrus aurantium* L. u toku 60 dana, došlo do smanjenja aktivnosti CK, a samim tim i do smanjenja bolova i drugih propratnih efekata koje su trpeli zbog svog osnovnog poremećaja (De Souza et al., 2011). Umirujuć efekti udisanja ulja lavande (smanjenje krvnog pritiska, olakšavanje depresije ili stresa, smanjenje nivoa straha kod pacijenata na stomatološkoj klinici, poboljšavanje kvalitet sna) dokazan je u drugoj studiji (Sayorwan et al., 2012). Inhibicija enzima LDH u *in vivo* istraživanjima pokazuje određene efekte koji bi dalje mogli farmakološki da se testiraju. Dokazano je da etarsko ulje *Eucalyptus benthamii* and ima citotoksičan efekat na tumorske ćelije (Doll-Boscardin et al., 2012). Pozitivno delovanje ulja *Satureja khuzestanica* L. dokazano je kroz smanjenje lipidnog statusa, kroz dobru antioksidativnu aktivnost zbog čega smanjuje rizik od kardiovaskularnih bolesti ili oštećenja jetre (Ahmadvand et al., 2012). Neka ulja imaju i protektivno delovanje u odnosu na insekticide - etarsko ulje *Origanum majorana* L. u odnosu na insekticid praletrin (Abdel-Tawab et al., 2013). Upotreba etarskih ulja *Ocimum gratissimum* L. i *Piper guineense* dokazuje pozitivan efekat za lečenje poremećaja CNS kroz snažano sedativno, anksiolitičko i antidepresivno delovanje (Tankam and Ito, 2013 and 2014). U istraživanju efekta etarskog ulja *Cymbopogon winterianus* dokazano je da ima efekat na aktivnost CNS, i to hipnotički i sedativni, što potvrđuje upotrebu ove biljke u narodnoj medicini (Leite et al., 2011). Takođe, zaključuje se i da aromaterapija može proizvesti klinički relevantan pomak u pacijentovom percipiranju bola pa je preporučuju u lečenju afektivnih uzbuđenja, kao što su npr. stomatološke usluge (Gedney et al., 2004). Dokazano je da veći inhibitorni efekat na aktivnost α -amilaze imaju etarska ulja limunske trave i citronela trave nego što ga pokazuje zvanični lek za dijabetes tip 2 – oralni antidijabetik akarboza (Jumepaeng et al. 2013), kao i da je inhibitorni efekat etarskog ulja crnog bibera na aktivnost α -amilaze veći od 50% (Obok et al., 2013).

Sama inhibicija aktivnosti dijagnostički značajnijih enzima etarskim uljima/terpenima više nije sporna, ali se o njenom mehanizmu još uvek malo zna. Dokazana je inhibicija karvakrolom na enzim ciklooksigenaza EC 1.14.99.1 (COX) za koju se kaže da je „nespecifična ali relativno snažna“ (Marsik et al. 2006). Istraživanje efekta etarskog ulja *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. na aktivnost AMY i α -glukozidaze EC 3.2.1.20. gde je potvrđena inhibicija ova dva enzima nekompetitivnim mehanizmom (Sahin Basak & Candan, 2010). Interesantno je da je u istraživanju koje je podrazumevalo korišćenje bioinformatičkih alata dokazana inhibicija AChE sa linalolom zbog podložnosti enzima hidrofobnim interakcijama - terpeni su hidrofobni molekuli (Praveena & Sanjayan, 2011). Drugo takvo istraživanje je došlo do zaključka da što je manja ukupna energija nekog jedinjenja od ukupne

energije supstrata enzima, doći će do inhibicije enzimske aktivnosti u živom sistemu (Khanikor et al., 2013). Takođe, ne treba zaboraviti ni to da efekat terpena i efekat etarskog ulja iz koga se terpen izoluje ne moraju biti identični. Ovu tvrdnju potvrđuje ispitivanje efekta etarskog ulja *Thymus vulgaris* L. i njegovih sastojaka karvakrola i timola na inflamatorni odgovor *in vivo* - utvrđeno je da etarsko ulje i karvakrol pokazuju antiinflamatorni efekat, dok se timol koji je sastojak etarskog ulja ponaša antagonistički – pokazuje iritirajući efekat (Fachini-Queiroz et al., 2012).

2.4. Statistička analiza

2.4.1. Analiza glavnih komponentata

Analiza glavnih komponentata (PCA) predstavlja multivarijantnu metodu koja omogućava redukciju većeg broja promenljivih na manji broj novih promenljivih (koje se zovu glavne komponente). Na taj način, manjim brojem glavnih komponentata može se objasniti najveći deo varijanse originalnih promenljivih, što omogućava lakše razumevanje informacije sadržanih u originalnim podacima (Sharma, 1996). U postupku analize glavnih komponentata koriste se sve varijable, a može se primeniti na bilo koju matricu podataka X, pri čemu se Y podaci ne uzimaju u obzir. Smanjenje dimenzija promenljivih vrši se kako bi se izvršila vizualizacija multivarijantnih promenljivih pomoću grafika rasutosti (*scatter plot*), prevođenja visoko-korelisanih x-varijabli u manji set latentnih varijabli koje su nekorelisane, a koje mogu da se koriste u daljoj hemometrijskoj analizi, kao i zbog razdvajanja značajnih informacija (opisanih pomoću nekoliko latentnih varijabli) sadržanih u promenljivim od onih koje su manje bitne.

PCA je osetljiva na prisustvo rezultata opterećenih grubim greškama, jer takve vrednosti značajno povećavaju varijansu, a glavne komponente u PCA su usmerene na pravac najvećeg varijabiliteta. PCA se sastoji u pronalaženju pravca među varijablama koji na najbolji način odražava relativno rastojanje između objekata i opisuje maksimum varijanse skorova.

Skorovi predstavljaju projekcije vrednosti podataka na latentnu varijablu, odnosno pravac. Taj pravac se naziva prva glavna komponenta (PC1) i definiše se pomoću vektora koeficijenata latentnih varijabli (*loading vector*). PC1 se karakteriše najvećom varijansom, a svaka naredna glavna komponenta opisuje sve manji udeo varijabiliteta.

Druga glavna komponenta (PC2) predstavlja pravac normalan na PC1 kojim se opisuje maksimum preostalog varijabiliteta među podacima. Ostale glavne komponente su

normalne na prethodne i njihov pravac pokriva varijanse među podacima projektovane na posmatrani pravac. Ukupan broj glavnih komponenata isti je kao i broj varijabli.

Svojstvene vrednosti (*eigenvalues*) određenog faktora predstavljaju meru varijansi svih varijabla koje su obuhvaćene tim faktorom. Veličina svojstvenih vrednosti ukazuje na značaj faktora prema varijablama. Ukoliko je za određeni faktor svojstvena vrednost niska, onda je značenje tog faktora za objašnjenje varijanse varijabli minorno, pa se taj faktor eliminiše kao beznačajan.

Za određivanje potrebnog broja faktora koji se uzimaju u obzir postoje različiti kriterijumi, a najčešće primenjivani je Kaiser kriterijum prema kojem se odbacuju svi faktori kojima je svojstvena vrednost manja od 1. Takođe, ukoliko se grafički predstavi zavisnost broja glavnih komponenata od varijanse PCA skorova, tačka u kojoj kriva naglo menja nagib i postaje ravna, predstavlja broj glavnih komponenata koje bi trebalo uzeti u obzir za dalju analizu. Preostale glavne komponente sa niskim vrednostima varijansi pružaju informacije koje su od malog značaja za posmatranu analizu. Broj glavnih komponenata koje se koriste za dalja izračunavanja bi trebalo da objašnjava najmanje 80 % ukupne varijanse podataka.

Početni set podataka na samom početku PCA mora da se standardizuje u odnosu na srednju vrednost. Međutim, u izvesnim slučajevima, standardizacija podataka može da ima i neke nedostatke koji se ogledajuu činjenici da varijable za koje se zna da sadrže malu količinu informacija, nakon standardizacije, postaju značajne isto kao i varijable koje sadrže značajnije informacije. PCA ne može da napravi razliku između značajnih i informacija od malog značaja, već izražava što je moguće više varijabiliteta među podacima.

2.4.2. Klaster analiza

Klaster analiza predstavlja grupisanje jedinica posmatranja u grupe ili klase tako da se slične jedinice nađu u istoj klasi (klasteru). Grupisanje se vrši na osnovu rezultata (skora) koji se izračunava za svaku jedinicu posmatranja posebno na osnovu vrednosti obeležja po svim varijablama (Sharma, 1996). Klaster analiza omogućava značajnu redukciju podataka, a može i da na osnovu eventualno neočekivanog grupisanja jedinica posmatranja ukaže na postojanje određenih relacija između njih koje do tada nisu bile poznate i koje treba dalje ispitati. Klaster analiza se može vršiti na više načina, ali se dve metode izdvajaju kao najbolje:

1. hijerarhijska metoda – koja za krajnji rezultat ima dendogram koji predstavlja grafički prikaz klastera (grupa) u obliku stabla povezivanja. U osnovi ove metode je najpre izračunavanje udaljenosti svih jedinica međusobno, a potom se primenom

tehnika spajanja ili razdvajanja vrši formiranje odgovarajućih grupa - klastera. Tehnika spajanja (aglomerativna hijerarhijska metoda) polazi od toga da je svaka jedinica posmatranja sama u klasteru od jednog člana. Bliski klasteri se postepeno spajaju dok se na kraju sve jedinice posmatranja ne nađu u jednom klasteru. Kod tehnike razdvajanja ide se obrnutim redosledom, tako da se od jednog klastera koji sadrži sve jedinice posmatranja formiraju novi, pa od tih nastaju sledeći, sve dok ne bude svaka jedinica posmatranja posebno. To je takozvana divizionna hijerarhijska metoda.

2. nehijerarhijski pristup – koji omogućava raščlanjivanje na taj način da se jedinice posmatranja mogu da kreću iz jednog u drugi klaster u različitim fazama analize. Ovakav pristup zahteva da broj klastera i njihovi centriodi moraju biti poznati unapred. Postoji mnogo varijacija u primeni ove metode, ali sve u osnovi imaju najpre pronalaženje tačke grupisanja oko koje se nalaze jedinice (centroid), pa se nakon toga vrši izračunavanje nove tačke grupisanja na osnovu prosečne vrednosti jedinica. Jedinica posmatranja se tada pomera iz jednog u drugi klaster ukoliko je bliža novo izračunatoj tački grupisanja. Proces se odvija iterativno, sve do postizanja stabilnosti za unapred zadati broj klastera.

Klaster analiza je objektivna metoda za klasifikovanje na matematičkoj podlozi. Osetljiva je na izbor promenljivih, relevantnih za objekat istraživanja, kao i na varijable koji se razlikuju od ostalih. To znači da su od velikog značaja reprezentativnost uzorka i multikolinearnost. Osim toga, zbog velikog broja podmetoda, klaster analiza je, možda više nego ijedna druga multivarijatna analiza, pod uticajem izbora samog analitičara. Prezentovati klaster znači znati objasniti njihove sadržaje, odnosno, opisati klaster rečima ili mu dati ime (Sharma, 1996).

2.4.2.1. Hijerarhijska metoda

Agglomerativna hijerarhijska metoda gradi klaster korak po korak, sve dok se sve jedinice posmatranja ne nađu na dendogramu. Tek nakon toga se pristupa određivanju broja klastera koji imaju značaja za istraživača. Ova metoda otpočinje matricom udaljenosti između jedinica posmatranja. Sve jedinice su u klasterima veličine jedan, a zatim se vrši spajanje u veće klastera koje su međusobno na bliskoj udaljenosti. Postoji više načina da se definiše šta je to bliska udaljenost pri čemu se nijedna od postojećih tehnika grupisanja podataka u klastera nije izdvojila kao najbolja.

Najjednostavniji i najčešće korišćen pristup je metoda najbližih suseda. Dva klastera se spajaju u jedan kada je neka jedinica posmatranja iz jednog klastera najbliža nekoj jedinici iz drugog klastera. Kod povezivanja najdaljih suseda, dva klastera će se spojiti ukoliko je udaljenost najdaljih članova iz dva klastera najmanja. Treća tehnika grupisanja je na osnovu prosečnih udaljenosti, odnosno kada je prosečna udaljenost između dva klastera najmanja u odnosu na sve ostale prosečne udaljenosti između klastera.

Različite tehnike grupisanja mogu da daju sasvim različite rezultate što je uslovljeno prirodom originalnih podataka. Originalni podaci na osnovu kojih se vrši klaster analiza obično predstavljaju raspored n jedinica posmatranja u odnosu na p varijabli. Za izračunavanje udaljenosti jedinica posmatranja obično se koristi Euklidova funkcija (jednačina 8):

$$d_{ij} = \left\{ \sum_{k=1}^p (x_{ik} - x_{jk})^2 \right\}^{1/2} \quad (8)$$

gde je x_{ik} vrednost jedinice posmatranja x_i za varijablu X_k , a x_{jk} vrednost jedinice posmatranja x_j za varijablu X_k

Ukoliko su korišćene varijable izmerene različitim mernim skalama potrebno je prethodno izvršiti neki oblik standardizacije rezultata kako bi sve varijable bile u jednakom položaju. To znači da će aritmetička sredina za svaku varijablu biti jednaka nuli, a standardna devijacija jedinici. Neke klaster analize započinju sa izračunavanjem glavnih komponenti da bi se smanjio broj originalnih varijabli.

Da bi se utvrdilo da li se dobijeni klasteri zaista međusobno razlikuju moguće je vizuelno posmatranje grafičkih prikaza (dendograma, različitih linijskih dijagrama itd.), testiranje statističke značajnosti razlika između klastera preko, na primer, analize varijanse, kao i upoređivanje dobijenih rezultata sa rezultatima diskriminacione analize nad istim podacima.

Nakon izvršene klaster analize važno je odrediti broj klastera. Istraživač sam treba da prosudi, u kontekstu svog istraživanja koliko klastera i sa kakvim karakteristikama su potrebni. Taj postupak je uslovljen nizom faktora pri čemu najveći značaj imaju statistička značajnost razlike između klastera, veličina klastera, veličina uzorka, osobine klastera uslovljene karakteristikama originalnih varijabli i samog istraživanja, karakteristike klastera koje su od interesa za istraživača i slično.

2.4.2.2. Nehijerarhijska metoda ili metoda raščlanjivanja

Ova metoda polazi od unapred određenog broja klastera koji istraživač sam definiše na osnovu iskustva, ranijih analiza ili preporuke statističkog softvera. Nakon toga se pristupa razvrstavanju jedinica posmatranja. Postoje dva načina za razvrstavanje jedinica posmatranja.

Prvi je da se privremeno, na slučajan način, odrede jedinice koje predstavljaju tačke grupisanja, pa se na osnovu udaljenosti od tih jedinica sve ostale jedinice smeštaju u odgovarajući klaster. Tačka grupisanja se naziva centroid i uglavnom se nalazi tamo gde je najveća gustina jedinica posmatranja. Broj tačaka grupisanja je uslovljen unapred definisanim brojem klastera. Nakon toga računarski program premešta jedinice iz jednog u drugi klaster da bi bili što homogeniji. Postupak iteracija se nastavlja do situacije kada preseljavanje jedinica posmatranja iz jednog u drugi klaster više ne doprinosi poboljšanju homogenosti unutar klastera. Drugi pristup podrazumeva da se razvrstavanje odvija na osnovu nekog apriori zadatog kriterijuma.

EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Priprema uzoraka seruma

Kao izvor enzima korišćeni su komercijalni kontrolni humani serumi sa referentnom (N-serum) (Olympus 1, ODC 0003) i povećanom (H-serum) (Olympus 1, ODC 0004) aktivnošću enzima, proizvođača Olympus Life Science Research Europa GmbH, Munich, Germany.

Za ovo istraživanje određivana je aktivnost sedam enzima koji se najčešće određuju u kliničkoj praksi zbog njihovog nesporno velikog dijagnostičkog značaja: kreatin kinaza (CK), laktatdehidrogenaza (LDH), amilaza (AMY), alkalna fosfataza (ALP), γ -glutamilttransferaza (GGT), aspartat aminotransferaza (AST) i alanin aminotransferaza (ALT). Uzorak seruma za analizu pripremljen je tako što 60 μ L N ili H-seruma pomešano sa 120 μ L dejonizovane vode.

3.2. Priprema rastvora terpena

Za pripremanje rastvora terpena korišćena su komercijalno proizvedena jedinjenja: mircen (komorač - *Foeniculum vulgare*, kadulja, đumbir), β -pinen (ruzmarin - *Rosmarinus officinalis*, bor, peršun, bosiljak, hmelj), karvakrol (origano, timijan, majoran, čubrica), linalol (lavanda, menta, lovor, cimet, agrumi), nerol (limunska trava, hmelj i neroli ulje), geraniol (ružino ulje, palmarosa ulje i ulje citronele), citral (agrumi, limunova trava, matičnjak, bosiljak, eukaliptus), eukaliptol (eukaliptus, lovor, bosiljak, pelin, ruzmarin, kadulja), terpineol (bor, čajevac, listovi gorke narandže) i eugenol (muskatni oraščić, cimet, lovor, vanila) proizvođača Fluka, USA, čistoće 99,99%.

Izabrani terpeni su rastvarani u organskim rastvaračima (heksanu, etru, acetonu, metanolu, DMSO) i vodi. Međutim, testiranjem postojanosti kiveta aparata na kome je vršeno merenje enzimske aktivnosti prema tim rastvaračima utvrđeno je da aceton i etar rastvaraju kivete, dok heksan i metanol, ne rastvaraju kivete, ali izazivaju vidljivu denaturaciju proteina seruma odmah nakon mešanja, pa su kao rastvarači pogodni za istraživanje primenjeni voda i DMSO. Vodeni rastvori/emulzije terpena za ovo istraživanje pripremani su na dva načina:

- * ručnim mešanjem u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi. Ovako pripremljeni rastvori terpena, označeni su kao I₁ (na ovaj način pripremljen rastvor odgovara unosu terpena kroz začinske biljke ili neke terapijske formulacije pripremljene u kućnim uslovima).
- * ultrazvučnim mešanjem u ultrazvučnom kupatilu PS 20, na sobnoj temperaturi, frekvence 40.000 Hz, u trajanju od 5 minuta. Ovi rastvori terpena označeni su kao I₂

i predstavljaju simulaciju unosa terpena kroz galenske, zvanično registrovane formulacije farmaceutskih preparata.

DMSO je rastvarač u kome su terpeni rastvorni, ne utiče na aktivnost enzima, a takođe predstavlja i rastvarač koji se koristi za pripremu reagenasa za određivanje aktivnosti enzima (Instruction Architect c 8000, 2006) što znači da nema smetnji za upotrebu u analizatoru.

Tabela 4. Koncentracije rastvora terpena u reakcionoj smeši

Ime terpena	C ₁ (μmol/cm ³)	C ₂ (μmol/cm ³)	C ₃ (μmol/cm ³)	C ₄ (μmol/cm ³)
Karvakrol	5,54	3,96	3,07	2,51
Linalol	4,82	3,41	2,68	2,17
Nerol	4,86	3,49	2,68	2,22
Geraniol	4,90	3,49	2,73	2,22
Mircen	4,88	3,66	2,44	1,22
β-pinen	1,54	1,16	0,77	0,39
Citral	4,99	3,74	2,50	1,25
Eukaliptol	4,78	3,59	2,39	1,20
Terpineol	5,16	3,87	2,58	1,29
Eugenol	5,50	4,13	2,75	1,38

Početna koncentracija terpena određena je na osnovu literaturnih podataka (Suanarunsawat et al., 2010; De Souza et al., 2011; Ahmadvand et al., 2012; El-Soud et al., 2012; Sebai et al., 2013; Akolade et al., 2013; Dadkhah et al., 2014; etc), a predstavlja maksimalnu koncentraciju rastvora terpena koja dodavanjem u rastvor N ili H-seruma nije dovela do denaturacije proteina u periodu od 30 minuta, što je eksperimentalno potvrđeno. Zatim su pripremljeni rastvori terpena određenih koncentracija rastvarani u dejonizovanoj vodi i u DMSO što je predstavljeno koncentracijama C₁, C₂, C₃ i C₄ (Tabela 4.).

3.3. Merenje aktivnosti enzima u komercijalnom kontrolnom humanom serumu

Aktivnost sedam najčešće određivanih enzima u kliničkoj praksi u komercijalnom kontrolnom humanom serumu određivana je u biohemijskoj laboratoriji Doma zdravlja u Nišu na Abotovom dijagnostičkom analizatoru Aeroset ARCHITECT c 8000 (Slika 14.), proizvođača Abbott Laboratories, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, Illinois, 60, 064-3500, USA.



Slika 14. Abot dijagnostički analizator Aeroset ARCHITECT c 8000

To je automatski analizator sa 220 istovremeno aktivnih kanala koji mogu da se programiraju i kalibrišu. Analizira 215 uzoraka u minuti, odnosno, 65 analiza istovremeno. Od metoda za analizu koristi fotometrijske, potenciometrijske i turbidimetrijske metode. Kao uzorci mogu da se koriste: serum, plazma, likvor i urin. Odmeravanje uzoraka, reagenasa i analiza su automatizovani procesi (<http://www.captodayonline.com/productguides/instruments/chemistry-mid-high-june-2015/architect-c8000-and-ci8200-chemistry-mid-high-2015.html>).

Nakon kalibracije aparata (Tabela 5.) (Olympus system calibrator), određena je aktivnost ispitivanih enzima u N i H-serumu (Tabela 5.) po standardnim procedurama proizvođača (Instructions Architect c 8000, 2006). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 13.

Tabela 5. Metode za određivanje aktivnosti enzima i njihove aktivnosti (U/L) u N i H-serumu

Kalibracija aparata						
Analiza	Metoda		Mogućnost praćenja	Vrednost	Jedinica	
CK	IFCC	37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	148	U/L	
LDH	IFCC	37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	153	U/L	
AMY	IFCC referentna metoda (EPS) 37 ⁰ C		IFCC referentna metoda	133	U/L	
ALP	IFCC	37 ⁰ C	Olimpus master kalibrator	205	U/L	
GGT	IFCC	37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	101	U/L	
AST	IFCC referentna metoda sa P-5'-P 37 ⁰ C		IFCC referentna metoda	93,7	U/L	
ALT	IFCC referentna metoda sa P-5'-P 37 ⁰ C		IFCC referentna metoda	85,1	U/L	
N-serum (Control serum 1)						
Analiza	Metoda		Mogućnost praćenja	Srednja vrednost	Prihvatljiva vrednost	Jedinica
CK	IFCC 37 ⁰ C		IFCC referentna metoda	153	122-184	U/L
LDH	IFCC	37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	144	118-170	U/L
AMY	IFCC referentna metoda (EPS) 37 ⁰ C		IFCC referentna metoda	83,2	66,6-99,8	U/L
ALP	IFCC	37 ⁰ C	Olimpus master kalibrator	111	83,3-139	U/L
GGT	IFCC	37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	54,9	42,8-67	U/L
	IFCC referentna metoda sa		IFCC			

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

AST	P-5'-P 37 ⁰ C	referentna metoda	44,9	34,6-55,2	U/L
ALT	IFCC referentna metoda sa sa P-5'-P 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	40,8	31,4-50,2	U/L
H-serum (Control serum 2)					
Analiza	Metoda	Mogućnost praćenja	Srednja vrednost	Prihvatljiva vrednost	Jedinica
CK	IFCC 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	406	325-487	U/L
LDH	IFCC 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	520	426-614	U/L
AMY	IFCC referentna metoda (EPS) 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	235	188-282	U/L
ALP	IFCC 37 ⁰ C	Olimpus master kalibrator	490	368-613	U/L
GGT	IFCC 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	156	122-190	U/L
AST	IFCC referentna metoda sa sa P-5'-P 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	138	106-170	U/L
ALT	IFCC referentna metoda sa sa P-5'-P 37 ⁰ C	IFCC referentna metoda	124	95,5-153	U/L

Kalibracija aparata, kao i određivanje aktivnosti enzima u N ili H-komercijalnom serumu (Tabela 5.) merena je iz uzoraka seruma. Nakon toga, po istoj proceduri, određena je aktivnost istih enzima u razblaženim N i H-komercijalnim serumima, a razblaženje je vršeno dejonizovanom vodom u odnosu 1:2. Uzorak u kome je određivana enzimska aktivnost sadržao je 60 µL N ili H-komercijalnog seruma i 120 µL dejonizovane vode. Razblaživanje dejonizovanom vodom kod komercijalnih seruma, u razmeri 1:2, dovelo je do dvotrećinskog smanjenja aktivnosti enzima (Tabela 14.). Za razliku od komercijalnih seruma, kod seruma pacijenata bi se javio i određeni inhibitorski efekat dejonizovane vode (Koraćević i dr., 1996) odnosno, smanjenje aktivnosti enzima ne bi bilo proporcionalno razblaženju kao u našem slučaju, već bi bilo manje.

Merenje aktivnosti ispitivanih enzima vršeno je na sledeći način: razblaženom rastvoru seruma (180 μ L) dodavano je 40 μ L vodenog rastvora terpena ili 40 μ L rastvora terpena u DMSO i smeša je inkubirana 10 minuta. Vodeni rastvori terpena pripremani su u četiri koncentracije kao I₁ i I₂. Posle inkubacije određivana je aktivnost svakog od ispitivanih enzima. Kao slepa proba dodavana je dejonizovana voda (za vodene rastvore) ili DMSO (za rastvore DMSO). Sva merenja enzimskih aktivnosti ponavljana su tri puta.

3.3.1. Merenje aktivnosti enzima keratin kinaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti CK u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Tabela 6. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti CK u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
ADP kalijumova so	1,30 mg/ml
β -NADP	2,13 mg/ml
Heksokinaza (kvasac)	3,9 U/ml
G-6-PDH	1,95 U/ml
Glukoza	20 mmol/L
NAC	25,5 mmol/L
Natrijum azid	0,1 %
R₂	
Kreatin fosfat	50,1 mg/ml
Glukoza	20 mmol/L
Natrijum azid	0,1 %

Princip određivanja: CK iz uzorka katalizuje prenos visoko energetske fosfatne grupe sa kreatin fosfata na ADP. Nastali ATP fosforiliše glukozu u glukozu-6-fosfat (G-6-P) u reakciji koju katališe heksokinaza. G-6-P se zatim oksiduje glukozu-6-fosfat dehidrogenazom (G-6-PDH), pri čemu se NADP redukuje u NADPH. Meri se brzina

formiranja NADPH na 340 nm koja je proporcionalna aktivnosti CK u uzorku. Reakcija se odvija u prisustvu N-acetil-L-cisteina (NAC) koji ima funkciju reaktivatora enzima.

Reagensi: CK reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 6.

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom, odmerava se 8 µL seruma, kome se dodaje 160 µL reagensa R₁, i 40 µL reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 340 nm. Test je linearan za aktivnost CK do 4267 U/L.

Referentne vrednosti: Muškarci: 30-200 U/L, Žene: 29-168 U/L.

3.3.2. Merenje aktivnosti enzima laktat dehidrogenaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti LDH u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Tabela 7. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti LDH u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
Dietanolamin	381 mmol/L
L-laktat, litijumova so	76 mmol/L
Natrijum azid	0,1 %
R₂	
β-NAD	30,8 mmol/L

Princip određivanja: LDH katalizuje konverziju laktata u piruvat, kao i reverzibilnu reakciju konverzije piruvata u laktat. Oba jedinjenja mogu biti supstrati u reakciji određivanja LDH, ali se rezultati određivanja ove dve metode ne mogu direktno porediti. Druga reakcija ne zahteva preinkubaciju, kako bi se potrošile endogene α-keto kiseline i ima veliki opseg linearnosti. Laktat i oksidovani oblik NAD se pretvaraju u piruvat i redukovani oblik NADH delovanjem LDH. NADH apsorbuje svetlost na 340 nm, a NAD ne, što implicira da je stepen povećanja apsorbance na datoj talasnoj dužini direktno proporcionalan aktivnosti LDH u uzorku.

Reagensi: LDH reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 7.

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom, odmerava se 3,5 µL seruma, kome se dodaje 160 µL reagensa R₁, i 40 µL reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 340 nm. Test je linearan za aktivnost LDH do 1984 U/L.

Referentne vrednosti: Odrasli: 125-243U/L.

3.3.3. Merenje aktivnosti enzima alkalne fosfataze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti ALP u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Princip određivanja: ALP u uzorku katalizuje hidrolizu bezbojnog p-nitrofenilfosfata (p-NPP) pri čemu nastaje p-nitrofenol i neorganski fosfat. Pri alkalnoj pH p-nitrofenol je žuto obojen (fenoksidni jon). Porast apsorbance direktno je proporcionalna aktivnost ALP u uzorku

Reagensi: ALP reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 8.

Tabela 8. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti ALP u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
2-amino-2-metilpropanol	> 1,2 mol/L
Magnezijum	> 7,2 mmol/L
Cink sulfat	> 3,6 mmol/L
HEDTA	> 7,2 mmol/L
R₂	
4-nitrofenilfosfat	> 171,6 mmol/L

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom kontinuiranog merenja, odmerava se 7 µL seruma, kome se dodaje 60 µL reagensa

R₁, i 20 µL reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 404 nm. Test je linearan za aktivnost ALP do 2200 U/L.

Referentne vrednosti: Odrasli: 40-150 U/L.

3.3.4. Merenje aktivnosti enzima γ -glutamiltransferaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti GGT u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Princip određivanja: GGT katalizuje transfer gama glutamil grupe sa donor supstrata (3-karboksi-4-nitroanilida) na glicilglicin akceptor pri čemu nastaje 3-karboksi-4-nitroanilin. Porast apsorbance proporcionalan je GGT u uzorku..

Reagensi: GGT reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 9.

Tabela 9. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti GGT u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
Glicilglicin	191 mmol/L
R₂	
L-gama-glutamil-3-karboksi-4-nitroanilid, amonijumova so	30,6 mmol/L
Natrijum azid	0,1 %

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom, odmerava se 3,1 µL seruma, kome se dodaje 125 µL reagensa R₁, i 32 µL reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 412 nm. Test je linearan za aktivnost GGT do 1543 U/L.

Referentne vrednosti: Muškarci: 12-64 U/L, Žene: 9-36 U/L.

3.3.5. Merenje aktivnosti enzima aspartat aminotransferaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti AST u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Princip određivanja: AST iz uzorka katalizuje prenos amino grupe sa L-aspartata na α -ketoglutarat formirajući oksalacetat i L-glutamat. Oksalacetat u prisustvu NADH i malat dehidrogenaze (MDH) redukuje se u L-malat, a NADH se oksiduje u NAD. Reakcija se prati merenjem brzine opadanja apsorbance usled oksidacije NADH u NAD.

Reagensi: AST reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 10.

Tabela 10. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti AST u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
β -NADP	0,16 mg/mL
Malat dehidrogenaza	0,64 U/mL
Laktat dehidrogenaza	0,64 U/mL
L-aspartat	232 mmol/L
R₂	
α -ketoglutarat	51,3 mmol/L
L-aspartat	100 mmol/L

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom kontinuiranim merenjem, odmerava se 5,3 μ L seruma, kome se dodaje 160 μ L reagensa R₁, i 40 μ L reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 340 nm. Test je linearan za aktivnost AST do 913 U/L.

Referentne vrednosti: Odrasli: 5-34 U/L.

3.3.6. Merenje aktivnosti enzima alanin aminotransferaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti ALT u humanom serumu ili plazmi, za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin.

Princip određivanja: ALT iz uzorka katalizuje prenos amino grupe sa L-alanina na α -ketoglutarat formirajući piruvat i L-glutamat. Piruvat u prisustvu NADH i LDH redukuje se u L-laktat, a NADH se oksiduje u NAD. Reakcija se prati merenjem brzine opadanja apsorbance usled oksidacije NADH u NAD.

Reagensi: ALT reagensi su tečni reagensi, sadrže reagense R₁ i R₂ čiji je sastav prikazan u Tabeli 11.

Tabela 11. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti ALT u serumu ili plazmi

Sastojci	Koncentracija
R₁	
β-NADP	0,16 mg/mL
Laktat dehidrogenaza	2,57 U/mL
L-alanin	392 mmol/L
R₂	
α-ketoglutarat	77 mmol/L
L-alanin	1000 mmol/L

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom kontinuiranim merenjem, odmerava se 5,3 μL seruma, kome se dodaje 160 μL reagensa R₁, i 40 μL reagensa R₂, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 340 nm. Test je linearan za aktivnost ALT do 942 U/L.

Referentne vrednosti: Odrasli: 0-55 U/L.

3.3.7. Merenje aktivnosti enzima amilaze

Namena: test je namenjen za određivanje aktivnosti AMY u humanom serumu, plazmi (za koju su dozvoljeni antikoagulansi: litijum, natrijum ili amonijum heparin) ili urinu (bilo koji uzorak urina ili iz 24-satnog urina sakupljenog bez konzervansa).

Princip određivanja: AMY hidrolizuje 2-hloro-4-nitrofenil-α-D-maltotriozid (CNPG3) pri cemu nastaje 2-hloro-4-nitrofenol (CPNP) i 2-hloro-4-nitrofenil-α-D-maltozid (CNPG2), maltotrioza i glukoza. Aktivnost amilaze je proporcionalna brzini formiranja 2-hloro-4-nitrofenola.

Reagensi: AMY reagens je tečan reagens, sadrži reagens R₁ čiji je sastav prikazan u Tabeli 12.

Tabela12. Sastav reagenasa za određivanje aktivnosti AMY u serumu, plazmi ili urinu

Sastojci	Koncentracija
R₁	
2-hlor-4-nitrofenil- α -D-maltotriozid	2,25 mmol/L
Natrijum hlorid	350 mmol/L
Kalcijum acetat	6 mmol/L
Kalijum tiocijanat	900 mmol/L
Natrijum azid	0,1 %

Izvođenje testa: U potpuno automatizovanom procesu, spektrofotometrijskom metodom, odmerava se 4 μ L seruma, kome se dodaje 166 μ L reagensa R₁, a zatim vrši očitavanje na talasnoj dužini od 404 nm. Test je linearan za aktivnost AMY do 3010 U/L.

Referentne vrednosti: Odrasli: 25-125 U/L.

3.4. Obrada rezultata

Za obradu dobijenih podataka korišćen je softver STATISTICA 7. Statističkim analizama je utvrđivan:

- * stepen povezanosti (metodom kanoničke korelacije) rezultata;
- * značajnost razlika između grupa (metodom faktorijalne ANOVA analize);
- * struktura veze (metodom PCA – analize glavnih komponentata) (Tabachnick & Fidell, 1989).

REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Aktivnost kliničkih enzima

Serumi sa referentnom aktivnošću ili N-serumi, predstavljaju sliku normalnog fiziološkog stanja organizma u ovom *in vitro* istraživanju, dok serumi sa povećanom aktivnošću enzima ili H-serumi, predstavljaju stanje organizma u kome su prisutni poremećaji usled kojih su povišene aktivnosti klinički značajnih enzima u serumu. Korišćenje N i H-seruma u *in vitro* uslovima podržava istraživanja koja se obavljaju kako na zdravim tako i na jedinkama koje imaju određene metaboličke poremećaje (Suanarunsawat et al., 2010; Ahmavand et al., 2012; Sebai et al., 2013, El-Soud et al., 2012; De Souza et al., 2011) u *in vivo* uslovima.

Korišćenje komercijalnih kontrolnih seruma, u odnosu na serume dobijene od pacijenata, ima prednosti zbog nekoliko značajnih razloga za primenu u istraživanjima:

- * komercijalni serumi su HIV (*Human immunodeficiency virus*) i hepatitis negativni, za razliku od seruma koji se dobijaju od pacijenata a koji se ne testiraju na ove viruse, pa samim tim nisu bezbedni za istraživanja, odnosno istraživače,
- * kvalitativni i kvantitativni sastav komercijalnih seruma je u potpunosti određen, za razliku od seruma pacijenata u kojima se određuje ograničeni broj parametara. razblaživanje dejonizovanom vodom kod komercijalnih seruma dovodi do proporcionalnog smanjenja aktivnosti enzima, dok kod seruma pacijenata to često nije slučaj (Koraćević i dr., 1996)

Aktivnost kliničkih enzima određivana je u komercijalnim kontrolnim humanim serumima sa referentnom (N) i povećanom (H) aktivnošću enzima čije su vrednosti prikazane u Tabeli 13. Aktivnosti enzima u komercijalnim kontrolnim humanim N i H-serumima, razblaženim dejonizovanom vodom u odnosu 1:2, prikazane su Tabeli 14. Razblaživanje seruma vodom, kada su u pitanju serumi pacijenata, može da dovede do inhibicije enzima (Koraćević i dr., 1996). U ovom eksperimentu je ta mogućnost isključena korišćenjem komercijalnih kontrolnih seruma, što je potvrđeno rezultatima predstavljenim u Tabeli 14. Vrednosti aktivnosti enzima u uzorcima N i H-seruma, u koje su dodati vodeni rastvori terpena ili rastvori terpena u DMSO, prikazani su za svaki enzim, u Tabelama 15. - 42.

Takođe je prikazan i procenat inhibicije enzima dobijen izačunavanjem (jednačina 9) za sve proučavane vodene rastvore terpena u četiri različite koncentracije ($C_1 - C_4$) pripremljene ručnim (I_1) ili ultrazvučnim (I_2) mešanjem kao i za rastvore terpena u DMSO:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{A_0 - A_i}{A_0} \times 100 \quad (9)$$

gde je A_0 izmerena aktivnost enzima u N ili H-serumu bez prisustva terpena, a A_i izmerena aktivnost enzima u N ili H-serumu u prisustvu rastvora terpena.

Tabela 13. Vrednosti aktivnosti enzima u N i H-serumu (srednja vrednost \pm SD)

Enzim	Srednja vrednost (U/L) \pm SD u N-serumu	Srednja vrednost (U/L) \pm SD u H-serumu
CK	141,90 \pm 0,74	382,66 \pm 0,67
LDH	157,33 \pm 1,07	526,33 \pm 0,79
ALP	117,34 \pm 0,70	512,33 \pm 0,79
GGT	53,00 \pm 0,48	161,00 \pm 0,62
AST	43,33 \pm 0,53	141,33 \pm 0,70
ALT	44,66 \pm 0,88	132,33 \pm 0,82
AMY	87,66 \pm 0,70	237,33 \pm 0,63

Tabela 14. Vrednosti aktivnosti enzima u N i H-serumu razblaženim dejonizovanom vodom u odnosu 1:2 (srednja vrednost \pm SD)

Enzim	Srednja vrednost (U/L) \pm SD u N-serumu	Srednja vrednost (U/L) \pm SD u H-serumu
CK	49,00 \pm 0,71	131,50 \pm 0,53
LDH	54,00 \pm 0,94	172,60 \pm 0,97
ALP	42,40 \pm 0,84	174,10 \pm 0,57
GGT	17,40 \pm 0,48	54,80 \pm 0,63
AST	14,50 \pm 0,53	44,00 \pm 0,82
ALT	15,20 \pm 0,79	42,70 \pm 0,82
AMY	30,60 \pm 0,70	78,40 \pm 0,52

4.1.1. Uticaj rastvora terpena na aktivnost kreatin kinaze (CK)

Aktivnost enzima CK merena je nakon dodavanja vodenih rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola pripremljenih kao I₁ i kao I₂ u četiri koncentracije (C₁-C₄). Srednje vrednosti aktivnosti kreatin kinaze i procenat inhibicije u N i H-serumu prikazani su u Tabelama 15. i 16. Takođe, izmerena je i aktivnost CK u N i H-serumu nakon dodavanja rastvora terpena u DMSO, u četiri koncentracije (C₁-C₄), a srednje vrednosti aktivnosti i procenat inhibicije prikazani su u Tabelama 17. i 18.

Tabela 15. Aktivnost kreatin kinaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti CK ± SD(U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	41,0±1,2 16,3%	43,8±0,8 10,6%	40,6±1,5 17,1%	41,4±1,1 15,5%
C ₂	38,6±1,1 21,2%	35,8±1,3 26,9%	43,2±1,5 11,8%	39,8±1,3 18,8%
C ₃	43,2±1,8 11,8%	44,8±0,8 8,6%	42,6±1,7 13,1%	36,6±2,1 25,3%
C ₄	41,4±2,6 15,5%	38,2±0,8 22,0%	40,2±1,3 18,0%	41,4±1,1 15,5%
I ₂				
C ₁	39,8±0,8 18,8%	31,4±1,1 35,9%	40,6±1,5 17,1%	32,4±2,8 33,9%
C ₂	37,6±0,9 23,3%	31,2±1,3 36,3%	38,4±1,1 21,6%	32,8±1,9 33,1%
C ₃	35,2±1,5 28,1%	33,2±0,8 32,2%	41,2±0,8 15,9%	33,2±1,6 32,2%
C ₄	38,6±1,1 21,2%	36,2±1,4 26,1%	40,2±1,8 18,0%	33,6±2,7 31,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,87 \cdot 10^{-4}$ do $5,42 \cdot 10^{-10}$

Za vodene rastvorenja terpena pripremljenih ručnim mešanjem (I_1), procenat inhibicije je u opsegu od 8,6 – 26,9%, dok je za vodene rastvorenja terpena pripremljenih ultrazvučnim mešanjem (I_2), procenat inhibicije u opsegu od 15,9 – 36,3% u N-serumu (Tabela 15.). Najizraženiji inhibitorski efekat u N-serumu ispoljio je vodeni rastvor linalola u koncentraciji C_2 bez obzira na način pripreme rastvorenja terpena (26,9% i 36,3%). Najslabiji inhibitorski efekat u N-serumu pripremljen kao I_1 (8,6%) ispoljio je vodeni rastvor linalola, u koncentraciji C_3 , dok najslabiji inhibitorski efekat, pripremljen kao I_2 , pokazuje vodeni rastvor nerola u koncentraciji C_3 (15,9%). Podaci iz Tabele 15. ukazuju da se u N-serumu veći procenat inhibicije na aktivnost CK ostvaruje kada se vodeni rastvorenja terpena pripreme kao I_2 nego kao I_1 .

U H-serumu, za vodene rastvorenja terpena pripremljene kao I_1 procenat inhibicije je u opsegu od 15,4 – 27,6%, dok je za vodene rastvorenja pripremljene kao I_2 procenat inhibicije od 1,7 – 20,6% (Tabela 16.). Najbolji inhibitorski efekat procenjen preko procenta inhibicije u H-serumu zapažen je za rastvor geraniola u koncentraciji C_2 pripremljenog kao I_1 (27,6%) kao i za rastvor karvakrola u istoj koncentraciji (C_2), ali pripremljenog kao I_2 (20,6%). U H-serumu veća inhibicija se postiže kada se vodeni rastvorenja terpena pripreme ručnim mešanjem (I_1) nego ultrazvučno (I_2). Najslabiji inhibitorski efekat u H-serumu od 15,4% pokazao je vodeni rastvor nerola i to pripremljen kao I_1 sa koncentracijom C_3 , a pripremljen kao I_2 sa koncentracijom C_2 inhibira samo 1,7%.

Aktivnost enzima CK merena je i nakon dodavanja rastvorenja karvakrola, linalola, nerola i geraniola pripremljenih u DMSO u četiri koncentracije (C_1 - C_4). Srednje vrednosti aktivnosti kreatin kinaze i procenat inhibicije u N-serumu prikazani su u Tabeli 17., a u H-serumu u Tabeli 18.

Rastvorenja terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na CK u N-serumu u opsegu od 14,1 – 38,4% (Tabela 17.). Najbolji inhibitorski efekat ispoljio je rastvor linalola u koncentraciji C_2 (38,4%), dok je najslabiji inhibitorski efekat ispoljio rastvor nerola u koncentraciji C_3 (14,1%). Poređenjem dobijenih rezultata uočava se da se vrednosti procenta inhibicije (15,9 – 36,3%) vodenih rastvorenja terpena pripremljenih ultrazvučnim mešanjem (I_2) (Tabela 15.) vrlo malo razlikuju od procenta inhibicije (14,1 – 38,4%) rastvorenja terpena u DMSO (Tabela 17.). Pomenute vrednosti razlikuju se od procenta inhibicije (8,6 – 26,9%) vodenih rastvorenja terpena pripremljenih ručnim mešanjem (I_1) (Tabela 15.).

Tabela 16. Aktivnost kreatin kinaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti CK \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	102,2 \pm 1,5 22,3%	102,0 \pm 1,0 22,4%	98,8 \pm 0,8 24,9%	100,0 \pm 1,6 24,0%
C ₂	104,8 \pm 0,8 20,3%	99,8 \pm 1,9 24,1%	102,8 \pm 0,8 21,8%	95,2 \pm 1,5 27,6%
C ₃	99,6 \pm 1,1 24,3%	96,4 \pm 1,1 26,7%	111,2 \pm 1,3 15,4%	102,8 \pm 2,2 21,8%
C ₄	100,8 \pm 1,5 23,3%	102,2 \pm 0,8 22,3%	107,8 \pm 2,9 18,0%	99,6 \pm 2,3 24,3%
I ₂				
C ₁	111,0 \pm 2,2 15,6%	111,0 \pm 1,0 15,3%	121,2 \pm 0,8 7,8%	115,6 \pm 3,0 12,1%
C ₂	104,4 \pm 1,8 20,6%	114,8 \pm 1,3 12,7%	129,2 \pm 1,3 1,7%	115,8 \pm 2,4 11,9%
C ₃	105,8 \pm 1,3 19,5%	112,4 \pm 1,1 14,5%	127,4 \pm 0,9 3,1%	111,6 \pm 2,1 15,1%
C ₄	111,0 \pm 1,0 15,3%	116,6 \pm 0,6 11,3%	114,6 \pm 1,0 12,9%	110,6 \pm 1,8 15,9%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,35 \cdot 10^{-3}$ do $6,88 \cdot 10^{-13}$

Rastvori terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na aktivnost CK u H-serumu između 15,4 – 27,6% (Tabela 18.). Najbolji inhibitorni efekat pokazao je rastvor geraniola u koncentraciji C₁ (27,6%), dok je najslabiji inhibitorni efekat pokazao rastvor nerola u koncentraciji C₄ (15,4%). Poređenjem rezultata inhibicije aktivnosti CK u H-serumima, uočava se da su maksimalne i minimalne vrednosti procenata inhibicije vodenih rastvora terpena pripremljenih ručnim mešanjem (I₁) (Tabela 16.) i rastvora terpena u DMSO (Tabela 18.) iste. Te vrednosti se razlikuju od procenata inhibicije vodenih rastvora terpena (1,7 – 20,6%) pripremljenih ultrazvučnim mešanjem (I₂) u smislu da su veće od svih njihovih

zabeleženih inhibitornih vrednosti u Tabeli 16. (sa izuzetkom vrednosti karvakrola u koncentracijama C₁, C₂ i C₃ i geraniola u koncentraciji C₄).

Tabela 17. Aktivnost kreatin kinaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSOu koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti CK ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	39,2±1,5 20,0%	33,2±1,3 32,2%	40,4±1,1 17,5%	32,4±2,8 33,8%
C ₂	38,6±0,9 21,2%	30,2±0,8 38,4%	38,2±1,3 22,0%	34,6±2,1 29,4%
C ₃	36,6±1,1 25,3%	34,8±1,3 28,9%	42,1±0,8 14,1%	34,8±1,3 28,9%
C ₄	38,8±0,8 20,8%	37,2±1,4 24,1%	40,6±1,7 17,1%	36,4±1,1 25,7%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od 1,03 x 10⁻³ do 7,84 x 10⁻¹⁴

Tabela 18. Aktivnost kreatin kinaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSOu koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti CK ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	99,6±1,1 24,3%	96,4±1,1 26,7%	98,8±0,8 24,9%	95,2±1,5 27,6%
C ₂	100,8±1,5 23,3%	99,8±1,9 24,1%	102,8±0,8 21,8%	100,0±1,6 24,0%
C ₃	102,2±1,5 22,3%	102,0±1,0 22,4%	107,8±2,9 18,0%	102,8±2,2 21,8%
C ₄	104,4±1,8 20,6%	102,2±0,8 22,3%	111,2±1,3 15,4%	110,6±1,8 15,9%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od 8,44 x 10⁻² do 8,10 x 10⁻¹³

4.1.2. Uticaj rastvora terpena na aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH)

Aktivnost enzima LDH merena je nakon dodavanja vodenih rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola pripremljenih kao I₁ i kao I₂ u četiri koncentracije (C₁-C₄), a srednje vrednosti aktivnosti laktat dehidrogenaze i procenat inhibicije prikazani su tabelarno za N (Tabela 19.) i H-serum (Tabela 20.) Takođe, izmerena je i aktivnost enzima nakon dodavanja rastvora terpena u DMSO, u četiri koncentracije (C₁-C₄), a srednje vrednosti aktivnosti i procenat inhibicije prikazani su u Tabeli 21. za N-serum i Tabeli 22. za H-serum.

Tabela 19. Aktivnost laktat dehidrogenaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti LDH ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	32,0±1,0	50,8±1,9	45,4±2,1	50,6±2,7
	40,7%	5,9%	15,9%	6,3%
C ₂	33,6±1,1	50,6±2,3	48,0±0,7	53,0±3,2
	37,8%	6,3%	11,1%	1,9%
C ₃	39,2±0,8	47,6±0,5	49,8±1,5	47,2±3,6
	27,4%	11,6%	7,8%	12,6%
C ₄	36,2±1,3	50,6±1,3	44,8±1,3	52,2±3,8
	33,0%	6,3%	17,0%	3,3%
I ₂				
C ₁	32,4±1,1	45,8±1,1	44,0±1,7	42,2±1,6
	40,0%	15,2%	18,5%	21,9%
C ₂	28,6±1,1	41,4±1,1	44,2±2,1	45,0±3,2
	47,0%	23,3%	18,1%	16,7%
C ₃	30,8±1,9	43,6±1,1	47,4±0,9	44,2±2,6
	43,0%	19,3%	12,2%	18,1%
C ₄	30,0±1,7	46,2±0,8	46,4±1,1	42,6±4,0
	46,4%	17,5%	17,1%	23,9%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $7,22 \cdot 10^{-2}$ do $1,59 \cdot 10^{-11}$

Na osnovu prikazanih podataka jasno se uočava da postoji razlika između efekta koji u N-serum ostvaruju vodeni rastvori terpena u zavisnosti od načina pripreme rastvora (Tabela 19.). Naime, kod ručno pripremljenih rastvora inhibitora (I₁) procenat inhibicije se kreće od 1,9 - 40,7%. Najveći inhibitorski efekat pokazuje rastvor karvakrola u koncentraciji C₁ (40,7%) dok najmanji procenat inhibicije uz pomoć I₁ rastvora terpena pokazuje rastvor geraniola u koncentraciji C₂ (1,9%).

Tabela 20. Aktivnost laktat dehidrogenaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti LDH ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	131,6±2,1 23,8%	142,2±1,3 17,6%	133,8±1,1 22,5%	142,2±1,8 17,6%
C ₂	131,8±2,4 23,6%	138,6±1,5 19,7%	143,2±0,8 17,0%	140,6±1,8 18,5%
C ₃	132,0±1,4 23,5%	138,2±2,3 19,9%	153,6±3,6 11,0%	146,0±1,2 15,4%
C ₄	133,8±1,3 22,5%	143,2±1,6 17,0%	149,2±1,1 13,6%	142,0±1,9 17,7%
I ₂				
C ₁	150,0±0,7 13,1%	166,2±0,8 8,2%	165,6±1,1 4,0%	171,0±3,2 1,5%
C ₂	144,2±1,5 16,5%	170,6±1,1 1,2%	170,8±1,1 1,0%	170,6±2,9 1,2%
C ₃	145,8±0,8 15,5%	166,8±1,3 3,4%	170,6±1,8 1,2%	166,0±1,9 3,8%
C ₄	150,2±1,6 13,0%	167,0±1,9 3,2%	161,4±2,6 6,5%	167,2±2,2 3,1%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $2,02 \cdot 10^{-3}$ do $6,04 \cdot 10^{-13}$

Kod ultrazvučno mešanih rastvora inhibitora (I₂) i dalje je rastvor karvakrola najbolji inhibitor u koncentraciji C₂ sa kojom inhibira čak 47,0% aktivnosti LDH, što predstavlja i najveći procenat inhibicije u ovom istraživanju. Najmanji inhibitorski efekat ispoljio je I₂ rastvor nerola u koncentraciji C₃ od 12,2%. Način pripreme vodenih rastvora terpena utiče na aktivnost enzima LDH u N-serumu na isti način kao što je već zabeleženo kod aktivnosti CK – bolji inhibitorski efekat se postiže primenom ultrazvučno pripremljenih vodenih rastvora terpena (I₂).

Procenat inhibicije vodenih rastvora terpena pripremljenim kao I₁ na aktivnost LDH u H-serumu kreće se od 11,0 - 23,8%, dok su vrednosti za procenat inhibicije za rastvore terpena pripremljene kao I₂ u interval od 1,0 - 16,5% (Tabela 20.). Od svih rastvora terpena pripremljenih kao I₁, rastvor karvakrola u koncentraciji C₁ je ispoljio najveći procenat inhibicije (23,8%), a najmanji rastvor nerola u koncentraciji C₃ (11,0%). Karvakrol zadržava poziciju najboljeg inhibitora i kada se rastvori pripreme kao I₂, s tim što najbolji inhibitorski efekat tada postiže sa koncentracijom rastvora C₂ (16,5%), a nerol ostaje i ovde najslabiji inhibitor od samo 1,0% inhibicije sa koncentracijom rastvora C₂, što ujedno predstavlja i najmanji procenat inhibicije zabeležen u ovom istraživanju. Način pripreme vodenih rastvora terpena utiče na procenat inhibicije u H-serumu tako što se veća inhibicija postiže sa rastvorima terpena pripremljenim kao I₁.

Tabela 21. Aktivnost laktat dehidrogenaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti LDH ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	32,0±1,0	46,2±0,8	44,0±1,7	42,2±1,6
	40,7%	14,4%	18,5%	21,9%
C ₂	28,6±1,1	41,4±1,1	45,4±2,1	50,6±2,7
	47,0%	23,3%	15,9%	6,3%
C ₃	30,8±1,9	43,6±1,1	47,4±0,9	47,2±3,6
	43,0%	19,3%	12,2%	12,6%
C ₄	30,0±1,7	45,8±1,1	46,4±1,1	45,0±3,2
	44,4%	15,2%	14,1%	16,7%

*p vrednosti za sve enzimske aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,08 \times 10^{-3}$ do $1,19 \times 10^{-14}$;

Rastvori terpena u DMSO u N-serumu inhibiraju LDH sa procentom inhibicije u opsegu od 6,3 – 47,0%. Najveći procenat inhibicije ostvaruje se rastvorom karvakrola koncentracije C₂ (7,0%), dok se najmanji procenat inhibicije ostvaruje uz pomoć rastvora geraniola iste koncentracije (6,3%).

Tabela 22. Aktivnost laktat dehidrogenaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti LDH ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	132,6±2,1	143,2±1,6	143,2±0,8	142,2±1,8
	23,2%	17,0%	17,0%	17,6%
C ₂	132,0±1,4	142,2±1,3	153,6±3,6	146,0±1,2
	23,5%	17,6%	11,0%	15,4%
C ₃	133,8±1,3	138,2±2,3	149,2±1,1	166,0±1,9
	22,9%	19,9%	13,6%	3,8%
C ₄	132,8±2,4	138,6±1,5	133,8±1,1	140,6±1,8
	23,0%	19,7%	22,5%	18,5%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,04 \times 10^{-3}$ do $8,71 \times 10^{-14}$

Opseg procenta inhibicije LDH rastvorima terpena u DMSO u H-serumu je 3,8 – 23,5% (Tabela 22.). Maksimum iinhibitornog efekta i u H-serumu pokazuje rastvor karvakrola sa koncentracijom C₂ (23,5%), a rastvor geraniola sa koncentracijom C₃ daje najmanji inhibicioni efekat (3,8%).

4.1.3. Uticaj rastvora terpena na aktivnost alkalne fosfataze (ALP)

Uticaj terpena na aktivnost enzima ALP ispitivan je rastvorima četiri terpena, (karvakrol, linalol, nerol i geraniol), pripremljenih kao vodeni rastvori ručno (I₁) ili ultrazvučno (I₂) mešani, kao i rastvorima istih terpena u DMSO u četiri različite koncentracije (C₁–C₄) u N i H-serumu (Tabele 23. – 26.).

Tabela 23. Aktivnost alkalne fosfataze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALP ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	37,4±0,6	37,2±0,8	35,6±0,6	37,6±1,1
	11,8%	12,3%	16,0%	11,3%
C ₂	33,8±2,3	35,4±2,1	37,6±1,1	38,0±1,0
	20,3%	16,5%	11,3%	10,4%
C ₃	36,2±1,6	36,4±2,1	37,2±1,5	33,4±1,5
	14,6%	14,2%	12,3%	21,2%
C ₄	36,4±3,8	36,6±2,1	35,2±0,8	38,4±0,9
	14,2%	13,7%	17,0%	9,4%
I ₂				
C ₁	32,0±1,0	30,6±1,5	31,8±1,3	30,2±2,2
	24,5%	27,8%	25,0%	28,8%
C ₂	33,0±1,2	28,6±1,7	32,8±0,8	30,4±2,3
	22,2%	32,5%	22,6%	28,3%
C ₃	32,4±1,1	28,6±1,7	31,8±1,3	30,8±3,2
	23,6%	32,5%	25,0%	27,4%
C ₄	32,8±1,9	32,6±1,1	32,8±1,1	31,8±2,8
	22,6%	23,1%	22,6%	25,0%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $6,59 \cdot 10^{-2}$ do $9,77 \cdot 10^{-8}$

Procenat inhibicije ALP dobijeni u N-serumu primenom ručno mešanih vodenih rastvora terpena (I₁) nalaze se u opsegu od 9,4 – 21,2%. Rastvor geraniolasa koncentracijom C₃ pokazuje maksimalni procenat inhibicije (21,2%), a rastvor istogterpenasa koncentracijom C₄ pokazuje minimalniprocent inhibicije (9,4%). Kada se vodeni rastvori pripreme kao I₂ procenti inhibicije imaju vrednost od 22,2% koju ostvaruje rastvor karvakrola sa koncentracijom C₂, do 32,5% koju ostvaruje rastvor linalola u koncentracijama C₂ i C₃.

Tabela 24. Aktivnost alkalne fosfataze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALP ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	137,6±0,8 20,9%	147,6±0,6 15,2%	133,8±1,6 23,1%	144,8±1,3 16,8%
C ₂	140,4±1,1 19,4%	143,4±2,5 17,7%	143,0±2,6 17,9%	142,4±2,7 18,2%
C ₃	133,2±1,8 23,5%	140,8±1,6 19,1%	156,2±1,5 10,3%	154,4±0,5 11,3%
C ₄	136,0±1,4 21,9%	148,2±2,3 14,9%	141,0±7,5 19,0%	145,8±1,3 16,3%
I ₂				
C ₁	155,2±1,1 10,9%	145,4±4,2 16,5%	147,4±0,9 15,3%	155,8±2,2 10,5%
C ₂	148,4±1,5 14,8%	155,8±0,8 10,5%	166,2±0,8 4,5%	150,4±2,7 13,6%
C ₃	152,0±1,9 12,7%	152,4±1,1 12,5%	153,2±1,3 12,0%	149,2±3,8 14,3%
C ₄	158,0±1,8 9,2%	156,6±1,5 10,0%	150,8±4,7 13,4%	149,0±3,6 14,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $5,72 \cdot 10^{-3}$ do $3,81 \cdot 10^{-14}$

U H-serumu, sa rastvorima terpena pripremljenim kao I₁ najmanji procenat inhibicije pokazuje rastvor nerola (10,3%) a najveći (23,5%) procenat inhibicije pokazuje rastvor karvakrola sa koncentracijom C₃. Kada se rastvori terpena pripreme kao I₂ najmanju (4,5%) pojedinačnu vrednost pokazao je rastvor nerola u koncentraciji C₂, a najveću (16,5%) rastvor linalola sa koncentracijom C₁.

Tabela 25. Aktivnost alkalne fosfataze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALP \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	32,0 \pm 1,0 24,5%	28,6 \pm 1,7 32,5%	31,8 \pm 1,3 25,0%	30,2 \pm 2,2 28,8%
C ₂	33,0 \pm 1,2 22,2%	29,2 \pm 1,1 31,1%	32,8 \pm 0,8 22,6%	33,4 \pm 1,5 21,2%
C ₃	32,4 \pm 1,9 23,6%	30,6 \pm 1,5 27,8%	31,8 \pm 0,8 25,0%	30,2 \pm 2,2 28,8%
C ₄	32,8 \pm 1,1 22,6%	32,6 \pm 1,1 23,1%	35,6 \pm 0,6 16,0%	33,4 \pm 1,5 22,2%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,03 \times 10^{-3}$ do $7,84 \times 10^{-14}$

Rastvori terpena u DMSO u N-serumu inhibiraju aktivnost ALP od 16,0 – 32,5% (Tabela 25.). Najveći procenat inhibicije pokazuje rastvor linalola u koncentraciji C₁, dok je najmanju inhibiciju zabeležio rastvor nerola sa koncentracijom C₄.

Tabela 26. Aktivnost alkalne fosfataze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALP \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	134,6 \pm 1,8 22,7%	147,6 \pm 0,6 15,2%	141,0 \pm 7,5 19,0%	142,4 \pm 2,7 18,2%
C ₂	137,6 \pm 0,8 21,0%	140,8 \pm 1,6 19,1%	147,4 \pm 0,9 15,3%	144,8 \pm 1,3 16,8%
C ₃	133,6 \pm 1,4 23,5%	145,4 \pm 4,2 16,5%	133,8 \pm 1,6 23,1%	149,0 \pm 3,6 14,4%
C ₄	140,4 \pm 1,1 19,4%	143,4 \pm 2,5 17,6%	143,0 \pm 2,6 17,9%	154,4 \pm 0,5 11,3%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $8,44 \times 10^{-2}$ do $8,10 \times 10^{-13}$;

Rastvori terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na aktivnost ALP u H-serumu između 11,3 – 23,1% (Tabela 26.). Najbolji inhibitorski efekat pokazao je rastvor nerola u koncentraciji C₃, dok je najslabiji inhibitorski efekat pokazao rastvor geraniola u koncentraciji C₄.

4.1.4. Uticaj rastvora terpena na aktivnost γ -glutamil transferaze (GGT)

Aktivnost enzima GGT merena je nakon dodavanja vodenih rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola pripremljenih kao I₁ i kao I₂ u četiri koncentracije (C₁-C₄).

Tabela 27. Aktivnost γ -glutamil transferaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti GGT \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	14,0 \pm 1,0 19,5%	14,6 \pm 0,9 16,1%	15,8 \pm 0,8 9,2%	16,2 \pm 0,8 6,9%
C ₂	13,6 \pm 1,1 21,8%	15,6 \pm 0,9 10,3%	15,8 \pm 1,1 9,2%	15,6 \pm 1,1 10,3%
C ₃	16,0 \pm 1,2 8,0%	14,2 \pm 0,8 18,4%	16,2 \pm 0,8 6,9%	14,4 \pm 1,8 17,2%
C ₄	14,4 \pm 1,8 17,2%	15,6 \pm 1,3 10,3%	14,8 \pm 1,3 14,9%	14,8 \pm 1,3 14,9%
I ₂				
C ₁	15,0 \pm 1,4 13,8%	12,6 \pm 1,5 27,6%	14,0 \pm 0,7 19,5%	11,2 \pm 1,8 35,6%
C ₂	12,6 \pm 0,5 27,6%	13,2 \pm 0,8 24,1%	14,2 \pm 0,8 18,4%	11,8 \pm 2,8 32,2%
C ₃	16,4 \pm 0,5 5,7%	12,6 \pm 1,3 27,6%	15,8 \pm 0,8 9,2%	13,0 \pm 1,8 25,3%
C ₄	16,0 \pm 1,0 8,0%	12,6 \pm 1,1 27,6%	15,6 \pm 1,3 10,3%	15,2 \pm 1,6 12,6%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $5,16 \cdot 10^{-3}$ do $1,89 \cdot 10^{-8}$

Srednje vrednosti aktivnosti γ -glutamil transferaze i procenat inhibicije u N i H-serumu prikazani su u Tabelama 27. i 28. Takođe, izmerena je i aktivnost GGT u N i H-serumu nakon dodavanja rastvora terpena u DMSO, u četiri koncentracije (C₁-C₄), a srednje vrednosti aktivnosti i procenat inhibicije prikazani su u Tabelama 29. i 30.

Tabela 28. Aktivnost γ -glutamil transferaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti GGT \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	42,6 \pm 1,1 22,3%	43,8 \pm 2,2 20,1%	42,0 \pm 1,6 23,4%	43,8 \pm 1,1 20,1%
C ₂	43,4 \pm 1,5 20,8%	42,8 \pm 1,6 21,9%	43,0 \pm 2,7 21,5%	43,0 \pm 2,7 21,5%
C ₃	41,8 \pm 1,3 23,7%	42,4 \pm 1,1 22,6%	47,8 \pm 3,6 12,8%	44,4 \pm 1,5 19,0%
C ₄	43,6 \pm 1,3 20,4%	44,2 \pm 0,8 19,3%	45,8 \pm 0,8 16,4%	43,8 \pm 2,2 20,1%
I ₂				
C ₁	42,2 \pm 1,3 23,0%	51,2 \pm 1,6 6,6%	49,8 \pm 0,8 9,1%	52,2 \pm 0,8 4,7%
C ₂	43,4 \pm 1,5 20,8%	51,8 \pm 1,3 5,5%	51,6 \pm 1,1 5,8%	52,0 \pm 2,1 5,1%
C ₃	42,6 \pm 1,1 22,3%	50,0 \pm 1,9 8,8%	51,4 \pm 0,9 6,2%	51,8 \pm 2,6 5,5%
C ₄	42,2 \pm 1,5 23,0%	51,8 \pm 1,3 5,5%	46,8 \pm 0,8 14,6%	50,2 \pm 1,9 8,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $5,44 \cdot 10^{-3}$ do $4,72 \cdot 10^{-9}$

U N-serumu procenat inhibicije za rastvore terpena pripremljene kao I₁ najnižu vrednost inhibicije od 6,9% postižu rastvori nerola i geraniolau koncentracijama C₃ i C₁, dok maksimalnu inhibiciju od 21,8% pokazuje vodeni rastvor karvakrola u koncentraciji C₂

(Tabela 27.). Kod rastvora terpena pripremljenih kao I₂ najveći procenat inhibicije zabeležen je za rastvor geraniola u koncentraciji C₁ i iznosi 35,6%, dok je najniža vrednost procenta inhibicije zabeležena za I₂ rastvore karvakrola i iznosi 5,7%.

U serumu povećane enzimске aktivnosti (H-serumu), na aktivnost GGT najveći procenat inhibicije pokazuje vodeni rastvor karvakrola u koncentraciji C₃ (23,7%), a najmanji rastvor nerola u koncentraciji C₃ (12,8%), kada su rastvori terpena pripremljeni kao I₁ (Tabela 28.). Procenat Inhibicije vodenim rastvorima terpena pripremljenim kao I₂ nalazi se u opsegu od 4,7 – 23,0%. Najveći inhibitorni efekat pokazuje rastvor karvakrola, u koncentraciji C₁ (23,0%), u kojoj rastvor geraniola postiže najmanji inhibitorni efekat (4,7%).

Tabela 29. Aktivnost γ -glutamil transferaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti GGT \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	12,6 \pm 0,5 27,6%	13,2 \pm 0,8 24,1%	14,0 \pm 0,7 19,5%	11,6 \pm 1,8 33,3%
C ₂	14,0 \pm 1,0 19,5%	12,6 \pm 1,1 27,6%	15,6 \pm 1,3 10,3%	13,0 \pm 1,8 25,3%
C ₃	13,6 \pm 1,1 21,8%	14,2 \pm 0,8 18,4%	14,8 \pm 1,3 14,9%	14,4 \pm 1,8 17,2%
C ₄	14,4 \pm 1,8 17,2%	15,6 \pm 0,9 10,3%	16,2 \pm 0,8 6,9%	15,2 \pm 1,6 12,6%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,08 \times 10^{-3}$ do $1,19 \times 10^{-14}$

Rastvori terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na GGT u N-serumu u opsegu od 6,9 – 33,3% (Tabela 32.). Najveći inhibitorni efekat ispoljio je rastvor geraniola u koncentraciji C₁ (33,3%), dok je najmanji ispoljio rastvor nerola u koncentraciji C₄ (6,9%).

Rastvori terpena u DMSO u H-serumu inhibiraju aktivnost GGT od 8,4 – 26,6%. (Tabela 30.). Najveći procenat inhibicije pokazuje rastvor karvakrola u koncentraciji C₂ (26,6%), dok je najmanju inhibiciju zabeležio rastvor geraniola sa koncentracijom C₄ (8,4%).

Tabela 30. Aktivnost γ -glutamil transferaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti GGT \pm SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	41,8 \pm 1,3	42,4 \pm 1,1	46,8 \pm 0,8	43,0 \pm 2,7
	23,7%	22,6%	14,6%	21,5%
C ₂	40,2 \pm 1,3	42,8 \pm 1,6	45,8 \pm 0,8	44,4 \pm 1,5
	26,6%	21,9%	16,4%	19,0%
C ₃	42,2 \pm 1,5	43,8 \pm 2,2	43,0 \pm 2,7	43,8 \pm 1,1
	23,0%	20,1%	21,5%	20,1%
C ₄	42,6 \pm 1,1	44,2 \pm 0,8	42,0 \pm 1,6	50,2 \pm 1,9
	22,3%	19,3%	23,4%	8,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,04 \times 10^{-3}$ do $8,71 \times 10^{-14}$

4.1.5. Uticaj rastvora terpena na aktivnost aspartat aminotransferaze (AST)

Aktivnosti enzima AST kao i procenat inhibicije prouzrokovan uticajem vodenih rastvora terpena, pripremljenih ručno i ultrazvučno (I₁ i I₂) u sve četiri koncentracije u obe vrste seruma prikazane su u Tabelama 31. i 32., dok se u Tabelama 33. i 34. može pratiti uticaj na aktivnost AST tih istih terpena rastvorenih u DMSO, u istim koncentracijama, u N i H-serumu.

U N-serumu pod dejstvom rastvora terpena pripremljenih kao I₁ opseg inhibicije se nalazi u opsegu od 11,7 – 21,4% (Tabela 31.). Najveći procenat pokazuje vodeni rastvor linalola u koncentracijama C₁ i C₄ (21,4%), a najmanji rastvor geraniola koncentracije C₂ (11,7%). Kada se rastvori pripreme ultrazvučnim mešanjem (I₂) i najveći (29,7%) i najmanji (14,5%) procenat inhibicije pokazuje vodeni rastvor karvakrola u koncentracijama C₃ i C₂. Procenat inhibicije od 29,7% dostiže i vodeni rastvor geraniola sa koncentracijom C₁.

U serumu povećane aktivnosti enzima, kada se inhibitori pripreme kao I₁ rastvori i najveći (21,4%) i najmanji (2,3%) procenat inhibicije na aktivnost AST pokazuje rastvor nerola u koncentracijama C₁ i C₃ (Tabela 32.). Kada se vodeni rastvori terpena pripreme kao I₂ inhibitorski opseg AST se kreće od 1,4 – 15,0%. Maksimalnu vrednost procenta inhibicije

postiče se rastvorom karvakrola u koncentraciji C₃ (15,0%), a minimalnu vrednost procenta inhibicije postiče rastvor geraniola sa koncentracijom C₁ (1,4%).

Tabela 31. Aktivnost aspartat aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AST ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	12,4±1,3 14,5%	11,4±1,5 21,4%	12,0±0,7 17,2%	12,4±1,1 14,5%
C ₂	11,8±1,6 18,6%	12,6±1,3 13,1%	12,4±0,5 14,5%	12,8±1,1 11,7%
C ₃	12,4±1,5 14,5%	12,4±1,5 14,5%	12,6±1,1 13,1%	11,8±1,3 18,6%
C ₄	12,0±1,4 17,2%	11,4±1,1 21,4%	12,0±1,2 17,2%	12,4±1,1 14,5%
I ₂				
C ₁	11,6±0,5 20,0%	12,0±1,9 17,2%	10,4±1,7 28,3%	10,2±1,5 29,7%
C ₂	10,2±1,3 29,7%	11,0±1,0 24,1%	11,0±1,0 24,1%	10,4±1,1 28,3%
C ₃	12,4±1,5 14,5%	11,4±1,8 21,4%	11,6±1,1 20,0%	11,4±2,2 21,4%
C ₄	10,8±1,3 25,5%	12,0±1,2 17,2%	10,8±2,1 25,5%	10,8±1,5 25,5%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $7,12 \cdot 10^{-3}$ do $7,02 \cdot 10^{-7}$

Rastvori terpena u DMSO inhibiraju aktivnost AST u N-serumu u intervalu od 14,5 – 29,7% (Tabela 33.). Maksimalni procenat inhibicije prouzrokuju rastvori karvakrola i geraniola u koncentracijama C₄ i C₁ (29,7%), a minimalni rastvori linalola i geraniola u koncentracijama C₂ i C₄ (14,5%).

Tabela 32. Aktivnost aspartat aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AST ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	35,6±2,5	36,6±2,2	34,6±1,1	35,4±1,4
	19,1%	16,8%	21,4%	19,5%
C ₂	35,8±1,3	36,4±1,8	35,2±0,8	35,4±1,3
	18,6%	17,3%	20,0%	19,5%
C ₃	35,0±1,0	36,0±2,1	43,0±2,4	38,0±1,2
	20,5%	18,2%	2,3%	13,6%
C ₄	35,6±1,7	38,6±1,1	37,4±0,9	36,4±1,3
	19,1%	12,3%	15,0%	17,3%
I ₂				
C ₁	39,8±1,3	39,0±2,4	40,8±1,6	43,4±0,5
	9,5%	11,4%	7,3%	1,4%
C ₂	39,8±1,3	41,2±1,3	42,8±1,5	41,0±1,0
	9,5%	6,4%	2,7%	6,8%
C ₃	37,4±1,1	40,6±0,9	42,6±1,3	40,8±1,3
	15,0%	7,7%	3,2%	7,3%
C ₄	41,0±0,7	42,0±0,7	41,6±1,5	40,0±0,7
	6,8%	4,5%	5,5%	9,1%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,43 \cdot 10^{-3}$ do $5,82 \cdot 10^{-10}$

Rastvori terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na AST u H-serumu između 7,3 – 21,4% (Tabela 34.). Najbolji inhibitorski efekat pokazao je rastvor nerola u koncentraciji C₃ (21,4%), dok je najslabiji inhibitorski efekat pokazao takođe, rastvor nerola u koncentraciji C₄ (7,3%).

Tabela 33. Aktivnost aspartat aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AST ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	11,6±0,5	11,0±1,0	11,0±1,0	10,2±1,5
	20,0%	24,1%	24,1%	29,7%
C ₂	10,8±1,3	12,4±1,5	10,8±2,1	10,8±1,5
	25,5%	14,5%	25,5%	25,5%
C ₃	11,8±1,6	12,0±1,2	10,4±1,7	11,4±2,2
	18,6%	17,3%	28,3%	21,4%
C ₄	10,2±1,3	11,4±1,1	11,6±1,1	12,4±1,1
	29,7%	21,4%	20,0%	14,5%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,03 \times 10^{-3}$ do $7,84 \times 10^{-14}$

Tabela 34. Aktivnost aspartat aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AST ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	35,0±1,0	36,0±2,1	37,4±0,9	38,0±1,2
	20,5%	18,2%	15,0%	13,6%
C ₂	35,6±1,7	38,6±1,1	35,2±0,8	40,0±0,7
	19,1%	12,3%	20,0%	9,1%
C ₃	37,4±1,1	36,6±2,2	34,6±1,1	35,4±1,3
	15,0%	16,8%	21,4%	19,5%
C ₄	35,8±1,3	36,4±1,8	40,8±1,6	36,4±1,3
	18,6%	17,3%	7,3%	17,3%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $8,44 \times 10^{-2}$ do $8,10 \times 10^{-13}$

4.1.6. Uticaj rastvora terpena na aktivnost alanin aminotransferaze (ALT)

Uticaj terpena na aktivnost enzima ALT ispitivana je rastvorima četiri terpena, karvakrol, linalol, nerol i geraniol, pripremljenih kao vodeni rastvori ručnim (I₁) ili ultrazvučnim (I₂) mešanjem, kao i rastvorima istih terpena u DMSO u četiri različite koncentracije (C₁–C₄) u N i H-serumu (Tabele 35. – 38.).

Tabela 35. Aktivnost alanin aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALT ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	12,6±1,5 17,1%	14,2±1,1 6,6%	13,0±1,2 14,5%	12,6±2,1 17,1%
C ₂	13,0±0,7 14,5%	13,4±0,9 11,8%	14,2±0,5 6,6%	13,0±1,6 14,5%
C ₃	14,0±1,2 7,9%	14,0±0,7 7,9%	13,0±1,6 14,5%	12,6±1,5 17,1%
C ₄	14,0±1,0 7,9%	12,2±1,8 19,7%	12,6±0,8 17,1%	13,4±2,6 11,8%
I ₂				
C ₁	10,0±2,1 34,2%	12,0±2,0 21,1%	11,8±1,5 22,4%	13,2±1,3 13,2%
C ₂	10,0±2,2 34,2%	11,8±1,3 22,4%	13,0±1,6 14,5%	12,4±1,7 18,4%
C ₃	12,6±1,1 17,1%	12,6±0,6 17,1%	12,0±1,2 21,1%	12,6±1,9 17,1%
C ₄	10,4±1,8 31,6%	12,4±1,8 18,4%	13,6±0,9 10,5%	12,4±2,3 18,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $5,63 \cdot 10^{-2}$ do $7,02 \cdot 10^{-7}$

Najveći procenat inhibicije od 19,7% u N-serumu pokazuje linalol sa koncentracijom rastvora C₄ (Tabela 35), a najmanju procenat inhibicije sa I₁ rastvorima terpena pokazuju linalol i nerol, u iznosu od 6,6%, koju dostižu koncentracijom C₁, odnosno C₂. Kada se rastvori terpena pripreme ultrazvučno u N-serumu najveći procenat inhibicije od 34,2% ispoljava rastvor karvakrola sa koncentracijama C₁ i C₂, a.namanji procenat inhibicije u iznosu od 10,5% pokazuje rastvor nerola sa C₄ koncentracijom.

Tabela 36. Aktivnost alanin aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALT ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
	I ₁			
C ₁	32,2±2,3	34,0±0,7	32,2±0,8	32,8±1,3
	24,6%	20,4%	24,6%	23,2%
C ₂	33,6±1,1	32,6±1,7	33,6±1,5	32,2±0,8
	21,3%	23,7%	21,3%	24,6%
C ₃	32,4±1,1	32,4±0,8	36,6±1,5	35,6±1,5
	24,1%	24,1%	14,3%	16,6%
C ₄	32,6±1,9	35,4±1,1	39,6±1,1	34,2±0,8
	23,7%	17,1%	7,3%	19,9%
I ₂				
C ₁	32,8±2,9	40,0±1,2	39,2±1,3	40,4±0,5
	23,2%	6,3%	8,2%	5,4%
C ₂	32,4±1,7	42,2±0,8	42,2±1,1	40,6±1,5
	24,1%	1,2%	1,2%	4,9%
C ₃	32,6±2,2	38,2±0,8	41,8±1,3	37,2±0,8
	23,7%	10,5%	2,1%	12,9%
C ₄	33,4±2,2	41,2±1,1	39,8±1,8	36,2±1,9
	21,8%	3,5%	6,8%	15,2%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $6,27 \cdot 10^{-3}$ do $1,11 \cdot 10^{-9}$

U H-serumu, procenat inhibicije vodenih rastvora terpena pripremljenih kao I₁ inhibitori imaju opseg od 7,3 – 24,6% (Tabela 36.). Maksimalni procenat inhibicije pokazuje rastvor karvakrola u koncentraciji C₁ (24,6%), a minimum daje rastvor nerola u koncentraciji C₄ (7,3%). Kada se rastvori pripreme ultrazvučno rastvor karvakrola, sa koncentracijom C₁ pokazuje maksimalni procenat inhibicije od 24,1%, dok rastvori nerola i linalola u koncentraciji C₂ pokazuju minimalnu inhibiciju od 1,2%

Tabela 37. Aktivnost alanin aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALT ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	10,0±2,1 34,2%	12,0±2,0 21,1%	12,0±1,2 21,1%	13,0±1,6 14,5%
C ₂	10,4±1,8 31,6%	11,8±1,3 22,4%	11,8±1,5 22,4%	12,6±2,1 17,6%
C ₃	12,6±1,1 17,1%	12,4±1,8 18,4%	12,6±0,8 17,1%	13,2±1,3 13,2%
C ₄	11,0±0,7 29,5%	12,2±1,8 19,7%	13,0±1,2 14,5%	12,4±1,7 18,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,08 \times 10^{-3}$ do $1,19 \times 10^{-14}$

Rastvori terpena u DMSO ostvaruju procenat inhibicije na aktivnost ALT u N-serumu u opsegu od 13,2 – 34,2% (Tabela 37.). Naveći procenat inhibicije ispoljio je rastvor karvakrola u koncentraciji C₁ (34,2%), dok je najmanju ispoljio rastvor geraniola u koncentraciji C₃ (13,2%).

Opseg inhibicije ALT rastvorima terpena u DMSO u H-serumu kreće se od 8,2 – 27,4% (Tabela 38.). Maksimum procenta inhibicije u H-serumu ispoljava rastvor karvakrola u koncentraciji C₁ (27,4%), dok minimum ispoljava rastvor nerolau koncentraciji C₄ (8,2%).

Tabela 38. Aktivnost alanin aminotransferaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti ALT ± SD (U/L) i procenat inhibicije			
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol
C ₁	31,0±2,9 27,4%	32,4±0,8 24,1%	32,2±0,8 24,6%	32,2±0,8 24,6%
C ₂	31,2±2,2 26,9%	32,6±1,7 23,7%	33,6±1,5 21,3%	34,2±0,8 19,9%
C ₃	31,4±1,7 26,5%	34,0±0,7 20,4%	36,6±1,5 14,3%	35,6±1,5 16,6%
C ₄	32,2±2,3 24,6%	35,4±1,1 17,1%	39,2±1,3 8,2%	36,2±1,9 15,2%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,04 \times 10^{-3}$ do $8,71 \times 10^{-14}$

4.1.7. Uticaj rastvora terpena na aktivnost amilaze (AMY)

Amilaza je ne samo dijagnostički važan enzim, već ima i sve veći značaj u tretmanu dijabetesa tip 2. Dijabetes je hronična bolest koja nastaje kada pankreas ne proizvodi dovoljno insulina (tip 1 – insulin zavisni) ili organizam efikasno ne koristi proizveden insulin (tip 2 – insulin nezavisni). SZO predviđa da će u bliskoj budućnosti doći do pandemije dijabetesa tip 2, naročito u razvijenim zemljama, a kao razlog za to navodi prvenstveno neadekvatan način života i ishrane (WHO, 2008). Jedan od najsavremenijih pristupa u lečenju dijabetesa tip 2 (Melzig & Funke, 2007; Sudha et al., 2011; Nickavar et al., 2008) zasniva se na inhibiciji amilaze u digestivnom traktu čime se smanjuje varenje složenih šećera (naročito skroba) zbog čega je manja koncentracija slobodne glukoze u tankom crevu koja može da se resorbuje u cirkulaciju, čime se značajno utiče na glikemiju posle obroka (Grover et al., 2002; Mukherjee et al., 2006; Salehi et al., 2013). Zbog toga je izuzetno značajno pronaći adekvatne oralne antidijabetike, naročito ako se ima na umu da ovi koji su trenutno u upotrebi (npr. akarboza i miglitol) imaju dosta kontraindikacija (Grover et al., 2002; Cheng & Fantus, 2005).

Zbog toga što amilaza ima veoma značajan dijagnostički i potencijalno terapijski značaj, njena aktivnost je ispitivana sa većim brojem rastvora terpena u odnosu na sve ostale kliničke enzime u okviru ovog istraživanja. Za razliku od ostalih enzima, amilaza je tretirana

sa 10 rastvora terpena – osim proučavanih kod ostalih enzima: karvakrola, linalola, nerola i geraniola, dodati su i: mircen, β -pinen, citral, eukaliptol, terpineol i eugenol.

Aktivnost enzima AMY merena je nakon dodavanja vodenih rastvora karvakrola, linalola, nerola, geraniola, mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola pripremljenih kao I₁ i kao I₂ u četiri koncentracije (C₁-C₄). Srednje vrednosti aktivnosti amilaze i procenat inhibicije u N i H-serumu prikazani su u Tabelama 39. i 40. Takođe, izmerena je i aktivnost AMY u N i H-serumu nakon dodavanja rastvora terpena (karvakrol, linalol, nerol i geraniol) u DMSO, u četiri koncentracije (C₁-C₄), a srednje vrednosti aktivnosti i procenat inhibicije prikazani su u Tabelama 41. i 42.

Tabela 39. Aktivnost amilaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola, geraniola, mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola pripremljenih kao I₁ i I₂ u koncentracijama rastvora terpena (C₁-C₄)

UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AMY ± SD (U/L) i procenat inhibicije									
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol	Mircen	β-pinen	Citral	Eukaliptol	Terpineol	Eugenol
	I ₁									
C ₁	25,0±1,6	28,6±0,5	25,4±0,9	26,0±1,0	23,1±0,4	22,4±0,7	21,4±0,3	24,5±0,7	22,3±0,8	25,3±0,1
	18,3%	6,5%	17,0%	15,0%	24,5%	26,8%	30,1%	19,9%	27,1%	17,3%
C ₂	23,2±1,6	25,8±1,1	25,2±1,5	26,4±0,5	23,2±0,6	22,6±0,9	21,3±0,3	23,3±0,2	22,2±0,9	24,7±0,9
	24,2%	15,7%	17,6%	13,7%	24,2%	26,2%	30,4%	23,9%	27,5%	19,3%
C ₃	26,2±1,1	25,6±1,1	25,0±1,9	25,2±1,3	23,1±0,6	23,8±0,6	23,6±0,1	23,2±0,9	24,9±0,6	23,1±0,2
	14,4%	16,3%	18,3%	17,6%	24,5%	22,2%	22,9%	24,2%	18,6%	24,5%
C ₄	23,6±1,5	27,8±1,3	23,8±1,3	26,4±0,9	23,3±0,9	22,2±0,8	23,8±0,4	23,3±0,5	24,8±0,7	24,7±0,5
	22,9%	9,2%	22,2%	13,7%	23,9%	27,5%	22,2%	23,9%	19,0%	19,3%
I ₂										
C ₁	22,8±0,8	23,4±0,9	23,2±1,1	22,6±0,6	21,5±0,4	22,9±0,2	23,8±0,3	22,5±0,7	22,7±0,2	23,7±0,7
	25,5%	23,5%	24,2%	26,1%	29,7%	25,2%	22,2%	26,5%	25,8%	22,5%
C ₂	21,8±0,8	21,2±0,8	24,0±1,7	23,0±2,4	27,8±0,8	26,3±0,4	19,7±0,6	25,6±0,8	28,5±0,3	26,2±0,1
	28,8%	30,7%	21,6%	24,8%	9,2%	14,1%	35,6%	16,3%	6,9%	14,4%
C ₃	22,0±1,0	22,0±1,0	23,8±0,8	23,4±1,7	23,9±0,3	24,8±0,7	24,3±0,9	24,6±0,3	25,7±0,6	26,3±0,2
	28,1%	28,1%	22,2%	23,5%	21,9%	19,0%	20,6%	19,6%	16,0%	14,1%
C ₄	22,6±0,5	22,6±0,9	23,2±0,8	23,4±1,5	25,3±0,1	24,5±0,5	25,2±0,4	25,8±0,3	23,9±0,7	25,9±0,9
	26,1%	26,1%	24,2%	23,5%	17,3%	19,9%	17,6%	15,7%	21,9%	15,4%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $5,44 \cdot 10^{-3}$ do $1,56 \cdot 10^{-9}$

S obzirom da se jedino kod AMY prati inhibitorski efekat 10 rastvora terpena pripremljenih u četiri koncentracije ($C_1 - C_4$), uz primenu dva načina mešanja (I_1 i I_2), u dve vrste seruma (N i H) rezultatu su podeljeni u dve grupe: prva grupa su do sada analizirani rastvori (karvakrol, linalol, nerol i geraniol), a drugu čine rastvori: mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola. U serumu normalne enzimске aktivnosti, kada se deluje rastvorima terpena koji su pripremljeni ručnim mešanjem prva grupa terpena pokazuje procenat inhibicije od 6,5 – 24,2%, a druga grupa 17,3 – 30,4%, što znači da se opseg procenta inhibicije AMY rastvorima 10 terpena pripremljenih kao I_1 u N-serumu kreće od 6,5 - 30,4% (Tabela 39.). U prvoj grupi rastvora terpena maksimalni procenat inhibicije se postiže rastvorom karvakrola u koncentraciji C_2 (24,2%), a minimalni rastvorom linalola u koncentraciji C_1 (6,5%). U drugoj grupi ispitivanih terpena najveći procenat inhibicije pokazuje rastvor citrala u koncentraciji C_2 (30,4%), a najmanji rastvorom eugenola sa koncentracijom C_1 (17,3%). Kada se rastvori pripreme ultrazvučno u N-serumu prva grupa terpena pokazuje procenat inhibicije od 21,6 – 30,7%, a druga grupa od 6,9 – 35,6%, što znači da je inhibitorski opseg I_2 rastvora u N-serumu od 6,9 – 35,6%. Najveći procenat inhibicije u prvoj grupi ultrazvučno pripremljenih rastvora terpena pokazuje linalol u koncentraciji C_2 (35,6%), dok najslabiju inhibiciju pokazuje rastvor nerola u istoj koncentraciji (6,9%). U drugoj grupi ultrazvučno pripremljenih rastvora terpena najbolju inhibiciju daje rastvor citrala u koncentraciji C_2 (35,65%), a najslabiju rastvor terpineola u istoj koncentraciji (6,9%). Na osnovu ovih vrednosti rezultata inhibicije uočava se da se veći procenat inhibicije AMY postiže primenom druge grupe terpena. Ako se uporedi efekat koji rastvori terpena imaju na aktivnost AMY u serumu referentne enzimске aktivnosti, u zavisnosti od toga da li su pripremljeni ručnim ili ultrazvučnim mešanjem, može se primetiti da je rastvor citrala u svim slučajevima, i kao I_1 i kao I_2 , rastvor sa najvećim inhibitorskim efektom na AMY, dok karvakrol ima najbolji inhibitorski potencijal prema AMY u N-serumu u odnosu na terpene iz prve grupe.

Tabela 40. Aktivnost amilaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola, geraniola, mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola pripremljenih kao I_1 i I_2 u koncentracijama rastvora terpena (C_1 - C_4)

UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AMY ± SD (U/L) i procenat inhibicije									
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol	Mircen	β-pinen	Citral	Eukaliptol	Terpineol	Eugenol
	I₁									
C₁	61,4±1,1 21,7%	65,8±1,1 16,1%	61,8±1,1 21,2%	65,0±1,6 17,1%	64,6±0,2 17,6%	63,2±0,8 19,4%	64,1±0,4 18,2%	67,3±0,5 14,2%	62,2±0,6 20,7%	66,6±0,2 15,1%
C₂	64,6±2,1 17,6%	65,2±2,2 16,8%	67,2±0,8 14,3%	64,6±0,9 17,6%	62,3±0,9 20,5%	62,6±0,2 20,2%	60,5±0,2 22,8%	63,4±0,8 19,1%	60,9±0,4 22,3%	63,4±0,9 19,1%
C₃	60,6±0,5 22,7%	63,8±1,3 18,6%	68,0±6,2 13,3%	67,4±2,1 14,0%	67,9±0,9 13,4%	67,8±0,1 13,5%	66,7±0,1 14,9%	66,5±0,4 15,2%	60,7±0,7 22,6%	69,8±0,6 11,0%
C₄	61,6±0,5 21,4%	66,2±0,8 15,6%	64,0±0,7 18,4%	64,8±1,1 17,3%	60,2±0,8 23,2%	61,9±0,9 21,0%	67,6±0,6 13,8%	62,4±0,2 20,4%	62,5±0,2 20,3%	62,3±0,3 20,5%
	I₂									
C₁	66,8±1,3 14,8%	77,2±1,0 1,5%	75,0±1,0 4,3%	76,4±1,9 2,6%	70,1±0,5 10,6%	67,8±0,3 13,5%	61,2±0,4 21,9%	67,8±0,2 13,5%	63,4±0,3 19,1%	70,9±0,4 9,6%
C₂	66,4±0,5 15,3%	77,2±0,8 1,5%	77,2±1,8 1,5%	77,2±1,5 1,5%	70,4±0,2 10,2%	66,7±0,9 14,9%	66,9±0,9 14,7%	69,0±0,2 12,0%	66,5±0,9 15,2%	67,9±0,4 13,4%
C₃	66,4±1,8 15,3%	75,4±1,5 3,8%	77,0±1,0 1,8%	72,4±4,0 7,7%	64,5±0,9 17,7%	69,0±0,6 12,0%	63,4±0,4 19,1%	64,6±0,6 17,6%	67,8±0,8 13,5%	64,5±0,8 17,7%
C₄	69,8±1,5 11,0%	75,4±1,1 3,8%	72,0±1,0 8,2%	70,2±4,8 10,5%	62,1±0,1 20,7%	64,0±0,8 18,4%	67,8±0,7 13,5%	64,5±0,5 17,7%	61,4±0,5 21,7%	65,4±0,9 16,6%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $8,44 \cdot 10^{-2}$ do $3,75 \cdot 10^{-14}$

Prva grupa rastvora terpena pripremljenih kao I₁ u H-serumu ispoljava procenat inhibicije od 13,3 – 22,7%, a druga grupa od 11,0 – 23,2%, što znači da je opseg procenta inhibicije na AMY rastvorima terpena pripremljenim ručnim mešanjem od 11,0 -23,2% (Tabela 40.). U prvoj grupi rastvora terpena najveći procenat inhibicije ispoljava rastvor karvakrola u koncentraciji C₃ (22,7%), a najmanju inhibiciju pokazuje rastvor nerola u istoj koncentraciji (13,3%), dok u drugoj grupi terpena najveći procenat inhibicije pokazuje rastvor mircena u koncentraciji C₄ (23,2%), a najmanju rastvor eugenola u koncentraciji C₃ (11,0%). Kada se rastvori terpena pripreme ultrazvučno, u H-serumu, prva grupa rastvora pokazuje procenat inhibicije u opsegu od 1,5 – 15,3%, a druga od 9,6 -21,9%, što znači da je opseg procenta inhibicije ultrazvučno pripremljenih rastvora terpena od 1,5 – 21,9% u H-serumu. Najbolji inhibitor u prvoj grupi je rastvor karvakrola koji dostiže maksimum inhibicije u dve koncentracije (C₂ i C₃) (15,3%), a najslabiju inhibiciju u prvoj grupi rastvora pokazuju čak tri tepena: rastvor linalola u koncentracijama C₂ i C₃, rastvor nerola u koncentraciji C₂ i rastvor geraniola u koncentraciji C₂ (1,5%). U drugoj grupi rastvora terpena koji supripremljeni kao I₂ inhibitori u H-serumu najbolju inhibiciju postižu uz pomoć rastvora citrala u koncentraciji C₁ (21,9%), a najslabiju uz rastvor eugenola u koncentraciju C₃ (1,5%).

Tabela 41. Aktivnost amilaze (srednja vrednost ± SD) i procenat inhibicije u N-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola, geraniolageraniola, mircena, β-pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C₁ do C₄

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AMY ± SD (U/L) i procenat inhibicije									
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol	Mircen	β-pinen	Citral	Eukaliptol	Terpineol	Eugenol
C ₁	21,8±0,8	23,4±0,9	24,0±1,7	22,6±0,6	22,5±0,4	21,9±0,2	24,8±0,3	21,5±0,7	21,7±0,2	24,7±0,7
	28,8%	23,5%	21,6%	26,1%	26,5%	28,4%	19,0%	29,7%	29,1%	19,3%
C ₂	22,6±0,5	22,0±1,0	23,2±0,8	25,2±1,3	28,8±0,8	25,3±0,4	20,7±0,6	24,6±0,8	27,5±0,3	27,2±0,1
	26,1%	28,1%	24,2%	17,6%	5,9%	17,3%	32,4%	19,6%	10,1%	11,1%
C ₃	22,0±1,0	22,6±0,9	25,0±1,9	23,4±1,5	22,9±0,3	25,8±0,7	23,3±0,9	25,6±0,3	26,7±0,6	25,3±0,2
	28,1%	26,1%	18,3%	23,5%	25,1%	15,7%	23,9%	16,3%	12,7%	17,3%
C ₄	22,8±0,8	21,2±0,8	23,8±1,3	26,4±0,5	24,3±0,1	25,5±0,5	25,2±0,4	26,8±0,3	24,9±0,7	26,9±0,9
	25,5%	30,7%	22,2%	13,7%	20,6%	16,7%	17,6%	12,4%	18,6%	12,1%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $1,03 \times 10^{-3}$ do $7,84 \times 10^{-14}$

Procenti inhibicije AMY rastvorima terpena u DMSO (karvakrol, linalol, nerol, geraniol, mircen, β -pinen, citral, eukaliptol, terpineol i eugenol) u N-serumu nalaze se u intervalu od 10,1 – 32,4% (Tabela 41.). U prvoj grupi terpena maksimalni procenat inhibicije dostiže rastvor linalola u koncentraciji (C_4) i iznosi 30,7%, a minimalni procenat inhibicije ostvaruje rastvor geraniola u koncentraciji C_4 (13,7%). U preostalih šest terpena (mircen, β -pinen, citral, eukaliptol, terpineol i eugenol) najveći procenat inhibicije (32,4%) ostvaruje citral sa koncentracijom C_2 , a najmanji (10,1%) postiže terpineol u istoj koncentraciji (C_2).

Opseg procenta inhibicije AMY rastvorima terpena u DMSO u H-serumu je od 7,6 – 23,2% (Tabela 42.). Maksimalni procenat inhibicije ispoljava rastvor karvakrola u koncentraciji C_1 (22,7%), a minimum rastvor geraniola sa koncentracijom C_4 (7,6%) kada pratimo uticaj rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola. Rastvori mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola najveći procenat inhibicije koja iznosi 23,2% i postižu rastvorom citrala u koncentraciji C_1 a najmanji rastvorom eugenola (8,3%) u istoj koncentraciji C_1 .

Tabela 42. Aktivnost amilaze (srednja vrednost \pm SD) i procenat inhibicije u H-serumu u prisustvu karvakrola, linalola, nerola i geraniola, pripremljenih rastvaranjem u DMSO u koncentracijama od C_1 do C_4

Koncentracija	Srednja vrednost aktivnosti AMY ± SD (U/L) i procenat inhibicije									
	Karvakrol	Linalol	Nerol	Geraniol	Mircen	β-pinen	Citral	Eukaliptol	Terpineol	Eugenol
C ₁	60,6±0,5	66,2±0,8	61,8±1,1	67,4±2,1	71,1±0,5	66,8±0,3	60,2±0,4	68,8±0,2	62,4±0,3	71,9±0,4
	22,7%	15,6%	21,2%	14,0%	9,3%	13,5%	23,2%	12,2%	20,4%	8,3%
C ₂	61,6±0,5	63,8±1,3	67,2±0,8	64,6±0,9	71,4±0,2	65,7±0,9	65,9±0,9	70,0±0,2	65,5±0,9	68,9±0,4
	21,4%	18,8%	14,3%	17,6%	8,9%	16,2%	15,9%	10,7%	16,5%	12,1%
C ₃	61,4±1,1	65,8±1,1	64,0±0,7	70,2±4,8	63,5±0,9	70,0±0,6	64,4±0,4	63,6±0,6	68,8±0,8	63,5±0,8
	21,7%	16,1%	18,4%	10,5%	19,0%	10,7%	17,9%	18,8%	12,2%	19,0%
C ₄	64,6±2,1	65,2±2,2	72,0±1,0	72,4±4,0	61,1±0,1	65,0±0,8	68,8±0,7	63,5±0,5	62,4±0,5	66,4±0,9
	17,6%	16,8%	8,2%	7,6%	22,1%	17,1%	12,2%	19,0%	20,4%	15,3%

*p vrednosti za sve enzimске aktivnosti su manje od 0,05 i kreću se od $8,44 \times 10^{-2}$ do $8,10 \times 10^{-13}$

4.2. Statistički testovi

4.2.1. Uticaj vodenih i DMSO rastvora karvakrola na aktivnost ispitivanih enzima

Kod obrade statističkih podataka za karvakrol u obzir je uzeto 168 podataka iz Tabela 15. - 42. koji se odnose na vodene rastvore karvakrola pripremljene u četiri koncentracije (C₁-C₄), na dva načina (I₁ i I₂), kao i na rastvore karvakrola u DMSO u četiri koncentracije (C₁-C₄), koji su delovali na sedam ispitivanih enzima u dve vrste seruma (N i H-serum). Kao varijable posmatrani su ispitivani klinički enzimi, a kao slučajevi su uzete četiri koncentracije terpena pripremljene kao vodeni rastvori na dva načina i kao DMSO rastvori u dve vrste seruma.

Tabela 43. Korelaciona matrica uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola na aktivnost sedam ispitivanih enzima u N i H-serumu

Enzim	CK	LDH	ALP	GGT	AST	ALT	AMY
CK	1,00						
LDH	0,26	1,00					
ALP	0,74	0,56	1,00				
GGT	0,13	-0,33	-0,04	1,00			
AST	0,40	0,69	0,70	0,02	1,00		
ALT	0,35	0,20	0,49	0,33	0,51	1,00	
AMY	0,62	0,83	0,85	-0,07	0,73	0,37	1,00

Prvi korak u analizi glavnih komponenata je standardizacija originalnih varijabli, odnosno transformacija podataka u seriju koja ima aritmetičku sredinu jednaku nuli i standardnu devijaciju jednaku jedinici.

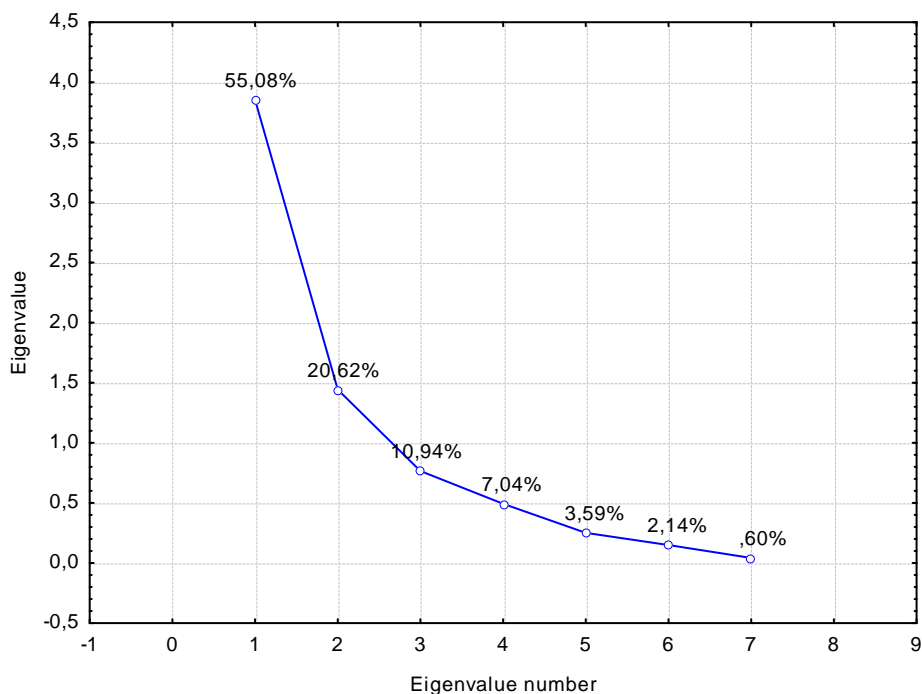
Korelaciona matrica pokazuje da svaka varijabla ima bar jedan koeficijent korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 (Tabela 43.), što je minimum koji se predlaže kao kriterijum da bi se varijabla uvrstila u analizu (Kinnear & Gray, 1994).

Sledeći korak predstavlja preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues) koje su predstavljene u Tabeli 44. Svojstvene vrednosti ilustruju kvalitet smanjivanja N-dimenzionalnog prostora (u ovom slučaju N=7) u manji broj dimenzija. Svaka svojstvena vrednost odgovara jednom faktoru, a svaki faktor jednoj dimenziji. Faktor je linearna kombinacija polaznih varijabli pri čemu su svi faktori nekorelisani ($r=0$). Svojstvene vrednosti odgovarajućih faktora su poredane po opadajućim vrednostima koje pokazuju koliki procenat početnih varijabli predstavljaju. Nerotiranim faktorskim rešenjem faktori se izvode prema njihovoj važnosti. Na taj način prvi faktor je opšti i gotovo svaka varijabla na njemu ima visoko opterećenje. Svaki sledeći faktor objašnjava sve manji deo varijanse. U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prvog faktora je 3,86 tako da prvi faktor objašnjava 55,08% varijanse među varijablama, drugi 20,62%, a treći faktor 10,94% ukupnog varijabiliteta podataka.

Tabela 44. Svojstvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola na sedam enzima u N i H serumu

Svojstvene vrednosti korelacione matrice				
	Svojstvena vrednost	Ukupnavarijansa %	Kumulativne svojstvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	3,86	55,08	3,86	55,08
2	1,44	20,62	5,30	75,70
3	0,77	10,94	6,06	86,64
4	0,49	7,04	6,56	93,67
5	0,25	3,59	6,81	97,26
6	0,15	2,14	6,96	99,40
7	0,04	0,60	7,00	100,00

Iz Tabele 44. se vidi da prva dva faktora objašnjavaju 75,70% ukupnog varijabiliteta, dok je sa četiri faktora moguće objasniti 93,67% ukupnog varijabiliteta. Broj faktora kojima je moguće objasniti ukupni varijabilitet može se odrediti i grafički sa Slike 15.



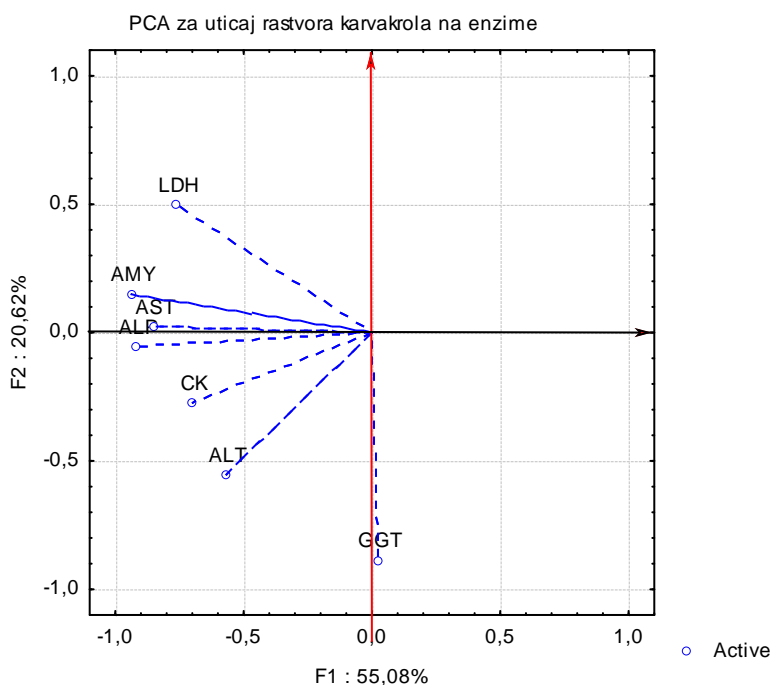
Slika 15. Grafički prikaz svojstvenih vrednosti za primenu Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola na sedam enzima u N i H-serumu

Slika 15. prikazuje dijagram (Screen test) kojim je grafički prikazan odnos broja izdvojenih faktora (glavnih komponenata) i pripadajućih svojstvenih vrednosti. Apscisa predstavlja redni broj faktora, a ordinata njegovu veličinu (eigenvalue). S obzirom da su faktori poređani u opadajući niz, dobijena izlomljena linija je opadajuća. Smatra se da je broj glavnih komponenata koje se koriste pri kasnijim statističkim analizama određen tačkom na pregibu iza koje su svojstvene vrednosti male i koje se značajno ne razlikuju. Iz prikaza se vidi da se linija kojom je prikazan među odnos karakterističnih svojstvenih vrednosti i broja izdvojenih faktora izrazito oštro spušta na prelazu između drugog i trećeg faktora, te zatim laganije do broja od četiri izdvojena faktora. Nakon toga je denivelacija gotovo ujednačena, bez izrazitih pragova. Prema Cattellu (Cattell, 1966), uzimajući u obzir navedena očitavanja sa grafičkog prikaza, optimalni broj faktora koji možemo zadržati iznosi četiri. Kako šest odabranih faktora zadovoljavaju i Keiserov kriterijum (Kaiser 1958) (svojstvena vrijednost od 1), kao i da je udeo objašnjene varijance od 93,67% u daljnjoj analizi se mogu koristiti 6 faktora, mada vrlo zadovoljavajuća objašnjenja mogu da se dobiju ekstrahovanjem 2 faktora. Naime, pojednostavljenje polaznih sedam varijabli na dve nove omogućava objašnjenje 75,70% ukupnog varijabiliteta.

U Tabeli 45. prikazana su faktorska opterećenja i iz nje je uočljivo je da svi enzimi osim GGT (0,02) pokazuju negativno opterećenje prvog faktora. Prvi faktor ima visoko

Tabela 45. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola na sedam enzima u H i N-serumu

Faktorske koordinate varijabli							
Varijable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
CK	-0,70	-0,27	-0,61	0,04	-0,00	-0,21	-0,01
LDH	-0,76	0,49	0,25	-0,19	0,21	-0,09	-0,10
ALP	-0,92	-0,05	-0,22	0,10	-0,09	0,27	-0,08
GGT	0,02	-0,88	0,11	-0,44	0,04	0,03	-0,03
AST	-0,85	0,02	0,34	-0,08	-0,37	-0,09	0,02
ALT	-0,56	-0,55	0,36	0,45	0,15	-0,03	0,01
AMY	-0,93	0,15	-0,05	-0,18	0,16	0,08	0,14



Slika 16. PCA dijagram uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Tabela 46. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora karvakrola i vrstu seruma

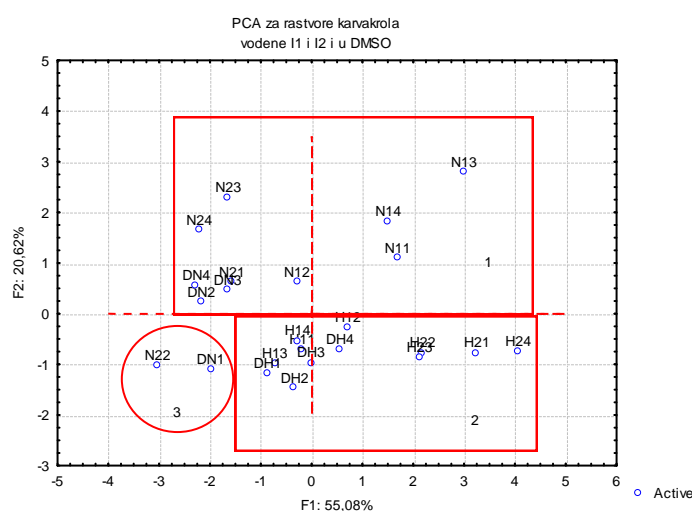
Koordinate faktora slučaja na osnovu korelacije							
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
N ₁₁	1,69	1,08	0,87	-0,81	0,66	-0,58	-0,32
N ₁₂	-0,28	0,62	-0,48	-1,26	-0,00	0,14	-0,15
N ₁₃	3,00	2,79	0,51	0,15	-0,75	0,60	-0,18
N ₁₄	1,51	1,82	0,25	-1,41	-0,18	0,22	0,54
N ₂₁	-1,56	0,61	0,83	1,26	0,50	0,70	-0,01
N ₂₂	-3,02	-1,02	1,21	-0,77	-0,00	-0,56	0,10
N ₂₃	-1,63	2,29	-2,39	0,68	0,69	-0,41	0,09
N ₂₄	-2,20	1,64	0,72	1,34	-0,08	-0,33	0,14
H ₁₁	-0,17	-0,70	-0,41	0,04	-0,33	0,11	0,11
H ₁₂	0,71	-0,28	-0,16	0,06	-0,65	0,07	-0,28
H ₁₃	-0,71	-0,97	-0,81	-0,13	-0,54	0,09	0,07
H ₁₄	-0,27	-0,53	-0,78	0,26	-0,51	0,12	0,07
H ₂₁	3,25	-0,77	0,49	0,23	0,44	0,02	0,34
H ₂₂	2,18	-0,77	-0,59	0,65	0,44	-0,23	-0,08
H ₂₃	2,13	-0,86	0,09	0,27	-0,22	-0,58	0,22
H ₂₄	4,07	-0,75	0,42	0,31	0,56	-0,20	-0,10
ND ₁	-1,98	-1,09	0,89	-0,39	0,97	0,83	0,03
ND ₂	-2,16	0,21	1,02	0,07	0,14	-0,25	-0,14
ND ₃	-1,64	0,45	-1,21	-1,19	0,41	0,03	-0,17
ND ₄	-2,26	0,56	1,14	0,14	-0,69	-0,29	0,00
HD ₁	-0,85	-1,17	-0,61	0,14	-0,39	0,04	0,07
HD ₂	-0,32	-1,47	-0,38	-0,17	-0,20	0,00	-0,03
HD ₃	-0,00	-0,97	-0,64	0,27	0,22	0,45	-0,02
HD ₄	0,56	-0,69	0,00	0,19	-0,48	0,00	-0,30

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C₁-C₄; D - rastvor terpena u DMSO

faktorsko opterećenje negativnog predznaka na varijablama: AMY (-0,93), ALP (-0,92), AST (-0,85), LDH (-0,76), CK (-0,70) i ALT (-0,56), što znači da je negativno koreliran sa tim enzimima. Faktorsko opterećenje pozitivnog predznaka drugi faktor ima sa varijablama LDH (0,49), AMY (0,15) i AST (0,02), dok jedina pozitivna varijabla prvog faktora, GGT, u drugom faktoru ima najveće negativno opterećenje (-0,88).

Na Slici 16. kroz položaj svih varijabli, može da se uoči uticaj koji je na enzimsku aktivnost ostvario karvakrol, naročito na LDH, koji ima najmanju razliku prva dva faktorska opterećenja, što je i saglasno sa najvećim procentom inhibicije koji pokazuje karvakrol.

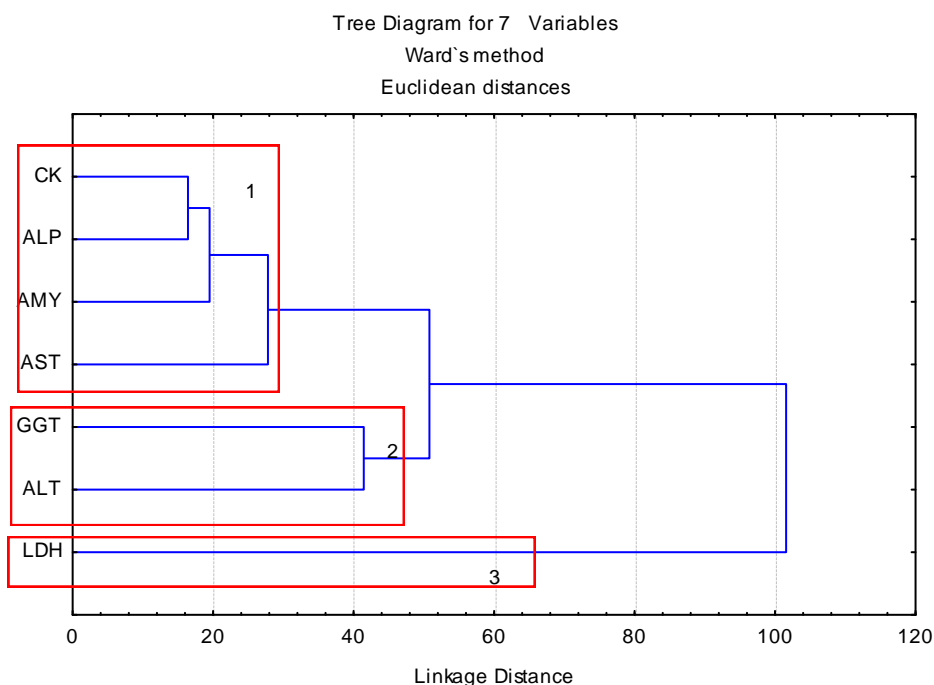
Ispitivan je i uticaj načina mešanja vodenih rastvora (1-ručno, 2-ultrazvučno) u N i H-serumu, kao i vrste rastvarača (voda i DMSO) na rezultate delovanja karvakrola (pripremljenog u 4 koncentracije) na 7 određivanih enzima. Iz Tabele 46. u kojoj su prikazana faktorska opterećenja za slučajeve može se uočiti da pozitivna faktorska opterećenja prvog faktora imaju ručno mešani rastvori sve četiri koncentracije u serumu normalne aktivnosti enzima (sa izuzetkom N₁₂) i ultrazvučno mešani rastvori u serumu povećane aktivnosti enzima, dok negativna imaju rastvori DMSO za obe vrste seruma, kao i vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno u N-serumu i ručno u H-serumu (sa izuzetkom H₁₂ i HD₄). Faktorsko opterećenje drugog faktora pokazuje da pozitivno opterećenje imaju i DMSO i vodeni rastvori pripremljeni na oba načina u N serumu (sa izuzetkom N₂₂ i ND₁), dok negativno faktorsko opterećenje imaju svi rastvori pripremljeni za H-serum.



Slika 17. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva vodenih i DMSO rastvora karvakrola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Grupisanost na osnovu vrste rastvarača, načina pripreme vodenih rastvora ili vrste seruma, može da se uoči i na grafičkom prikazu na Slici 17. U oblasti pozitivnih vrednosti ordinate (područje 1, Slika 17.) grupisani su rastvori koji dovode do inhibicije u N-serumu, a koji su pripremljeni u obe vrste rastvarača i na oba načina pripreme vodenih rastvora. U oblasti ispod x ose nalaze se rastvori koji inhibiraju posmatrane enzime u H-serumu (područje 2, Slika 17.). Odstupanje se grafički javlja samo za N-serum (područje 3, Slika 17., rastvori N_{22} i DN_1) zbog toga što su odstupanja sa istim predznakom (oba negativna). Može se zaključiti da PCA pokazuje grupisanost podataka prema vrsti seruma.

Statistička obrada podataka obuhvatila je i klaster analizu koja je omogućila grupisanje enzima na osnovu uticaja koji je karvakrol imao na njih. Sa Slike 18. se vidi da je rezultat klaster analize izdvajanje tri klastera, od kojih prvi klaster obuhvata enzime: CK, ALP, AMY i AST, drugi klaster sadrži GGT i ALT, a dok trećem klasteru pripada LDH. Unutar klastera 1 nalaze se tri potklastera, pri čemu je unutar potklastera koji obuhvata CK i ALP sličnost najveća.



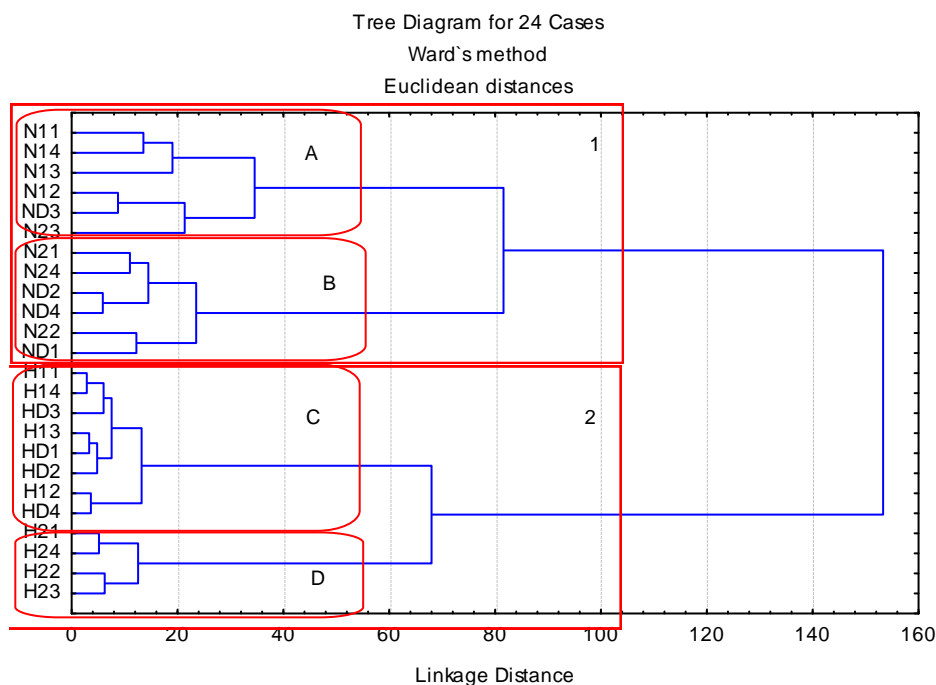
Slika 18. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora karvakrola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Dosadašnji rezultati ukazuju da je za aktivnost karvakrola na 7 određivanih enzima od značaja vrsta seruma, što potvrđuje i HCA slučaja (Slika 19.) Klaster analiza (HCA) omogućava grupisanje u dva klastera prema vrsti seruma. Prvi klaster se sastoji od vodenih i

DMSO rastvora koji su ispitivani za N-serum, dok se drugi sastoji od svih rastvora terpena koji su delovali u H-serumu.

U prvom klasteru rastvora za N-serum uočavaju se dva potklastera (A i B). Prvi (A) čine svi vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem i po jedan DMSO i vodeni rastvori pripremljen ultrazvučno. Sličnost pokazuju rastvori N₁₁-N₁₄, kao i N₁₂-ND₃, dok su u ovom potklasteru i rastvori N₁₃-N₂₃. Drugi potklaster (B) prvog klastera čine ultrazvučno pripremljeni vodeni i DMSO rastvori. Međusobno pokazuju sličnost sledeći parovi rastvora: N₂₁/N₂₄, ND₂/ND₄, kao i N₂₂/ND₁.

U drugom klasteru rastvora za H-serum, takođe se izdvajaju dva potklastera (C i D)- prvi (C) čine svi vodeni rastvori koji su pripremljeni ručno i kao DMSO rastvori, a drugi (D) svi ultrazvučno pripremljeni rastvori. U prvom potklasteru (C) najveću sličnost pokazuju rastvori H₁₁/H₁₄, H₁₃/HD₁, kao i H₁₂/HD₄. Ovom potklasteru pripadaju i rastvori HD₃/HD₂. U drugom potklasteru (D) najveću sličnost pokazuju H₂₁/H₂₄, kao i H₂₂/H₂₃.



Slika 19. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora karvakrola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Rezultati dobijeni na osnovu PCA i HCA analize slučajeva su potpuno podudarni i potvrđuju mogućnost razlikovanja inhibicije na osnovu vrste seruma kada su u pitanju i vodeni i DMSO rastvori karvakrola.

4.2.2. Uticaj vodenih i DMSO rastvora linalola na aktivnost ispitivanih enzima

Statistička analiza linalola, počinje formiranjem sa korelacione matrice koju prikazuje Tabela 47. Na osnovu vrednosti iz Tabele 47., za dalju statističku analizu u obzir se uzimaju sve varijable, tako da se potom vrši preračunavanje svojstvenih vrednosti (eigenvalues). Dobijeni rezultati su prikazani u Tabeli 48.

Prvi faktor ima svojstvenu vrednost od 5,22 dok sledeća dva faktora imaju vrlo slične vrednosti 0,57 i 0,54. Pošto prvi faktor ima devet puta veću vrednost od sledećeg, drugog faktora, jasno je i da je samo njime moguće objašnjavanje 74,63% ukupne varijanse među varijablama. Drugi faktor objašnjava 8,20%, a treći 7,72% ukupnog varijabiliteta podataka. Sve to ukazuje da prva dva faktora objašnjavaju 82,83% ukupnog varijabiliteta, dok je sa četiri faktora moguće objasniti čak 95,00% varijabiliteta.

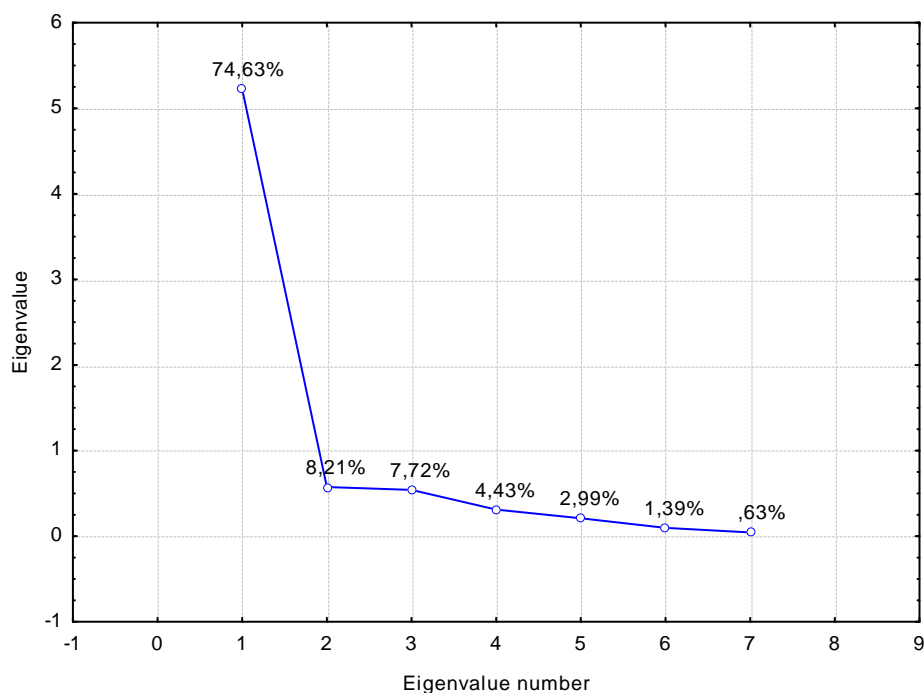
Tabela 47. Korelaciona matrica uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola na sedam enzima u N i H-serumu

Enzim	CK	LDH	AMY	ALP	GGT	AST	ALT
CK	1,00						
LDH	0,71	1,00					
ALP	0,85	0,65	1,00				
GGT	0,71	0,82	0,68	1,00			
AST	0,53	0,53	0,59	0,56	1,00		
ALT	0,77	0,82	0,54	0,72	0,61	1,00	
AMY	1,00	0,71	0,85	0,71	0,53	0,77	1,00

Tabela 48. Svojsvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola na sedam enzima u N i H serumu

Svojsvene vrednosti koleracione matrice				
	Svojsvena vrednost	Totalna varijansa %	Kumulativne svojsvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	5,22	74,63	5,22	74,63
2	0,57	8,20	5,79	82,83
3	0,54	7,72	6,34	90,56
4	0,31	4,43	6,64	95,00
5	0,20	2,98	6,85	97,99
6	0,09	1,39	6,95	99,37
7	0,04	0,62	7,00	100,00

Određivanje broja faktora (glavnih komponenta) koje treba izdvojiti moguće je uraditi i grafički (Slika 20.).



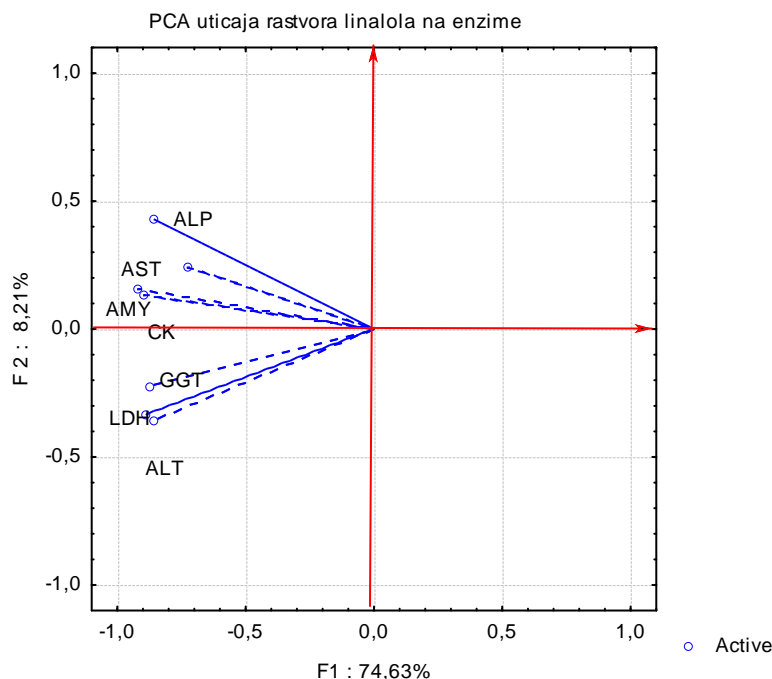
Slika 20. Grafički prikaz svojsvenih vrednosti za primenu Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola na sedam enzima u N i H-serumu

Na dijagramu su faktori poređani u opadajući niz pa je dobijena izlomljena linija opadajuća. Kako nakon drugog faktora linija kojom su svojstvene vrednosti faktora spojene naglo menja pravac (Slika 20.), dalja statistička tumačenja mogu se dobiti razmatranjem samo prva dva faktora (82,83% objašnjenog varijabiliteta).

Tabela 49. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola na sedam enzima u H i N-serumu

Faktorske koordinate varijabli							
Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
CK	-0,89	0,13	-0,23	0,28	0,14	-0,02	-0,12
LDH	-0,89	-0,33	-0,05	-0,12	-0,19	-0,19	-0,03
ALP	-0,86	0,42	-0,21	-0,05	0,02	-0,09	0,12
GGT	-0,87	-0,22	-0,05	-0,32	0,27	0,08	-0,00
AST	-0,72	0,23	0,63	-0,02	0,03	-0,03	-0,03
ALT	-0,87	-0,35	0,13	0,31	0,00	0,05	0,10
AMY	-0,92	0,15	-0,08	-0,07	-0,26	0,19	-0,02

Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola na sedam enzima u H i N-serumu su prikazane u Tabeli 49. Prvi faktor ima visoko faktorsko opterećenje negativnog predznaka na svim varijablama, sa najmanjom apsolutnom vrednošću za AST (-0,72), preko ALP, GGT, ALT, CK i LDH do najveće vrednosti za AMY (-0,92), što znači da je prvi faktor negativno korelisan sa svim enzimima. Enzimi GGT, LDH i ALT imaju negativni predznak faktorskog opterećenja i za drugi factor. Ova tri enzima ukupno imaju najveće negativno faktorsko opterećenje prva dva faktora, zbog čega se i nalaze u istom odsečku PCA dijagrama na Slici 21. Takođe, linalol na njih ispoljava manji inhibitorski efekat u odnosu na preostale enzime. ALP ima najmanju vrednost ukupnih faktorskih opterećenja prvog i drugog faktora, slede AST, CK, i na kraju AMY. Na Slici 21. prikazan je PCA dijagram za uticaj rastvora linalola na aktivnost ispitivanih enzima.



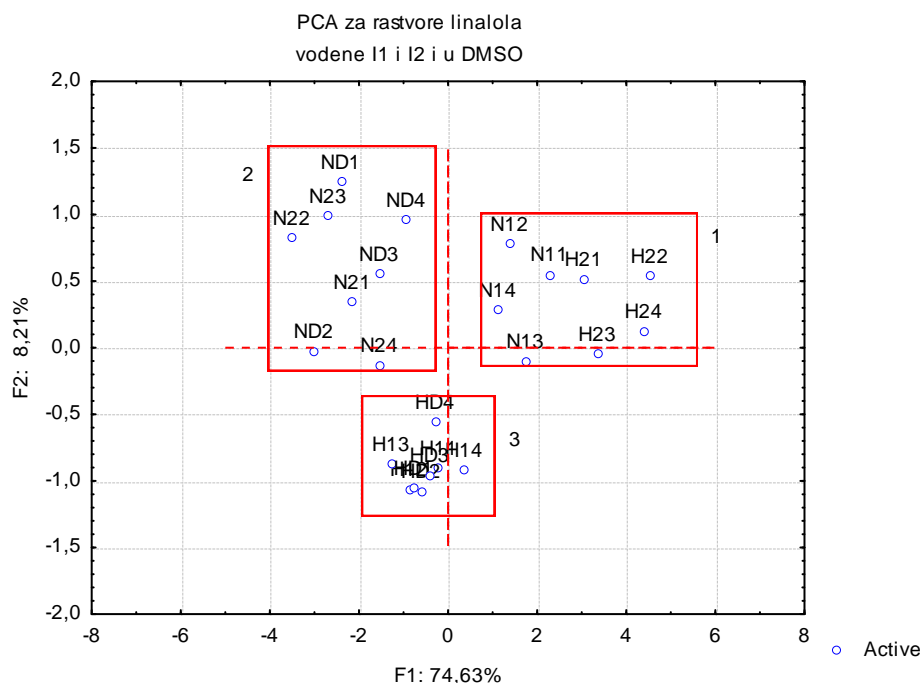
Slika 21. PCA dijagram uticaja vodenih i DMSO rastvora linalola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Ako se PCA analiza (Tabela 50.) primeni na i slučajeve, može se uočiti da pozitivna faktorska opterećenja prvog faktora imaju ručno mešani vodeni rastvori sve četiri koncentracije u N-serumu i ultrazvučno mešani rastvori u H-serumu. Negativna opterećenja imaju vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno u N-serumu, ručno u H serumu, kao i DMSO rastvori u N i H-serumu, sa izuzetkom H₁₄ koji ima pozitivno opterećenje prvog faktora. Pozitivno faktorsko opterećenje drugog faktora pokazuju vodeni rastvori pripremljeni ručnim i ultrazvučnim mešanjem u N-serumu (sa izuzetkom N₁₃ i N₂₄), ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori u H-serumu (sa izuzetkom H₂₃), kao i DMSO rastvori u N-serumu. Negativno faktorsko opterećenje drugog faktora imaju vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučnim mešanjem u H-serumu kao i DMSO rastvori u H-serumu.

Tabela 50. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora linalola i vrstu seruma

Koordinate faktora slučaja na osnovu korelacije							
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
N ₁₁	2,27	0,55	1,68	-0,96	0,53	-0,01	-0,14
N ₁₂	1,38	0,78	-0,43	0,79	0,01	0,39	-0,48
N ₁₃	1,74	-0,09	0,35	-1,46	-0,44	0,37	0,14
N ₁₄	1,11	0,28	1,53	1,19	0,35	0,11	0,03
N ₂₁	-2,14	0,34	-0,70	0,13	0,85	0,33	-0,05
N ₂₂	-3,50	0,82	0,12	0,04	-0,25	-0,36	-0,15
N ₂₃	-2,69	0,99	-0,25	-0,72	0,24	-0,09	-0,01
N ₂₄	-1,53	-0,13	-0,25	-0,74	0,10	0,52	-0,02
H ₁₁	-0,20	-0,90	0,39	0,03	-0,06	-0,01	-0,10
H ₁₂	-0,87	-1,06	0,33	0,14	-0,01	-0,14	0,12
H ₁₃	-1,27	-0,87	0,30	0,22	0,05	-0,10	0,028
H ₁₄	0,36	-0,91	-0,40	-0,10	-0,13	0,01	-0,19
H ₂₁	3,05	0,51	-0,21	0,08	0,02	-0,90	0,13
H ₂₂	4,52	0,53	-0,73	-0,04	0,15	-0,03	-0,16
H ₂₃	3,35	-0,04	-0,52	0,41	0,25	0,15	0,38
H ₂₄	4,39	0,12	-0,97	-0,02	-0,20	0,07	0,02
ND ₁	-2,40	1,24	0,44	0,09	0,62	-0,05	0,39
ND ₂	-3,01	-0,02	-1,50	0,03	0,12	-0,14	-0,09
ND ₃	-1,54	0,55	-0,46	0,03	-0,59	-0,20	0,09
ND ₄	-0,94	0,95	0,69	0,575	-1,45	0,38	0,08
HD ₁	-0,77	-1,05	0,53	0,41	0,39	0,12	-0,16
HD ₂	-0,60	-1,07	-0,55	0,21	-0,05	0,24	0,41
HD ₃	-0,40	-0,95	0,31	-0,06	-0,20	-0,28	-0,06
HD ₄	-0,29	-0,55	0,27	-0,29	-0,29	-0,38	-0,22

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C1-C4; D - rastvor terpena u DMSO.

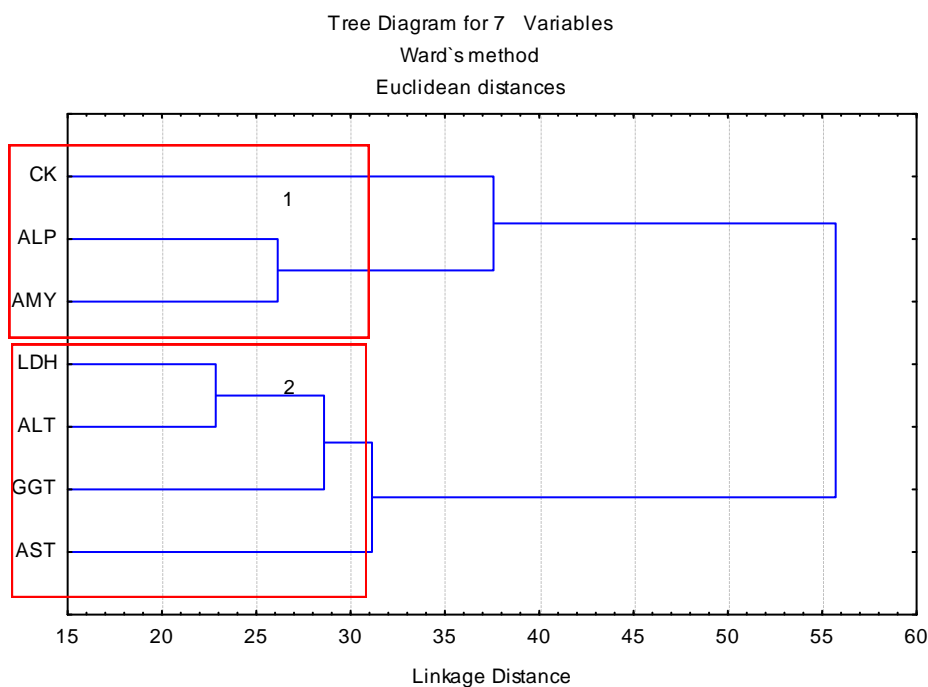


Slika 22. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva vodenih i DMSO rastvora linalola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Grupisanost slučajeva na PCA dijagramu linalola (Slika 22.) u tri grupe izvršena na snovu vrste seruma ili načina pripreme vodenih rastvora. Prvu grupu (Slika 22., područje 1) čine vodeni rastvori pripremljeni ručnim (N-serum) ili ultrazvučnim (H-serum) mešanjem koji imaju pozitivna opterećenja i prvog i drugog faktora, pa se nalaze u pozitivnom delu grafika. Drugu grupu (Slika 22., područje 2) čine samo rastvori N-seruma – vodeni, pripremljeni ultrazvučnim mešanjem i DMSO rastvori. Oni imaju negativno faktorsko opterećenje prvog, a pozitivno drugog faktora. Poslednju, treću grupu (Slika 22., područje 3), čine rastvori za H-serum: vodeni pripremljeni ručnim mešanjem i DMSO rastvori. Kako su njihova faktorska opterećenja sa negativnim predznakom, smešteni su ispod x-ose, u negativnom delu, sa odstupanjem jednog rastvora H_{14} . On ima pozitivno faktorsko opterećenje prvog faktora, pa se nalazi sa druge strane y-ose u odnosu na sve druge rastvore iz ove grupe.

Podaci koji su bili predmet PCA analize bili su podvrgnuti i HCA analizi, a rezultati HCA analize su predstavljeni kao klaster dijagram (Slika 23.), dobijen primenom Vardove metode u odnosu na sedam ispitivanih enzima. Na Slici 23. uočavaju se dva klastera. U prvom klasteru su CK, ALP i AMY. Drugi klaster se sastoji od tri potklastera. Prvi

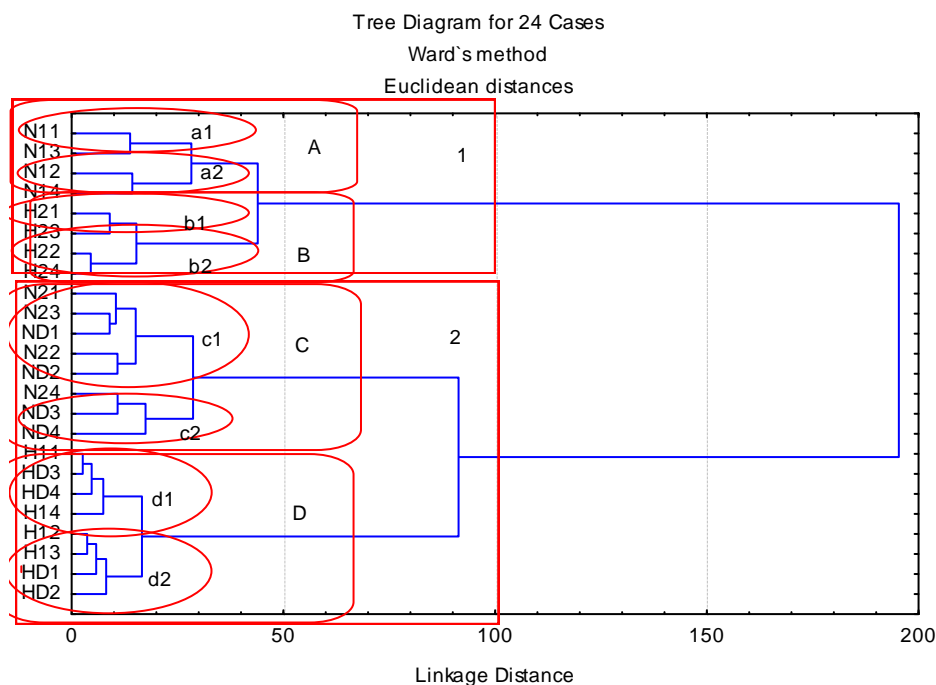
sačinjavaju LDH i ALT, drugi GGT a treći AST. Najveću sličnost u procentu inhibicije linalola pokazuju LDH i ALT tako da se oni i nalaze na najmanjem međusobnom rastojanju.



Slika 23. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora linalola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Klaster analiza izvedena primenom Vardove metode prikazana je na Slici 26., i u potpunosti potvrđuje grupisanost dobijenu pri PCA analizi. Uočava se postojanje dva klastera. U prvom klasteru nalaze se samo vodeni rastvori i to pripremljeni ručnim mešanjem za N-serum (prvi potklaster A sa rastvorima N_{11} , N_{13} , N_{12} , i N_{14}) i ultrazvučnim mešanjem za H-serum (drugi potklaster B koji obuhvata rastvore H_{21} , H_{23} , H_{22} , H_{24}). Sličnost međusobno pokazuju sledeći parovi rastvora: N_{11}/N_{13} , N_{12}/N_{14} , H_{21}/H_{23} , kao i H_{22}/H_{24} .

Drugi klaster se na rastojanju (linkage distance) od 90 deli na dva potklastera (C i D). Prvi potklaster (C) u svom sastavu ima DMSO i vodene rastvore pripremljene ultrazvučnim mešanjem. Rastvori u njemu su grupisani u dva potpotklastera (c_1 i c_2). Prvi (c_1) obuhvata pet rastvora, Najmanje rastojanje je između rastvora N_{23}/ND_1 . U drugom potpotklasteru (c_2) najveću sličnost pokazuju rastvori N_{24}/ND_3 .



Slika 24. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora linalola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Drugi potklaster (D) drugog klastera sastoji se iz DMSO i vodenih rastvora pripremljenih ručnim mešanjem za H-serum. Tih 6 rastvora su podeljeni u dva potpotklastera (d_1 i d_2) koji se karakterišu time da su rastojanja između parova u oba potpotklastera ista. Ista sličnost postoji između rastvora H_{11}/HD_3 , kao i između rastvora H_{12}/H_{13} . Paru H_{11}/HD_3 se pridružuje rastvor HD_4 na istoj udaljenosti na kojoj se paru H_{12}/H_{13} pridružuje rastvor HD_1 .

Kao i kod karvakrola (poglavlje 4.2.1.) i kod rastvora linalola postoji potpuna podudarnost kod grupisanja slučaja PCA i HCA analize. Naime, podela na tri grupe rastvora je prema intenzitetu inhibicije koju postižu u obe vrste seruma. Tako su u jednoj grupi rastvori koji postižu najmanju inhibiciju u vrsti seruma (ručno mešani vodeni rastvori za N-serum i ultrazvučno mešani vodeni rastvori za H-serum). Drugu grupu čine vodeni ultrazvučno pripremljeni i DMSO rastvori za N-serum koji postižu srednje i velike procenete inhibicije u N-serumu. Treću grupu takođe čine rastvori koji dostižu srednje i velike procenete inhibicije, ali u H-serumu (ručno mešani vodeni i DMSO rastvori).

4.2.3. Uticaj vodenih i DMSO rastvora nerola na aktivnost ispitivanih enzima

Prvi korak u statističkoj analizi nerola je izrada korelacione matrice (Tabela 51.), a na osnovu vrednosti procenata inhibicije predstavljenih u Tabelama 15. – 42.

Tabela 51. Korelaciona matrica uticaja vodenih i DMSO rastvora nerola na sedam enzima u N i H-serumu

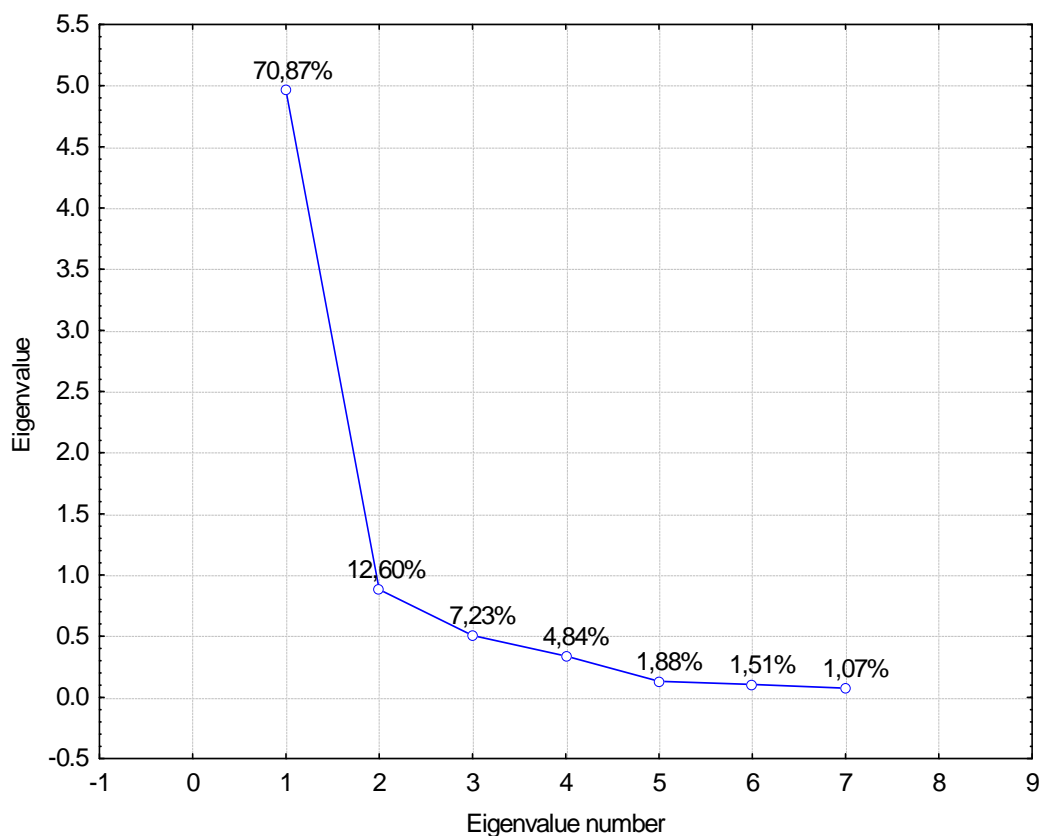
Enzim	CK	LDH	ALP	GGT	AST	ALT	AMY
CK	1,00						
LDH	0,82	1,00					
ALP	0,62	0,68	1,00				
GGT	0,59	0,69	0,53	1,00			
AST	0,64	0,62	0,83	0,35	1,00		
ALT	0,81	0,63	0,64	0,43	0,68	1,00	
AMY	0,76	0,74	0,74	0,30	0,83	0,69	1,00

Korelaciona matrica pokazuje da je moguće svih sedam varijabli uvrstiti u analizu. Preračunavanjem svojstvenih vrednosti (eigenvalues) za nerol (Tabela 52.), došlo se do vrednosti prvog faktora od 4,96 kojom može da se objasni 70,87% varijanse. Do poslednjeg faktora sve svojstvene vrednosti su veće od jedinice.

Uz pomoć prva četiri faktora može da se objasni 95,54% varijanse među varijablama, a sa prva dva 83,47% ukupnog varijabiliteta. Kumulativnu varijansu svojstvenih vrednosti (Tabela 52.) moguće je prikazati i grafički (Slika 25.). Grafik na Slici 25. pokazuje da su faktori poređani u opadajući niz pri čemu je između prva dva faktora najveći pad nagiba linije, između drugog i petog faktora je vrlo blag, dok je posle petog faktora linija gotovo horizontalna. I na osnovu grafika (Slika 25.) je jasno da se za dalju statističku analizu mogu koristiti samo prva dva faktora (objašnjavaju 83,47% ukupnog varijabiliteta).

Tabela 52. Svojtstvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora nerola na sedam enzima u N i H-serumu

Svojtstvene vrednosti korelacione matrice				
	Svojtstvena vrednost	Totalna varijansa %	Kumulativne svojtstvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	4,96	70,87	4,96	70,87
2	0,88	12,60	5,84	83,47
3	0,50	7,23	6,34	90,70
4	0,33	4,83	6,68	95,54
5	0,13	1,87	6,81	97,42
6	0,10	1,50	6,92	98,93
7	0,07	1,06	7,00	100,00



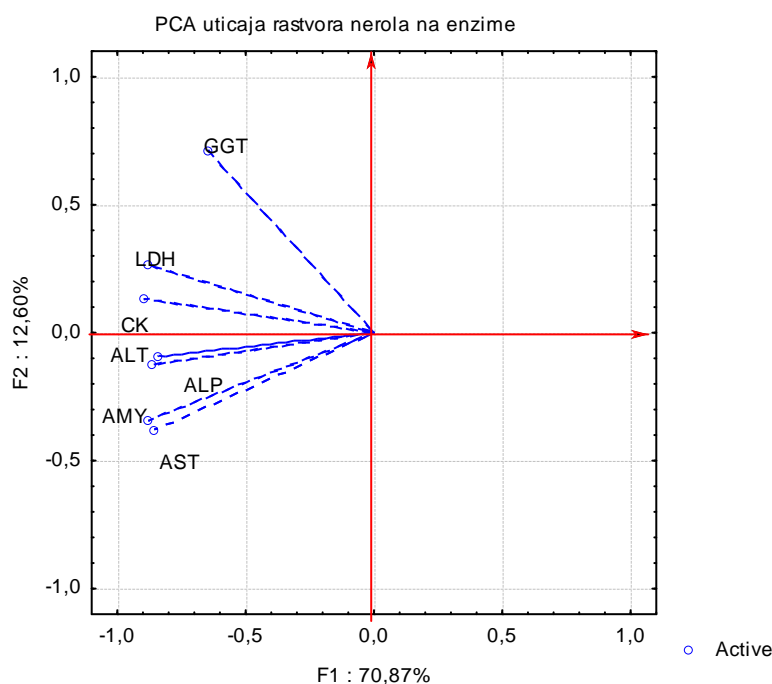
Slika 25. Grafički prikaz svojtstvenih vrednosti za primenu Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora nerola na sedam enzima u N i H-serumu

Tabela 53. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora nerola na sedam enzima u H i N-serumu

Faktorske koordinate varijabli							
Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
CK	-0,89	0,13	-0,34	-0,06	-0,09	0,17	-0,12
LDH	-0,88	0,26	-0,02	-0,30	0,12	-0,17	-0,06
ALP	-0,86	-0,12	0,40	0,14	0,18	0,12	-0,05
GGT	-0,64	0,71	0,19	0,10	-0,10	0,01	0,10
AST	-0,85	-0,37	0,22	0,06	-0,22	-0,11	-0,06
ALT	-0,83	-0,08	-0,36	0,36	0,08	-0,09	0,05
AMY	-0,87	-0,34	-0,03	-0,25	-0,02	0,07	0,18

Iz Tabele 53. je uočljivo da je prvi faktor definisan visokim negativnim faktorskim opterećenjima svih varijabli koje se kreće od -0,64 za GGT do -0,89 za CK a što pokazuje da je negativno korelisan sa svim enzimima. Negativni predznak faktorskog opterećenja drugog faktora zadržavaju ALT, ALP, AMY i AST (-0,08 do -0,37). Preostala tri enzima (CK, LDH i GGT) imaju pozitivno opterećenje drugim faktorom, koje je kod GGT po brojnoj vrednosti veće od negativnog opterećenja prvog faktora što ga izdvaja u odnosu na sve ostale enzime na Slici 26.

Dobijeni rezultati inhibicije sedam enzima nerolom mogu da se posmatraju i u koordinatnoj ravani čije su koordinatne ose ekstrahovani faktori (Slika 26.) Na Slici 26. se jasno uočava da se tri enzima (CK, LDH i GGT), koja su imala i pozitivna i negativna faktorska opterećenja prvog i drugog faktora, nalaze u istom odsečku PCA dijagrama. Ostala četiri enzima (AKP, AST, ALT i AMY), koji su imali negativna opterećenja oba faktora, nalaze se u drugom odsečku PCA dijagrama, što u potpunosti podržava podatke iz Tabele 53.



Slika 26. PCA dijagram vodenih i DMSO rastvora nerola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

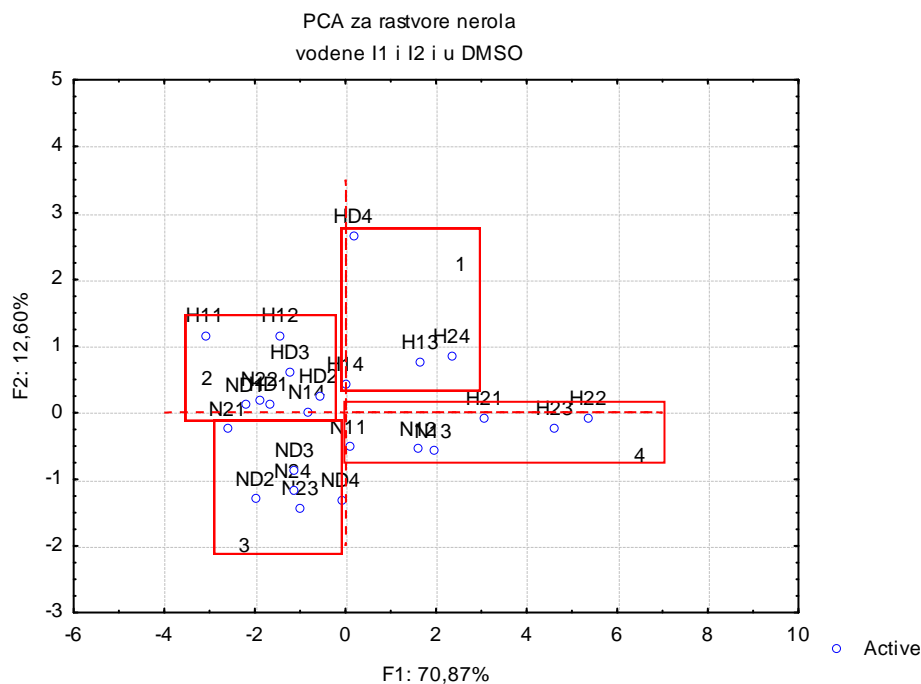
Faktorska opterećenja za slučajeve prikazana su u Tabeli 57. Pozitivna faktorska opterećenja prvog faktora imaju ručno mešani vodeni rastvori u N-serumu (sa izuzetkom N₁₄) i ultrazvučno mešani rastvori u H-serumu. Negativna faktorska opterećenja imaju vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno u N-serumu, ručno pripremljeni u H-serumu (sa izuzetkom H₁₃ i H₁₄), kao i rastvori DMSO u N i H-serumu (sa izuzetkom HD₄). Faktorsko opterećenje drugog faktora pokazuje da pozitivno opterećenje imaju vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem u H-serumu kao i DMSO rastvori u H-serumu. Negativno faktorsko opterećenje drugog faktora imaju na oba načina pripremljeni vodeni rastvori u N-serumu i DMSO rastvori u N-serumu (sa izuzetkom N₁₄, N₂₂ i ND₁), kao i ultrazvučnim mešanjem pripremljeni rastvori u H-serumu (sa izuzetkom H₂₄).

Grupisanost pozitivnih i negativnih faktorskih opterećenja prvim i drugim faktorom na grafiku (Slika 27.) ne omogućava razgraničenja po vrsti seruma ili načinu mešanja vodenih rastvora ili prema vrsti rastvarača kao što je to bio slučaj kod karvakrola (poglavljje 4.2.1) ili linalola (poglavljje 4.2.2).

Tabela 54. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora nerola i vrstu seruma

Koordinate faktora slučaja na osnovu korelacije							
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
N ₁₁	0,07	-0,51	-0,49	-0,54	0,13	-0,32	-0,36
N ₁₂	1,61	-0,54	-0,04	-1,01	-0,42	-0,21	0,33
N ₁₃	1,94	-0,574	-0,70	0,50	-0,07	-0,30	-0,42
N ₁₄	-0,84	0,02	-0,42	-0,51	0,04	-0,17	0,42
N ₂₁	-2,59	-0,24	0,70	0,37	0,03	-0,48	0,46
N ₂₂	-1,88	0,20	0,47	-0,42	-0,33	0,24	-0,20
N ₂₃	-0,98	-1,43	0,12	0,52	0,80	0,26	0,15
N ₂₄	-1,14	-1,16	0,70	-1,03	-0,05	0,12	-0,32
H ₁₁	-3,09	1,16	-0,36	0,20	0,13	-0,09	-0,01
H ₁₂	-1,43	1,16	-0,46	0,57	-0,44	-0,25	-0,17
H ₁₃	1,65	0,75	-1,27	-0,19	0,33	0,17	0,49
H ₁₄	0,01	0,42	0,53	-0,75	-0,22	0,67	0,01
H ₂₁	3,07	-0,08	0,43	0,74	0,31	0,17	-0,21
H ₂₂	5,36	-0,08	0,04	0,01	-0,31	-0,45	0,23
H ₂₃	4,62	-0,22	0,66	0,39	0,30	0,11	-0,09
H ₂₄	2,35	0,85	0,07	0,12	-0,13	0,59	0,09
ND ₁	-2,21	0,12	0,62	0,35	0,26	-0,28	0,26
ND ₂	-1,98	-1,29	-0,48	0,07	0,10	0,10	-0,24
ND ₃	-1,11	-0,86	1,19	0,73	-0,18	-0,17	-0,04
ND ₄	-0,09	-1,31	-0,53	-0,74	-0,07	-0,13	-0,02
HD ₁	-1,68	0,13	-1,43	0,14	0,37	0,34	-0,02
HD ₂	-0,58	0,25	-0,94	0,83	-0,78	0,07	-0,15
HD ₃	-1,21	0,60	0,93	0,31	-0,36	0,41	0,21
HD ₄	0,17	2,64	0,64	-0,72	0,59	-0,41	-0,38

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C1-C4; D - rastvor terpena u DMSO.

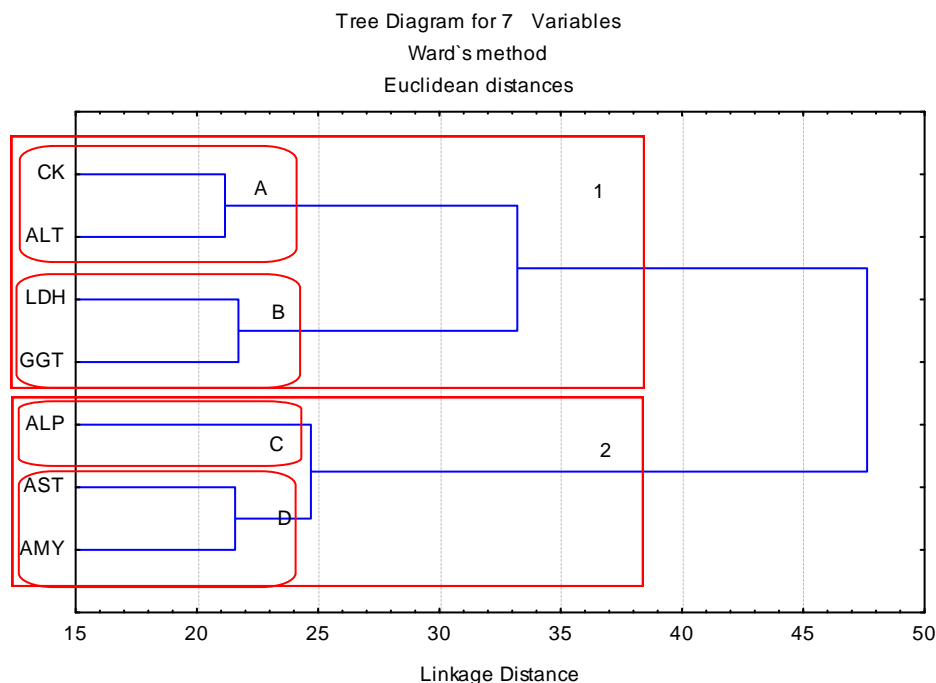


Slika 27. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva vodenih i DMSO rastvora nerola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

U četiri obeležena područja na Slici 27. rastvori su grupisani na osnovu predznaka faktorskog opterećenja prvog i drugog faktora. područje 1 čine četiri rastvora kod kojih su oba opterećenja pozitivnog predznaka: H₁₃, H₁₄, H₂₄ i HD₄ i karakteristični su samo za H-serum. U pitanju su i DMSO i vodeni rastvori pripremljeni i ručnim i ultrazvučnim mešanjem. Područje 2 čini osam rastvora koji imaju negativno opterećenje prvim, a pozitivno drugim faktorom: N₁₄, N₂₂, ND₁, H₁₁, H₁₂, HD₁, HD₂ i HD₃. U ovoj grupi se nalaze sve vrste rastvora osim ultrazvučno pripremljenih vodenih rastvora u H-serumu. Područje 3 čini šest rastvora koja imaju oba faktorska opterećenja sa negativnim predznakom: N₂₁, N₂₃, N₂₄, ND₂, ND₃ i ND₄. To su rastvori u N-serumu koji su pripremljeni u DMSO ili vodeni ultrazvučnim mešanjem. Područje 4, takođe, čini šest rastvora koji imaju pozitivno opterećenje prvim faktorom, a negativno drugim: N₁₁, N₁₂, N₁₃, H₂₁, H₂₂ i H₂₃. Ovu grupu čine samo vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem za N-serum ili ultrazvučnim mešanjem za H-serum.

Ako se primeni Vardova metoda klaster analize u odnosu na sedam ispitivanih kliničkih enzima, na dobijenom dijagramu se uočava postojanje dva klastera (Slika 28.). Šest enzima, po dva u paru, imaju ista rastojanja, odnosno pokazuju veliku međusobnu sličnost u

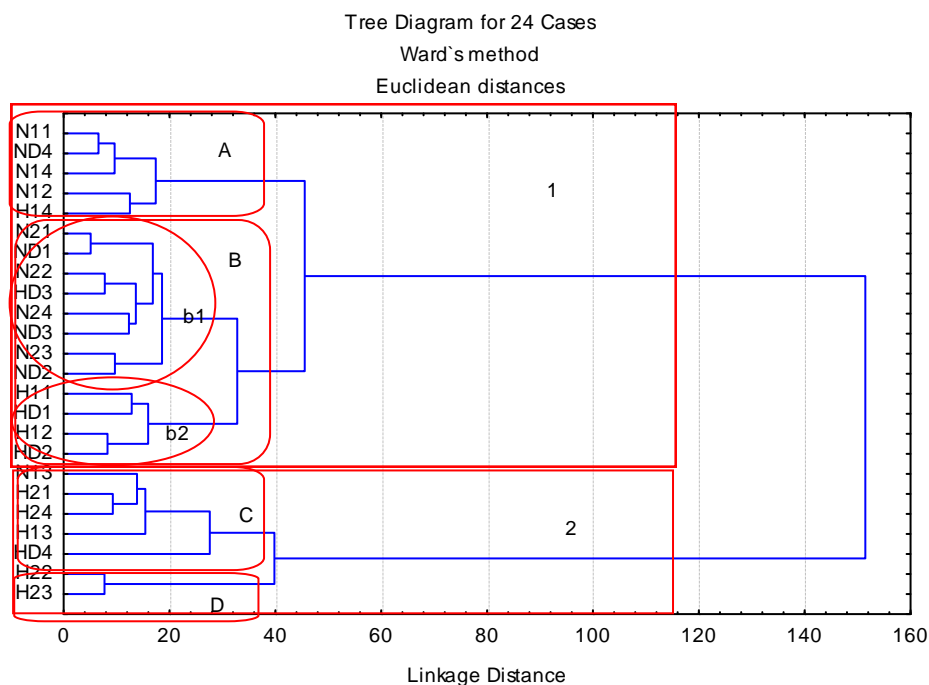
pogledu inhibicije rastvorima nerola. To su parovi CK i ALT (A), kao i LDH i GGT (B), koji predstavljaju potklaster prvog klastera. Preostali par, AST i AMY (D), predstavlja potklaster drugog klastera u kome se osim njih nalazi i ALP (C). Jedini samostalni enzim na dendogramu (Slika 28.) je ALP, sa najvećim rastojanjem što odgovara činjenici da nerol postiže najveći procenat inhibicije upravo na ovom enzimu, u N ili H-serumu, bez obzira da li je u pitanu vodeni ili DMSO rastvor, ručno ili ultrazvučno pripremljen.



Slika 28. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora nerola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Ako se sada slučajevi predstave grafički na Slici 29. uočava se grupisanje rastvora terpena u N i H-serumu u dva klastera, gde prvi klaster (1) ima 14 rastvora, dok se drugi (2) sastoji iz sedam rastvora.

Prvi klaster se sastoji iz dva potklastera (A i B). Prvi potklaster (A) obuhvata 5 rastvora, od kojih sličnost pokazuju: N_{11}/ND_4 , kao i N_{12}/H_{14} . Drugi potklaster (B) se sastoji od dva potpotklastera (b_1 i b_2) sa sledećim parovima sličnosti: N_{21}/ND_1 , N_{22}/HD_3 , N_{24}/ND_3 kao i N_{23}/ND_2 za b_1 , odnosno H_{11}/HD_1 i H_{12}/HD_2 za b_2 potpotklaster. Karakteristično je i to da su u prvom klasteru svi DMSO rastvori (osim HD_4) za obe vrste seruma. U drugom klasteru sličnost pokazuju: H_{21}/H_{24} , kao i H_{22}/H_{23} , dok su rastvori N_{13} , H_{13} i HD_4 prisutni kao samostalni.



Slika 29. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora nerola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

4.2.4. Uticaj vodenih i DMSO rastvora geraniola na aktivnost ispitivanih enzima

Izrada korelacione matrice (Tabela 55.) predstavlja prvi korak u statističkoj analizi uticaja rastvora geraniola na aktivnost enzima.

Iz Tabele 55. može se uočiti da svaka varijabla ima sve koeficijente korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 što ukazuje da se sve varijable uzimaju za dalju satističku analizu. Najpre se izračunavaju svojstvene vrednosti faktora (glavnih komponenata). U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prvog faktora je 5,15 tako da prvi faktor objašnjava 73,62% varijance među varijablama, drugi 12,94%, treći faktor 5,25%, dok četvrti objašnjava svega 3,36% ukupnog varijabiliteta podataka, što je prikazano u Tabeli 56.

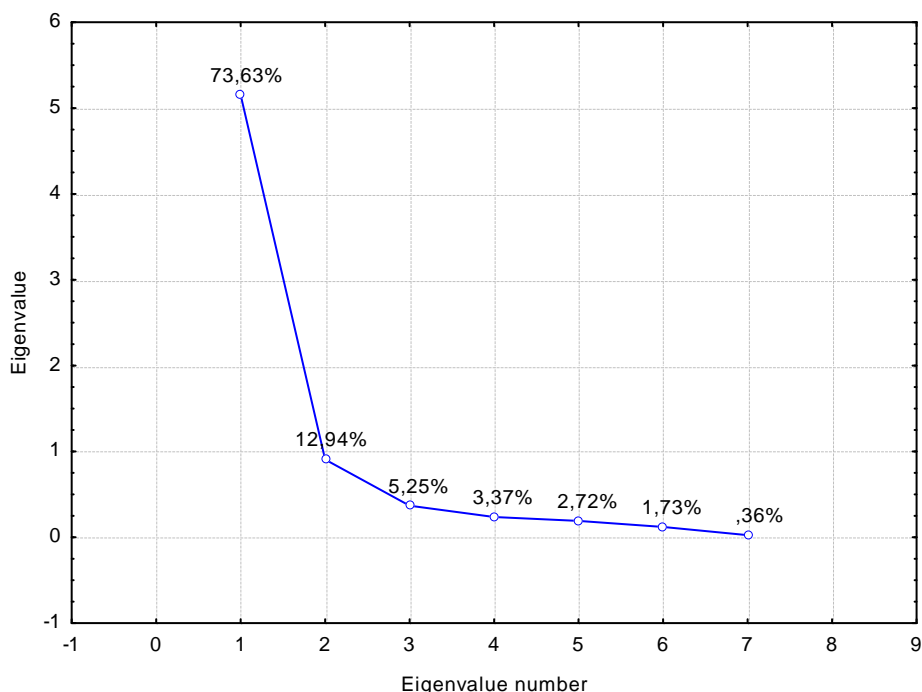
Sa prva dva faktora moguće je objasniti 86,56% ukupnog varijabiliteta (Tabela 56.), dok je sa četiri faktora moguće objasniti čak 95,18% varijabiliteta. Procentualni udeo svakog faktora u ukupnoj varijansi moguće je prikazati i grafički (Slika 30.).

Tabela 55. Korelaciona matrica uticaja vodenih i DMSO rastvora geraniola na sedam enzima u N i H-serumu

Enzim	CK	LDH	ALP	GGT	AST	ALT	AMY
CK	1,00						
LDH	0,76	1,00					
ALP	0,89	0,63	1,00				
GGT	0,86	0,61	0,71	1,00			
AST	0,85	0,65	0,77	0,81	1,00		
ALT	0,51	0,57	0,21	0,39	0,36	1,00	
AMY	0,90	0,70	0,82	0,79	0,84	0,45	1,00

Tabela 56. Svojtvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora geraniola na sedam enzima u N i H-serumu

Svojtvene vrednosti korelacione matrice				
	Svojtvena vrednost	Totalna varijansa %	Kumulativne svojtvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	5,15	73,62	5,15	73,62
2	0,90	12,94	6,05	86,56
3	0,36	5,25	6,42	91,82
4	0,23	3,36	6,66	95,18
5	0,19	2,72	6,85	97,90
6	0,12	1,72	6,97	99,63
7	0,02	0,36	7,00	100,00



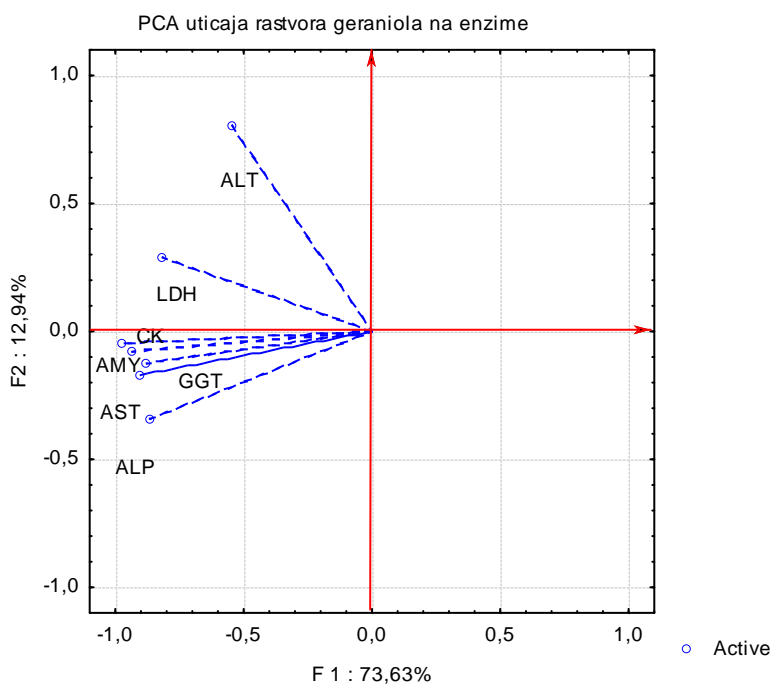
Slika 30. Grafički prikaz svojstvenih vrednosti za primenu Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora geraniola na sedam enzima u N i H-serumu

Kako je totalna varijansa (izražena u %) u opadajućem nizu od prvog do sedmog faktora (Tabela 56.) tako je i linija na Slici 30. opadajuća. Najveći pad linija ima između prvog i drugog faktora, od drugog do četvrtog blago opada, dok je posle četvrtog faktora denivelacija zanemarljiva, gotovo da ne postoji. Zbog toga je moguće pojednostavljenje polaznih sedam varijabli na dve nove čime se omogućava objašnjenje 86,56% ukupnog varijabiliteta. To je razlog zašto će se u daljoj analizi komentarisati samo faktorska opterećenja prvog i drugog faktora, premda su u Tabeli 57. prikazana opterećenja svih 7 faktora za sve varijable (kliničke enzime).

U Tabeli 57. uočljivo je da prvi faktor ima visoko faktorsko opterećenje negativnog predznaka na svim varijablama i ono se kreće od ALT (-0,54) do CK (-0,97), što znači da je negativno koreliran sa svim enzimima. Klinički enzimi CK, AMY, GGT, AST i ALP imaju negativan predznak faktorskog opterećenja drugog faktora. Ostali enzimi (LDH i ALT) imaju pozitivan predznak faktorskog opterećenja drugog faktora. Ako se diskutovane vrednosti prikažu grafički (Slika 31.), u odnosu na faktore 1 i 2, jasno se uočava da su enzimi koji imaju oba negativna faktorska opterećenja smešteni u jedan odsečak PCA dijagrama. Enzimi sa pozitivnim drugim faktorskim opterećenjem (LDH i ALT) nalaze se u drugom odsečku PCA dijagrama na Slici 31.

Tabela 57. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora geraniola na sedam enzima u H i N-serumu

Faktorske koordinate varijabli							
Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
CK	-0,97	-0,04	0,06	-0,09	0,09	0,04	0,13
LDH	-0,81	0,28	0,41	0,26	0,04	-0,03	-0,05
ALP	-0,86	-0,34	0,21	-0,23	0,10	0,11	-0,07
GGT	-0,88	-0,12	-0,31	0,22	0,23	-0,02	-0,03
AST	-0,90	-0,17	-0,14	0,11	-0,31	0,14	-0,03
ALT	-0,54	0,80	-0,14	-0,15	0,04	0,06	-0,02
AMY	-0,93	-0,08	-0,04	-0,13	-0,12	-0,28	-0,01



Slika 31. PCA dijagram uticaja vodenih i DMSO rastvora geraniola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

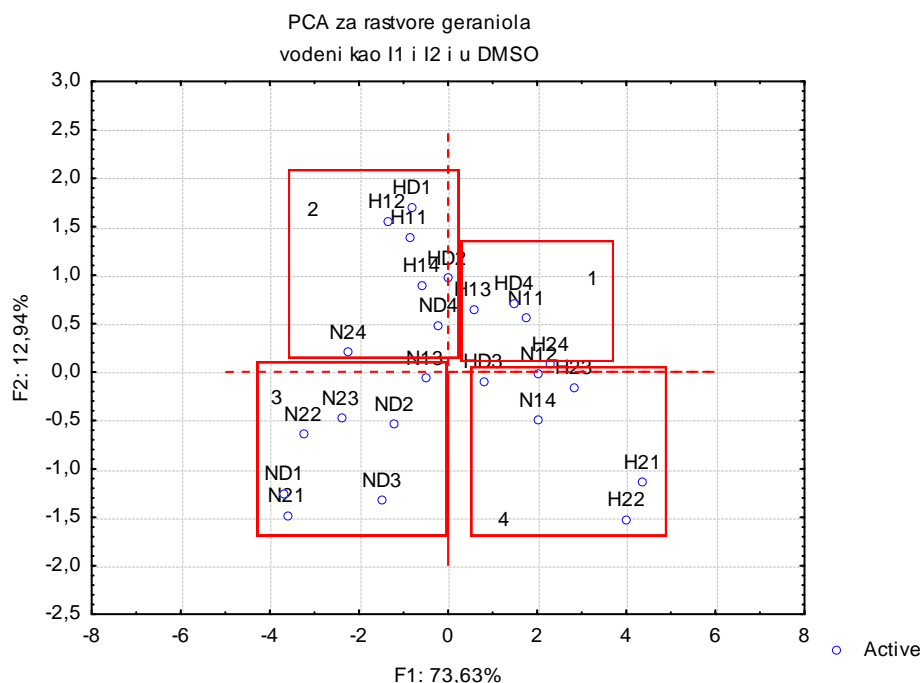
Tabela 58. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora geraniola i vrstu seruma

Koordinate faktora slučaja na osnovu korelacije							
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
N ₁₁	1,76	0,55	-0,27	-0,32	-0,86	-0,36	-0,20
N ₁₂	2,04	-0,01	-0,68	-0,36	-0,28	-0,43	0,30
N ₁₃	-0,51	-0,06	0,08	-0,33	-0,08	0,07	-0,04
N ₁₄	2,02	-0,49	-0,83	0,39	-0,41	-0,53	-0,03
N ₂₁	-3,61	-1,47	0,03	0,70	0,14	-0,17	-0,04
N ₂₂	-3,24	-0,64	-0,47	-0,11	0,08	0,14	-0,16
N ₂₃	-2,40	-0,47	0,30	-0,34	0,33	-0,16	0,03
N ₂₄	-2,23	0,20	1,24	-0,32	-0,91	0,01	0,33
H ₁₁	-0,86	1,39	-0,18	0,17	-0,15	0,07	-0,22
H ₁₂	-1,36	1,55	-0,18	-0,01	0,08	0,18	0,01
H ₁₃	0,56	0,65	-0,06	0,78	0,19	-0,41	0,23
H ₁₄	-0,59	0,89	0,03	0,34	0,03	-0,21	-0,02
H ₂₁	4,37	-1,16	0,50	0,23	0,60	-0,10	0,16
H ₂₂	4,00	-1,52	0,47	0,25	0,26	0,46	-0,06
H ₂₃	2,83	-0,16	0,25	-0,43	0,12	0,11	-0,13
H ₂₄	2,30	0,08	-0,17	-0,57	0,04	-0,02	-0,24
ND ₁	-3,67	-1,24	-0,03	0,61	0,14	-0,12	-0,10
ND ₂	-1,16	-0,54	-1,21	-0,31	-0,13	0,56	0,22
ND ₃	-1,47	-1,32	0,53	-0,89	-0,22	-0,16	-0,07
ND ₄	-0,20	0,48	0,88	-0,41	0,25	0,39	0,03
HD ₁	-0,79	1,70	-0,03	-0,11	0,79	0,28	0,07
HD ₂	-0,02	0,96	0,18	-0,16	0,74	-0,65	-0,03
HD ₃	0,79	-0,09	-1,19	0,12	-0,06	0,61	0,07
HD ₄	1,48	0,71	0,83	1,12	-0,70	0,44	-0,09

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C1-C4; D - rastvor terpena u DMSO.

Vrednosti PCA za slučajeve prikazane su u Tabeli 58. Pozitivno faktorsko opterećenje prvog faktora imaju vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem za N serum (sa izuzetkom rastvora N₁₃) i vodeni rastvor pripremljen ultrazvučnim mešanjem za H-serum. Negativna faktorska opterećenja prvog faktora imaju vodeni rastvori za H-serum (sa izuzetkom H₁₃), pripremljeni ručnim mešanjem, kao i vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno za N-serum i DMSO rastvori za N i H-serum (sa izuzetkom HD₁ i HD₂). Rastvori u DMSO za H-serum je karakterističan po tome što ima pozitivna faktorska opterećenja drugim faktorom (sa izuzetkom HD₃), kao i vodeni rastvor ručno mešan za H-serum. Negativno opterećenje drugog faktora imaju vodeni rastvori pripremljeni ručno i ultrazvučno za N-serum (sa izuzetkom N₁₁ i N₂₄), kao i ultrazvučno pripremljen vodeni rastvor za H-serum (sa izuzetkom H₂₄). Osim pomenutih, negativna opterećenja drugog faktora ima još i DMSO rastvor za N-serum (sa izuzetkom ND₄).

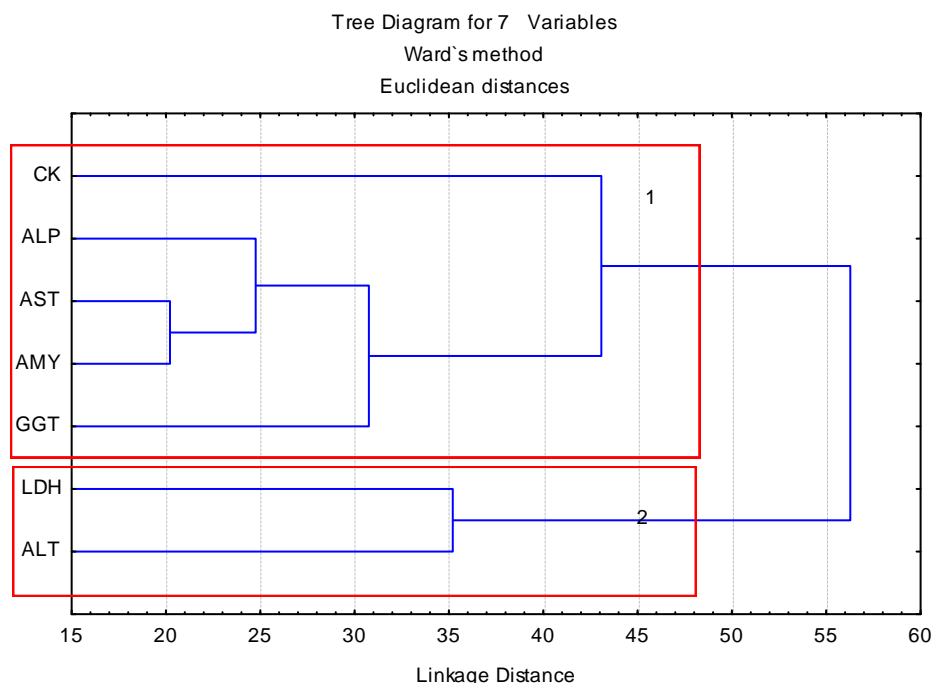
Grupisanost rastvora geraniola na osnovu načina pripreme vodenih rastvoraili vrste seruma ili vrste rastvarača, a u pogledu delovanja na sedam kliničkih enzima ne postoji (Slika 32.).



Slika 32. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva vodenih i DMSO rastvora geraniola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Područje 1 sa Slike 32. čine četiri rastvora koja imaju oba pozitivna znaka faktorskih opterećenja: N₁₁, H₁₃, H₂₄ i HD₄. Područje 2 čini sedam rastvora i vodenih i DMSO, za obe vrste seruma: N₂₄, H₁₁, H₁₂, H₁₄, ND₄, HD₁ i HD₂, a koji imaju negativan predznak prvog i pozitivan drugog faktorskog opterećenja. Područje 3 se takođe sastoji od sedam rastvora sa oba negativna predznaka. U ovoj grupi su i vodenih i DMSO rastvori, ali samo za N-serum: N₁₃, N₂₁, N₂₂, N₂₃, ND₁, ND₂ i ND₃. Poslednja, grupa 4 sadrži rastvore pozitivnog prvog i negativnog drugog opterećenja, pet vodenih N₁₂, N₁₄, H₂₁, H₂₂ i H₂₃ i jedan DMSO rastvor HD₃.

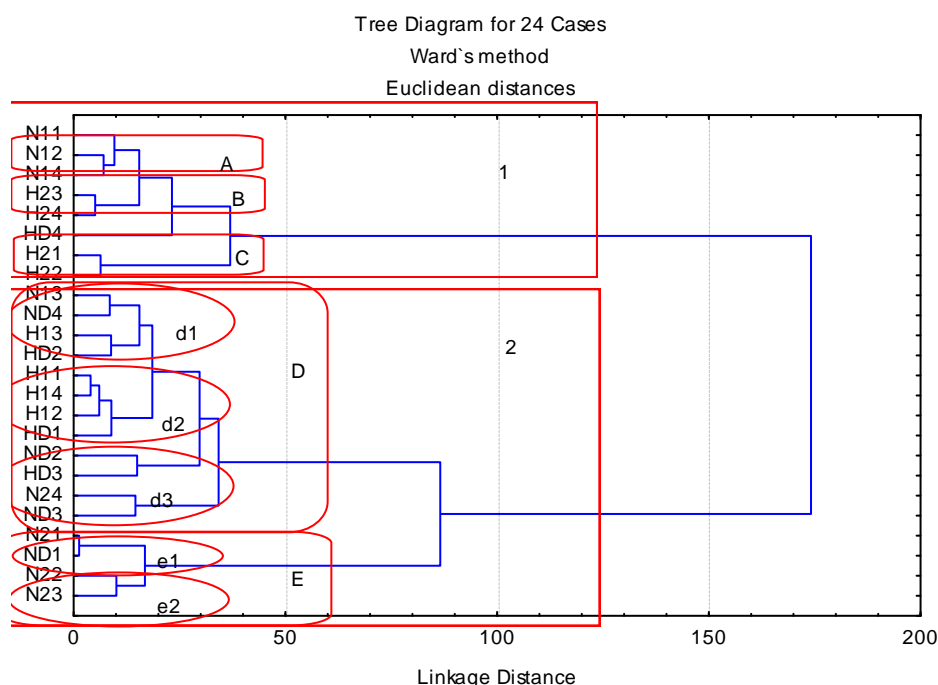
Klaster analiza urađena primenom Vardove metode prikazana je na Slici 36. sa koje se može uočiti da ALT i LDH, enzimi koji su se izdvojili pri PCA analizi sa pozitivnim faktorskim opterećenjem drugog faktora, i pri HCA predstavljaju jedan klaster (2) jer pokazuju veliku sličnost. Sličnost pokazuju i enzimi AST i AMY, koji su potklaster u klasteru 1 koji čine zajedno sa CK, ALP i GGT. Enzim CK koji je ostvario najveće rastojanje na dendogramu pokazuje i najveću inhibiciju rastvorima geraniola.



Slika 33. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora geraniola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Ako se rastvori geraniola podvrgnu HCA dobija se dendogram prikazan na Slici 36. Na njemu se mogu uočiti dva klastera. Klaster 1 se sastoji od osam rastvora, od koji sličnost pokazuju potklasteri N₁₂/N₁₄ (A) H₂₃/H₂₄ (B) kao i H₂₁/H₂₂ (C). U klasteru 1 nalaze se i

pojedinačni rastvori: N₁₁ i HD₄. Klaster 2 se sastoji od 16 rastvora koji su organizovani kroz dva potklastera. Prvi potklaster (D) karakterističan je po tri potpotklastera. Prvi potpotklaster (d₁) ima dva para rastvora istog rastojanja: N₁₃/ND₄, i H₁₃/HD₂, dok drugi (d₂) ima par rastvora H₁₁/H₁₄, kao i dva pojedinačna H₁₂ i HD₁. Treći potpotklaster (d₃) ima četiri rastvora, takođe organizovanih u dva para rastvora istog rastojanja: ND₂/HD₃ kao i N₂₄/ND₃. Drugi potklaster (E) klastera 2 se sastoji od dva para rastvora: (e₁) N₂₁/ND₁ i (e₂) N₂₂/N₂₃, od kojih N₂₁/ND₁ ima najmanje rastojanje na dendogramu.



Slika 34. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora geraniola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

4.2.5. Zajednički uticaj vodenih i DMSO rastvora karvakrola, nerola, linalola i geraniola na aktivnost ispitivanih enzima

Statistička obrada svih rezultata (Tabele 15. - 42.) delovanja vodeih rastvora četiri terpena: karvakrola, linalola, nerola i geraniola pripremljenih u četiri koncentracije (C₁-C₄), na dva načina (I₁ i I₂), kao i DMSO rastvora navedenih terpena na sedam ispitivanih enzima u dve vrste seruma (N i H-serum) počinje izradom korelacione matrice (Tabela 59.). Korelaciona matrica sadrži faktorska opterećenja za svaku varijablu na svakom faktoru.

Svih sedam varijabli mogu da budu uključene u analizu na osnovu teorijskih postavki (Kinneer & Gray, 1994), pošto se iz korelacione matrice može uočiti da svaka varijabla ima

sve koeficijente korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3. Preračunate svojstve vrednosti (eigenvalues) su predstavljene u Tabeli 60.

Tabela 59. Korelaciona matrica uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola na sedam enzima u N i H-serumu

Enzim	CK	LDH	ALP	GGT	AST	ALT	AMY
CK	1,00						
LDH	0,35	1,00					
ALP	0,74	0,45	1,00				
GGT	0,65	0,38	0,54	1,00			
AST	0,54	0,50	0,70	0,48	1,00		
ALT	0,51	0,61	0,44	0,50	0,51	1,00	
AMY	0,67	0,69	0,78	0,54	0,73	0,62	1,00

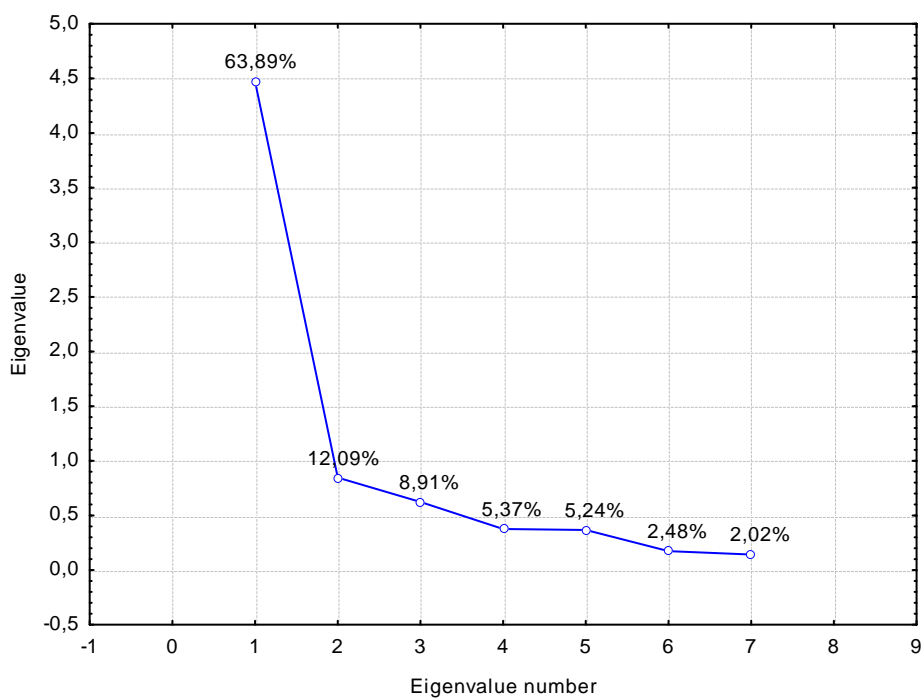
Prvi faktor se može posmatrati kao najbolji rezime linearnih odnosa prikazanih u podacima. Drugi faktor se definiše kao druga najbolja linearna kombinacija varijabli, i on mora da bude ortogonalan u odnosu na prvi faktor. Da bi se to postiglo, drugi faktor se mora izvesti iz varijanse koja preostaje nakon što je prvi faktor ekstrahovan.

U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prvog faktora je 4,47. To znači da prvi faktor ima je 4,47 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardiziranih varijabli, tako da objašnjava 63,89% varijanse među varijablama. Druga svojstvena vrednost od 0,84 ukazuje da drugi faktor ima varijansu samo 0,84 od varijance originalnih standardizovanih varijabli, te se njime može da objasni 12,08 % varijanse među varijablama. Preostale glavne komponente – faktori objašnjavaju još manji deo ukupne varijanse.

Broj faktora kojima je moguće objasniti ukupni varijabilitet može se odrediti i grafički (Slika 35.). Kriterijum screen testa omogućava da se odredi optimalan broj faktora koje treba izdvojiti pre nego specifična varijansa počne da dominira nad zajedničkom. Ovakvim pristupom najpre se ekstrahujuse kombinacije varijabli koje objašnjavaju najveći obim varijanse, a onda produžava na kombinacije koje objašnjavaju sve manje i manje obime varijanse.

Tabela 60. Svojsstvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola na sedam enzima u N i H serumu

Svojsstvene vrednosti korelacione matrice				
	Svojsstvena vrednost	Totalna varijansa %	Kumulativne svojsstvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	4,47	63,89	4,47	63,89
2	0,84	12,08	5,31	75,97
3	0,62	8,90	5,94	84,88
4	0,37	5,37	6,31	90,26
5	0,36	5,24	6,68	95,50
6	0,17	2,47	6,85	97,97
7	0,14	2,02	7,00	100,00



Slika 35. Grafički prikaz svojsstvenih vrednosti za primenu Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola na sedam enzima u N i H-serumu

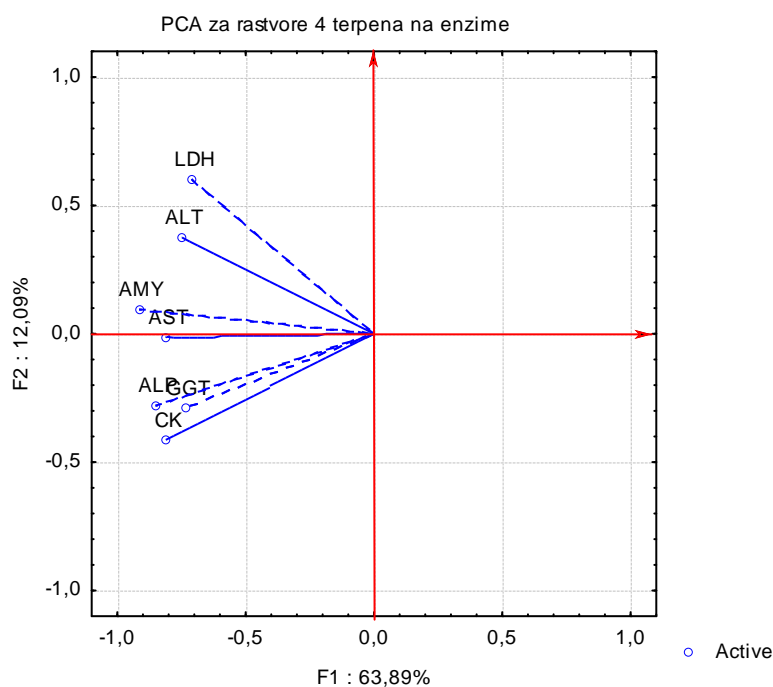
Prva četiri faktora, što odgovara teorijskim postavkama (Cattell, 1966; Kaiser, 1958), daju udeo objašnjene varijanse od 90,26%, mada se i korišćenjem prva dva faktora dobijaju vrlo zadovoljavajuća objašnjenja (75,97%). U Tabeli 61. prikazana su sva faktorska opterećenja.

Tabela 61. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola na sedam enzima u H i N-serumu

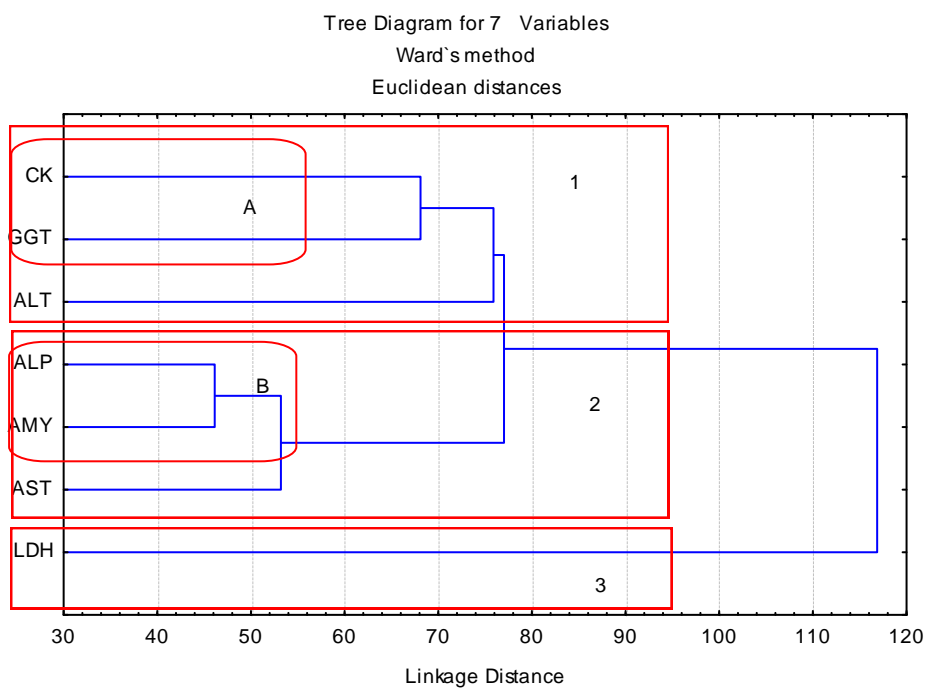
Faktorske koordinate varijabli							
Variable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
CK	-0,81	-0,41	-0,12	-0,06	0,29	-0,25	-0,02
LDH	-0,71	0,60	0,01	0,32	0,04	-0,10	-0,12
ALP	-0,85	-0,27	0,29	0,06	0,13	0,24	-0,16
GGT	-0,73	-0,29	-0,48	0,21	-0,30	0,06	0,01
AST	-0,80	-0,01	0,35	-0,22	-0,39	-0,12	-0,03
ALT	-0,74	0,37	-0,34	-0,39	0,08	0,10	-0,01
AMY	-0,91	0,09	0,19	0,09	0,09	0,05	0,31

Faktorska opterećenja predstavljaju korelaciju svake varijable i faktora pri čemu je veća opterećenja čine varijablu boljim reprezentom faktora. Iz toga proizilazi da su faktorska opterećenja pokazatelji stepena korespondentnosti između varijable i faktora. Iz Tabele 61. je uočljivo da svi enzimi pokazuju negativno opterećenje prvog faktora, kao i u slučaju multivarijantne statističke analize rezultata delovanja svakog terpena pojedinačno na ispitivane enzime

Vrednosti faktorskih opterećenja negativnog predznaka na svim varijablama se kreću od -0,71 za enzim LDH do -0,91 za enzim AMY. Negativni predznak faktorskog opterećenja drugog faktora imaju svi enzimi osim LDH, ALT i AMY koji imaju pozitivan predznak. Zbog toga su na grafičkom prikazu (Slika 38.), enzimi AMY, ALT i LDH, raspoređeni iznad y-ose, dok su preostala četiri enzima (CK, ALP, GGT i AST) koja imaju oba negativna opterećenja raspoređena ispod y ose PCA dijagrama.



Slika 36. PCA dijagram za vodene i DMSO rastvore karvakrola, linalola, nerola i geraniola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima



Slika 37. HCA dendrogram uticaja vodenih i DMSO rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola u odnosu na aktivnost ispitivanih enzima

Ako se na variable primeni klaster analiza (Slika 37.) primenom Vardove metode, uočava se postojanje tri klastera nejednaka po broju enzima koji obuhvataju. Prvi i drugi klaster obuhvataju po tri enzima dok je treći klaster predstavljen samo jednim enzimom – LDH. Najveća sličnost u pogledu delovanja uzoraka četiri terpena na ispitivane kliničke enzime je kod ALP i AMY (B), jer je povezivanje ova dva enzima izvršeno na najnižem rastojanju (linkage distance 47). Navedenom potklasteru se priključuje i enzim AST gradeći pri tome klaster koji se odlikuje najvećom sličnošću u pogledu uticaja ispitivanih terpena. I prvi klaster obuhvata tri enzima, pri čemu CK i GGT (A) predstavljaju potklaster kojem se na rastojanju od 75 priključuje enzim ALT. Enzim LDH kao samostalni klaster postoji zbog najveće inhibicije zabeležene u ovom istraživanju bilo kojom vrstom rastvora, na bilo koji način pripremljen i za bilo koju vrstu seruma.

U Tabeli 62. prikazana su faktorska opterećenja za 96 slučajeva (vrsta seruma N ili H, vodeni ili DMSO rastvor, način pripreme vodenog rastvora 1 ili 2 i koncentracija rastvora 1-4, kao i odgovarajući terpen).

Tabela 62. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora karvakrola, linalola, nerola i geraniola i vrstu seruma

Koordinate faktora slučajeva na osnovu korelacije							
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6	Faktor 7
KN ₁₁	1,02	0,44	0,79	-0,20	0,07	-0,19	0,19
KN ₁₂	2,26	0,31	0,92	0,41	-0,37	-0,23	0,89
KN ₁₃	2,57	0,39	0,28	-0,66	-0,01	-0,02	-0,16
KN ₁₄	0,18	0,37	0,36	0,01	-0,04	0,09	0,67
KN ₂₁	-1,56	0,22	0,98	-0,58	-1,03	0,72	0,11
KN ₂₂	-0,81	-0,38	0,93	0,10	-0,54	-0,04	0,07
KN ₂₃	-0,17	0,28	1,32	-0,84	0,27	1,06	0,17
KN ₂₄	-0,25	-0,05	2,11	0,04	-0,49	-0,03	0,39
KH ₁₁	-1,70	-0,01	-0,32	-0,22	-0,16	0,19	-0,17
KH ₁₂	-0,29	-0,07	-0,53	-0,39	-0,54	-0,12	-0,33
KH ₁₃	2,54	0,36	-0,93	0,42	0,83	0,18	0,59
KH ₁₄	0,89	-0,57	0,67	0,85	-0,15	0,09	0,32

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

KH ₂₁	3,54	-0,12	0,24	0,17	-0,08	0,83	-0,50
KH ₂₂	5,59	0,35	0,02	0,58	-0,45	0,22	0,20
KH ₂₃	4,91	-0,06	0,40	0,62	-0,12	0,85	-0,32
KH ₂₄	3,00	-0,46	-0,35	0,76	0,06	0,35	-0,01
KND ₁	-1,13	0,09	0,68	-0,24	-0,68	0,79	-0,10
KND ₂	-1,00	0,27	1,30	-1,10	0,08	0,06	0,30
KND ₃	-0,39	-0,13	1,55	-0,71	-1,19	0,75	-0,30
KND ₄	0,72	0,50	1,33	-0,44	0,05	-0,24	0,77
KHD ¹	-0,48	0,25	-0,22	-0,63	0,86	0,02	0,32
KHD ²	0,29	-0,08	-0,27	-0,96	-0,33	-0,34	-0,01
KHD ₃	-0,31	-0,62	0,50	0,20	-0,82	0,55	-0,08
KHD ₄	1,49	-0,20	-0,81	1,76	-0,23	0,35	-0,82
LN ₁₁	1,96	0,43	0,32	-0,94	0,15	-0,16	0,62
LN ₁₂	2,17	-0,28	-0,17	-0,69	0,28	-0,35	0,71
LN ₁₃	-0,28	-0,72	0,20	-0,29	0,19	-0,12	-0,09
LN ₁₄	2,13	-0,29	-0,19	-0,29	-0,60	-0,32	0,78
LN ₂₁	-3,34	-2,01	0,19	0,95	-1,08	-0,46	-0,09
LN ₂₂	-3,04	-1,82	0,01	0,14	-0,75	-0,16	-0,07
LN ₂₃	-2,11	-1,42	0,13	0,33	0,24	-0,10	-0,11
LN ₂₄	-1,79	-0,29	1,28	-0,37	0,62	-0,80	-0,25
LH ₁₁	-0,52	0,07	-0,59	-0,56	-0,19	-0,33	-0,01
LH ₁₂	-1,00	-0,14	-0,77	-0,59	0,05	-0,44	-0,12
LH ₁₃	0,91	0,01	-0,89	0,05	-0,11	-0,66	0,25
LH ₁₄	-0,23	-0,08	-0,57	-0,16	-0,04	-0,42	0,09
LH ₂₁	4,48	-0,28	-0,05	0,23	0,79	0,10	-0,24
LH ₂₂	4,05	-0,51	0,46	0,02	0,31	0,15	-0,65
LH ₂₃	2,96	-0,09	0,15	-0,47	0,78	0,25	-0,19
LH ₂₄	2,42	-0,15	-0,02	-0,61	0,56	0,31	0,09
LND ₁	-3,40	-1,93	0,11	0,84	-1,06	-0,41	-0,10
LND ₂	-1,11	-1,69	-0,14	-0,67	-0,76	-0,46	-0,01
LND ₃	-1,29	-1,47	1,20	0,09	0,50	0,14	-0,03
LND ₄	0,12	-0,33	0,17	-0,28	0,94	-0,08	-0,69

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

LHD ₁	-0,42	-0,23	-1,28	-0,39	0,54	-0,21	-0,40
LHD ₂	0,32	-0,16	-0,98	0,15	0,81	0,05	0,28
LHD ₃	0,87	-0,93	-0,52	-0,78	-0,74	-0,39	-0,08
LHD ₄	1,86	0,85	0,26	-0,44	-0,29	-0,76	-0,58
NN ₁₁	1,02	0,44	0,79	-0,20	0,07	-0,19	0,19
NN ₁₂	2,26	0,31	0,92	0,41	-0,37	-0,23	0,89
NN ₁₃	2,57	0,39	0,28	-0,66	-0,01	-0,02	-0,16
NN ₁₄	0,18	0,37	0,36	0,01	-0,04	0,09	0,67
NN ₂₁	-1,50	0,22	0,98	-0,58	-1,03	0,72	0,11
NN ₂₂	-0,81	-0,34	0,93	0,10	-0,54	-0,04	0,07
NN ₂₃	-0,17	0,28	1,32	-0,84	0,27	1,06	0,17
NN ₂₄	-0,25	-0,05	2,11	0,04	-0,41	-0,03	0,39
NH ₁₁	-1,70	-0,01	-0,37	-0,22	-0,16	0,19	-0,17
NH ₁₂	-0,29	-0,07	-0,53	-0,39	-0,54	-0,12	-0,33
NH ₁₃	2,54	0,36	-0,93	0,42	0,83	0,18	0,59
NH ₁₄	0,89	-0,57	0,67	0,85	-0,15	0,09	0,32
NH ₂₁	3,54	-0,12	0,24	0,17	-0,08	0,83	-0,50
NH ₂₂	5,59	0,35	0,02	0,58	-0,45	0,22	0,20
NH ₂₃	4,91	-0,06	0,40	0,62	-0,12	0,85	-0,32
NH ₂₄	3,00	-0,46	-0,32	0,76	0,06	0,35	-0,01
NND ₁	-1,17	0,09	0,68	-0,29	-0,68	0,796	-0,10
NND ₂	-1,00	0,27	1,30	-1,10	0,08	0,06	0,30
NND ₃	-0,39	-0,13	1,55	-0,71	-1,19	0,75	-0,30
NND ₄	0,72	0,50	1,33	-0,44	0,05	-0,24	0,77
NHD ₁	-0,48	0,25	-0,26	-0,63	0,86	0,02	0,32
NHD ₂	0,29	-0,08	-0,27	-0,96	-0,34	-0,34	-0,01
NHD ₃	-0,31	-0,62	0,50	0,20	-0,82	0,55	-0,08
NHD ₄	1,49	-0,20	-0,81	1,76	-0,23	0,35	-0,82
GN ₁₁	1,96	0,43	0,32	-0,94	0,15	-0,16	0,62
GN ₁₂	2,17	-0,28	-0,17	-0,69	0,28	-0,35	0,71
GN ₁₃	-0,28	-0,72	0,20	-0,29	0,19	-0,12	-0,09
GN ₁₄	2,13	-0,29	-0,19	-0,29	-0,60	-0,32	0,78

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

GN ₂₁	-3,34	-2,01	0,19	0,95	-1,08	-0,46	-0,09
GN ₂₂	-3,04	-1,82	0,01	0,14	-0,75	-0,16	-0,07
GN ₂₃	-2,11	-1,42	0,13	0,33	0,24	-0,10	-0,11
GN ₂₄	-1,79	-0,29	1,28	-0,37	0,62	-0,80	-0,25
GH ₁₁	-0,52	0,07	-0,59	-0,56	-0,19	-0,33	-0,01
GH ₁₂	-1,00	-0,15	-0,77	-0,59	0,05	-0,44	-0,12
GH ₁₃	0,91	0,01	-0,89	0,05	-0,11	-0,66	0,25
GH ₁₄	-0,23	-0,08	-0,57	-0,16	-0,04	-0,42	0,09
GH ₂₁	4,48	-0,28	-0,05	0,23	0,79	0,10	-0,24
GH ₂₂	4,05	-0,51	0,46	0,02	0,31	0,15	-0,65
GH ₂₃	2,96	-0,09	0,15	-0,47	0,78	0,25	-0,19
GH ₂₄	2,42	-0,15	-0,02	-0,61	0,56	0,31	0,09
GND ₁	-3,45	-1,93	0,11	0,84	-1,06	-0,41	-0,10
GND ₂	-1,11	-1,69	-0,14	-0,67	-0,76	-0,46	-0,01
GND ₃	-1,29	-1,47	1,20	0,09	0,50	0,14	-0,03
GND ₄	0,12	-0,33	0,17	-0,28	0,94	-0,08	-0,69
GHD ₁	-0,42	-0,23	-1,28	-0,39	0,54	-0,21	-0,40
GHD ₂	0,32	-0,16	-0,98	0,15	0,81	0,05	0,28
GHD ₃	0,87	-0,93	-0,52	-0,78	-0,79	-0,39	-0,08
GHD ₄	1,86	0,85	0,26	-0,44	-0,29	-0,76	-0,58

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C₁-C₄; D - rastvor terpena u DMSO; K – karvakrol; L – linalool; N – nerol; G – geraniol.

Na osnovu podataka iz Tabele 62., uočeno je da vodeni rastvori karvakrola pripremljeni ručnim mešanjem u N-serumu pokazuju pozitivna opterećenja i prvog i drugog faktora. Vodeni rastvori karvakrola pripremljeni ultrazvučno u N-serumu imaju negativna opterećenja oba faktora (izuzetak KN₂₁ i KN₂₃) kao i ručno mešani vodeni rastvori karvakrola u H-serumu i DMSO rastvori u H-serumu. Izuzetak su rastvori KH₁₃, KH₁₄, KHD₂, KHD₄ i KHD₁. Ultrazvučno mešani rastvori karvakrola u H-serumu pokazuju pozitivno opterećenje prvog, a negativno drugog faktora (sa izuzetkom KH₂₂), DMSO rastvori u N-serumu imaju negativan predznak prvog faktora (izuzetak KND₄) a pozitivandrugog faktora (izuzetak KND₃).

Za rastvore linalola (Tabela 62.) karakteristično je da negativna opterećenja oba faktora pokazuju vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno u N-serumu i DMSO rastvori za N-serum (izuzetak LND₄). Pozitivno opterećenje prvog, a negativno drugog faktora imaju vodeni rastvori ručno mešani u N-serumu (sa izuzetkom LN₁₃ i LN₁₁), zatim vodeni rastvor pripremljen ultrazvučno u H-serumu i DMSO rastvor u H-serumu (izuzetak LHD₁ i LHD₄). Negativno opterećenje prvog, a pozitivno drugog faktora ima vodeni rastvor ručno mešan u H-serumu (bez LH₁₃, LH₁₂ i LH₁₄).

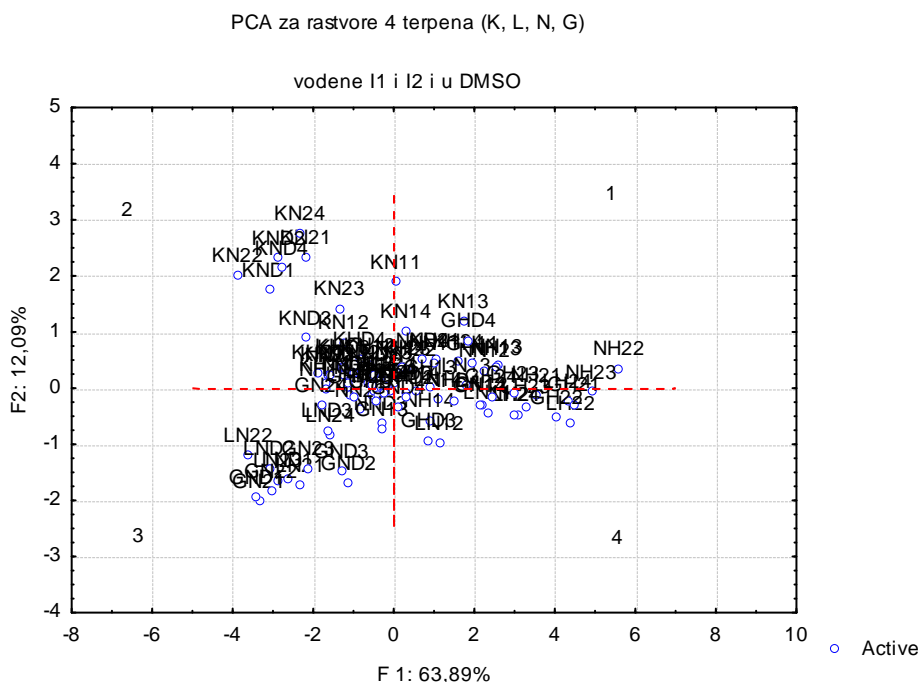
Rastvori nerola (Tabela 62.) prikazani su kroz sledeće rezultate: pozitivna faktorska opterećenja prvog i drugog faktora imaju vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem u N-serumu, dok oba negativna opterećenja imaju DMSO rastvori i u N i H-serumu (sa izuzecima NND₄, NHD₂, NHD₄, NND₁ i NHD₁), kao i vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno u N-serumu (izuzetak NN₂₁ i NN₂₃) i vodeni rastvori pripremljeni ručno u H-serumu (bez NH₁₃ i NH₁₄). Vodeni rastvor u H-serumu pripremljen ultrazvučno ima pozitivno opterećenje prvog a negativno drugog faktora (sa izuzetkom NH₂₂).

Rastvori geraniola u Tabeli 62. pokazuju sledeća faktorska opterećenja: oba negativna imaju vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučno i DMSO rastvori u N-serumu (bez GND₄), kao i vodeni rastvori pripremljeni ručnim mešanjem u H-serumu (bez GH₁₃ i GH₁₁). Prvo pozitivno a drugo negativno faktorsko opterećenje pokazuju sledeći rastvori: vodeni u N-serumu pripremljen ručno (bez GN₁₃ i GN₁₁), ultrazvučno pripremljen vodeni rastvor u H-serumu, kao i DMSO rastvor u H-serumu (bez GHD₁ i GHD₄).

Na Slici 38. grafički je predstavljeno 96 slučajeva iz Tabele 62, a grupisanost se uočava tek uvećavanjem pojedinih segmenata grafičkog prikaza.

U području grafika br. 1, nalazi se 19 rastvora, u području br. 2 je 26, u području br. 3 je 28, dok je u području br. 4 smešteno 23 rastvora. Rastvori karvakrola su smešteni u području br. 1 i 2, tako što su u području br. 1 vodeni rastvori ručno mešani za N-serum i ultrazvučno za H-serum, dok su u području br. 2 svi ostali vodeni i DMSO rastvori karvakrola. Slično su raspoređeni i rastvori linalola: Vodeni rastvori linalola ultrazvučno mešani za N-serum nalaze se u području br. 3, zajedno sa DMSO rastvorima linalola za obe vrste seruma, dok se u području br. 4 nalaze vodeni rastvori linalola za N-serum ručno mešani i ultrazvučno za H-serum. Rastvori geraniola se nalaze u područjima br. 1, 3 i 4. DMSO i ultrazvučno mešani vodeni rastvori geraniola za N-serum su u području br. 3, a DMSO i vodeni ultrazvučno mešani rastvori za H-serum su u području br. 4. Rastvori geraniola prisutni su i u području br. 1. Ručno mešani vodeni rastvori nerola u N-serumu su u

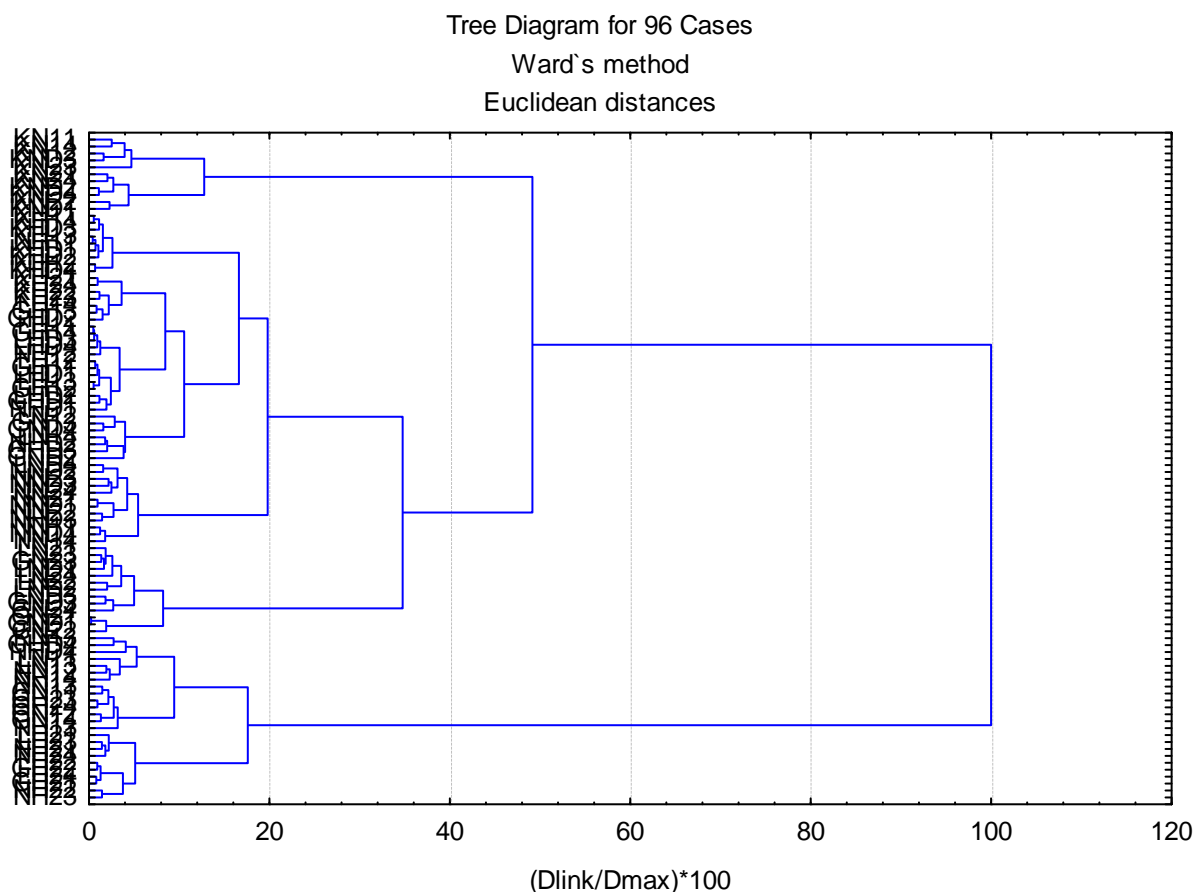
području br. 1, a ultrazvučno mešani u H-serumu u području br. 4., dok su ostali rastvori raspoređeni u područjima br. 2 i 3.



Slika 38. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva za vodene i DMSO rastvore karvakrola, linalola, nerola i geraniola

Klaster analiza vodenih (pripremljenih ručnim i ultrazvučnim mešanjem) i DMSO rastvora karvakrola (K), linalola (L), nerola (N) i geraniola (G) u serumima normalne (N) i povećane aktivnosti (H) prikazana je na Slici 41. na kojoj se uočavaju dva klastera od kojih prvi ima sadrži 72 rastvora dok je u drugom klasteru 24 rastvora.

Prvi klaster se sastoji od dva potklastera od kojih prvi ima 11 rastvora sa sličnostima između parova: KN_{11}/KN_{14} , KN_{12}/KND_3 , KN_{21}/KN_{24} , KND_2/KND_4 , KN_{22}/KND_1 i pojedinačnim KN_{23} . Može se reći da je ovo potklaster karvakrola. Drugi potklaster organizovan je kroz tri potpotklastera sa 36 rastvora u prvom, 12 u drugom i 13 u trećem potpotklasteru. Parovi rastvora koji pokazuju sličnost unutar prvog potpotklastera su: KH_{11}/KH_{14} , KH_{13}/NH_{11} , KH_{12}/KHD_4 , KH_{21}/KH_{24} , KH_{22}/KH_{23} , LH_{14}/GH_{13} , LH_{11}/GH_{14} , LH_{12}/GH_{11} , LH_{13}/GH_{12} , LHD_2/GHD_1 , GN_{13}/GND_4 i LN_{14}/NHD_2 . Ovaj klaster se može smatrati karvakrol/linalol potpotklasterom. U drugom potpotklasteru slični su rastvori: LND_4/LND_2 , NN_{23}/NHD_3 , NN_{21}/NND_1 , NN_{22}/NHD_3 i NN_{11}/NND_4 . Ovo je potpotklaster nerola. U trećem potpotklasteru (potklaster linalola) najmanje udaljenost, je između sledećih rastvora: LN_{23}/GN_{23} , LN_{22}/LND_2 , LND_3/GND_3 i GN_{21}/GND_1 .



Slika 39. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora karvakrola (K), linalola (L), nerola (N) i geraniola (G) u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Drugi klaster se takođe sastoji od dva potklastera, od kojih prvi ima 14, a drugi 10 rastvora. U prvom potklasteru drugog klastera parovi rastvora su: KN_{13}/GHD_4 , LN_{13}/NN_{12} , NN_{13}/GN_{11} , GH_{23}/GH_{24} i GN_{12}/GN_{14} . Drugi potklaster formira parove: LH_{23} i NH_{21} , LH_{22}/GH_{22} , LH_{24}/GH_{21} i NH_{22}/NH_{23} . Potklasteri drugog klastera su mešovitog tipa.

4.2.6. Zajednički uticaj vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na aktivnost amilaze

Ručno i ultrazvučno pripremani voden i DMSO rastvori terpena čiji je uticaj praćen samo na aktivnost enzima amilaze (mircen, β -pinen, citral, eukaliptol, terpineol, eugenol), bili su premet multivarijantne statističke analize

Hemometrijska analiza (analiza glavnih komponenata i klaster analiza) primenjena je na rezultate merenja procenta inhibicije amilaze u serumu sa normalnom (N) i povećanom aktivnošću (H) za četiri koncentracije ispitivanih terpena pripremljene kao vodeni rastvori ručnim (I₁) i ultrazvučnim mešanjem (I₂) i kao DMSO rastvori. Korišćena matrica sadrži 144 podatka (Tabele 39. - 42). Kao varijable posmatrani su terpeni, a kao slučajevi četiri ispitivane koncentracije DMSO i vodenih rastvora pripremljenih na dva načina u N i H-serumu.

Prvi korak u analizi glavnih komponenata je standardizacija originalnih varijabli, odnosno transformacija podataka u seriju koja ima aritmetičku sredinu jednaku nuli i standardnu devijaciju jednaku jedinici.

Tabela 63. Korelaciona matrica uticaja vodenih rastvora i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na enzimAMY u N i H-serumu

Terpen	Mircen	β -pinen	Citral	Eukaliptol	Terpineol	Eugenol
Mircen	1,00					
β -pinen	0,67	1,00				
Citral	-0,11	0,20	1,00			
Eukaliptol	0,71	0,75	0,22	1,00		
Terpineol	0,55	0,69	-0,19	0,43	1,00	
Eugenol	0,79	0,58	0,02	0,76	0,28	1,00

Korelaciona matrica pokazuje da svaka varijabla ima barem jedan koeficijent korelacije sa apsolutnom vrednošću većom od 0,3 (Tabela 63.), pa je zbog toga je svih šest varijabli uključeno u analizu.

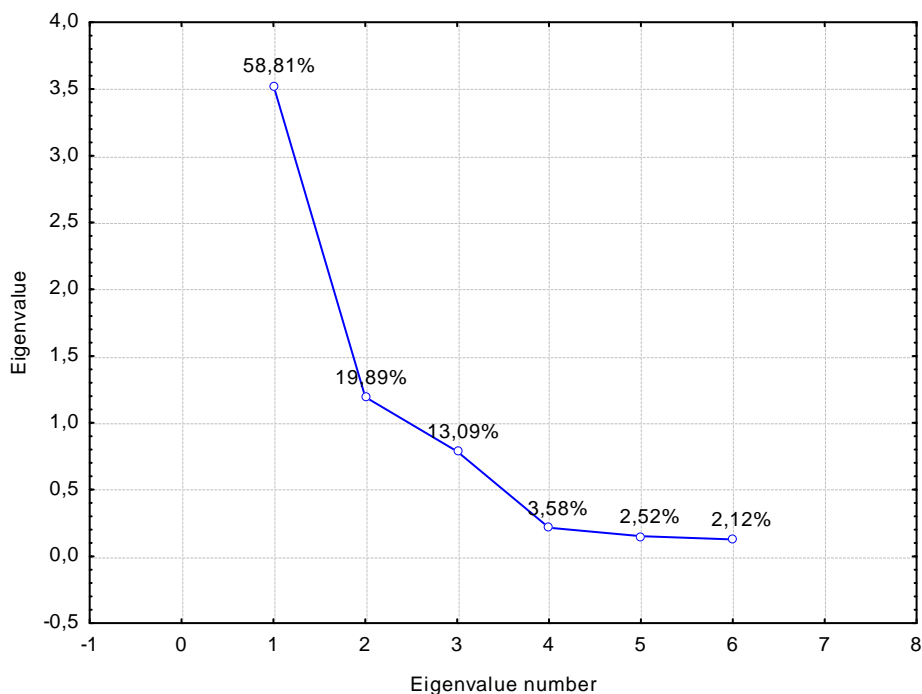
Nakon toga se prisupa izračunavanju svojstvenih vrednosti – eigen vrednosti koje su prikazane u Tabeli 64. Prvi faktor je opšti i gotovo svaka varijabla na njemu ima visoko opterećenje, dok svaki sledeći faktor objašnjava sve manji deo varijance. U posmatranoj analizi svojstvena vrednost prvog faktora je 3,52 što znači da prvi faktor ima je 3,52 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardiziranih varijabli pa se samo njime može objasniti 55,80% varijance među varijablama. Drugim faktorom se može objasniti 19,88 % varijance među varijablama jer ima 1,19 puta veću varijansu od varijanse originalnih standardiziranih varijabli. Treći faktor objašnjava 13,09 % ukupnog varijabiliteta podataka.

Iz Tabele 64. se uočava da prva dva faktora objašnjavaju 78,69% ukupnog varijabiliteta, dok ekstrahovanjem 4 faktora moguće je objasniti čak 95,36% varijabiliteta. Broj faktora kojima je moguće objasniti ukupan varijabilitet moguće je odrediti i grafički.

Tabela 64. Svojsvene vrednosti korelacione matrice uticaja vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na enzim AMY u N i H-serumu

Svojsvene vrednosti korelacione matrice i samo statistički aktivne promenjive				
	Svojsvena vrednost	Totalna varijansa %	Kumulativne svojsvene vrednosti	Kumulativna varijansa %
1	3,52	58,80	3,52	58,80
2	1,19	19,88	4,72	78,69
3	0,78	13,09	5,50	91,78
4	0,21	3,57	5,72	95,36
5	0,15	2,52	5,87	97,88
6	0,12	2,11	6,00	100,00

Slika 40. prikazuje dijagram (Screen test) kojim je grafički prikazan odnos broja izdvojenih faktora (glavnih komponenata) i pripadajućih svojsvenih vrednosti. Apscisa predstavlja redni broj faktora, a ordinata njegovu veličinu (svojsvenu vrednost). Broj glavnih komponenata koje se koriste za dalju analizu određen je tačkom na pregibu iza koje su svojsvene vrednosti male i koje se značajno ne razlikuju. Na grafiku se vidi da se linija izrazito oštro spušta nakon drugog faktora, te zatim laganije do broja od četiri izdvojena faktora. Nakon toga je denivelacija gotovo ujednačena, bez izrazitih pragova. Uzimajući u obzir navedena očitavanja sa grafičkog prikaza, optimalni broj faktora koji možemo zadržati iznosi šest. Vrlo zadovoljavajuća objašnjenja mogu se dobiti ekstrahovanjem samo prva 2 faktora. Naime, pojednostavljenje polaznih šest varijabli na dve nove omogućava objašnjenje 78,69% ukupnog varijabiliteta.



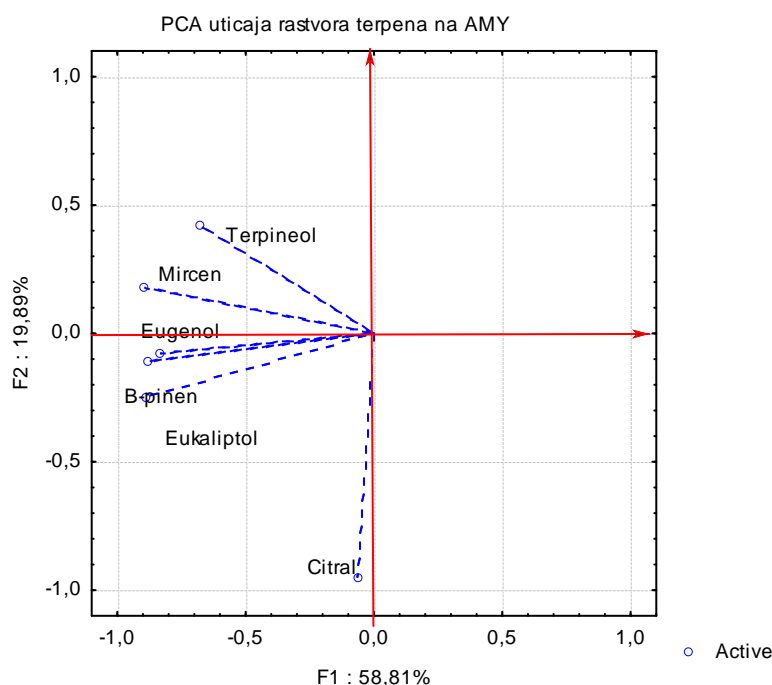
Slika 40. Grafički prikaz svojstvenih vrednosti primenom Screen test metoda ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na enzim AMY u N i H-serumu

Tabela 65. Faktorske koordinate varijabli ispitivanja uticaja vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola na enzim AMY u N i H-serumu

Faktorske koordinate varijabli						
Varijable	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
Mircen	-0,89	0,17	0,22	0,28	-0,10	-0,17
β -pinen	-0,88	-0,10	-0,33	-0,06	0,27	-0,11
Citral	-0,06	-0,95	-0,23	0,16	-0,06	0,04
Eukaliptol	-0,88	-0,24	0,10	-0,31	-0,18	-0,05
Terpineol	-0,67	0,42	-0,56	0,05	-0,11	0,16
Eugenol	-0,83	-0,07	0,48	0,04	0,11	0,22

Dalja statistička analiza podrazumeva PCA analizu, delovanja ispitivanih rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola u N i H-serumu na enzim AMY.

Vrednosti faktorskih opterećenja su prikazane u Tabeli 65. iz koje je uočljivo da svi terpeni pokazuju negativno opterećenje prvog faktora, što znači da je prva ekstrahovana glavna komponenta negativno korelisana sa svim terpenima (mircen -0,89, eukaliptol -0,88, β -pinen -0,88, eugenol -0,83, terpineol -0,67 citral -0,06). Negativno opterećenje drugog faktora zadržavaju svi osim mircena (0,17) i terpineola (0,42) koji imaju pozitivno opterećenje. Slika 41. prikazuje PCA dijagram na kome se kroz položaj svih varijabli prikazuje uticaj koji na enzimsku aktivnost AMY ispoljavaju svi ispitivani terpeni.



Slika 41. PCA dijagram uticaja vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenolau odnosu na aktivnost enzima AMY

Iz Tabele 66. u kojoj su prikazana faktorska opterećenja za slučajeve može se uočiti da rastvori bez obzira na vrstu rastvarača u kojem supripremani ili način mešanja (ako su u pitanju vodeni rastvori) pokazuju pozitivna faktorska opterećenja i prvog i drugog faktor kada su pripremljeni za delovanje u H-serumu. Izuzeci se javljaju kod prvog faktora za rastvore: H₁₂, H₁₄, H₂₄ i HD₄, dok su za drugi faktor izuzeci rastvori: H₁₂ i H₂₃.

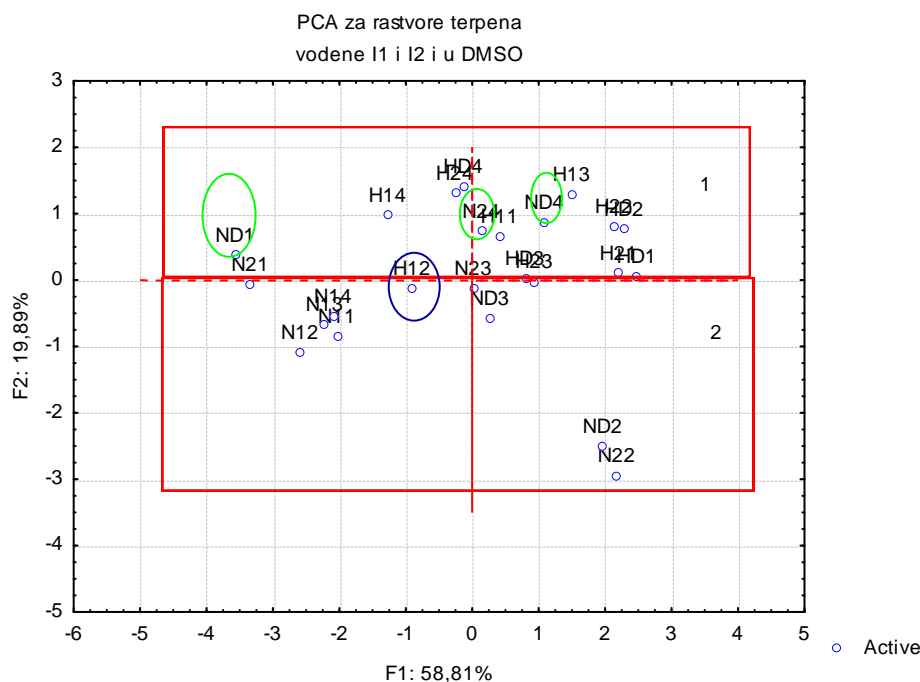
Rastvori koji su inhibirali aktivnost AMY u N-serumu imaju pozitivno opterećenje prvog i negativno opterećenje drugog faktora, ako su u pitanju DMSO ili vodeni rastvori pripremljeni ultrazvučnim mešanjem sa izuzecima rastvora N₂₁ i ND₁ za prvi, odnosno N₂₄, ND₁ i ND₄ za drugi faktor. Vodeni rastvori koji su pripremani ručnim mešanjem u N-serumu

Tabela 66. Faktorske koordinate slučajeva u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora terpena i vrstu seruma

Koordinate faktora slučaja na osnovu korelacije						
Slučajevi	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4	Faktor 5	Faktor 6
N ₁₁	-2,03	-0,84	-1,48	0,82	0,13	0,06
N ₁₂	-2,59	-1,07	-1,14	0,31	-0,21	0,35
N ₁₃	-2,21	-0,65	1,21	-0,08	0,24	0,49
N ₁₄	-2,09	-0,54	0,08	-0,38	0,66	-0,56
N ₂₁	-3,33	-0,06	0,18	0,053	-0,28	0,11
N ₂₂	2,17	-2,93	0,48	0,07	0,08	0,10
N ₂₃	0,01	-0,12	0,25	-0,02	-0,17	-0,86
N ₂₄	0,13	0,74	-0,49	0,06	0,35	0,16
H ₁₁	0,41	0,66	-0,37	0,32	0,44	0,08
H ₁₂	-0,91	-0,11	-0,05	0,26	0,03	0,52
H ₁₃	1,49	1,30	-0,69	-0,29	-0,60	0,17
H ₁₄	-1,27	0,98	0,82	-0,21	0,36	0,10
H ₂₁	2,20	0,10	-0,93	-0,02	-0,41	0,08
H ₂₂	2,13	0,81	0,18	-0,28	0,60	0,19
H ₂₃	0,93	-0,02	1,39	0,01	-0,36	0,26
H ₂₄	-0,25	1,30	0,19	-0,07	0,02	0,02
ND ₁	-3,56	0,38	-0,76	-0,96	-0,34	-0,23
ND ₂	1,96	-2,50	-0,45	-0,96	0,02	-0,26
ND ₃	0,26	-0,57	1,19	1,01	-0,13	-0,50
ND ₄	1,08	0,86	-0,24	0,77	0,04	-0,57
HD ₁	2,47	0,06	-1,39	0,11	-0,43	0,14
HD ₂	2,28	0,76	-0,37	-0,18	0,77	0,17
HD ₃	0,79	0,03	1,94	-0,08	-0,51	0,28
HD ₄	-0,19	1,42	0,40	-0,22	-0,32	-0,37

N – serum referentne aktivnosti enzima; H – serum povećane aktivnosti enzima; 1 - ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 2 - ultrazvučno pripremljeni vodeni rastvori terpena; 1-4 - koncentracija rastvora terpena za C₁-C₄; D - rastvor terpena u DMSO

imaju oba negativna faktorska opterećenja. Grupisanost na osnovu vrste rastvarača, načina pripreme vodenih rastvora ili vrste seruma, može da se uoči i na grafičkom prikazu na Slici 42.



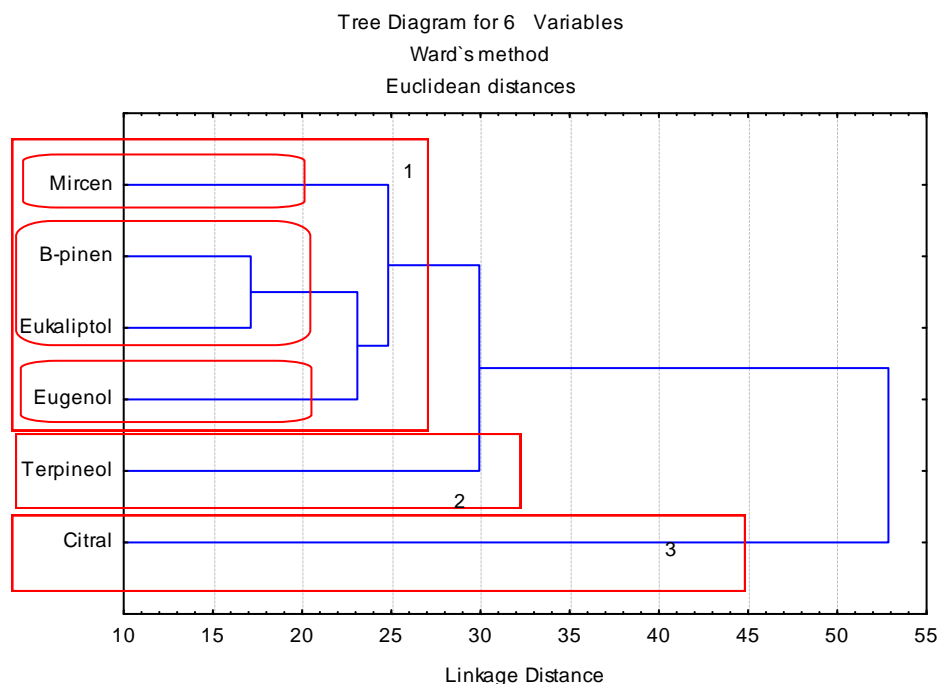
Slika 42. Grafički prikaz faktorskih koordinata slučajeva vodenih i DMSO rastvora terpena u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

Na osnovu grafičkog prikaza jasno se može uočiti da se slučajevi razlikuju prema vrsti seruma na koji deluju. Iznad x-ose grupisali su se rastvori koji deluju u H-serumu sa izuzetkom rastvora H₁₂ koji se nalazi ispod ose i zaokružen je na grafiku plavom bojom. Ispod x-ose grupisali su se rastvori koji deluju u N-serumu sa izuzetkom rastvora koji su na grafiku zaokruženi zelenom bojom: N₂₄, ND₁ i ND₄.

Dalja statistička obrada podataka obuhvatila je i klaster analizu koja je omogućila grupisanje terpena na osnovu uticaja koji su imali na aktivnost enzima AMY.

Sa Slike 43. se vidi da je rezultat klaster analize izdvajanje tri klastera. Prvi klaster obuhvata četiri terpena: mircen, β -pinen, eukaliptol i eugenol sa najvećom sličnošću u delovanju na AMY između β -pinena i eukaliptola zbog čega ta dva terpena čine jedan potklaster, dok su mircen i eugenol samostalni subklasteri. Drugi i treći klaster sadrže po jedan terpen – u drugom se nalazi terpineol, a trećem klasteru pripada citral. Najveće

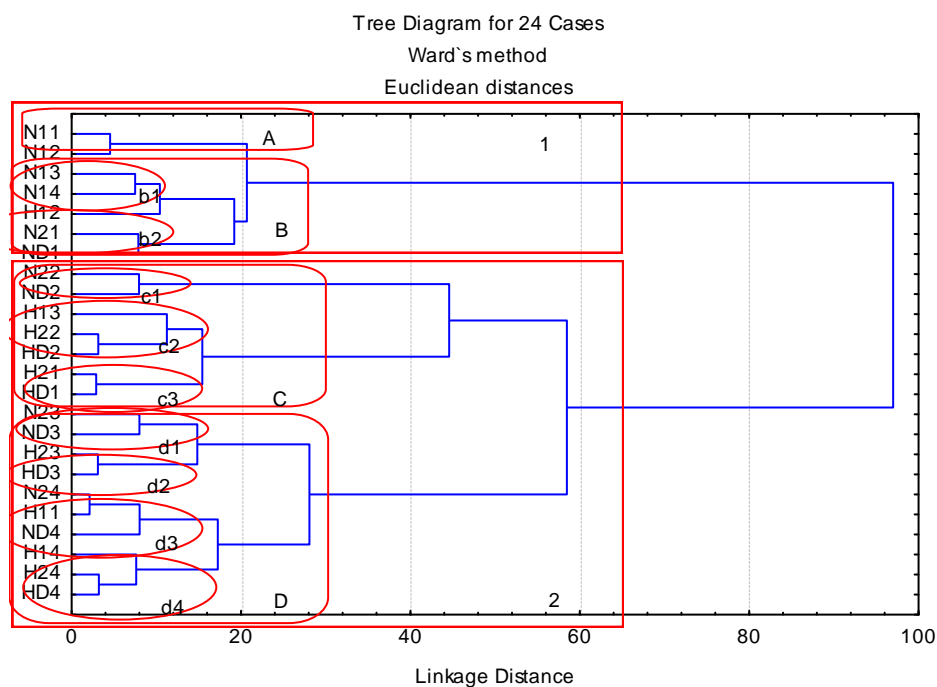
rastojanje na grafiku pokazuje citral, što ujedno odgovara najvećem stepenu inhibicije koju postiže na aktivnost amilaze u odnosu na sve ostale terpeene i bez obzira na način pripreme vodenog rastvora, vrstu rastvarača ili vrstu seruma.



Slika 43. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpeneola i eugenola u odnosu na aktivnost enzima AMY

Dosadašnji rezultati ukazuju da je za inhibitornu aktivnost mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpeneola i eugenola na enzim AMY od značaja vrsta seruma, što potvrđuje i HCA slučaja (Slika 44.). Klaster analiza (HCA) omogućava grupisanje u dva klastera. Prvi klaster se sastoji od sedam vodenih i DMSO rastvora koji su pripremljeni za N i H-serum, koji su raspoređeni u dva potklastera (A i B). Potklaster A se sastoji od dva rastvora koji pokazuju sličnost N_{11}/N_{12} , dok se u potklasteru B nalaze pet rastvora raspoređenih u dva potpotklastera (b_1 i b_2), od kojih se b_1 sastoji od sličnih rastvora N_{13}/N_{14} i samostalnog rastvora H_{12} , dok se b_2 sastoji od N_{21} i ND_2 . Drugi klaster se takođe sastoji od dva potklastera (C i D) i sadrži 17 rastvora. U potklasteru C razlikuju se potpotklasteri: c_1 – koji se sastoji od para sličnih rastvora N_{22}/ND_2 , c_2 – kod koga osim para rastvora H_{22}/HD_2 , se nalazi i samostalni rastvor H_{13} , i c_3 – sa parom sličnih rastvora H_{21}/HD_1 . Potklaster D se sastoji od četiri potpotklastera sa 10 rastvora: d_1 – sačinjava par N_{23}/ND_3 rastvora, d_2 – sa parom H_{23}/HD_3 . Treći potpotklaster d_3 obuhvata dva rastvora koji ispoljavaju najveću sličnost i imaju najmanje rastojanje na dijagramu N_{24}/H_{11} i samostalni rastvor ND_4 . Četvrti potpotklaster d_4 se

sastoji iz rastvora H₁₄ i para H₂₄/HD₄. U oba klastera sličnost iskazuju parovi rastvora pripremljeni u istoj vrsti seruma (N ili H), sa izuzetkom para N₂₄/H₁₁.



Slika 44. HCA dendrogram vodenih i DMSO rastvora mircena, β -pinena, citrala, eukaliptola, terpineola i eugenola u odnosu na vrstu i način pripreme rastvora (ručno – 1 i ultrazvučno – 2), koncentraciju (1-4), rastvor u DMSO (D), kao i vrstu seruma (N – referentne i H – povišene vrednosti aktivnosti enzima)

ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj četiri rastvora monoterpena (karvakrol, linalol, nerol, geraniol) na aktivnost sedam dijagnostički značajnijih enzima: keratin kinaza (CK), laktat dehidrogenaza (LDH), alkalna fosfataza (ALP), gama glutamil transferaza (GGT), aspartat aminotransferaza (AST), alanin aminotransferaza (ALT) i amilaza (AMY) kao i uticaj šest terpena (mircen, β -pinen, citral, eukaliptol, terpineol i eugenol) na aktivnost AMY u *in vitro* uslovima. Kao izvor terpena korišćeni su komercijalno proizvedeni terpeni a kao izvor enzima komercijalni kontrolni humani serumi sa referentnom (N-serum) i povećanom aktivnošću (H-serum) enzima. Rastvori terpena pripremani su kao vodeni ili ratsvaranjem u DMSO. Vodeni rastvori su pripremljeni na dva načina: ručnim (I_1) i ultrazvučnim mešanjem (I_2). Svi rastvori terpena su pokazali inhibitorno delovanje na sedam klinički značajnih enzima u obe vrste seruma, bez obzira na vrstu rastvarača ili način pripreme vodenih rastvora terpena.

Najveći procenat inhibicije za CK u N-serumu postiže se vodenima rastvorom linalola. Kada se pripremi kao I_1 smanjuje aktivnost enzima 26,9% dok pripremljen kao I_2 smanjuje aktivnost 36,3%. U N-serumu rastvor linalola u DMSO takođe ispoljava najveći procenat inhibicije (38,4%). Vodeni rastvori terpena pripremljeni kao I_1 , ispoljavaju veći procenat inhibicije CK u H-serumu, a najveći pokazuje rastvor geraniola (27,6%). Od rastvora pripremljenih kao I_2 najveći procenat inhibicije CK u H-serumu pokazuje rastvor karvakrola (20,6%). Rastvor linalola u DMSO ispoljava najveći procenat inhibicije u H-serumu (26,7%) u odnosu na rastvore ostalih terpena u DMSO.

Enzim LDH se u najvećoj meri inhibira rastvorima karvakrola - i rastvori u vodi i u DMSO pokazuju najveće procenat inhibicije bez obzira na vrstu seruma ili način pripreme rastvora terpena. Tako u N-serumu vodeni rastvori karvakrola pripremljeni kao I_1 smanjuju aktivnost LDH 40,7%, dok rastvori pripremljeni kao I_2 smanjuju aktivnost 47,0% isto koliko inhibiraju i rastvori u DMSO. U H-serumu najveći procenti inhibicije LDH su: 23,8% za vodene rastvore karvakrola pripremljene kao I_1 , 16,5% za vodene rastvore karvakrola pripremljene kao I_2 i 23,5% za rastvore u DMSO. Procenat inhibicije karvakrolom enzima LDH (47,0%) je i najveći procenat inhibicije zabeležen u ovom istraživanju.

Na aktivnost ALP u N-serumu najveći procenat inhibicije ispoljavaju vodeni rastvori geraniola pripremljeni kao I_1 (21,2%) i linalola pripremljeni kao I_2 (32,5%). Rastvori linalola u DMSO ispoljavaju iste procenat inhibicije ALP u N-serumu kao i vodeni rastvor linalola pripremljeni kao I_2 . Vodeni rastvor karvakrola pripremljen kao I_1 i vodeni rastvor linalola pripremljen kao I_2 pokazuju najveći procenat inhibicije ALP u H-serumu (23,5% i 16,5%),

dok DMSO rastvori karvakrola pokazuju najveći procenat inhibicije ALP u H-serumu (22,7%).

Vodeni rastvor karvakrola pripremljen ručnim mešanjem i rastvor geraniola pripremljen ultrazvučnim mešanjem pokazuju najveće procenat inhibicije kod GGT-a u N-serumu (21,8% i 35,6%). Od DMSO rastvora terpena najveći procenat inhibicije na GGT u N-serumu pokazuje rastvor geraniola (33,3%). Procenat inhibicije GGT u H-serumu vodenim rastvorima karvakrola je najveći i iznosi 23,8% kada su oni pripremljeni kao I₁, 23,7% kada su pripremljeni kao I₂ i 26,6% kao rastvori u DMSO.

Najveći procenat inhibicije na AST u N-serumu postize se vodenim rastvorima linalola pripremljenim kao I₁ (21,4%). Rastvori geraniola i karvakrola pripremljeni kao I₂ i rastvarani u DMSO pokazuju procenat inhibicije AST od 29,7%. U H-serumu, najveći procenat inhibicije AST ispoljavaju rastvori karvakrola bez obzira na način na koji su pripremljeni rastvori (I₁ i rastvori u DMSO - 20,5%, a kao I₂- 15,0%).

Vodeni rastvor linalola pripremljen kao I₁ ima najveći procenat inhibicije ALT u N-serumu (19,7%). Od rastvora pripremljenih kao I₂ vodeni rastvor karvakrola, kao i njegov DMSO rastvor ispoljavaju maksimalan procenat inhibicije od 34,2%. U H-serumu je ALT inhibiran u najvećoj meri vodenim rastvorom karvakrola pripremljenim kao I₁ (24,6%), kao I₂ (24,1%), a rastvoran u DMSO (27,4%).

Ispitivanje uticaja na aktivnost enzima AMY vršeno je rastvorima 10 terpena zbog velikog kliničkog i potencijalnog terapijskog značaja koji ima. U N-serumu je ustanovljeno da rastvori terpena kojima su tretirani i svi ostali enzimi ispoljavaju najveći inhibicioni efekat kada su pripremljeni kao I₁ vodeni rastvori i rastvori karvakrola u DMSO (24,2% i 28,8%), odnosno vodeni rastvori linalola (30,7%) kao I₂. Preostali ispitivani terpeni pokazuju inhibiciju koja je veća od prethodno navedene uz pomoć vodenih (I₁ i I₂) kao i rastvora citrala u DMSO (30,4%, 35,6% i 32,4%). U H-serumu, karvakrol je terpen koji dovodi do najvećeg procenta inhibicije bez obzira na koji način je pripremljen njegov vodeni rastvor ili se radi o rastvoru u DMSO - 22,7% kada su u pitanju I₁ vodeni rastvori ili DMSO rastvori i 15,3% kada je vodeni rastvor karvakrola pripremljen kao I₂, ako posmatramo terpena kojima su tretirani svi enzimi. Terpeni čiji je uticaj testiran samo na AMY, kao i u N-serumu, pokazuju inhibiciju koja je veća od navedene vodenim i DMSO rastvorima citrala na AMY i to od 22,8% kada su pripremljeni kao I₁ i 21,9% kao I₂ vodeni rastvori, odnosno 23,2% kao rastvori u DMSO.

Kod pojedinačnih rastvora terpena na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da kod vodenih rastvora pripremljenih i kao I₁ i kao I₂ u N-serumu najbolji inhibicioni efekat

ispoljavaju isti terpeni: rastvori karvakrola za enzime LDH, AMY i GGT, linalola za CK, AST i ALT i geraniola za ALP pripremljeni kao I₁ inhibitori, dok kao I₂ inhibitori isti terpeni deluju maksimalno na LDH, AST i ALT (karvakrol), CK, AMY i ALP (linalol) kao i na GGT (geraniol). Kao DMSO rastvori terpena u N-serumu ti isti molekuli najveći procenat inhibicije enzima postižu na LDH, ALT i AMY (karvakrol), CK i ALP (linalol), kao i GGT i AST (geraniol).

U H-serumu, rastvor karvakrola bez obzira da li je vodeni (I₁ ili I₂) ili u DMSO ispoljava najbolji inhibitorski efekat pripremljen kao I₁ na sve enzime osim CK (bolje ga inhibira geraniol), kao I₂ na sve enzime, osim ALP (linalol), dok pripremljen kao rastvor u DMSO, ispoljava najbolji inhibitorski efekat prema svim enzimima sa izuzetkom CK (bolje ga inhibira linalol).

Rastvor citrala je pokazao najveće vrednosti inhibicije na AMY bez obzira na način pripreme ili vrstu seruma. Veći procenti inhibicije svih enzima u N nego u H-serumu pa se zaključiti da procenat inhibicije enzima zavisi od njihove koncentracije u serumu. Vodeni rastvori terpena pripremljeni ultrazvučnim mešanjem i DMSO rastvori terpena dostižu približno jednake procenat inhibicije u obe vrste seruma. Način pripreme vodenih rastvora inhibitora utiče na procenat inhibicije u zavisnosti od vrste seruma - veći procenti inhibicije u N-serumu postignuti su vodenim rastvorima terpena pripremljeni ultrazvučnim mešanjem (I₂), dok su u H-serumu veći procenat inhibicije beležili ručno pripremljeni vodeni rastvori terpena (I₁).

Statistička obrada podataka kod svih rastvora terpena iz ovog istraživanja (sa delimičnim izuzetkom nerola i geraniola) potvrdila je grupisanje ili po vrsti seruma ili po vrsti rastvarača ili po načinu pripreme vodenih rastvora. Statističkom obradom podataka nije izvršeno grupisanje rastvora terpena prema koncentraciji. Inhibicija enzima rastvorima terpena zavisi od različitih parametara – vrste enzima, vrste terpena, vrste rastvarača, načina pripreme vodenih rastvora kao i vrste seruma. Kako bi se utvrdila potencijalna primena terpena i uslovi za njihovu primenu u farmaceutske i medicinske svrhe potrebno je izvršiti istraživanja *in vivo*, uzimajući u obzir mesto i uslove delovanja u organizmu.

SUMMARY

In this doctoral thesis the impact of 10 monoterpenes solutions (myrcene, β -pinene, carvacrol, linalool, nerol, geraniol, citral, eucalyptol, terpineol, and eugenol) on the activity of the seven major diagnostic enzymes: creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), amylase (AMY), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) was examined in vitro. For this purpose, and in order to get consistent results, as a source of terpenes, were used commercially produced terpenes, and as a source of enzymes, were used the commercial control sera with the referential (N-serum) and increased activity (H-serum) enzymes. The solutions were prepared as water solutions or in DMSO. Aqueous solutions are prepared in two ways: by manual (I_1) and ultrasonic mixing (I_2). All the solutions of terpenes have shown inhibitory activity seven clinically important enzyme in both types of sera, irrespective of the kind of the solvent or the method of preparation of aqueous solutions of terpenes.

The highest percentage of inhibition of CK in N- serum is achieved by an aqueous solution of linalool, except that, prepared as I_1 it inhibited 26.9% of the enzyme activity, while prepared as I_2 it inhibited 36.3% of the activity of CK. DMSO solutions of terpenes in N- serum were also inhibited best by the solution of linalool and it is 38.4%. CK enzyme in the H-serum is better inhibited by the prepared aqueous solutions of terpenes as I_1 , and the best inhibitor is the solution of geraniol (27.6%), whereas when prepared as I_2 the best inhibitor is the solution of carvacrol (20.6%). In DMSO solution in H-sera the solution of linalool shows the best inhibition (26.7%).

For the LDH enzyme the solution of carvacrol is absolutely the best choice of terpene for inhibition, since both its aqueous and DMSO solutions recorded the highest percentages of inhibition of this enzyme, regardless of the type or method of preparation of the serum solution of terpene. Thus, in the N-serum prepared aqueous solutions of carvacrol as I_1 inhibited the activity of LDH to 40.7%, as I_2 solutions 47.0% which is equal to DMSO solution in N-serum. In H serum the highest percentages of inhibition of LDH were: 23.8% for I_1 prepared as aqueous solutions of carvacrol, 16.5% for I_2 prepared as aqueous solutions, while the percentage of DMSO solutions was 23.5%. At the same time, the inhibition of LDH by carvacrol was (47.0%) and it the highest percentage of inhibition observed in this study.

ALP in N-serum has the greatest inhibition by aqueous solutions of geraniol prepared as I_1 (21.2%) and linalool solutions prepared as I_2 (32.5%). DMSO solutions in N-serum inhibited ALP activity as well as an aqueous solution prepared as linalool I_2 . An aqueous solution prepared as carvacrol I_1 inhibited the activity of ALP in the H-serum to 23.5%, while

aqueous solutions prepared as I₂ achieved the best inhibition of solutions with 16.5% of linalool. DMSO dissolved in H-serum best inhibited the activity of ALP by soluble carvacrol (22.7%)

Carvacrol, as an aqueous solution prepared by manual mixing (I₁) in GGT shows the highest percentage of inhibition of the N-levels (21.8%), while I₂ prepared as an aqueous solution achieved the highest inhibitory effect by geraniol (35.6%). As a DMSO solution of the N-best serum inhibitory effect of GGT is achieved by the solution of 33.3% of geraniol. Percent of inhibition of GGT in serum- H by aqueous solutions of carvacrol is the largest and amounted to 23.8% when they are prepared as I₁, or 23.7%, when prepared as I₂. DMSO dissolved in H-serum also achieve maximum inhibition with solutions of carvacrol, which is now 26.6%

AST at the N-serum inhibition of 21.4% as the largest recorded by aqueous solution of terpene prepared as I₁ gives linalool, while geraniol and carvacrol prepared as I₂ inhibited the activity of AST of 29.7%, which is equal to the inhibition of DMSO solution. In H-serum, carvacrol is the best inhibitor for AST regardless of the ways the solutions were prepared. Prepared as I₁ water and DMSO solutions inhibited 20.5% of the activity of the enzyme AST and as I₂ aqueous solutions slightly less - 15.0% of the activity,

Linalool I₁ prepared as an aqueous solution provides the best inhibition of ALT in the N- serum (19.7%), while a better inhibitor is carvacrol as I₂ in aqueous solution and DMSO as a solution with a maximum percent of inhibition of 34.2%. The dominance of a solution of carvacrol will be continued in a H-serum in different percentages of inhibition - I₁ prepared as an aqueous solution achieved the inhibition of 24.6%, as an aqueous solution I₂ inhibition of 24.1% and when prepared as DMSO solution, its inhibition was 27.4%;

As for the AMY - the enzyme that was treated with an aqueous solution of 10 terpenes and due to the great clinical and therapeutic importance it has, in the N-serum are achieved the following values of the inhibition: the solutions of terpenes which have been used to treat all the other enzymes have achieved the greatest inhibition prepared as aqueous I₁ inhibitors of carvacrol (24.2%), linalool (30.7%) prepared as I₂ in aqueous solutions, and as DMSO and dissolved with the aid of carvacrol (28.8%). The remaining tested terpenes give the maximum inhibition which is greater than the previously mentioned and with the aid of aqueous solutions of citral prepared as inhibitors I₁ of 30.4%, and I₂ as the terpene solutions of 35.6%. This is comparable to H-serum: solutions of terpenes which have been used to treat other enzymes show inhibition of 22.7% with regard to aqueous solutions of carvacrol prepared as I₁ and DMSO solutions, and 15.3% when an aqueous solution is prepared as

carvacrol I₂. Other terpenes again reached higher percentages of inhibition of aqueous solutions of citral 22.8% when prepared as I₁ and 21.9% when prepared as I₂ inhibitors.

For individual terpenes solutions based on the obtained results it can be concluded that in aqueous solutions prepared as I₁ and I₂ in the N-serum best inhibitory effect is achieved by the same terpenes: carvacrol solutions for enzymes LDH, GGT and AMY, linalool for CK, AST and ALT and geraniol for the ALP prepared as inhibitor I₁ while as I₂ inhibitor it has the maximum effect on LDH, AST, and ALT (carvacrol), CK, AMY and ALP (linalool) as well as on GGT (geraniol). Terpenes such as DMSO dissolved in N-serum show that these same molecules achieved the highest percentage of enzyme inhibition on the LDH, ALT and AMY (carvacrol), CK and ALP (linalool), and AST and GGT (geraniol),

In the H-serum, a solution of carvacrol regardless of whether it is aqueous or DMSO and as prepared exhibited the best inhibitory effect was prepared as I₁ in all the enzymes except for CK (better it inhibits geraniol), as an aqueous solution of terpene I₂ best show inhibition of solutions of carvacrol for all enzymes except ALP in which linalool has better inhibition, while prepared as a solution in DMSO, to manifest the best inhibitory effect to all enzymes except CK (better by inhibiting linalool).

A solution of citral showed the greatest inhibition at AMY value regardless of the method of preparation or type of serum. Higher percentages of inhibition of the enzyme in N, than in the H-serum and to conclude that the percentage of inhibition of the enzyme depends on the concentration in the serum. Aqueous solutions prepared by ultrasonic mixing of terpenes and terpene DMSO solutions reached approximately equal percentages of inhibition in both types of serum. Method of preparing aqueous solutions of inhibitors affect the percentage of inhibition depending on the serum types - high percentages of inhibition of the N-serum were obtained an aqueous solution of terpene prepared by ultrasonic mixing (I₂), while the H-serum higher percentage inhibition recorded manually prepared aqueous solutions of terpenes (I₁).

Statistical analysis of the data in all solutions of terpenes from this study (with the partial exception of nerol and geraniol) confirmed the grouping by the type of serum, by the type of solvent or by the way of preparing aqueous solutions, which could already be discerned on the basis of the tabular data. Statistical analysis of the data also did not perform clustering of the solutions according to the concentration of terpenes. Inhibition of the enzyme by solutions of terpenes is indisputable and that it depends on various parameters –the type of enzyme, the type of terpenes, the type of solvent and methods of preparing aqueous solutions as well as the type of serum. In order to determine the potential use of terpenes and

conditions for its use in the pharmaceutical and medical purposes should be performed *in vivo* studies considering position and conditions of treatment in the organism.

LITERATURA

- * Abdel-Tawab H.M., Amel A.R., Amal R. et al. (2013). Amelioration of prallethrin induced oxidative stress and hepatotoxicity in rat by the administration of *Origanum majorana* essential oil. Bio Med Res Int [Online]:<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/859085/>.
- * Ahmadvand H, Tavafi M, Khalatbary AR. (2012). Hepatoprotective and hypolipidemic effects of *Satureja khuzestanica* essential oil in alloxan-induced type 1 diabetic rats. Iran J Pharm Res, 11 (4): 1219-1226.
- * Akolade J.O., Muhammad N.O., Usman L.A. et al. (2014). Effects of essential oil extracted from the leaves of *Hoslundia opposita* V. on selected biochemical indices in rats. British Journal of Pharmacology and Toxicology, 5 (3): 109-114.
- * Andersen D.N., Holmberg D.R., Larsen J.R. et al. (2006). *Survey and health assessment of chemical substances in massage oils*. Danish Toxicology Centre: Danish Ministry of the environment.
- * Azaizeh H, Fulder S, Khalil K, et al. (2003). Ethnobotanical knowledge of local Arab practitioners in the Middle Eastern region. Fitoterapia, 74: 98–108.
- * Barnard D.R., Xue R. (2004). Laboratory evaluation of mosquito repellents against *Aedes albopictus*, *Culex nigripalpus*, and *Ochlerotatus triseriatus* (Diptera: Culicidae). J Med Entomol, 41 (4): 726–730.
- * Barnes J., Anderson L.A., Phillipson J.D. (2007). *Herbal medicines*. London, UK: Pharmaceutical Press.
- * Behr A., Johnen L. (2009). Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. Chem Sus Chem, 2 (12): 1072–1095.
- * Bertram B., Hemm, I., Tang, W. (2001). Mutagenic and carcinogenic constituents of medicinal herbs used in Europe or in the USA. Pharmazie, 56 (2): 99-120.
- * Boland D.J., Brophy J.J., House A.P.N. (1991). *Eucalyptus leaf oils: Use, chemistry, distillation and marketing*. Melbourne, Australia: Inkata Press.
- * Boyer P.D. (1983). *The enzymes*. New York, USA: Academic Press.
- * Braun J.P., Fernet T.P. (1982). Gamma glutamyltransferase et alcohol. Pat Biol, 30: 243-251.
- * Budhiraja S.S, Cullum M.E., Sioutis S.S. et al. (1999). Biological activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil component terpinen 4-ol in human myelocytic cell line HL-60. J Manipulative Physiol Ther, 22 (7): 47-53.

- * Carnesecchi S., Schneider Y., Ceraline J., et al. (2001). Geraniol, a component of plant essential oils, inhibits growth and polyamine biosynthesis in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 298 (1): 197-200.
- * Casabianca H, Graff J.B., Faugier V. et al. (1998). Enantiomeric distribution studies of linalool and linalyl acetate. A powerful tool for authenticity control of essential oils. *High Res Chrom*, 21: 107–112.
- * Cattell R.B. (1966). The screen test for the number of factors. *Multivariate Behav Res*, 1: 245-276.
- * Cheng A.Y.Y., Fantus I.G. (2005). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. *CMAJ*, 172 (2): 213-226.
- * Chock P.B., Rhee S.G., Stadtman E.R. (1980). Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. *Annu rev Biochem*, 49: 813-843.
- * Christensson B.J., Forsström P., Wennberg A.M. et al. (2009). Air oxidation increases skin irritation from fragrance terpenes. *Contact Dermatitis*, 60: 32-40.
- * Control serum 1, ODC0003, Olympus Life Science Research Europe GmbH, Munich, Germany, LODC0003_0027_ML01, 2009-05.
- * Control serum 2, ODC0004, Olympus Life Science Research Europe GmbH, Munich, Germany, LODC0004_0028_ML01, 2009-05.
- * Cornish-Bowden A. (1986). Why is uncompetitive inhibition so rare? A possible explanation, with implications for the design of drugs and pesticides. *FEBS Letters* 203 (1): 3–6. doi:10.1016/0014-5793(86)81424-7.
- * Cornish-Bowden A. (2004). *Fundamentals of enzyme kinetics* (3rd Ed). London: Portland Press.
- * Cristenson R., Ohman M., Vollmer P.C. et al. (1991). Serum release of creatin kinase tissue-specific isoforms MM₃ and MB₂ is simultaneous during myocardial reperfusion. *Clin Chim Acta*, 200: 23-34.
- * Cristani M., D'Arrigo M., Mandalari G. et al. (2007). Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *J Agric Food Chem* 55 (15): 6300–6310.
- * Dadkhah A., Fatemi F., Ababzadeh S. et al. (2014). Potential preventive role of Iranian *Achillea wilhelmsii* C. Koch essential oils in acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Botanical Studies*, 55:37 [On line]: <http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/37>.

- * Da Silva A.C.R., Lopes P.M., De Azevedo M.M.B. et al. (2012). Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17: 6305-6316.
- * Da Silveira C.R., Andrade L.N., De Sousa P.D. (2013). A review on anti-inflammatory activity of monoterpenes. *Molecules*, 18: 1227-1254.
- * De Falco E., Mancini E., Roscigno G. et al. (2013). Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. *susp. vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules*, 18: 14948-14960.
- * De Souza P.A.T., Marques M.J., Lima C.A.H. et al. (2011). Effect of *Citrus aurantium* L. essential oil on muscle regeneration in mdx mice. *Int J Morphol*, 29 (4): 1357-1363.
- * De Vincenzi M., Stamatii A., De Vincenzi A. et al. (2004). Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia* 75 (7-8): 801-804.
- * Devon T.K., Scott A.I. (1972). *Handbook of naturally occurring compounds, II, Terpenes*, New York, USA: Academic Press.
- * Doll-Boscardin P.M., Sartoratto A., Sales Maia B.H.L.N. et al. (2012). *In vitro* cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine [Online]: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/342652>
- * Do Vale T.G., Couto Furtado E.C., Santos J.G. et al. (2002). Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) n.e. Brown. *Phytomedicine*, 9 (8): 709-714.
- * Edris EA. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res*, 21 (4): 308-323.
- * El-Hawary S., El-Shabrawy A., Ezzat S., et al. (2013). Gas chromatography-mass spectrometry analysis, hepatoprotective and antioxidant activities of the essential oils of four Libyan herbs. *J Med Plants Res*, 7 (24): 1746-1753.
- * El-Soud N.H.A., El-Lithy N.A., El-Saeed G.S.M. et al. (2012). Efficacy of *Coriandrum Sativum* L. essential oil as antidiabetic. *J Appl Sci Res*, 8 (7): 3646-3655.
- * Fachini-Queiroz F.C., Kummer R., Estevao-Silva C.F. et al. (2012). Effects of thymol and carvacrol, constituents of *Thymus vulgaris* L. essential oil, on the inflammatory response. Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, [Online]: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/657026>.

- * Fahlbusch K.G., Hammerschmidt F.J., Panten J. et al. (2002). *Flavors and fragrances in ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- * Fenaroli G., Furia T.E., Bellanca N. (1975). *Fenaroli's handbook of flavor ingredients*. Cleveland, Ohio, USA: CRC press.
- * Friedel R. Diederichs F., Lindena J. (1979). *Release and extracellular turnover of intracellular enzymes*. In: *Advances in clinical enzymology*. Schmidt E., Schmidt F.W., Trautschold I. et al. Basel: Karger, 70-105.
- * Fujisawa S., Atsumi T., Kadoma Y. et al. (2002). Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177 (1): 39–54.
- * Gasić M. (1985). *Etarskaulja*. Beograd, Srbija: IHTM Beograd.
- * Gasić O. (1992). *Biohemijabiljaka*. Beograd, Srbija: Naučna knjiga.
- * Gedney JJ, Glover TL, Fillingim RB. (2004). Sensory and affective pain discrimination after inhalation of essential oils. *Psychosom. Med*, 66: 599-606.
- * Gerhardt W., Wulff K. (1983). Creatine kinase. In: *Methods of enzymatic analysis*. 3rd. ed. Bergmeyer H.U., Bergmeyer J., Grassl M. Weinheim, Germany: Verlag-Chemie.
- * Godwin D.A., Michniak B.B. (1999). Influence of drug lipophilicity on terpenes as transdermal penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm*, 25: 905-915.
- * Goldberg D.M. (1980). Structural, functional and clinical aspects of gamma-glutamyltransferase. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 12:1-58.
- * Grover J.K., Yadav S., Vats V. (2002). Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol*, 81: 81-100.
- * Harborne J.B., Turner B.L. (1984). *Plant chemosystematics*. London, UK: Academic Press.
- * Haris H. (1989). The human alkaline phosphatase; what we know and what we don't know. *Clin Chim Acta*, 186: 133-150.
- * Hegnauer R. (1982). *Distribution and chemotaxonomy of essential oils in cultivation and utilisation of aromatic plants*, 1-2 Eds. Atal C.K., Kapur B.M., India: Research laboratory Jammu-Tawi.
- * Hill F. (1952). *Economic Botany*. New York-Toronto-London: Mc Grow-Hill.
- * Hirano K., Matsumoto H., Tanaka T. Et al. (1987). Specific assay for human alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chim Acta*, 166: 265-273.

- * Hommes G. (1982). *Enzyme catalysis and regulation*. New York, USA: Academic Press.
- * Imanishi J., Kuriyama H., Shigemori I. et al. (2009). Anxiolytic effect of aromatherapy massage in patients with breast cancer. *Evid Based Complement Alternat Med*, 6 (1): 123–128.
- * Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemoth*, 47: 565-573.
- * Instructions with the features and recipes for the determination of enzyme activities and Aeroset ARCHITECT c 8000. (2006). System issued by Abbott Clinical Chemistry.
- * Ismail M., Ibrar M., Iqbal Z. et al. (2009). Chemical constituents and antioxidant activity of *Geranium wallichianum*. *Rec Nat Prod*, 3-4: 193-197.
- * Jadhav B.K., Khandelwal K.R., Ketkar A.R. et al. (2004). Formulation and evaluation of mucoadhesive tablets containing eugenol for the treatment of periodontal diseases. *Drug Dev Ind Pharm*, 30 (2): 195–203.
- * Jaffe A.S., Serota H., Grace M. et al. (1986). Diagnostic changes in plasma creatine kinase isoforms early after onset of acute myocardial infarction. *Circulation*, 74:105-109.
- * Jaganathan S.K., Supriyanto E. (2012). Antiproliferative and molecular mechanism of eugenol-induced apoptosis in cancer cells. *Molecules*, 17 (6): 6290–6304.
- * Jakovljević V., Mimica-Dukić N., Popović, O. et al. (1996). Pharmacological study of *Mentha L. phenolis* extracts. *Int J Pharm Technol*, 34 (5): 359-365.
- * Jančić R., Stošić D. i sar. (1995). *Aromatične biljke Srbije*. Gornji Milanovac, Srbija: Nip Dečije novine.
- * Jelenković Lj. (2010). *Hemijska analiza i mikrobiološka aktivnost etarskog ulja *Satureja kitaibelii* Wierzb. et Heuff.* Magistarska teza, Univerzitet u Nišu, Prirodno-matematički fakultet, Niš.
- * Juergens U.R., Dethlefsen U., Steinkamp G. et al. (2003). Anti-Inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: A double-blind placebo-controlled trial. *Respir Med*, 97 (3): 250–256.

- * Jumepaeng T., Prachakool S., Luthria D.L. et al. (2013). Determination of antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity of the essential oil from Citronella Grass and Lemongrass. *Int Food Res J*, 20 (1): 481-485.
- * Kaiser H.F. (1958). The varimax criterion for analytic rotation in factor analysis. *Psychometrika*, 23: 187-200.
- * Kaplan M. (1986). Alkaline phosphatase. *Hepatology*, 6: 526-531.
- * Karlson P. (1989). *Biokemija*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- * Khanikor B., Parida P., Yadav R.N.S. (2013). Comparative mode of action of some terpene compounds against octopamine receptor and acetyl cholinesterase of mosquito and human system by the help of homology modeling and Docking studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3 (02): 6-12, [Online]: <http://www.japsonline.com> DOI: 10.7324/JAPS.2013.30202.
- * Kim E. (1989). Structure of alkaline phosphatases. *ClinChimActa*, 186: 175-188.
- * Kinnear P., Gray C.D. (1994). *SPSS for Windows made simple*. Hove, UK: Lawrence Erlbaum Associates Publishers.
- * Koraćević D., Bjelaković G., Đorđević V. i dr. (1996). *Biohemija*. Beograd, Srbija: Savremena administracija.
- * Kovačević N. (2004). *Osnovi farmakognozije*. Beograd, Srbija: Srpska školska knjiga.
- * Kristensen S.R., Horder M. (1983). Release and turnover of intracellular enzymes. In: clinical and analytical concepts in enzymology. Homburger H.A., Skoki I.L., College of American Pathologist, 1-13.
- * Kuwana T., Rasalki B.S. (1990). Intestinal variant alkaline phosphatase in plasma in diseases. *Clin Chem*, 36: 1918-1921.
- * Lang H. (1981). *Creatine kinase isoenzymes*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- * Lang H., Wurzburg U. (1982). Creatine kinase, an enzyme of many forms. *Clin Chem*, 28:1439-1447.
- * Leite A.M., Lima E.O., De Souza E.L. et al. (2007). Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *RBCF, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43 (1): 121-126.
- * Leite BL, Souza TT, Antonioli RA, et al. (2011). Volatile constituents and behavioral change induced by *Cymbopogon winterianus* leaf essential oil in rodents. *Afr J Biotechnol*, 10 (42): 8312-8319.

- * Leite M.P., Fassin J., Baziloni E.M. et al. (2008). Behavioral effects of essential oil of *Citrus aurantium* L. inhalation in rats. *Rev Bras Farmacogn*, 18: 661-666.
- * Lorenzetti B., Souza, G.E., Sarti S.J. et al. (1991). Myrcene mimics the peripheral analgesic activity of lemongrass tea. *J ethnopharmacol*, 34(1): 43-48.
- * Majkić-Singh N. (1993). *Klinička enzimologija*. Subotica, Srbija: Birografika.
- * Marsik P., Landa P., Pribylova M. et al. (2006). Carvacrol as the inhibitor of cyclooxygenase-1 and -2, the key enzymes of prostaglandin biosynthesis: *in vitro* assays. *Planta Med*, 72 - P_088, [Online]: <http://DOI: 10.1055/s-2006-949888>.
- * Matlawska I., Bylka W. (2001). Flavonoids and free phenolic acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Pol Pharm*, 58 (1): 69-72.
- * Mc Comb R.B., Blond L.W., Burnett R.W. et al. (1976). Determination of the molar absorptivity of NADH. *Clin Chem*, 22: 141-150.
- * Mc Comb R.B., Bowers G.N., Posen S. (1979). *Alkaline Phosphatase*. New York, USA: Plenum Press.
- * Melzig M.F., Funke I. (2007). Inhibitors of alpha-amylase from plants-a possibility to treat diabetes mellitus type II by phytotherapy? *Wien Med Wochenschr*, 157 (13-14): 320-324.
- * Mimica-Dukić M., Jančić, R. (1998). *Biološke funkcije etarskih ulja aromaticnih biljaka*. Dušan Stevanovic (ed): *Biološki aktivne materije viših biljaka, gljiva, algi i bakterija*. Novi Sad, Srbija: Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno Matematički fakultet, Institut za Biologiju.
- * Moss D.W. (1982). *Isoenzymes*. London, UK and New York, USA: Chapman and Hall.
- * Moss W.D. (1982). Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem*, 28 (10): 2007-2016.
- * Mukherjee P.K., Maiti K., Houghton P.J. (2006). Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials. *J Ethnopharmacol*, 106 (1): 1-28.
- * Muley B.P., Khadabadi S.S., Banarase N.B. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A review. *Trop J Pharm Res*, 8: 455-465.
- * Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A. et al. (2003). *Harper's illustrated biochemistry* (26nd Ed). New York: McGraw-Hill Companies.

- * Nafisi S., Hajiakhoondi A., Yektadoost A. (2004). Thymol and carvacrol binding to DNA: model for drug-DNA interaction. *Biopolymers*, 74 (5): 345-351.
- * Najafian M., Ebrahim-Habibi A., Yaghmaei P. et al. (2011). Citral as a potential antihyperlipidemic medicine in diabetes: a study on streptozotocin induced diabetic rats. *J Diabetes MetabDisord*, (10): 1- 8.
- * Nakamura A., Fujiwara S., Matsumoto I. et al. (2010). Stress repression in restrained rats by (R)-(-)-linalool inhalation and gene expression profiling of their whole blood cells. *J Agric Food Chem*, 57 (12): 5480–5485.
- * Newall C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D. (1996). *Herbal medicines*. London, UK: Pharmaceutical press.
- * Nickavar B., Abolhasani L., Izadpanah H. (2008). α -amylase inhibitory activities of six *Salvia* species. *Iran J Pharm Res*, 7 (4): 297-303.
- * Nomenclature Committee, IUB. (1979). *Enzyme nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of IUB on the nomenclature and classification of enzymes*. New York, USA: Academic Press.
- * Oboh G., Ademosun A.O., Odubanjo O.V. et al. (2013). Antioxidative properties and inhibition of key enzymes relevant to type-2 diabetes and hypertension by essential oils from black pepper. [Online]: <http://www.hindawi.com/journals/aps/2013/926047/>.
- * Olympus system calibrator, 66300 (Olympus Life Science Research Europe GmbH, Munich, Germany) L6630_0113_ML02, 2008-11
- * Onawunmi, G.O. (1989). Evaluation of the antimicrobial activity of citral. *Lett Appl Microbial*, 9 (3): 105–108.
- * Özkan A., Erdoğan A. (2011). A comparative evaluation of antioxidant and anticancer activity of essential oil from *Origanum onites* (Lamiaceae) and its two major phenolic components. *Turk J Biol*, 35: 735–742.
- * PDR for Herbal Medicines, (2001). 2nd edition, Montvale, New York, USA: Medical Economics Company.
- * Pengelly A. (2004). *The constituents of medicinal plants*. (2nd Ed). USA and UK: CABI Publishing.
- * Pekić B. (1983). *Hemija i tehnologija farmaceutskih proizvoda (alkaloida i etarskih ulja)*. Novi Sad, Srbija: Tehnoloski fakultet u Novom Sadu.
- * *Pharmacopoeia Jugoslavica IV*. (1984).

- * Praveena A., Sanjayan K.P. (2011). Inhibition of acetylcholinesterase in three insects of economic importance by linalool, a monoterpene phytochemical. *Insect Pest Management, A Current Scenario*, (ed.), Dunston P. Ambrose, 340-345, [Online]: <https://www.researchgate.net/publication/235898957>.
- * Price N.C. (1979). What is meant by 'competitive inhibition'?. *Trends in biochemical sciences* 4 (11): 272–273. doi:10.1016/0968-0004(79)90205-6.
- * Puelo P.R., Guadagno P.A., Roberts R. et al. (1989). Sensitive rapid assay of subforms of creatine kinase MB in plasma. *Clin Chem*, 35: 1452-1455.
- * Putzki H., Reichert B., Heymann H. (1989). The serum activities of AP, γ -GT, GLDH, GPT and CMF of the complete biliary obstruction and choledochocaval fistula. *Clin Chim Acta*, 181: 81-86.
- * Rahman S., Islam R., Kamruzzaman M., et al. (2011). *Ocimum sanctum* L.: A review of phytochemical and pharmacological profile. *Am J Drug Discov Dev* [Online]: ISSN 2150-427x / DOI: 10.3923/ajdd.2011.
- * Rivera JO, Loya AM, Ceballos R. (2013) Use of herbal medicines and implications for conventional drug therapy medical sciences. *Altern Integ Med*, 2 (6): 1-6.
- * Robacker D.C., Hendry L.B. (1977). Neral and geranial: components of the sex pheromone of the parasitic wasp, *Itopectis conquisitor*. *J Chem Ecol*, 3(5): 563–577.
- * Roberts D.V. (1977). *Enzyme kinetics*. London, UK: Cambridge University Press.
- * Rosalki S.B. (1975). Gamma-glutamyltranspeptidase. *Adv Clin Chem*, 17:53-107.
- * Sacchetti L., Castaldo G., Cimino L. et al. (1988). Diagnostic efficiency in discriminating liver malignancies from cirrhosis by serum γ -glutamyltransferase isoforms. *Clin Chim Acta*, 197: 162-172.
- * Sahin Basak S., Candan F. (2010). Chemical composition and *in vitro* antioxidant and antidiabetic activities of *Eucalyptus Camaldulensis* Dehnh. essential oil. *J Iran Chem Soc*, 7 (1): 216-226.
- * Sajt: <http://www.captodayonline.com/productguides/instruments/chemistry-mid-high-june-2015/architect-c8000-and-ci8200-chemistry-mid-high-2015.html>.
- * Salehi P., Asghari B., Ali Esmaeili M. et al. (2013). α -glucosidase and α -amylase inhibitory effect and antioxidant activity of ten plant extracts traditionally used in Iran for diabetes. *Planta Med*, 7 (6): 257-266 [Online]: <http://DOI: 10.5897/JMPR11.1320>.

- * Sayorwan W., Siripornpanich V., Piriyaupunyporn T. et al. (2012). The effects of lavender oil inhalation on emotional states, autonomic nervous system, and brain electrical activity. *J Med Assoc Thai*, 95 (4): 598-606.
- * Scheider G. (1975). *Pharmazeutische biologie*, Mannheim, Germany: Bibliographisches Institut.
- * Schilcher H. (1984). Essential Oils - effects and side effects. *Dtsch Apoth Ztg*, 124: 1433-1442.
- * Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Souli A, Gharbi N, Sakly M. (2013). Lavender (*Lavandula stoechas* L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. *Lipids Health Dis*, 12:189.
- * Sfara V., Zerba E.N., Alzogaray R.A. (2009). Fumigant insecticidal activity and repellent effect of five essential oils and seven monoterpenes on first-instar nymphs of *Rhodnius prolixus*. *J Med Entomol*, 46(3): 511–515.
- * Sharma S. (1996). *Applied multivariate techniques*. New York, USA: John Wiley and Sons Inc.
- * Stryer L., Berg J., Tymoczko J. (1991). *Biokemija*. Zagreb, Hrvatska: Školska knjiga.
- * Suanarunsawat T, Devakul W, Ayutthaya N, Pongshompoo S. (2010). Antioxidant activity and lipid-lowering effect of essential oils extracted from *Ocimum sanctum* L. leaves in rats fed with a high cholesterol diet. *J Clin Biochem Nutr*, 46: 52-59.
- * Sudha P., Zinjarde S.S., Bhargava S.Y. et al. (2011). Potent α -amylase inhibitory activity of Indian Ayurvedic medicinal plants. *BMC Complement Altern Med*, 11 (5): 1-10.
- * Štraus B. (1992). *Medicinska biokemija*. Zagreb, Hrvatska: Medicinska naklada.
- * Tabachnick B.G., Fidell L.S. (1989). *Using multivariate statistics*. New York, USA: Harper & Row Publishers.
- * Tamonud M., Abhilash M. (2011). Effects of citral, a naturally occurring antiadipogenic molecule, on an energy intense diet model of obesity. *Indian J Pharmacol*, 43 (3): 300-305.
- * Tankam J.M., Ito M. (2013). Inhalation of the essential oil of *Piper guineense* from Cameroon shows sedative and anxiolyticlike effects in mice. *Biol Pharm Bull*, 36 (10):1608-1614.

- * Tankam J.M., Ito M. (2014). Sedative, anxiolytic and antidepressant-like effects of inhalation of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. from Cameroon in mice. JPP [Online]: http://www.phytojournal.com/vol2Issue5/Issue_jan_2014/8.1.pdf.
- * Tietz N.W., Finley P.R. (1983). *Clinical guide to laboratory tests*. Philadelphia, USA: W.B. Saunders co.
- * Tietz N.W. (1997). *Osnovikliničkehemije*. Beograd, Srbija: Velarta.
- * Tisserand R.B. (1980). *Aromatherapie*. Frieberg, Germany: Bauer.
- * Toncer O., Karaman S., Kizil S. et al. (2009). Changes in essential oil composition of oregano (*Oreganum onites* L.) due to diurnal variations at different development stages. Not Bot Horti Agrobo, 37: 177-181.
- * University of Maryland Medical Center (2011). Aromatherapy. A Member of the University of Maryland Medical System In Partnership with the University of Maryland School of Medicine.
- * Vanderlinde R.E. (1986). Review of piridoxalphosphat and the transaminases in liver diseases. Ann Clin Lab Sci, 16: 79-93.
- * Wagner H., Wolf P. (1977). *New natural products and plant drugs with pharmacological, biological of therapeuticactivity*. Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- * Wenham P.R., Horn D.B., Smith A.F. (1984). Physical properties of γ -glutamyltransferase in human serum. Clin Chim Acta, 141: 205-218.
- * Wenham P.R., Horn D.B., Smith A.F. (1985). Multiple forms of γ -glutamyltransferase: A clinical study. Clin Chem, 31: 569-573.
- * WHO policy perspectives on medicines. (2002). Traditional medicine; growing needs and potential. 2:1-6. Geneva, World Health Organization.
- * WHO (2008). *Action plan for the global strategy for the prevention and control of noncommunicable diseases 2008-2013*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- * Wichtl M. (2004). *Herbal drugs and phytopharmaceuticals*. Sao Paulo, Brazil: Medpharm.
- * Wilkinson J.H. (1976). *The principles and practice of diagnostic enzymology*. London, UK: Edward Arnold.

- * Wirth JH, Hudgins JC, Paice JA. (2005). Use of herbal therapies to relieve pain: A review of efficacy and adverse effects. *Pain Manag Nurs*, 6 (4): 145-167.
- * Yoshifumi Y., Yoko Y. (2006). A practical synthesis of d- α -terpineol via Markovnikov addition of d-limonene using trifluoroacetic acid. *Org Process Res Dev*, 10 (6): 1231–1232.
- * Zhang X. (2002). *WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.

PRILOZI

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Prilog 1.

OLYMPUS

OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR, 66300

LOT 0113

Constituent	Method	Traceability	Assigned Value	Units
ACID PHOSPHATASE OSR6101	(ACP-T) Hillman 37°C	Olympus Master Calibrator	26.9 0.45	U/L µkat/L
	(ACP-NP) Hillman 37°C	Olympus Master Calibrator	15.2 0.25	U/L µkat/L
ALBUMIN OSR6102	Bromocresol Green	CRM470	41.3 4.13	g/L g/dL
ALKALINE PHOSPHATASE OSR6104	IFCC Method 37°C	Olympus Master Calibrator	205 3.42	U/L µkat/L
	DEA-Buffer 37°C	Olympus Master Calibrator	294 4.90	U/L µkat/L
ALT OSR6107 + P-5-P	IFCC Reference method with P-5-P 37°C	IFCC Reference Method	85.1 1.42	U/L µkat/L
	Modified without P-5-P 37°C	Olympus Master Calibrator	85.1 1.42	U/L µkat/L
α-AMYLASE OSR6182	IFCC Reference Method (EPS) 37°C	IFCC Reference Method	133 2.22	U/L µkat/L
	CNPG ₃ 37°C	Olympus Master Calibrator	120 2.00	U/L µkat/L
AST OSR6109 + P-5-P	IFCC Reference method with P-5-P 37°C	IFCC Reference Method	93.7 1.56	U/L µkat/L
	Modified without P-5-P 37°C	Olympus Master Calibrator	93.7 1.56	U/L µkat/L
DIRECT BILIRUBIN OSR6111	DPD	Olympus Master Calibrator	40.1 2.35	µmol/L mg/dL
TOTAL BILIRUBIN OSR6112	DPD	NIST SRM 916a	59.9 3.50	µmol/L mg/dL
CALCIUM OSR6113, OSR6176	oCPC, Arsenazo III	NIST SRM 909b L1	2.48 9.92	mmol/L mg/dL
	Arsenazo		2.48 9.92	mmol/L mg/dL
CHOLINESTERASE OSR6114	GSCC 1994 37°C	GSCC Std Method	6.26 104	kU/L µkat/L
CHOLESTEROL OSR6116	CHO-POD	NIST SRM 909b L1 (IDMS)	4.94 191	mmol/L mg/dL
		CDC Reference Method (Abell-Kendall)	4.89 182	mmol/L mg/dL
CK-NAC OSR6179	IFCC 37°C	IFCC Reference Method	148 2.47	U/L µkat/L
CREATININE OSR6178	Jaffe IDMS Traceable	NIST SRM 967 L1 & L2	233 2.64	µmol/L mg/dL
	Uncompensated Jaffe	NIST SRM 909b L2	230 2.60	µmol/L mg/dL
OSR61204	Enzymatic	NIST SRM 967 L1 & L2	217 2.45	µmol/L mg/dL

Olympus Life Science Research Europa GmbH, Sauerbruchstr. 50, 81377 Munich, Germany.

L66300_0113_ML.02
2008-11

Calibrator

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Constituent	Method		Traceability	Assigned Value	Units
GGT OSR6120	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	101 1.68	U/L μkat/L
GLUCOSE OSR6121	HK G6P-DH		NIST SRM 965	7.79 140	mmol/L mg/dL
GLUCOSE-STAT OSR6140	HK G6P-DH		NIST SRM 965	7.63 137	mmol/L mg/dL
HBDH OSR6129	GSCC 1972	37°C	Olympus Master Calibrator	115 1.92	U/L μkat/L
INORGANIC PHOSPHOROUS OSR6122	Molybdate, UV		Olympus Master Calibrator	2.78 8.62	mmol/L mg/dL
IRON OSR6196	TPTZ		Olympus Master Calibrator	31.4 175	μmol/L μg/dL
LACTATE OSR6193	Trinder Method		Gravimetric Standard	2.44 22.0	mmol/L mg/dL
LDH OSR6128	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	153 2.55	U/L μkat/L
OSR6126	SCE 1982	37°C	Olympus Master Calibrator	316 5.27	U/L μkat/L
LIPASE OSR6130	Colorimetric (Imamura)	37°C	Olympus Master Calibrator	132 2.20	U/L μkat/L
MAGNESIUM OSR6189	Xylidyl blue		NIST SRM 909b L2	0.84 2.04	mmol/L mg/dL
TOTAL PROTEIN OSR6132	Biuret		NIST SRM 927c	70.4 7.04	g/L g/dL
TRIGLYCERIDE OSR6133 OSR6118	GPO-POD		Isotope Dilution Mass Spectrometry Reference Method	2.52 223	mmol/L mg/dL
UIBC OSR6124	Nitroso-PSAP		Olympus Master Calibrator	38.8 217	μmol/L μg/dL
OSR61205	Nitroso-PSAP		NIST SRM 937	39.9 223	μmol/L μg/dL
UREA OSR6134 OSR6141	Urease/GLDH		NIST SRM 909b L1	16.6 99.6	mmol/L mg/dL
URIC ACID OSR6136	Uricase/POD		NIST SRM 909b L1	444 7.46	μmol/L mg/dL
OSR6198			Isotope Dilution Mass Spectrometry Reference Method	450 7.56	μmol/L mg/dL

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Prilog 2.

OLYMPUS

CONTROL SERUM 1, ODC0003						LOT 0027
Constituent	Method	Traceability	Mean	Acceptable Range	Units	
ACP OSR6101	(ACP-T) Hillman	37°C	9.84 0.16	6.59 – 13.1 0.11 – 0.22	U/L µkat/L	
	(ACP-NP) Hillman	37°C	3.95 0.07	2.65 – 5.25 0.04 – 0.09	U/L µkat/L	
	(ACP-Prostatic) Hillman	37°C	5.89 0.10	3.95 – 7.83 0.07 – 0.13	U/L µkat/L	
ALBUMIN OSR6102	Bromocresol Green		24.1 2.41	18.6 – 29.6 1.86 – 2.96	g/L g/dL	
ALP OSR6104	IFCC Method	37°C	111 1.85	83.3 – 139 1.39 – 2.31	U/L µkat/L	
	DEA-Buffer	37°C	152 2.53	114 – 190 1.90 – 3.17	U/L µkat/L	
ALT OSR6107 + P-5-P	IFCC Reference method with Pyridoxal Phosphate	37°C	40.8 0.68	31.4 – 50.2 0.52 – 0.84	U/L µkat/L	
	Modified without Pyridoxal Phosphate	37°C	40.8 0.68	31.4 – 50.2 0.52 – 0.84	U/L µkat/L	
α-AMYLASE OSR6182	IFCC Reference Method (EPS)	37°C	83.2 1.39	66.6 – 99.8 1.11 – 1.66	U/L µkat/L	
	CNPG ₃	37°C	79.1 1.32	63.3 – 94.9 1.05 – 1.58	U/L µkat/L	
APO A1 OSR6142	Turbidimetry		0.85 85.0	0.68 – 1.02 68.0 – 102	g/L mg/dL	
AST OSR6109 + P-5-P	IFCC Reference method with Pyridoxal Phosphate	37°C	44.9 0.75	34.6 – 55.2 0.58 – 0.92	U/L µkat/L	
	Modified without Pyridoxal Phosphate	37°C	44.9 0.75	34.6 – 55.2 0.58 – 0.92	U/L µkat/L	
DIRECT BILIRUBIN OSR6111	DPD		19.3 1.13	14.3 – 24.3 0.84 – 1.42	µmol/L mg/dL	
TOTAL BILIRUBIN OSR6112	DPD		26.9 1.57	19.9 – 33.9 1.16 – 1.98	µmol/L mg/dL	
CALCIUM OSR6113	oCPC		2.33 9.30	2.07 – 2.59 8.29 – 10.3	mmol/L mg/dL	
	Arsenazo III		2.32 9.28	2.06 – 2.58 8.26 – 10.3	mmol/L mg/dL	
	Arsenazo III		2.28 9.12	2.03 – 2.53 8.12 – 10.1	mmol/L mg/dL	
CHOLINESTERASE OSR6114	GSCC 1994	37°C	3.85 64.0	3.16 – 4.54 52.6 – 75.7	kU/L µkat/L	
CHLORIDE	ISE Indirect		89.9 89.9	81.8 – 98.0 81.8 – 98.0	mmol/L mEq/L	
Cholesterol OSR6116	CHO-POD		3.88 150	3.34 – 4.42 129 – 171	mmol/L mg/dL	
			3.71 144	3.19 – 4.23 123 – 164	mmol/L mg/dL	
CK-NAC OSR6179	IFCC	37°C	153 2.55	122 – 184 2.04 – 3.06	U/L µkat/L	
Creatinine OSR6178	Jaffe IDMS Traceable		91.0 1.03	71.0 – 111 0.80 – 1.26	µmol/L mg/dL	
	Uncompensated Jaffe		107 1.21	83.5 – 131 0.94 – 1.48	µmol/L mg/dL	
OSR61204	Enzymatic		99.4 1.12	77.5 – 121 0.88 – 1.37	µmol/L mg/dL	

Olympus Life Science Research Europa GmbH, Sauerbruchstr. 50, 81377 Munich, Germany.

LODC0003_0027_ML.01
2009-05

Control

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Constituent	Method		Traceability	Mean	Acceptable Range	Units
GGT OSR6120	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	54.9 0.92	42.8 – 67.0 0.71 – 1.12	U/L μkat/L
GLUCOSE OSR6121	HK G6P-DH		NIST SRM 965	5.35 96.0	4.49 – 6.21 80.9 – 112	mmol/L mg/dL
OSR6140				5.35 96.0	4.49 – 6.21 80.9 – 112	mmol/L mg/dL
HBDH OSR6129	GSCC 1972	37°C	Olympus Master Calibrator	108 1.80	86.4 – 130 1.44 – 2.16	U/L μkat/L
IgA OSR6144	Turbidimetry		ERM - DA470	1.05 105	0.80 – 1.30 79.8 – 130	g/L mg/dL
OSR61171				1.13 113	0.86 – 1.40 85.9 – 140	g/L mg/dL
IgG OSR6145	Turbidimetry		ERM - DA470	5.59 559	4.47 – 6.71 447 – 671	g/L mg/dL
OSR61172				5.74 574	4.59 – 6.89 459 – 689	g/L mg/dL
IgM OSR6146	Turbidimetry		ERM - DA470	0.60 59.9	0.43 – 0.77 43.1 – 76.7	g/L mg/dL
OSR61173				0.62 62.0	0.45 – 0.79 44.6 – 79.4	g/L mg/dL
INORGANIC PHOSPHOROUS OSR6122	Molybdate, UV		Olympus Master Calibrator	1.89 5.86	1.55 – 2.23 4.80 – 6.91	mmol/L mg/dL
IRON OSR6186	TPTZ		Olympus Master Calibrator	11.7 65.0	10.1 – 13.3 56.2 – 74.5	μmol/L μg/dL
LACTATE OSR6193	Trinder Method		Gravimetric Standard	1.61 14.5	1.27 – 1.95 11.5 – 17.6	mmol/L mg/dL
LDH OSR6126	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	144 2.40	118 – 170 1.97 – 2.83	U/L μkat/L
OSR6126	SCE 1974	37°C	Olympus Master Calibrator	301 5.00	247 – 355 4.11 – 5.92	U/L μkat/L
LIPASE OSR6130	Colorimetric (Imamura)	37°C	Olympus Master Calibrator	78.0 1.30	62.4 – 93.6 1.04 – 1.56	U/L μkat/L
LITHIUM	Atomic Absorption Spectrometry		Reference method*	1.03 1.03	0.89 – 1.17 0.89 – 1.17	mmol/L mEq/L
MAGNESIUM OSR6189	Xylidyl blue		NIST SRM 909b L2	0.73 1.77	0.61 – 0.85 1.49 – 2.06	mmol/L mg/dL
POTASSIUM	ISE Indirect		NIST (SRM) 956a	3.81 3.81	3.47 – 4.15 3.47 – 4.15	mmol/L mEq/L
SODIUM	ISE Indirect		NIST (SRM) 956a	118 118	111 – 125 111 – 125	mmol/L mEq/L
TRIGLYCERIDE OSR6133	GPO-POD		Isotope Dilution Mass Spectrometry Reference Method	1.85 164	1.52 – 2.18 134 – 193	mmol/L mg/dL
OSR61118				1.85 164	1.52 – 2.18 134 – 193	mmol/L mg/dL
TOTAL PROTEIN OSR6132	Biuret		NIST SRM 927c	40.3 4.03	35.9 – 44.7 3.59 – 4.47	g/L g/dL
UIBC OSR6124	Nitroso-PSAP		Olympus Master Calibrator	33.8 189	27.0 – 40.6 151 – 227	μmol/L μg/dL
OSR61205	Nitroso-PSAP		NIST SRM 937	22.7 127	18.2 – 27.2 101 – 152	μmol/L μg/dL
UREA OSR6134, OSR6141	Urease/GLDH		NIST SRM 909b L1	6.34 38.0 17.8	4.95 – 7.73 29.7 – 46.4 13.8 – 21.7	mmol/L mg/dL mg BUN/dL
URIC ACID OSR6136	Uricase/POD		NIST SRM 909b L1	300 5.04	258 – 342 4.34 – 5.75	μmol/L mg/dL
OSR6198				314 5.28	270 – 358 4.54 – 6.00	μmol/L mg/dL

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Prilog 3.

OLYMPUS

CONTROL SERUM 2, ODC0004						LOT	0028
Constituent	Method	Traceability	Mean	Acceptable Range	Units		
ACP OSR6101	(ACP-T) Hillman	37°C	19.3	12.9 – 25.7	U/L		
			0.32	0.22 – 0.43	µkat/L		
	(ACP-NP) Hillman	37°C	8.62	5.78 – 11.5	U/L		
			0.14	0.10 – 0.19	µkat/L		
	(ACP-Prostatic) Hillman	37°C	10.7	7.16 – 14.2	U/L		
			0.18	0.12 – 0.24	µkat/L		
ALBUMIN OSR6102	Bromocresol Green	ERM - DA470	43.6	33.6 – 53.6	g/L		
			4.36	3.36 – 5.36	g/dL		
ALP OSR6104	IFCC Method	37°C	490	368 – 613	U/L		
			8.17	6.13 – 10.2	µkat/L		
OSR6103	DEA-Buffer	37°C	653	490 – 816	U/L		
			10.9	8.16 – 13.6	µkat/L		
ALT OSR6107 + P-5-P	IFCC Reference method with Pyridoxal Phosphate	37°C	124	95.5 – 153	U/L		
			2.07	1.59 – 2.54	µkat/L		
OSR6107	Modified without Pyridoxal Phosphate	37°C	124	95.5 – 153	U/L		
			2.07	1.59 – 2.54	µkat/L		
α-AMYLASE OSR6182	IFCC Reference Method (EPS)	37°C	235	188 – 282	U/L		
			3.92	3.13 – 4.70	µkat/L		
OSR6106	CNPG ₃	37°C	220	176 – 264	U/L		
			3.67	2.93 – 4.40	µkat/L		
Apo A1 OSR6142	Turbidimetry	WHO, SP1-01	1.25	1.00 – 1.50	g/L		
			125	100 – 150	mg/dL		
Apo B OSR6143	Turbidimetry	WHO, SP3-07	0.68	0.54 – 0.82	g/L		
			68.0	54.4 – 81.6	mg/dL		
AST OSR6109 + P-5-P	IFCC Reference Method with Pyridoxal Phosphate	37°C	138	106 – 170	U/L		
			2.30	1.77 – 2.83	µkat/L		
OSR6109	Modified without Pyridoxal Phosphate	37°C	138	106 – 170	U/L		
			2.30	1.77 – 2.83	µkat/L		
DIRECT BILIRUBIN OSR6111	DPD	Olympus Master Calibrator	81.6	60.4 – 103	µmol/L		
			4.77	3.53 – 6.01	mg/dL		
TOTAL BILIRUBIN OSR6112	DPD	NIST SRM 916a	116	85.8 – 146	µmol/L		
			6.78	5.02 – 8.55	mg/dL		
CALCIUM OSR6113	oCPC		3.27	2.91 – 3.63	mmol/L		
			13.1	11.6 – 14.5	mg/dL		
OSR6176	Arsenazo III	NIST SRM 909b L1	3.23	2.87 – 3.59	mmol/L		
			12.9	11.5 – 14.3	mg/dL		
OSR61117	Arsenazo III		3.21	2.86 – 3.56	mmol/L		
			12.8	11.4 – 14.3	mg/dL		
CHOLINESTERASE OSR6114	GSCC 1994	37°C	5.55	4.55 – 6.55	U/L		
			92.0	75.8 – 109	µkat/L		
CHLORIDE	ISE indirect	NIST (SRM) 956a	118	107 – 129	mmol/L		
			118	107 – 129	mEq/L		
CHOLESTEROL OSR6116		NIST SRM 909b L1 (IDMS)	7.65	6.58 – 8.72	mmol/L		
			296	255 – 338	mg/dL		
	CHO-POD	CDC Reference Method (Abell-Kendall)	7.31	6.29 – 8.33	mmol/L		
			283	243 – 323	mg/dL		
CK-NAC OSR6179	IFCC	37°C	406	325 – 487	U/L		
			6.77	5.41 – 8.12	µkat/L		
CREATININE OSR6178	Jaffe IDMS Traceable	NIST SRM 967 L1 & L2	436	340 – 532	µmol/L		
			4.93	3.85 – 6.02	mg/dL		
	Uncompensated Jaffe	NIST SRM 909b L2	448	350 – 547	µmol/L		
			5.07	3.96 – 6.19	mg/dL		
OSR61204	Enzymatic	NIST SRM 967 L1 & L2	456	355 – 556	µmol/L		
			5.15	4.02 – 6.29	mg/dL		

Olympus Life Science Research Europa GmbH, Sauerbruchstr. 50, 81377 Munich, Germany.

LOCC0004_0028_ML01
2009-05

Control

**UTICAJ ODABRANIH MONOTERPENA NA AKTIVNOST DIJAGNOSTIČKI ZNAČAJNIJIH ENZIMA
U KONTROLNOM HUMANOM SERUMU IN VITRO**

Constituent	Method		Traceability	Mean	Acceptable Range	Units
GGT OSR6120	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	156 2.60	122 – 190 2.03 – 3.17	U/L µkat/L
GLUCOSE OSR6121 OSR6140	HK G6P-DH		NIST SRM 965	12.6 226 12.6 226	10.6 – 14.6 190 – 263 10.5 – 14.6 190 – 262	mmol/L mg/dL mmol/L mg/dL
HBDH OSR6129	GSCC 1972	37°C	Olympus Master Calibrator	449 7.48	359 – 539 5.99 – 8.98	U/L µkat/L
IgA OSR6144 OSR61171	Turbidimetry		ERM - DA470	1.71 171 1.82 182	1.30 – 2.12 130 – 212 1.38 – 2.26 138 – 226	g/L mg/dL g/L mg/dL
IgG OSR6145 OSR61172	Turbidimetry		ERM - DA470	9.71 971 9.41 941	7.77 – 11.7 777 – 1165 7.53 – 11.3 753 – 1129	g/L mg/dL g/L mg/dL
IgM OSR6146 OSR61173	Turbidimetry		ERM - DA470	0.90 90.4 0.94 94.0	0.65 – 1.16 65.1 – 116 0.68 – 1.20 67.7 – 120	g/L mg/dL g/L mg/dL
INORGANIC PHOSPHOROUS OSR6122	Molybdate, UV		Olympus Master Calibrator	3.36 10.4	2.76 – 3.96 8.54 – 12.3	mmol/L mg/dL
IRON OSR6186	TPTZ		Olympus Master Calibrator	38.3 214	32.9 – 43.7 184 – 244	µmol/L µg/dL
LACTATE OSR6193	Trinder Method		Gravimetric Standard	4.26 38.4	3.37 – 5.15 30.3 – 46.4	mmol/L mg/dL
LDH OSR6128 OSR6126	IFCC	37°C	IFCC Reference Method	520 8.67	426 – 614 7.11 – 10.2	U/L µkat/L
	SCE 1974	37°C	Olympus Master Calibrator	1175 19.6	964 – 1387 16.1 – 23.1	U/L µkat/L
LIPASE OSR6130	Colorimetric (Imamura)	37°C	Olympus Master Calibrator	184 3.07	147 – 221 2.45 – 3.68	U/L µkat/L
LITHIUM	Atomic Absorption Spectrometry		Reference method*	1.97 1.97	1.69 – 2.25 1.69 – 2.25	mmol/L mEq/L
MAGNESIUM OSR6189	Xylidyl blue		NIST SRM 909b L2	1.68 4.08	1.41 – 1.95 3.43 – 4.74	mmol/L mg/dL
POTASSIUM	ISE Indirect		NIST (SRM) 956a	6.36 6.36	5.79 – 6.93 5.79 – 6.93	mmol/L mEq/L
SODIUM	ISE Indirect		NIST (SRM) 956a	152 152	143 – 161 143 – 161	mmol/L mEq/L
TRIGLYCERIDE OSR6133 OSR61118	GPO-POD		Isotope Dilution Mass Spectrometry Reference Method	3.90 345 3.91 346	3.20 – 4.60 283 – 407 3.21 – 4.61 284 – 408	mmol/L mg/dL mmol/L mg/dL
TOTAL PROTEIN OSR6132	Biuret		NIST SRM 927c	75.0 7.50	66.8 – 83.3 6.68 – 8.33	g/L g/dL
UIBC OSR6124 OSR61205	Nitroso-PSAP		Olympus Master Calibrator	41.0 229	32.8 – 49.2 183 – 275	µmol/L µg/dL
	Nitroso-PSAP		NIST SRM 937	42.0 235	33.6 – 50.4 188 – 281	µmol/L µg/dL
UREA OSR6134, OSR6141	Urease/GLDH		NIST SRM 909b L1	26.9 161 75.3	21.0 – 32.8 126 – 197 58.7 – 91.9	mmol/L mg/dL mg BUN/dL
URIC ACID OSR6136 OSR6198	Uricase/POD		NIST SRM 909b L1 Isotope Dilution Mass Spectrometry Reference Method	536 9.01 570 9.58	461 – 611 7.75 – 10.3 490 – 650 8.24 – 10.9	µmol/L mg/dL µmol/L mg/dL

Control

LOCC0004_0026_ML.01
2009-05

BIOGRAFIJA AUTORA

Ljiljana Jelenković rođena je u Nišu, gde je završila Osnovnu školu „Učitelj Tasa“ i Gimnaziju „Svetozar Marković“, kao nosilac diplome Vuk Karadžić. Na Filozofskom fakultetu Univerziteta u Nišu, Prirodno-matematičkom odseku, grupi za Hemiju, završila je osnovne studije. Magistarsku tezu odbranila je na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Nišu, Departmanu za hemiju, jula 2010. Izradu doktorske disertacije započela je školske 2010/2011. godine, ostvarivši saradnju Departmana za hemiju PMF-a u Nišu i biohemijske laboratorije Doma zdravlja u Nišu.

Zaposlena je kao profesor medicinske biohemije u Medicinskoj školi u Nišu od septembra 1994. Stručni ispit za rad u prosveti (licenca), položila je u novembru 1996. i stekla zvanje profesor. U dva navrata, od 2003-2006. i od 2008-2013. obavljala je i poslove pomoćnika direktora vezane za organizaciju nastave. Od 2004. do danas ima preko 250 sati akreditovanih seminara Ministarstva prosvete RS za osnaživanje kompetencija nastavnika. Angažovana je i kao mentor kolegama pripravnicima za uvođenje u posao u školi.

Od 2000-2006. bila je aktivna u lokalnoj zajednici za zaštitu i očuvanje životne sredine kroz članstvo u lokalnom ekološkom akcionom timu, kao i timu za zaštitu životne sredine i održivi razvoj. Aktivno je učestvovala u izradi LEAP dokumenta opštine Niš, prvog takve vrste u zemlji, kao i u njegovoj kasnijoj implementaciji. Od 2002-2004. Bila je koordinator za zdrav način ishrane u ekološkom timu Evro regiona Eurobalkan. Član Naučno-stručnog društva za ekologiju i zaštitu životne sredine Ecologica.

Do sada je objavila 12 naučnih radova, sa temama iz biohemije, ekologije i prosvete. Učestvovala je na jednom svetskom i 7 međunarodnih kongresa sa prezentovanjem svojih radova. Autor je seminara iz oblasti ekologije i biohemije, koje izvodi po pozivu. Objavila je i tri monografije, dve koautorske iz oblasti ekologije i jednu autorsku iz oblasti biohemije. U pripremi je i monografija bazirana na velikom istraživanju sprovedenom na niškim maturantima o izboru buduće profesije.

Udata je i majka dvoje dece, Vladimira i Aleksandra.

BIBLIOGRAFIJA AUTORA

-NAUČNI RADOVI-

- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Ecology today, economy tomorrow, Economics, (2012), 58 (4): 171-178. (M₅₂)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Scientific and educational aspects of the structures of amino acids, HealthMED, (2013), 7 (2): 714-722. ISSN: 1840-2291. (M₂₃)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Systems of communication in order to choice of profession - a case study of Nis, Themes, (2013), 37 (2): 667-681. (M₂₄)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Solving problems in communication of human and nature, Ecologica, (2013), 20 (71): 522-526. (M₅₁)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Advertising in the function of the communication system, Communications, Media and Culture, (2013), 5: 281-299. (M₅₃)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, The Significance of Lobbyng and Marketing in Accepting Healthy Habits, Ecologica, (2014), 21 (76): 684 – 688. (M₅₁)
- * Ljiljana Jelenkovic, Vesna Stankov Jovanovic, Ivan Palić, Violeta Mitic and Milanka Radulovic, In Vitro Screening of α -Amylase Inhibition by Selected Terpenes from Essential Oils, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, (TJPR), (2014); 13 (9): 1421-1428, ISSN: 1596-5996 (M₂₃)
- * Ljiljana Jelenković, Vesna Stankov Jovanović, Ivan Palić, Violeta Mitić, Tatjana Jevtović-Stoimenov and Milanka Radulović. “Examination of the decrease in activity of clinically significant enzymes in commercial serum caused by terpenes in vitro”. Oxidation Communication, accepted for publication in book 4 (2016) (M₂₃).
- * Ljiljana Jelenković, Predrag Jelenković, Ljubo Pejanović. „The economic possibilities and perspectives of aromatic and medicinal herbs (*Satureja kitaibelii*)”. Economics of agriculture, accepted for publication in book 2 (2016) (M₂₄).

-ZBORNICI SA KONGRESA-

- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Local government and Environmental protection, Proceedings, 4th International Conference Multiculturalism and Contemporary Society Novi Sad, (2013): 592-601, ISBN 978-86-7910-066-5 (M₃₁)

- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Local government and Environmental protection, Book of abstracts, 4th International Conference Multiculturalism and Contemporary Society Novi Sad, (2013): 194, ISBN 978-86-7910-056-6. (**M₃₂**)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Solving problems in communication of human and nature, Book of abstracts, International scientific conference on Impact of Climate Change on the Environment and the Economy, Beograd, (2013): 240-242. (**M₃₄**)
- * Ljiljana Jelenkovic, Ivan Palic, Violeta Mitic, Marija Ilic, Strahinja Simonovic, Vesna Stankov Jovanovic, Screening of Amylase Inhibition by Selected Essential Oils Components as Potential Agents in Diabetes Prevention, Book of abstracts 11th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, (2013), 82. (**M₆₄**)
- * Ljiljana Jelenkovic, Ivan Palic, Violeta Mitic, Marija Ilic, Strahinja Simonovic, Vesna Stankov Jovanovic, Influence of Selected Terpenes on Diagnostically Significant Enzymes, Book of abstracts 11th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighbouring Regions, Vlasina Lake, (2013), 98. (**M₆₄**)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, The Significance of Lobbying and Marketing in Accepting Healthy Habits, Book of abstracts, International scientific conference on Sustainable Economy and the Environment, Beograd, (2014): 205-206. (**M₃₄**)
- * Ljiljana Jelenkovic, Predrag Jelenkovic, Medical/Pharmaceutical Waste as Environmental Risk, Proceedings 1th Symposium with international participation, State and prospects of pharmaceutical and medical waste, Palić, (2014): 21-26. (**M₆₁**)
- * Ljiljana Jelenkovic, Predrag Jelenkovic, Secondary metabolite plants and their importance for the living world (Satureja kitaibelii Wierzb. et Heuff.), Book of Abstracts from the International Scientific Meeting Environment and adaptation to climate change in the economy, Beograd, (2015), (**M₃₄**)
- * Ljiljana Jelenkovic, Predrag Jelenkovic, Dealing with medical / pharmaceutical waste - a challenge for the preservation of the environment, Proceedings of the 2nd consultation with international participation, Sremski Karlovci (2015): 43-51. (**M₆₁**)
- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, The importance of the public and education in the protection of biodiversity from the global to the local levels, Book of abstracts III World biodiversity congress, Mokra Gora (2015), 22. (**M₃₂**)

- * Predrag Jelenkovic, Ljiljana Jelenkovic, Miljan Hadzovic, Communication aspects of grapes and implementing security strategies of young people - a case study of Nis, Proceedings of the 5th International Conference Values and Identity, Novi Sad, (2015), 322-332. (M₃₁)

-MONOGRAFIJE-

- * LEAP municipalities Nis (Local Environmental Action Plan) - Municipality of Nis, 2001. (co-author Ljiljana Jelenkovic)
- * Environment in the documents of the European Union - Publisher MRC Nis, January 2012. (Predrag and Ljiljana Jelenkovic) ISBN 978-86-910483-6-5. (M₄₅)
- * Public relations in the field of environmental protection - Publisher Cigoja printing Belgrade, May 2012. (Predrag and Ljiljana Jelenkovic) ISBN 978-86-7558-910-5. (M₄₂)
- * Terpene and metabolism (*Satureja kitaibelii* Wierzb. et Heuff.) - Publisher Foundation Andrejevic, Belgrade, November 2014. (Ljiljana Jelenkovic) ISBN 978-86-525-0179-3. (M₄₂)

IZJAVE AUTORA



Изјава 1.

ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

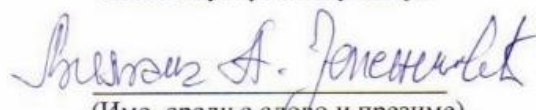
Утицај одабраних монотерпена на активност дијагностички значајнијих ензима у контролном хуманом серуму *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да ову дисертацију, ни у целини, нити у деловима, нисам пријављивао/ла на другим факултетима, нити универзитетима;
- да нисам повредио/ла ауторска права, нити злоупотребио/ла интелектуалну својину других лица.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са ауторством и добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Нишу, 22. 06. 2016.

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)



Изјава 2.

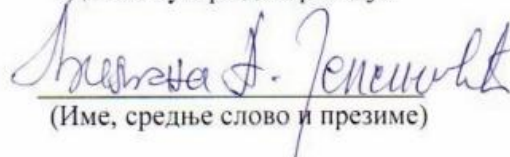
**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ЕЛЕКТРОНСКОГ И ШТАМПАНОГ ОБЛИКА
ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Наслов дисертације: __ Утицај одабраних монотерпена на активност дијагностички значајнијих ензима у контролном хуманом серуму *in vitro* _____

Изјављујем да је електронски облик моје докторске дисертације, коју сам предао/ла за уношење у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, истоветан штампаном облику.

У Нишу, 22. 06. 2016.

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)



Изјава 3:

ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

_____ Утицај одабраних монотерпена на активност дијагностички значајнијих ензима у контролном хуманом серуму *in vitro* _____

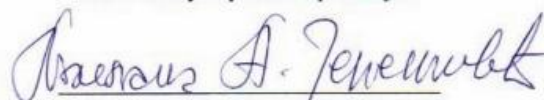
Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском облику, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прераде (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)¹

У Нишу, 22. 06. 2016.

Потпис аутора дисертације:


(Име, средње слово и презиме)

ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ КРЕАТИВНЕ ЗАЈЕДНИЦЕ

1. Ауторство (CC BY)

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

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. Уодносу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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