



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

Милена Ћурчић

**МОЛЕКУЛАРНИ МЕХАНИЗМИ АПОПТОЗЕ У ЋЕЛИЈАМА КАРЦИНОМА
КОЛОНА НАКОН *IN VITRO* ТРЕТМАНА ЕКСТРАКТИМА
ЛЕКОВИТИХ БИЉАКА**

Докторска дисертација

Крагујевац, 2014. године

I Аутор
Име и презиме: Милена Г. Ђурчић
Датум и место рођења: 30.10.1985. године, Ивањица
Садашње запослење: Институт за биологију и екологију, звање истраживач-сарадник Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
II Докторска дисертација
Наслов: Молекуларни механизми апоптозе у ћелијама карцинома колона након <i>in vitro</i> третмана екстрактима лековитих биљака
Број страница: 194
Број слика: 34 слике, 27 графикона и 45 табела
Број библиографских података: 436
Установа и место где је рад израђен: Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Биологија, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија, 577.2: 591.1
Ментор: Др Снежана Д. Марковић, доцент Природно-математичког факултета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 12.06.2013. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата:
<p>Др Андраш Штајн, редовни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</p> <p>Др Марина Топузовић, ванредни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Морфологија, систематика и филогенија биљака;</p> <p>Др Снежана Марковић, доцент ПМФ-а Универзитет, у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија – ментор;</p> <p>Др Милица Пешић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду, научна област Биологија, ужа научна област Молекуларна.</p>
Комисија за преглед и одбрану докторске дисертације:
<p>_____</p> <p>Др Андраш Штајн, редовни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија;</p> <p>_____</p> <p>Др Марина Топузовић, ванредни професор ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Морфологија, систематика и филогенија биљака;</p> <p>_____</p> <p>Др Снежана Марковић, доцент ПМФ-а, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија – ментор;</p> <p>_____</p> <p>Др Милица Пешић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић“ Универзитет у Београду, научна област Биологија, ужа научна област Молекуларна неуробиологија и Молекуларна онкологија.</p>
Датум одбране докторске дисертације:



ЗАХВАЛНИЦА

Задовољство ми је да се захвалим људима који су на било који начин олакшали, подржали и допринели изради докторске дисертације.

Првенствено захвалност дугујем људима који су свакодневно били присутни, ментору доц. др Снежани Марковић, на пруженој помоћи, стручним сугестијама и смерницама током истраживачког рада и израде докторске дисертације;

Желела бих да се захвалим члановима комисије проф. др Андрашу Штајну, др Милици Пешић и проф. др Марини Топузовић на корисним саветима и сугестијама, које су допринеле квалитету докторске дисертације;

На сарадњи у свакодневном раду захваљујем се колегама из Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију на ПМФ-у у Крагујевцу, са којима сам направила своје прве истраживачке кораке у области молекуларне и ћелијске биологије. Међу њима, посебну захвалност дугујем Данијели Цветковић на пријатељској подршци и осмеху од раних јутарњих сати;

Посебну захвалност дугујем доц. др Милану Станковићу на пријатељским и стручним саветима од самог почетка докторских студија, почев од теренских истраживања, лабораторијског рада, помоћи приликом писања и обраде резултата дисертације. За помоћ приликом теренских истраживања, као и на фотографијама биљног материјала захваљујем се колеги Милошу Радаковићу;

Захваљујем се др Вуку Максимовићу из Института за биолошка истраживања „Синиша Станковић” у Београду за помоћ приликом експерименталног рада и обраде резултата HPLC анализе, као и др Биљани Шмит из Института за хемију, ПМФ-а у Крагујевцу, за синтезу Pd(II) комплекса;

Захвалност дугујем Министарству просвете, науке и технолошког развоја. Републике Србије на стипендирању током прве две године докторских студија и даљем финансирању пројекта „Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС” - ИИИ 41010, у оквиру којег је урађена докторска дисертација;

ЗАХВАЛНИЦА

Највећу захвалност дугујем људима које волим и који су ми највећа подршка: мојој породици, Жељку и пријатељима. Хвала вам на љубави, пруженом стрпљењу и разумевању.

***Породици**, јер су ме својим поносом и вером у мене задужили да истрајем до краја и будем оно што јесам, као и на пруженој прилици да учим и радим оно што волим;*

***Жељку**, на позитивном ставу и разумевању мојих амбиција у сваком животном тренутку;*

***Пријатељима**, због подршке на коју увек могу да рачунам.*

Милена Г. Ђурчић

*Овај рад посвећујем нани Радивојки,
због љубави и помоћи пружене мени и другима*

САДРЖАЈ

I УВОД	1
1. Канцерогенеза	1
1.1. Терапија канцера	3
1.1.1. Цитостатици	4
1.1.2. Резистентција на цитостатике	5
1.1.3. Комбиновани третмани	6
1.1.4. Антитуморска својства паладијума	7
1.2. Колоректални карцином	8
1.2.1. Епидемиологија	8
1.2.2. Етиологија	8
1.2.3. Клиничка слика	9
1.2.4. Лечење	9
1.2.5. Ћелијске линије као модел системи за изучавање колоректалног карцинома	10
2. Апоптоза – програмирана ћелијска смрт	12
2.1. Спољашњи пут апоптозе	14
2.2. Унутрашњи пут апоптозе	15
2.3. Апоптоза у канцерогенези	17
2.4. Апоптоза у терапији канцера	18
3. Механизми редокс равнотеже	19
3.1. Реактивне врсте кисеоника (ROS)	20
3.1.1. Супероксид анион радикал (O_2^-)	21
3.2. Азот моноксид (NO) и реактивне врсте азота (RNS)	21
3.3. Ефекти ROS и NO на канцер и апоптозу	22
3.4. Антиоксидациони заштитни систем (AOS)	25
3.4.1. Глутатион (GSH)	25
3.5. Глутатион S-трансфераза (GST)	26
3.6. Цитохром P450 ензими	27
4. Употреба лековитих биљака у народној медицини	28
4.1. Биљке са антитуморским својствима)	28
4.2. Биолошки активне компоненте биљака	29
4.3. Екстракти биљака	33
4.4. Морфолошке, систематске и еколошке карактеристике изабраних биљних врста. Биолошка активност и употреба у народној медицини	34
4.4.1. <i>Teucrium chamaedrys</i> L. (подубица, дубац, дубчац)	34
4.4.2. <i>Allium flavum</i> L.	35
4.4.3. <i>Gentiana punctata</i> L. (пегава линцура)	37
4.4.4. <i>Ligustrum vulgare</i> L. (дивља калина)	38
4.4.5. <i>Centaureum erythrea</i> Rafn. (syn. <i>Centaureum umbellatum</i> Gilib., кичица, црвени кантарион)	40
II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	42

III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА.....	44
1. Узорковање, обрада и анализа биљног материјала	45
1.1. Узорковање и припрема биљног материјала	45
1.1.1. Идентификација биљног материјала	45
1.1.2. Поступак припреме биљних екстраката.....	46
1.2. Анализе биљног материјала <i>in vitro</i>	46
1.2.1. Одређивање укупне количине фенолних једињења	46
1.2.2. Одређивање количине флавоноида	47
2. Ђелијско молекуларне анализе	47
2.1. Ђелијске линије као модел систем.....	47
2.1.1. Коришћене ћелијске линије.....	48
2.1.2. Одређивање ћелија.....	49
2.1.3. Трипсинизација	49
2.1.4. Пасажирање ћелија	50
2.1.5. Одређивање броја и вијабилности ћелија.....	50
2.2. Методе испитивања биолошких ефеката	51
2.2.1. Третмани.....	51
2.2.1.1. Прављење раствора биљних екстраката	51
2.2.1.2. Прављење раствора паладијума	51
2.2.1.3. Појединачни третмани.....	51
2.2.1.4. Комбиновани третмани	52
2.2.2. Испитивање цитотоксичности и механизма апоптозе	53
2.2.2.1. МТТ тест цитотоксичности.....	53
2.2.2.2. Акридин оранж/етијидијум бромид микроскопска метода	54
2.2.2.3. Одређивање протеинске експресије Fas рецептора на мембрани	54
2.2.2.4. Одређивање активности каспаза 8 и 9	55
2.2.3. Испитивање параметара редокс статуса	56
2.2.3.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (NBT есеј).....	56
2.2.3.2. Одређивање концентрације нитрита по Griess-у.....	56
2.2.3.3. Одређивање протеинске експресије индуцибилне азот монооксид синтетазе (iNOS) имунофлуоресценцом	57
2.2.3.4. Одређивање концентрације редукованог глутатиона.....	57
2.2.4. Испитивање експресије информационе РНК <i>CYP1A1</i> , <i>GSTP1</i> и <i>MRP2</i> гена	58
2.2.4.1. Екстракција РНК из ћелија.....	58
2.2.4.2. Реверзна транскрипција (RT)	58
2.2.4.3. Ланчана реакција полимеразе (PCR)	59
3. Статистичка обрада резултата	59
IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА	61
1. Концентрације фенолних једињења и флавоноида у биљним екстрактима	61
2. Биолошки ефекти испитиваних супстанци и механизми деловања	62
2.1. Цитотоксичност и механизам проапоптотског деловања испитиваних супстанци	63
2.1.1. Цитотоксичност биљних екстраката у појединачним и комбинованим	

третманима са Pd(II) комплексом.....	63
2.1.2. Тип ћелијске смрти изазване појединачним и комбинованим третманима биљних екстраката и Pd(II) комплекса.....	70
2.1.3. Експресија Fas рецептора на ћелијској мембрани	80
2.1.4. Активност каспазе 8	83
2.1.5. Активност каспазе 9.....	85
2.2. Параметри прооксидационо/антиоксидационог статуса	87
2.2.1. Концентрација супероксид анјон радикала	88
2.2.2. Концентрација нитрита	93
2.2.3. Протеинска експресија iNOS	98
2.2.4. Концентрација глутатиона	102
2.3. Испитивање експресије информационе РНК ензима укључених у детоксификационе процесе	107
2.3.1. Експресија <i>β-actin-a</i>	108
2.3.2. Експресија <i>CYP1A1</i>	108
2.3.3. Експресија <i>GSTP1</i>	109
2.3.4. Експресија <i>MRP2</i>	111
V ДИСКУСИЈА.....	113
VI ЗАКЉУЧЦИ	138
VII ЛИТЕРАТУРА	142
VIII ПРИЛОЗИ	175

ЛИСТА СКРАЋЕНИЦА

ABC транспортери - *ATP Binding Cassette*
AIF - *Apoptosis Inducing Factor*
AlCl₃ (*Aluminum Chloride*) - алуминијум хлорид
AOS (*Antioxidative Defense System*) - антиоксидациони заштитни систем
APAF-1 - *Apoptosis Protease Activating Factor-1*
AP-1 - *Activator Protein 1*
ATCC - *American Type Culture Collection*
АТР - аденозин трифосфат
BCRP - *Breast Cancer Resistance Protein*
ВНА - 3-терц-бутил-4-хидроксианизол
Bid - *BH3 Interacting-domain Death-agonist*
BH3 domain - *Bcl-2 homology domains*
BSA (*Bovine Serum Albumin*) - говеђи албумин серум
CARD - *Caspase Activation and Recruitment Domain*
CEA - карциномембриогени антиген
CAT - каталаза
CDNB - 1-хлоро-2,4-динитробензен
CYP450 - цитохром P450
цДНК - комплементарна ДНК
DAPI - *Diamidino-2-Phenylindole*
DD - *Death Domain*
DED - *Death Effector Domain*
DISC - *Death Inducing Signaling Complex*
DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO (*Dimethyl Sulfoxide*) - диметил сулфоксид
DPPH - 2,2-дифенил-1-пикрилхидразил
DTNB - *5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid)*
EDTA – етилендиаминотетра сирћетна киселина
ECACC - *The European Collection of Animal Cell Cultures*
EMA - *European Medicines Agency*
FADD - *Fas Associated Death Domain Protein*
FasL - *Fatty acid synthetase Ligand*
FBS - *Fetal Bovine Serum*
FDA - *Food and Drug Administration*
FLIP - *FLICE Inhibitory Proteins*
GCS (*γ-glutamyl Cysteine Synthase*) - γ- глутамил цистеин синтетаза
GR - глутатион редуктаза
GS - глутатион синтаза
GSH - редуковани глутатион
GSH-Px - глутатион пероксидаза
GSSG - глутатион дисулфид
GST - глутатион-S-трансфераза
HIF-1α (*Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha*) - хипоксија индуцибилни фактор 1 алфа
H₂O₂ - водоник пероксид
HOCl - хипохлорна киселина
HPLC-MS - *High-performance liquid chromatography mass spectrometry*
IAPs - *Inhibitor of Apoptosis Proteins*

иРНК - информациона РНК
JNK киназа - *Jun N-terminal Kinase*
KOH - калијум хидроксид
MRP1 и 2 - *Multidrug Resistance-associated Proteins-1 and -2*
МТТ - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NaHCO₃ - натријум хидроген карбонат
NaOH - натријум хидроксид
NaNO₃ - натријум нитрат
Na₂HPO₄ - натријум хидроген фосфат
NBT - *Nitro Blue Tetrazolium*
NO (*Nitric Oxide*) - азот монооксид
NO[•] - нитроксил анјон
NO₂⁻ - нитрити
NOS (*Nitric Oxide Synthase*) - синтаза азот монооксида
 eNOS - ендотелна синтаза азот монооксида
 iNOS - индуцибилна синтаза азот монооксида
 mtNOS - митохондријална синтаза азот монооксида
 nNOS - неурална синтаза азот монооксида
NADPH - никотинамид аденин динуклеоти фосфат
NF-κB (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) - NF-κappaB
OH[•] - хидроксил радикал
ONOO⁻ - пероксинитрит
¹O₂ - синглет кисеоник
O₂^{-•} - супероксид анјон радикал
O₃ - озон
PBS - *Phosphate Buffer Saline*
PCR (*Polymerase Chain Reaction*) - ланчана реакција полимеразе
P-gp - P-гликопротеин
RNS (*Reactive Nitrogen Species*) - реактивне врсте азота
ROS (*Reactive Oxygen Species*) - реактивне врсте кисеоника
RO[•] - алкоксил радикал
RO₂^{-•} - пероксил радикал
RT - реверзна транскриптаза
SAPK/JNK - *Stress Activated Protein Kinases/Jun amino-terminal Kinases*
SOD - супероксид дисмутаза
TNF - *Tumor necrosis factors*
TNFR - *Tumor Necrosis Factor Receptor*
TNFR1 - *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*
TRADD - *TNFR Associated Death Domain*
TRAIL - *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*

ИЗВОД

Колоректални карцином представља значајан медицински проблем пошто су учесталост обољевања и смртност од ове болести у сталном порасту. Супстанце природног порекла које имају способност да интерагују са сигналним путевима укљученим у ћелијске функције и модификују сигналне путеве током процеса канцерогенезе успоравајући или блокирајући овај процес, поседују бројне предности у односу на синтетске. Због тога се јавља све већа потреба ка проналаску потенцијалних антитуморских супстанци пореклом из природних извора, као и испитивањима ефеката ових супстанци и биљних екстраката на изазивање апоптозе, као једне од водећих стратегија у терапији малигнух болести.

Циљеви истраживања докторске дисертације су: испитивање антитуморског потенцијала екстраката лековитих биљака флоре Србије, традиционално коришћених у третманима различитих дигестивних поремећаја (*Teucrium chamaedrys* L., *Allium flavum* L., *Gentiana punctata* L., *Ligustrum vulgare* L. и *Centaurium erythrea* Rafn.) на HCT-116 и SW480 ћелијама колоректалног карцинома и здравим фибробластима коже; испитивање потенцијалних синергистичких ефеката екстраката биљака *A. flavum* и *G. punctata* и новосинтетисаног Pd(II) комплекса (Паладијум(II) комплекс са лигандом 3-[(2-хидроксипензилиден) амино]-2-тиоксоимидазо лидин-4-он); испитивање молекуларних механизма проапоптотске активности изабраних врста биљака у појединачним и комбинованим третманима на HCT-116 и SW480 ћелијама, укључујући и механизме редокс зависне модулације процеса апоптозе и иРНК експресију гена чији протеински производи учествују у метаболизму антитуморских супстанци и појави резистенције малигнух ћелија.

Екстракти испитиваних врста лековитих биљака делују цитотоксично на ћелијским линијама колоректалног карцинома, док на здравим фибробластима коже не показују овакве ефекте, што потврђује њихова антитуморска својства. Интензитет цитотоксичности зависи од врсте биљке, квантитативног и квалитативног састава фенолних једињења присутних у њима и коришћеног растварача у екстракционој процедури. Међу испитиваним врстама екстраката, метанолни и ацетонски екстракт показују подједнако добру цитотоксичну активност, а етилацетатни екстракт најслабију, што је у корелацији са садржајем укупних фенола и флавоноида у екстрактима. Цитотоксични ефекти испитиваних врста биљака су последица индуковане апоптозе, као доминантно присутног типа ћелијске смрти. Третмани екстрактима биљака изазивају повећану експресију Fas рецептора на мембрани и активност каспазе 8 у спољашњем апоптотском путу у обе ћелијске линије. Повећана активност каспазе 9 потврђује улогу митохондрија у

апоптози, доминантно у НСТ-116 ћелијама у односу на SW480. Третмани биљним екстрактима утичу на редокс статус у ћелијама и доводе до редокс зависне модулације процеса апоптозе, као могућег узрока проапоптотског деловања биљака. Резултати испитивања иРНК експресије углавном показују инхибиторне ефекте биљних екстраката на иРНК експресију гена (*CYP1A1* (цитохром P450), *GSTP1* (глутатион-S-трансфераза) и *MRP2* (*Multidrug Resistance-associated Protein 2*)). Pd(II) комплекс изазива значајну цитотоксичност на ћелијама колоректалног карцинома, али и високе проценте некрозе и цитотоксичне ефекте на здравим фибробластима коже. Третмани Pd(II) комплексом изазивају највећу активност каспазе 9, што указује на значајну улогу митохондрија у процесу апоптозе у НСТ-116 ћелијама. У зависности од аплициране дозе индукује двојаке ефекте на параметре сигналних путева апоптозе и редокс статуса. Високе концентрације Pd(II) комплекса изазивају оксидациони стрес у ћелијама карцинома колона, што је могућ узрок индуковане некрозе, док ниске концентрације уводе ћелије у апоптозу. Експресија иРНК испитиваних гена за метаболичке ензиме је непромењена или негде повећана, што указује на метаболизам Pd(II) комплекса овим ензимима. Комбиновани третмани Pd(II) комплекса и екстраката биљака *A. flavum* и *G. punctata* смањују токсичност Pd(II) комплекса на здравим ћелијама, а супротно повећавају цитотоксичност на малигним ћелијама, при чему долази до међусобних синергистичких ефеката. У комбинованим третманима смањује се проценат некрозе у односу на појединачни третман Pd(II) комплексом, а повећава цитотоксичност изазвана апоптозом. Експресија иРНК гена чији су протеински производи укључени у метаболизам антитуморских супстанци генерално је смањена у комбинованим третманима у односу на појединачне у обе ћелијске линије, што резултира повећаном цитотоксичношћу Pd(II) комплекса због његовог слабијег метаболизма и транспорта кроз мембрану у присуству биљака које инхибирају експресију ових протеина.

Обзиром на актуелност теме, резултати докторске дисертације имају велики значај у испитивању нових антитуморских супстанци пореклом из природних извора, повећавају значај коришћења биљака као извора лекова, доприносе развоју адекватне терапије и тиме дају допринос дисертације како у научном, тако и у практичном смислу. Активне компоненте испитиваних врста биљака, са посебним нагласком на биљку *A. flavum*, неопходно је додатно изоловати, тестирати и одредити начин аплицирања приликом терапије у будућим *in vitro* и *in vivo* експерименталним истраживањима. Обзиром на инхибиторну активност експресије метаболичких ензима, неопходно је истаћи могућност комбинованог аплицирања ових биљака или њихових пречишћених компоненти са одговарајућим цитостатикима у циљу смањења резистенције малигнућих ћелија, као једног од највећих проблема у терапији тумора.

SUMMARY

Colorectal cancer represents a major health problem, because the incidence of morbidity and mortality of this disease is constantly increasing. Substances from natural origin have the ability to interact with and modify signaling pathways involved in the cellular functions during the cancerogenesis, postponing or blocking this process and also have a number of advantages compared to synthetic compounds. Therefore, there is an emerging need for the investigation of potential anticancer substances from natural origin, mainly plant extracts, and studying their effects on the induction of apoptosis, since it is one of the major strategies in the cancer therapy.

The aims of this doctoral dissertation are: investigation of anticancer potential of medicinal plants extracts from Serbian flora, traditionally used in treatments of different digestive disorders (*Teucrium chamaedrys* L., *Allium flavum* L., *Gentiana punctata* L., *Ligustrum vulgare* L. and *Centaurium erythrea* Rafn.) on HCT-116 and SW480 colon cancer cell lines and untransformed human skin fibroblasts; investigation of potential synergistic effects of *A. flavum* and *G. punctata* extracts co-treatment with newly synthesized Pd(II) complex (Pd(II) complex with 3-[(2-hydroxy-benzylidene)-amino]-2-thioxo-imidazolidin-4-one ligand); investigation of molecular mechanism of proapoptotic activity of investigated plant extracts in single and co-treatments on HCT-116 and SW480 cell lines, including mechanism of redox-dependant modulation of apoptosis and iRNK expression of genes responsible for anticancer substances metabolism and cell resistance on anticancer drugs.

Extracts of the tested medicinal plants showed cytotoxic activity on colon cancer cell lines, whilst exhibited no effects on fibroblasts, which confirmed their anticancer properties. Effectiveness of cytotoxic activity depended of plant type, qualitative and quantitative composition of phenolic compounds and solvent used in the extraction procedure. Methanol and acetone plant extracts showed significant cytotoxic activity, while ethyl acetate extracts showed the lowest activity, which is in correlation with phenolic and flavonoid content in the extracts. Cytotoxic effects of the investigated plants were the outcome of the induction of apoptosis, as a dominant type of cell death. Plant extracts caused increasing of Fas receptor protein expression and activity of caspase 8 in extrinsic apoptotic pathway in the both cell lines. Increased caspase 9 activity confirm significance of mitochondria in apoptosis, more intensive in HCT-116 than in SW480 cells. Potential cause of proapoptotic activity of plant extracts could be explained by their effects on redox status and redox-dependant modulation of apoptosis. Results, in general, showed inhibitory activity on iRNK expression of gene *CYP1A1* (*Cytochrome P450*), *GSTP1* (*Glutathion-S-Transferase*) and *MRP2* (*Multidrug Resistance-associated Protein 2*). Pd(II) complex

induced significant cytotoxic effects on colon cancer cells, but at the same time induced high percent of necrosis and also exhibited cytotoxic effects on skin fibroblasts. Pd(II) complex caused the highest caspase 9 activity, suggesting that mitochondria play significant role in apoptosis in HCT-116 cells. Depending on the applied concentration, Pd(II) complex induced dual effects on apoptotic signaling pathway and parameters of redox status. Higher concentrations of Pd(II) complex induced oxidative stress in colon cancer cells, which could be a cause of the induction of necrosis, while lower concentrations induced apoptosis. Expression of iRNK of metabolic enzymes was unchanged or increased in some treatments, which suggests that Pd(II) complex was metabolized by these enzymes. Co-treatments of Pd(II) complex with *A. flavum* and *G. punctata* extracts decreased toxicity of Pd(II) complex on untransformed human skin fibroblasts and on contrary increased cytotoxicity on cancer cells, exhibiting synergistic effects. In co-treatments, percents of necrosis are decreased, compared to single treatments with Pd(II) complex, and cytotoxicity induced by apoptosis is increased. Expression of genes involved in anticancer drug metabolism, was generally decreased in co-treatment, compared to single treatment on both cell lines, which resulted in increased cytotoxicity of Pd(II) complex, because of its decreased metabolism and transport through cell membrane in the presence of plant extracts, since they inhibited expression of these enzymes.

Considering current trends in this research area, results of this doctoral dissertation have great impact on investigation of new anticancer substances from natural source, focus on the importance of using plants as the source of medicinal drugs, contribute to the development of the appropriate therapy and give contribution in both scientific and practical means. There is a need for the isolation of bioactive components of the investigated plants, further testing and development of application therapy procedure in future *in vitro* and *in vivo* experimental investigations, with special focus on *A. flavum*. With regards to inhibitory activity on gene expression of metabolic enzymes, it is necessary to highlight the possibility of co-treatments of tested plant extracts or their bioactive compounds with the appropriate chemotherapeutic, in order to reduce the resistance of malignant cells, as one of the greatest problems in the tumor therapy.



I УВОД

1. Канцерогенеза

Канцерогенеза представља вишестепен и комплексан процес, где током трансформације нормалне ћелије у туморску долази до акумулације мултиплих генетских промена. Неправилности у процесима репликације и поправке грешака у ДНК молекулу, настале спонтано или деловањем генотоксичних и негенотоксичних агенаса, условљавају појаву мутација. Настале промене у геному, од тачкастих мутација, транслокација, делеција, хипердиплоидија до великих хромозомских реаранжмана, имају за последицу активацију онкогена, инактивацију тумор супресор гена или доводе до измена гена који контролишу стабилност генома. На тај начин долази до поремећаја у контроли нормалног раста, деобе и диференцијације ћелија, раста карактеристичних клонова туморских ћелија са високим пролиферативним потенцијалом (Weinberg, 1989; Katić и сар., 1996; Coleman и Tsongalis, 2006).

Клон ћелија који се независно размножава и ствара масу нежељеног ткива, назива се тумор или неоплазма. Тумори се према особинама и клиничком току могу поделити на: (а) доброћудне или бенигне (чији је раст спор и ограничен на ткива у којима је настао и нема способност ширења и разарања околних ткива), (б) туморе *in situ* (углавном се развијају у епителу, морфолошки су слични ћелијама малигну тумора, али не пробијају базалну мембрану) и (в) злоћудне или малигне туморе (разарају ткива у којима расту и имају способност метастазирања у околна ткива) (Katić и сар., 1996).

Подела тумора може се направити и према хистогенези и ембрионалном пореклу ткива из кога су настали. Најчешћи су тумори настали из епителног ткива и одговорни су за преко 80% смртности од свих пацијената оболелих од тумора. Епителни тумори могу бити бенигни (полипи, папиломи, аденоми, цистаденоми и папиларни цистаденоми) и малигни који се називају карциноми (аденокарциноми и анапластични карциноми). Мезенхимални тумори су мезодермалног порекла и настају из везивних ткива и такође могу бити бенигни (липому, фиброми, неурини, остеоми, хондроми и др.) и малигни, који се називају саркоми (липосаркоми, фибросаркоми, неуросаркоми, остеосаркоми, хондросаркоми и др.). Тумори

настали на бази поремећаја ембрионалног развоја се називају дизонтогенетски тумори (хамартоми, хористоми и тератоми). Четврта и најређа група су неуроендокрини тумори (Katić и сар., 1996).

Већина тумора се развија у више фаза, али се због значаја извесних промена развој тумора најчешће приказује кроз две фазе: иницијација и промоција. Иницијација представља фазу брзих и иреверзибилних првих промена у малигној трансформацији ћелија. Овим променама најчешће долази до оштећења генетског материјала у циљаним ћелијама, али је ћелијска популација још увек под нормалном контролом механизма раста и деобе. Промоција обухвата многе друге генске и молекуларне промене, које узрокују малигну трансформацију и почетак раста тумора (Јуришић и Џиванчевић-Simonović, 2002).

Особине малигних ћелија

За настанак малигне трансформације ћелије важни су поремећаји у грађи и функцији гена који регулишу пролиферацију ћелије, програмирану ћелијску смрт и поправљање оштећења у грађи ДНК молекула, а то су: онкогени, тумор супресор гени, гени који регулишу апоптозу и гени на основу којих се синтетишу ензими репаративног система. У геному човека су нормално присутни протоонкогени, чији протеински производи имају важну улогу у регулацији пролиферације ћелија. Услед дејства различитих врста канцетогена може доћи до активације, односно мутације протоонкогена при чему настају онкогени. Транскрипцијом онкогена долази до прекомерне експресије протеина одговорних за раст тако да може доћи до неконтролисаног умножавања ћелија. Основна улога тумор супресорних гена је да регулишу ћелијски циклус и изврше поправку оштећења на ДНК. Уколико то није могуће, тумор супресор гени уводе ћелију у апоптозу. Немогућност ћелија да свој живот окончају процесом апоптозе ремети равнотежу између процеса пролиферације и процеса ћелијске смрти и узрокује накупљање ћелија и настанак тумора. Системи за репарацију насталих оштећења ДНК су веома прецизни и сложени, они проналазе и поправљају оштећења ДНК пре него што она узрокују мутације. Мутације гена одговорних за синтезу ензима репарационог система могу довести до немогућности поправљања насталих оштећења и појаву нових мутација. Канцерогенеза је вишестепена јер активација само једног онкогена не може довести до потпуне малигне трансформације ћелије, већ се сматра да је неопходна активација најмање два онкогена или више генетских алтерација (Katić и сар., 1996; Bertram, 2000; Корнин, 2000; Јуришић и Џиванчевић-Simonović, 2002).

Малигне ћелије поседују одређене карактеристике које их разликују од здравих ћелија:

а) Малигне ћелије имају *атипичну структуру*, са поремећеним односом једро-цитоплазма. Једра су већа у односу на једра здравих ћелија, што је у корелацији са њиховом метаболичком

активношћу. Мембрана ћелија је промењена, услед чега се губи контактна инхибиција (Јуришић и Џиванчевић-Simonović, 2002);

б) Малигне ћелије су способне да *измене свој енергетски метаболизам*, како би испратиле потребу за брзом производњом енергије коју намеће стална пролиферација (Hanahan и Weinberg, 2011);

в) *Пролиферација* малигних ћелија није контролисана постојећим регулаторним процесима ћелије. Малигне ћелије имају способност аутокрине производње фактора раста, повећања нивоа рецептора на мембрани, активације сигналних путева укључених у контролу раста ћелија (Hanahan и Weinberg, 2011);

г) Малигне ћелије су развиле различите механизме у циљу *избегавања ћелијске смрти - апоптозе*, најчешће губитком функције одређених протеина укључених у процес апоптозе, повећањем експресије антиапоптотских или смањењем експресије проапоптотских молекула (Hanahan и Weinberg, 2011; Wong, 2011);

д) Малигне ћелије константно пролиферишу, за шта је одговорна активност теломераза, ензима који су високо експримирани код брзо пролиферишућих ћелија, укључујући ћелије канцера и имају улогу да одрже стабилност теломера (Shay и сар., 2001);

ђ) Потребне за кисеоником и хранљивим материјама се повећавају са прогресијом канцера па долази до стварања нових крвних судова, *ангиогенезе*. Малигне ћелије излучују ангиогене факторе који подстичу процес ангиогенезе одређеним механизмима (Hanahan и Folkman, 1996; Katić и сар., 1996);

е) *Инвазивност*, способност насељавања околних ткива, последица је слабљења међућелијских веза, излучивања протеолитичких ензима и металопроотеиназа које разграђују међућелијски матрикс и олакшавају продирање малигних ћелија у околна ткива (Katić и сар., 1996; Ниа и сар., 2011);

ж) *Метастазитање* представља преношење малигних ћелија са примарног места настанка на неко друго, често удаљено место у организму (Katić и сар., 1996).

1.1. Терапија канцера

У лечењу канцера и његових метастаза најчешће се примењују три основна приступа: хируршко лечење, зрачење и терапија цитостатицима. Лечење се углавном спроводи њиховом комбинацијом јер се потпуни терапијски учинак врло ретко постиже применом само једне методе.

1.1.1. Цитостатици

Цитостатици су хемикалије које делују на метаболизам ћелије, спречавају њен раст инхибицијом одређених ензима, оштећују једро ћелије и инхибирају ћелијску деобу. Према основној намени њихово деловање је усмерено на малигне ћелије, јер нарушавањем ћелијског циклуса спречавају њихов раст. Недостатак примене цитостатика је што већина ових лекова убија и здраве ћелије и изазива многобројне нуспојаве (Hegarty и Chisholm, 2002). Ткива која брзо пролиферишу (нпр. коштана срж и слузокожа пробавног тракта) су најосетљивије на дејство цитостатика. Откривањем једињења из природних извора постигнут је значајан напредак у терапији канцера и избегавању нежељених ефеката (Chabner и сар., 2006). Често се у терапији примењују комбинације цитостатика са различитим механизмима деловања и са различитом врстом нежељених дејстава које изазивају, како би се постигао најбољи могући ефекат са што мање токсичног деловања на организам, селективније цитотоксично деловање на ћелије канцера и смањена могућност резистенције на поједини цитостатик.

Цитостатици који се користе у терапији канцера, могу се поделити у неколико општих категорија (Janković, 2003):

а) *Алкилирајући агенси* и сличне супстанце које поседују алкил радикале који се лако везују за азотове атоме у пуринским и пиримидинским базама нуклеинских киселина. Веома су ефективни на брзо растућим ћелијама, јер приликом репликације ДНК долази до грешака, прекида и смрти ћелије. Најважније групе алкилирајућих агенаса су пликавци, нитрозоурије и деривати платине (цисплатина и карбоплатина) (Ralhan и Kaur, 2007);

б) *Антиметаболити* су структурни аналози природних молекула који учествују у синтези нуклеинских киселина, потпуно замењујући природне молекуле у процесу синтезе. Због тога делују на брзо метаболишуће ћелије и не делују на ћелије у фази мировања. Основне подгрупе ових цитостатика су: аналози фолата (метотрексат), аналози пурина, аналози пиримидина (5-флуороурацил, капецитабин) и аналози уреје (Avenidao и Meuendz, 2008);

в) *Антитуморски антибиотици* који интеркалирају између две суседне базе ДНК, што онемогућава даљу репликацију. Они спречавају деобу ћелија тако што инхибирају топоизомеразе I и II. Најчешће коришћени антитуморски антибиотици су доксорубицин, епирубицин, даунорубицин и блеомицин (Galm и сар., 2005);

г) *Цитостатици биљног порекла*. Постоји више врста ових цитостатика и сви се одликују значајном активношћу. Неки од њих нарушавају функцију деобног вретена везивањем за протеине који изграђују микротубуле и на тај начин спречавају митозу малигних ћелија и раст канцера.

Пример су винка алкалоиди из биљке *Vinca rosea*. Токсин из биљке *Podophyllum pelatum* инхибира топоизомеразу II, спречавајући синтезу ДНК, а тиме и деобу малигнућ ћелија. Паклитаксел и доцетаксел су полусинтетски деривати природних супстанци из биљке *Taxus baccata*, који такође ометају функционисање деобног вретена и индукују апоптозу малигнућ ћелија. Кампотецин је изолован из биљке *Camptotheca acuminata* и његов полусинтетски деривати иринотекан и топотекан инхибирају топоизомеразу I и тако спречавају репликацију ДНК (Cragg и Newman, 2005; Kingston, 2009);

г) Посебну врсту цитостатика чине *бактеријски ензими* аспарагиназе (разграђују аспарагин, неопходан за раст ћелија лимфобластне леукемије) и хидроксиуреа (инхибира претварање рибонуклеотида у дезоксирибонуклеоиде, чиме спречава синтезу ДНК) (Covini и сар., 2012; Madaan и сар., 2012).

Поред цитостатика, у терапији канцера користи се и *имунотерапија*, која подразумева стимулацију организма носиоца канцера да препозна канцер као “стран” и да развије имунски одговор на њега (Harris и Drake, 2013). Такође се користе моноклонска антитела на специфичне протеине на мембрани малигнућ ћелија (Tol и Punt, 2010). Пример је алемтузумаб који се користи за лечење лимфоцитне леукемије β -ћелија, које на себи носе антиген CD52 и представља антитело које се везује за антиген CD52 и доводи до лизе малигнућ ћелија (Gribben и Hallek, 2009).

1.1.2. Резистенција на цитостатике

Резистенција на хемиотерапију (енгл. *Multidrug Resistance*, MDR), као учестао клинички проблем у терапији канцера представља главни неуспех коришћења цитостатика (Gottesman и Pastan, 1993; Fojo и Bates, 2003). Канцери се углавном састоје од фенотипски различитих популација малигнућ ћелија, од којих су неке осетљиве на дејство цитостатика, док су друге резистентне. У оквиру хетерогене популације туморских ћелија, заступљене су у мањем или већем проценту и ћелије са већ развијеним механизмима резистенције. Тако, канцери са већим уделом ових ћелија су урођено резистентни, како на хемиотерапију, тако и на радиотерапију. Канцери са мањом заступљеношћу резистентних ћелија имају потенцијал да у току терапије развију (стекну) резистенцију активирањем механизма резистенције или преносом резистентних карактеристика са већ постојећих резистентних ћелија (Graudens и сар., 2006; Gonzalez-Angulo и сар., 2007).

Једна од основних карактеристика резистентних ћелија је да спорије пролазе кроз ћелијски циклус и на тај начин избегавају дејство цитостатика, обично дизајнираних тако да циљају брзопродиферишуће ћелије у S фази ћелијског циклуса. Постоји више механизма одговорних за настанак резистенције: немогућност цитостатика да уђе у малигну ћелију; одстрањивање

цитостатика уз помоћ мембранских пумпи које не дозвољавају њихов пролазак кроз мембрану у ћелију; умножавањем гена одговорних за синтезу протеина који инактивирају цитостатике, најчешће ензимским путем; повећањем ниова ћелијских тиола, као што је глутатион који конјугује са цитостатикима и на тај начин их инактивира или потпомаже избацивање из ћелије; спречавањем транспорта цитостатика кроз ћелију јер протеини који их транспортују постају нефункционални; поседовањем механизма којим поправљају ДНК оштећења настала дејством цитостатика; избегавањем апоптозе (Komarova и Wodarz, 2005; Torigoe, 2005; Hall и сар., 2008; Podolski-Renić и сар., 2013). Најчешћи механизам резистенције је прекомерна експресија гена који кодирају транспортне пумпе на мембрани ћелија, ABC транспортери (енгл. *ATP Binding Cassette*), који за транспорт кроз мембрану користе енергију добијену хидролизом аденозин трифосфата (енгл. *Adenosin Triphosphate*, АТФ). Они представљају трансмембранске пумпе које избацују екзогене или ендogene токсине из ћелија. Код канцера изложених дејству цитостатика долази до прекомерне експресије ових пумпи, услед чега малигне ћелије веома брзо и лако избацују цитостатике пре него што они испоље дејство на функционалне молекуле. Постоје три врсте ABC транспортера који су одговорни за резистенције ћелија канцера: ABCB1/P-gp/MDR1, познат и као P-гликопротеин (P-gp), ABCC1/MRP1 и ABCC2/MRP2 (енгл. *Multidrug Resistance-associated Proteins-1 and -2*) и ABCG2/MXR/BCRP (енгл. *Breast Cancer Resistance Protein*) (Dean и Allikmets, 1995; Janković, 2003).

Да би се савладала и спречила појава резистенције на цитостатике, у онкологији се широко примењују бројни протоколи са следећим принципима: комбиновање већег броја цитостатика који имају различите механизме деловања, примена цитостатика који имају различит спектар дејства, примена што краћих циклуса лечења (што омогућава опоравак организма пацијената).

1.1.3. Комбиновани третмани

Последњих година постоји велико интересовање за испитивање синергистичких ефеката комбинација цитостатика са антитуморским лековима пореклом из природних извора. Комбинације лекова, као и коришћење природних лекова као додатка хемиотерапији могу омогућити ефикаснији третман, као и смањење штетних ефеката на здрава ткива. Могућа позитивна својства комбинованих третмана су: смањење дозе лека, али одржавање исте или повећане ефикасности, изостанак или смањење појаве резистенције на лек, смањење токсичности на здраве ћелије и органе, фаворизовање апоптозе у односу на некрозу као типа ћелијске смрти код малигнућих ћелија. Због ових терапеутских предности, комбинације лекова су широко

коришћене и постају водећи избор у третманима многих болести, укључујући канцер (Tsuji и сар., 2002; Sak, 2012).

1.1.4. Антитуморска својства паладијума

Најчешће коришћен неоргански хемиотерапеутик је цисплатина и њени деривати, који дуги низ година представљају једну од главних терапијских опција за многе врсте канцера (Rosenberg и VanCamp, 1970; Hainsworth и сар., 1992; Lorusso и сар., 2014). Међутим, цисплатина изазива оштећења здравих ћелија изазвана оксидационим стресом и штетне ефекте на организам као што су нефротоксичност, неуротоксичност, мијелотоксичност, хематотоксичност, изазивање мучнина и многе друге (Florea и Busselberg, 2011; Marković и сар., 2011a, 2011b). Отежавајућа околност у терапији канцера цисплатином је појава резистенције која умањује њену ефикасност (Timmer-Bosscha и сар., 1992; Rennie и сар. 2005). Након открића антитуморске активности платине, веома брзо су почела истраживања других неорганских једињења са могућом антитуморском активношћу, која су укључивала велики број метала, њихових лиганата и различите начине синтезе у зависности од специфичних рецептора и циљаних молекула. Најчешће су коришћени паладијум(II), злато(I) и злато(III), рутенијум(II) и рутенијум(III), бизмут(III) и бакар(II) једињења и многи од њих показују добру антитуморску активност *in vitro* (Galanski и сар., 2003; Marques, 2013; Šmit и сар., 2013). Обзиром да су хемијске карактеристике паладијума сличне карактеристикама платине, истраживања су ишла у правцу синтезе нових паладијумских комплекса са сличном антитуморском активношћу, али смањеним штетним ефектима на здрава ткива и ћелије. Pd(II) јони имају способност да интерагују са ДНК везивањем и инхибицијом синтезе овог молекула, као и способност индукције апоптозе (Matesanz и сар., 1999). Све више је литературних података који потврђују антитуморску активност паладијумских комплекса (Rau и сар., 1996; Kostova, 2006; Volarević и сар., 2013; Šmit и сар., 2013). У циљу стабилизовања Pd(II) комплекса коришћени су различити лиганди за његову синтезу (Mansuri и сар., 1992). Недостатак Pd(II) комплекса у односу на платинске је његова нестабилност у раствору као што је ћелијска цитоплазма и веома брза разградња од стране различитих биомолекула као што је глутатион, дајући интермедијерна једињења која не могу да остваре фармацеутски циљ (Butour и сар., 1997).

1.2. Колоректални карцином

1.2.1. Епидемиологија

Карцином колона, као најчешћи малигни тумор висцеларних органа трбушне дупље, је болест високоразвијених земаља. Урбане и економски развијене друштвене заједнице су много више изложене опасности од ове болести у односу на сиромашне афроазијске земаље (Hamilton, 1996). Оваква дистрибуција и разлике учесталости у појединим земљама су више одраз начина исхране и услова живота него расних и етничких карактеристика (Stevović, 1994; Popović, 2003). У Србији карцином колона је на седмом месту по узроку смрти и стопа смртности се удвостручила у последњих двадесет година.

Колоректални карцином се претежно јавља у каснијем животном добу, најчешће у шестој, седмој и осмој деценији живота. Испод 40 година живота се ретко јавља, у око 10% болесника са карциномом колона. Однос полова код карцинома колона је уједначен, док је карцином ректума незнатно учесталији код мушког пола (Milić и Damjanović, 2013).

1.2.2. Етиологија

Иако је етиологија карцинома колона непозната, претпоставља се да настаје као последица комплексне и недовољно разјашњене интеракције генетских фактора и чинилаца спољашње средине. Фактори као што су фамилијарна појава колоректалног карцинома који сугеририше генетски фактор, затим стрес, хипоксија, редукован унос глукозе и других нутрицијената, смањен унос минерала и витамина, жучне киселине, као и промена рН фецеса доводе до започињања процеса канцерогенезе у мукози дебелог црева (Stevović, 1994; Popović, 2003; Khuhaprema и Srivatanakul, 2008; Milić и Damjanović, 2013). Исхрана богата мастима и угљеним хидратима, а сиромашна целулозом и влакнастим материјама условљава дуже задржавање фекалних маса у дебелом цреву. Тиме се продужава контакт његове слузокоже са могућим канцерогеним материјама које настају дејством бактерија на унете хранљиве материје и њихове метаболите. Такође, мала физичка активност, пушење, конзумирање алкохола и нитрити као конзерванси хране, повећавају ризик од настанка колоректалног карцинома (Stevović, 1994).

Према начину настанка, карцином колона може бити спорадичан (70-80%), фамилијарни (20-30%) или наследни (неколико процената) (Clarens, 2004). Фамилијарни карцином није повезан са конкретном мутацијом одређеног гена, али је уочено да особе чији су први рођаци већ имали колоректални карцином имају 2 до 3 пута већи ризик од осталих особа да и саме оболе. Фамилијарни карцином настаје услед наследно пренетих болести дебелог црева, јер представљају

ризичну групу за настанак карцинома: фамилијарна аденоматозна полипоза, јувенилна полипоза, фамилијарни улцерозни колитис, Кронова болест и друге. Соматске мутације или губитак тумор супресорских гена из хромозома 5q, 18q и 17p и мутација онкогена, нпр. *K-ras (17p)*, делују у вишестепеном процесу који од нормалног епитела води, преко разних стадијума аденоматозних полипа, до карцинома и метастаза (Pоровић, 2003).

1.2.3. Клиничка слика

Колоректални карцином се одликује спорим растом, потребно је да прође и 5-10 година до фазе испољавања симптома. Испољавање симптома и њихов след зависе од локализације и степена развоја канцера (Pоровић, 2003). Клиничка слика често има притајен и подмукао ток па рано откривање болести има кључни значај у погледу лечења ових болесника и њиховог преживљавања.

Основни начин ширења је директни у околна ткива и органе. Метастатско ширење обезбеђује добро развијена мрежа лимфних путева, као и крвних судова у које овај карцином може да продре већ у својој почетној фази.

У крвној плазми болесника са колоректалним карциномом може се открити присуство тзв. тумор маркера, специфичних молекула које канцер секретује у крв. За колоректални карцином постоји неколико туморских маркера који пружају корисне прогностичке информације: карциноембриогени антиген (СЕА), карбохидратни канцер антигени (СА 19-9, СА 50, СА 242), серумски гастрин, катепсин В, CD 26, као и ниво експресије гена *p16*, *p21* и *p53* (Arber и сар., 1999). Карциноембрионални антиген је најчешће коришћен тумор маркер, али је недовољно специфичан за рано откривање болести, јер се у повишеним вредностима среће и код других канцера (плућа, дојка, панкреас), као и код бенигних лезија (цироза, панкреатитис, запаљења дебелог црева) (Мајкић-Singh, 2006; Таги и сар., 2010).

1.2.4. Лечење

Лечење колоректалног карцинома је првенствено хируршко. Радикално хируршко лечење подразумева уклањање примарног канцера са знатним делом здравог црева (више од 5 cm од макроскопских граница канцера), као и свих околних лимфних жлезда.

Додатна терапија у лечењу се примењује након радикалне хируршке интервенције у циљу побољшања њених ефеката, односно продужења живота болесника. Она подразумева коришћење цитостатика и зрачење. Постоперативно зрачење има за циљ да спречи појаву неотклоњених малигних ћелија, које су релативно честе након хируршке интервенције. Зрачење, као додатна

мера лечења, примењује се код канцера који су пробили зид ректума или су дали лимфне метастазе. Хемиопревенција карцинома се користи са циљем да блокира, спречи или одложи развој карцинома (Milić и Damjanović, 2013). Постоперативна цитостатска хемиотерапија има за сврху да уништи малигне депозите у регионалним лимфним жлездама, као и да смањи малигни потенцијал. Највише и најчешће се употребљавају 5-флуороурацил, капецитабин, иринотекан, оксалиплатин, левамисол и метил-CCNU.

Ради превенције и лечења карцинома колоне постоји стална потреба за унапређењем постојећих и идентификацијом нових дијагностичких и прогностичких маркера, као и проналазак и евалуација нових, потенцијалних хемиопреентивних агенаса и испитивање њихове клиничке ефикасности (Fujino и сар., 2011).

1.2.5. Ћелијске линије као модел системи за изучавање колоректалног карцинома

Откривање и развој антигуморских лекова има дугу историју и обухвата многобројна преклиничка истраживања и тестирања једињења са потенцијалним цитостатским или цитотоксичним ефектима на хуманим ћелијским линијама. Према Америчком Националном Институту за канцер потенцијално активне супстанце пролазе прескрининг на неколико ћелијских линија најчешћих типова тумора, а затим се једињења која покажу активност испитују много детаљније на широј листи ћелијских линија (најчешће 60 различитих ћелијских линија пореклом из различитих органа) и животињским моделима (Burger и Fiebig, 2004).

Ћелијске линије представљају изоловане, различите врсте ћелија, способне за гајење у лабораторијским условима. Могу бити адхерентне, односно залепљене за подлогу у којој се гаје или у суспензији, које за своје преживљавање не захтевају везу са подлогом или другим ћелијама. Могу бити генетички идентичне и називају се хомогене или показују одређене генетичке варијације и представљају хетерогене популације. Ћелије изоловане директно из ткива се зову примарне културе. Са изузетком неких малигних ћелија, примарне културе углавном имају кратак животни век. Добијају се различитим експерименталним поступцима, као што је изолација ћелија из крви, механичком изолацијом пресовањем ткива кроз различите филтере или ензимском деградацијом ензимима који разлажу међућелијски матрикс (колагеназе и трипсин). После неколико деоба популације ћелија престају да се деле и смањује се њихова вијабилност, па је неопходно да се експерименти са примарним културама врше одмах након изолације. Други тип ћелија се комерцијално поручује и то су имортализоване ћелијске линије, које имају неограничену способност пролиферације, што се постиже мутацијом или модификацијом одговарајућих гена. Постоје колекције ћелијских линија, тзв. „банке ћелија“, које нуде велики избор добро

окарактерисаних ћелијских линија. Највеће и најпознатије колекције су АТСС (*The American Type Culture Collection*) и ЕСАСС (*The European Collection of Animal Cell Cultures*) (Harrison и Rae, 1997).

Гајење ћелија у култури је нашло многобројне примене јер омогућава једноставна испитивања физиологије, биохемије и метаболизма ћелија. Веома су погодне за изучавање регулације пролиферације, диференцијације и смрти ћелија, проучавање интерцелуларних и интрацелуларних сигналних путева. Културе ћелија представљају основу за истраживање канцера, евалуацију терапеутских агенаса, тестирање ефеката различитих хемијских једињења или лекова на здравим или малигним ћелијама и пружају могућност за лако истраживање ћелијских механизма којима они подлежу у ћелији (Allen и сар., 2005). Свака експериментална супстанца са потврђеним терапеутским потенцијалом мора проћи дуге циклусе преклиничког испитивања лека. Коришћење ћелијских линија је нашло примену у решавању проблема од клиничке важности, нарочито проблема повезаних са механизмима настанка одређене болести и развоју нових дијагностичких и терапеутских процедура. На ћелијама у култури могућа су истраживања у веома актуелној области познатој као инжењеринг ткива, комбиновањем различитих типова ћелија ради стварања вештачких ткива, на пример вештачке коже. Бројне ћелијске културе су основа за генске манипулације и производњу вирусних вакцина и других биотехнолошких продуката. Биолошки продукти добијени рекомбинантном ДНК технологијом у ћелијским културама укључују ензиме, специфичне протеине, синтетисане хормоне, моноклонска антитела, интерлеукине и др. Једна од примена је гајење, криопрезервација и складиштење матичних ћелија. Због свега наведеног култура ћелија је постала основ молекуларне генетике, имунологије, фармакологије и производње лекова и готово неопходна за развој биотехнологије (Harrison и Rae, 1997).

Процес гајења ћелија у култури подразумева одржавање одређеног типа ћелија у контролисаним условима. За свој раст и размножавање ћелије захтевају специфичне услове средине, одговарајућу температуру, осмотски притисак, рН, O_2 и CO_2 (најчешће је $37\text{ }^\circ\text{C}$ и $5\% CO_2$). Услови *in vitro*, у којима се ћелије гаје, опонашају услове *in vivo*, тако да варирају у зависности од типа ћелија. Различити услови могу довести до појаве различитог фенотипа. Поред оптималних физичких параметара најчешће променљив фактор у гајењу ћелија је медијум. Хранљиви медијум треба да садржи лако употребљив извор угљеника, азота и других хранљивих материја у одговарајућим количинама и односима. Медијуми могу варирати у рН, концентрацији глукозе, факторима раста, присуству хранљивих материја. Рад са ћелијским линијама захтева стерилне услове рада и посебне мере опрезности у циљу заштите и спречавања могуће контаминације бактеријама, гљивама или појаве кросконтаминација (Harrison и Rae, 1997).

Комерцијално набављене ћелијске линије колоректалног карцинома представљају добар модел систем за истраживање ефеката биоактивних супстанци из разлога што су генетске абнормалности одговорне за испољавање одговарајућег фенотипа познате. *The American Type Culture Collection* нуди листу великог броја ћелијских линија колоректалног карцинома и информације о карактеристикама, условима гајења и манипулације њима, као и информације о мутираним генима у свакој од њих. У оквиру докторске дисертације коришћене су две адхерентне ћелијске линије колоректалног карцинома, НСТ-116 и SW480 ћелијска линија. НСТ-116 ћелије имају епителну морфологију, експримиране гене за трансформишући фактор раста $\beta 1$ и $\beta 2$ и мутацију у кодону 13 за *ras* протоонкоген, а SW480 ћелије имају експрипиран ген за епидермални фактор раста и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген. Наведене ћелијске линије су међу најчешће коришеним ћелијским линијама колоректалног карцинома у *in vitro* истраживањима и представљају добар модел систем за преклиничка тестирања. Погодне су за испитивања цитотоксичних, проапоптотских и ефеката на редокс статус различитих синтетских или супстанци пореклом из природних извора (Mitrović и сар., 2011; Stanković и сар., 2011; Trišović и сар., 2011; Ćurčić и сар., 2012a, 2012b; Stanković и сар., 2012a; Obradović и сар., 2013; Žižić и сар., 2013; Jevtić и сар., 2014; Stojković и сар., 2014).

2. Апоптоза – програмирана ћелијска смрт

Апоптоза, као вид ћелијске смрти, основни је генетски програмиран механизам за контролу броја ћелија, којим се успоставља равнотежа између пролиферације, диференцијације и одумирања ћелија. То је физиолошки процес који се нормално јавља у току ембриогенезе и има кључну улогу у развоју вишећелијских организама и одржавању хомеостазе ткива. Свака ћелија носи у свом геному суицидни програм чијим активирањем може изазвати самоуништење, спроводећи генетски програмиран след морфолошких и биохемијских промена (Alberts и сар., 2008; Ouyang и сар., 2012).

Покретачи апоптозе

Велики број стимулуса и стања у организму, било физиолошких или патолошких, могу покренути апоптотски сигнални пут и довести до смрти ћелије. Апоптозу може узроковати изостајање или недостатак међућелијских сигнала. Већини ћелија потребна је стална стимулација, контакт са површином на којој расту или суседним ћелијама, а нарочито је важна улога цитокина, фактора раста и појединих хормона. Одсуство ових компоненти може активирати апоптотски

сигнални пут. Оштећења ДНК и фактори који доводе до ових оштећења, као што су јонизујуће зрачење, хемиотерапеутици, неки микотоксини или лекови могу да покрену апоптозу. Реактивне врсте кисеоника и азота, такође, могу деловати као покретачи апоптозе, најчешће повећавајући пропустљивост митохондријалне мембране и доводећи до отпуштања цитохрома ц (Cyt c) у цитоплазму, који даље покреће апоптотски сигнални пут (Žlender, 2003; Alberts и сар., 2008).

Апоптоза се може покренути и дејством активирајућих молекула (лиганда) који се везују за рецепторе на ћелијској мембрани или једру ћелије. Посебно место заузимају лиганди који се везују за рецепторе на мембрани ћелије, "рецептори смрти".

Морфолошке и биохемијске промене ћелија у процесу апоптозе

У раним стадијумима апоптозе долази до премештања молекула фосфатидил-серина са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. То узрокује рано препознавање апоптотских ћелија од стране макрофага који их одстрањују фагоцитозом, без ослобађања проинфламаторних ћелијских супстанци. Морфолошке промене у једру у процесу апоптозе су кондензација хроматина и фрагментација једра које доводе до смањења запремине ћелије. Кондензација хроматина почиње на периферији једрове мембране формирајући полумесечасту структуру. Након кондензације долази до фрагментације једра и цепања једарне ДНК прво у веће сегменте, а затим у нуклеозомалне фрагменте величине 180 до 200 базних парова. У каснијим стадијумима апоптозе долази до набирања мембране, модификације цитоплазматских органела, губљења интегритета мембране и на крају формирања великих цитоплазматичних везикула које се откидају од ћелијске површине – апоптотска тела (Elmore, 2007; Wong, 2011; Sankari и сар., 2012).

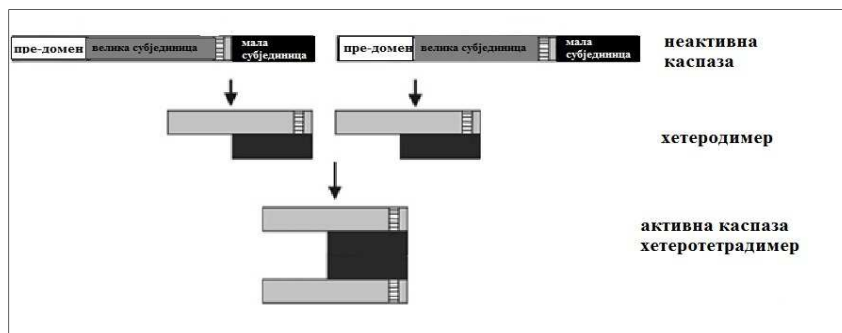
У току процеса апоптозе неопходна је експресија одређених гена, односно синтеза и активација ензима укључених у фрагментацију хроматина, цитоскелета и протеина цитоплазме (Jurišić и Živančević-Simonović, 2002; Alberts и сар., 2008).

Активација каспаза

Кључне компоненте апоптотског сигналног пута су протеолитички ензими, који су познати под називом каспазе (цитоплазматичне цистеин-аспартат специфичне ендотеазе). Налазе се у цитоплазми у облику инактивних прекурсорних молекула - проензима, који се активирају димеризацијом и/или протеолитичким цепањем у којем настају активни ензими.

Активан ензим има конфигурацију грађену од два хетеродимера који се састоје од велике (~17-21 kDa) и мале субјединице (~10-13 kDa). Познато је 14 различитих каспаза које се означавају редним бројевима 1-14. Према функцији могу се поделити у две групе: каспазе одговорне за

иницијацију процеса апоптозе, које се карактеришу дугачким продоменима дужим од 90 аминокиселина (каспазе 2, 8, 9, 10) и ефекторне каспазе са кратким продоменима које имају улогу у завршној фази апоптозе (каспазе 3, 6 и 7). У рецептрском сигналном путу апоптозе прва се активира каспаза 8, а у митохондријалном каспаза 9. Иницијаторске каспазе садрже "домене смрти" (енгл. *Death Domain*, DD) као што су CARD (енгл. *Caspase Activation and Recruitment Domain*) код каспаза 1, 2, 4 и 9 или DED (енгл. *Death Effector Domain*) код каспаза 8 и 10. Иницијаторске каспазе активирају ефекторне које разграђују ћелијске компоненте, што доводи до морфолошких промена карактеристичних за апоптозу. Једна каспаза може активирати друге каспазе, али и саму себе, појачавајући на тај начин апоптотски стимулус, што доводи до врло брзе смрти ћелије. Централну улогу у овом процесу има каспаза 3, која је након активације одговорна, делом или у потпуности, за цепање многих ћелијских компоненти (протеина, актина, ламина), фрагментацију ДНК и кондензацију хроматина. Постоје два основна пута активације каспаза, спољашњи и унутрашњи (Lawen, 2003; Elmore, 2007; Kumar и Dorstyn, 2009; Rastogi и сар., 2009).

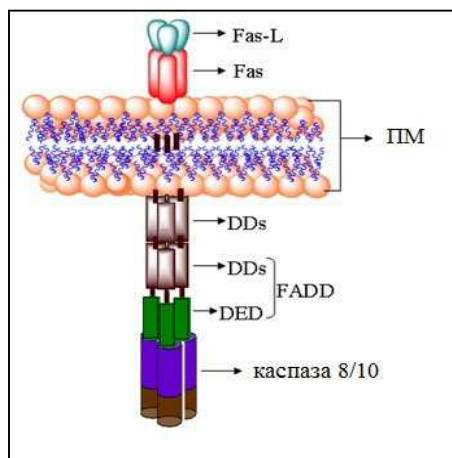


Слика 1. Шематски приказ активне каспазе. Активна каспаза има хетеротетрамерну структуру, грађену од два хетеродимера (модификовано из Kumar и Dorstyn, 2009).

2.1. Спољашњи пут апоптозе

Спољашњи апоптотски пут се активира везивањем лиганата за тзв. „рецепторе смрти“ из TNF/Fas породице, који се протежу од спољашње до унутрашње површине ћелијске мембране. Цитоплазматски делови ових рецептора називају се домени смрти и повезују рецептор са компонентама сигналног пута које индукују апоптозу. Везивањем Fas лиганда (енгл. *Fatty acid synthetase ligand*, FasL) за Fas рецептор долази до рецепторске тримеризације, што узрокује унутарћелијско накупљање DD делова Fas рецептора уз помоћ комплекса протеина познатих као DISC (енгл. *Death Inducing Signaling Complex*). Домен DD молекула FADD (енгл. *Fas Associated Death Domain Protein*) веже се за DD домен Fas рецептора, а домен DED молекула FADD за

прокаспазу 8 (или 10). Тиме долази до њеног преласка у активну форму (Wong, 2011; Ouyang и сар., 2012).



Слика 2. Активација каспазе 8 у спољашњем апоптотском путу. Лиганд смрти (FAS-L) везивањем за Fas рецептор изазива спајање DD домена Fas рецептора и DED домена молекула FADD који активира прокаспазу 8 или 10. ПМ -плазма мембрана (модификовано из Rastogi и сар., 2009).

Сигнални пут покренут везивањем FasL може ићи у два правца. Један од сигналних путева укључује митохондрије чија је основна функција у овој каскади да појача почетни сигнал настао везивањем лиганда. Активна каспаза 8 у цитосолу каталитички разграђује Bid (енгл. *BH3*

Interacting-domain Death-agonist), инактивну форму једног од проапоптотских чланова Bcl-2 фамилије, који се затим транслоцира у митохондрије, ремети пермеабилност мембране митохондрија и доводи до ослобађања Cyt c. Други сигнални пут је независан од митохондрија у коме каспаза 8 непосредно доводи до активације каспазе 3 и других ефекторних каспаза (Lawen, 2003; Wong, 2011).

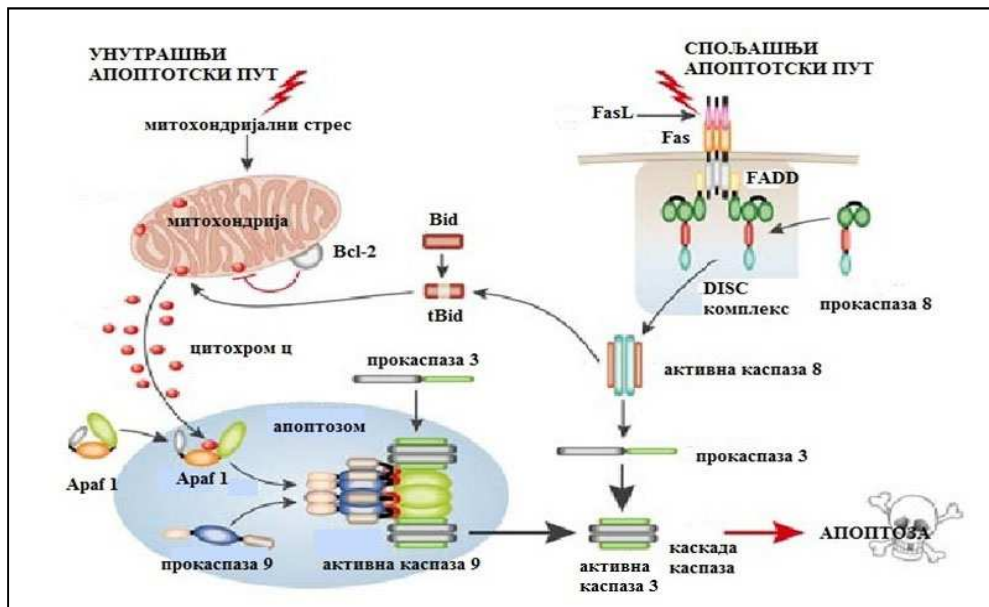
Везивањем TNF-лиганда (енгл. *Tumor Necrosis Factor*) за TNFR1 рецептор (енгл. *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*) покреће се сличан пут, осим што су у овом случају адаптерски молекули TRADD (енгл. *TNFR Associated Death Domain*), који имају способност везивања различитих протеина на активираним делу рецептора (Bazzoni и Beutler, 1996).

TRAIL (енгл. *TNF Related Apoptosis Inducing Ligand*) је такође покретач апоптозе и везује се за DR4 и DR5 рецепторе, који имају интрацелуларне домене (Žlender, 2003).

2.2. Унутрашњи пут апоптозе

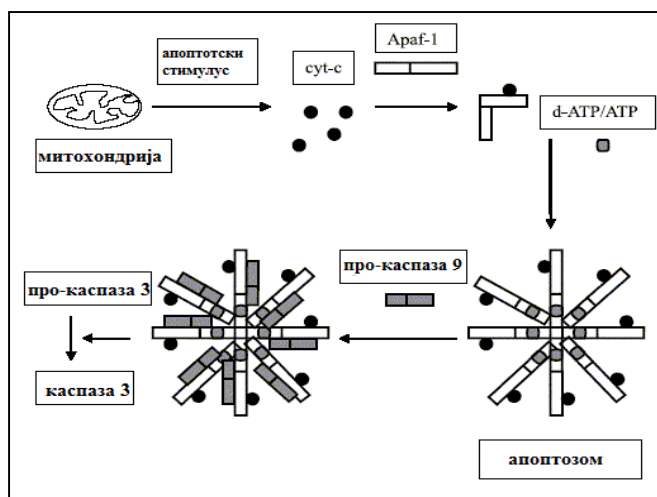
Унутрашњи апоптотски пут, укључује сигнале који потичу из унутрашњости ћелије, најчешће из митохондрија па се због тога другачије назива митохондријални пут. Апоптоза може бити активирана након различитих оштећења и у другим органелама, као што су једро, ендоплазматични ретикулум или Голџијев апарат. Централно место у овом путу имају митохондрије код којих долази до промене мембранског потенцијала, односно повећане пропустљивости за мале молекуле. Главни регулаторни протеини унутрашњег, митохондријалног пута су протеини Bcl-2 породице, који регулишу мембрански потенцијал. Повећање пропустљивости спољашње мембране митохондрија праћено је ослобађањем Cyt c из митохондрија у цитоплазму, који делује као „окидач“ апоптозе. У оквиру Bcl-2 фамилије постоје

проапоптотски (Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bid и др.) и антиапоптотски протеини (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W и др.). Проапоптотски протеини присутни су у цитосолу као сензори ћелијског оштећења или стреса, док се антиапоптотски протеини налазе у интермембранском простору митохондрија.



Слика 3. Шематски приказ спољашњег и унутрашњег апоптотског пута (моификовано из MacFarlane и Williams, 2004).

Однос проапоптотских и антиапоптотских фактора одређује осетљивост ћелија на апоптозу. Њихово дејство на ослобађање Cyt c је потпуно супротно: Вах формира каналиће у спољашњој мембрани митохондрија, а Bcl-2 те каналиће блокира и инхибира ослобађање Cyt c.



Слика 4. Ослобађање Cyt c и активација каспазе 9 (модификовано из Mohamad и сар., 2005).

Повећана експресија неког од антиапоптотских протеина Bcl-2 фамилије онемогућава реализацију апоптотског програма у ћелијама са оштећењем наследног материјала и уједно промовише неконтролисану пролиферацију трансформисаних ћелија. Ова фамилија протеина представља основу за развој нове генерације агенаса који би се користили у лечењу малигнух болести.

Ослобођени Cyt c се везује за протеин APAF 1 (енгл. *Apoptosis protease activating factor 1*) доводећи до његове конформационе промене, стварајући апоптозома који се везују и активирају прокаспазу 9. Ово има за последицу даље активирање ефекторске каспазе 3, што коначно води ћелију у смрт (Reed, 1998; Lawen, 2003; Wong, 2011; Sankari и сар., 2012).

Осим Cyt c, митохондрије садрже и друге апоптотске факторе као што су AIF (енгл. *Apoptosis Inducing Factor*) и ендонуклеаза G. AIF из митохондрија прелази у једро ћелије, независно од каспаза, фрагментира ДНК на фрагменте величине од 50-300 kb и тиме доводи до кондензације хроматина уз једарну мембрану (Joza и сар., 2001). Ендонуклеаза G излази из митохондрија током апоптозе и делимично је одговорна за интернуклеозомално цепање ДНК, које је такође независно од каспаза (Susin и сар., 2000; Joza и сар., 2001).

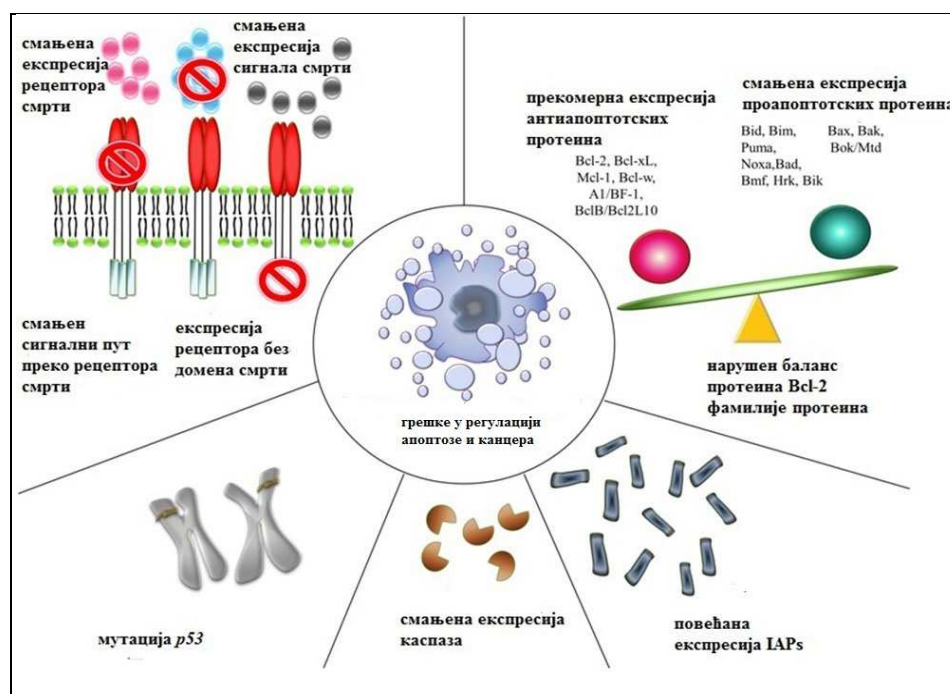
2.3. Апоптоза у канцерогенези

Контрола ћелијског броја остварује се балансом два супротна процеса, ћелијске пролиферације и програмиране ћелијске смрти. Здраве ћелије имају способност препознавања и поправљања оштећених места на ДНК уколико оштећења нису велика, а активацијом апоптозе спречавају деобу и умножавање ћелија са већим оштећењима. Накупљање ћелија са оштећеном ДНК може бити последица мутације гена укључених у регулацију апоптозе. Смањена апоптоза или појава резистенције на апоптозу, мутације и делеције апоптотских гена играју важну улогу у карциногенези, расту и регресији канцера (Kumar и сар., 2005; Alberts и сар., 2008).

Механизми којима малигне ћелије избегавају процес апоптозе могу бити тројаки: нарушен баланс проапоптотских и антиапоптотских протеина, смањена сигнализација путем рецептора смрти и смањена функција каспаза. Многи протеини показују про- и антиапоптотску активност у ћелијама. Однос ових протеина игра улогу у регулацији ћелијске смрти, јер прекомерна или смањена експресија доприносе канцерогенези, редуковањем апоптозе у малигним ћелијама. Најчешћи регулатори апоптозе су протеини Bcl-2 фамилије, преко унутрашњег апоптотског пута. Рецептори смрти су главни регулатори спољашњег апоптотског пута и многобројне промене у грађи и функцији ових рецептора могу да доведу до изостанка иницијалних сигнала неопходних у процесу апоптозе. Низак ниво или поремећаји у функцији каспаза, такође, могу довести до изостанка апоптозе. Многе студије показују да смањена експресија каспаза доприноси преживљавању малигних ћелија у различитим врстама канцера. У ћелијама су присутни и инхибитори апоптотских протеина, који представљају групу структурно и функционално сличних протеина који регулишу апоптозу и сигналну трансдукцију у ћелији. Ендогени инхибитори каспаза, као што је IAPs (енгл. *Inhibitor of Apoptosis Proteins*) могу инхибирати њихову активност

везивањем својих домена за активна места каспаза, што онемогућава њихово деловање на супстрат (Wong, 2011).

Уколико је узрок смрти ћелије оштећење ДНК, кључна је улога протеина p53, који је у ћелијама присутан у инактивном облику и учествује у контроли ћелијског циклуса. Немутирани, дивљи тип гена *p53*, врши негативну контролу ћелијске пролиферације и супримира ћелијску трансформацију и канцерогенезу, односно врши типичну улогу тумор супресорног гена. Оштећења ДНК подстичу накупљање протеина p53 у ћелији, због чега долази до заустављања ћелијског циклуса у G1 фази и поправљања оштећене ДНК, или до покретања апоптозе ако су та оштећења непоправљива (Komarova и Gudkov, 2001). Протеин p53 може покренути апоптозу ремећењем односа проапоптотских и антиапоптотских митохондријских протеина Bcl-2 породице или стимулацијом гена који повећавају продукцију реактивних врста кисеоника, снажних активатора апоптозе.



Слика 5. Механизми који доводе до избегавања апоптозе у канцерогенези (модификовано из Wong, 2011).

2.4. Апоптоза у терапији канцера

Апоптоза игра важну улогу како у канцерогенези, тако и у терапији канцера. За терапију канцера су неопходна знања о механизмима апоптозе и начинима на које промене у апоптотском путу доприносе процесу канцерогенезе. Сваки дефект, структурна или функционална

абнормалност дуж апоптотског сигналног пута може бити интересантна мета за терапију тумора. Антитуморске супстанце поседују директан или индиректан утицај на молекуларне механизме апоптозе. Различите стратегије третмана одговарајућим антитуморским супстанцама обухватају покушаје да се процес апоптозе врати на нормалу и да се елиминишу малигне ћелије. Неке од стратегија третмана канцера користе Bcl-2 фамилију протеина, укључијући коришћење терапеутских агенаса који инхибирају Bcl-2 фамилију антиапоптотских протеина или инхибицију протеина и гена укључених у њихову регулацију. Многобројне су и терапијске стратегије засноване на p53 генским терапијама или дизајну супстанци које активирају одговарајуће каспазе. На пример, апоптотин је активирајући агенс каспазе који је иницијално добијен из вируса и способан је да селективно индукује апоптозу у малигним, али не у нормалним ћелијама (Wong, 2011; Kanduc и сар., 2002).

Број изолованих и синтетисаних једињења са способношћу изазивања апоптозе малигнућ ћелија је у сталном порасту (Kamal и сар., 2014). Велики је број доступних литературних података о различитим једињењима у преклиничкој фази испитивања (Horneber и сар., 2008; Zhou и сар., 2013; Chu и сар., 2014; Weeksler и сар., 2014), као и једињења која су у фази клиничких испитивања или са одобрењем за употребу од стране FDA (*Food and Drug Administration*), као и Европске Медицинске Агенције (енгл. *European Medicines Agency*, ЕМА). У 2013. години одобрено је 12 нових антитуморских лекова за употребу од стране ЕМА, међу којима су и лекови са апоптотском активношћу, као што су afatinib, dabrafenib и cabozantinib (<http://sms-oncology.com/ema-anticancer-drug-approvals-in-2013/>).

3. Механизми редокс равнотеже

Фаворизовање аеробног начина живота условило је излагање живих организама потенцијално опасним оксидационим процесима, посредованим реактивним врстама кисеоника (енгл. *Reactive Oxygen Species*, ROS). Повећан ниво ROS најчешће долази из штетних извора у спољашњој средини (јонизујуће зрачење, токсини, лекови, хемикалије, полутанти). Међутим, свака ћелија живог организма производи ROS, док су неке ћелије специјализоване за овакву непрекидну синтезу, односно формирање “оксидационог распрскавања” (Sies, 1991). У оваквим условима стварања ROS, развио се и одбрамбени механизам организма – антиоксидациони заштитни систем (енгл. *Antioxidative Defence System*, AOS). Последњих деценија истраживања у овој области истичу важност ROS и читавог редокс система као основе физиолошких процеса у организму (ћелијске пролиферације и диференцијације, преноса сигнала, регулације метаболизма и међућелијске комуникације), цитопротективних механизма (инфламације, одбране од

микроорганизама), али и патофизиолошких феномена (старења, канцерогенезе, апоптозе, некрозе, токсичног деловање лекова и др.) (Žikić и сар., 2000; Droge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2006).

3.1. Реактивне врсте кисеоника (ROS)

Ћелије људског организма користе молекулски кисеоник (O_2) за метаболизам масти, угљених хидрата, протеина и добијање енергије. Међутим, кисеоник и неки његови метаболички продукти (реактивне врсте кисеоника), настали у бројним физиолошким и патолошким процесима, као споредни производи транспорта електрона у митохондријама, могу изазвати различита оштећења у ћелијама и ткивима. То су молекули, јони и атоми који имају један или више неспарених електрона у својој структури (Đorđević и сар., 2000; Žikić и сар., 2000). Основне особине ових молекула су веома кратак полуживот и изузетно велика реактивност. Због присуства неспарених електрона поседују изузетну хемијску реактивност и да би постали електронеутрални теже да се спајају са електронима других молекула. Током тог процеса формирају се нове ROS које затим учествују у низу ланчаних реакција, креирајући нове реактивне продукте. Уколико се новонастале ROS не деактивирају, од првобитне реакције може да настане хиљаде реактивних молекула за само неколико секунди. Реактивне врсте кисеоника обухватају слободне радикале кисеоника (супероксид - O_2^- , хидроксил - $\cdot OH$, пероксил - RO_2^\cdot , алкоксил - RO^\cdot и хидропероксил радикал - HO_2^\cdot) и реактивне врсте кисеоника које нису радикали (водоник пероксид - H_2O_2 , хипохлорна киселина - $HOCl$, озон - O_3 и синглет кисеоник - 1O_2).

У организму ROS могу да настану деловањем разних ензимских и неензимских система смештених на ћелијским мембранама, у цитоплазми, плазма мембрани и крвним елементима. Највећим делом настају у митохондријама, али и у пероксизомима, микрозомима, мембрански везаним ензимима (циклооксигеназе и липооксигеназе) (Žikić и сар., 2000).

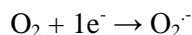
Реактивне врсте кисеоника имају способност реакције са липидима мембране, нуклеинским киселинама, протеинима, ензимима и другим молекулима, што може довести до њихових оштећења (Žikić и сар., 2000; Marković и сар., 2006). Кумулативни ефекат може да доведе до смрти ћелије (апоптоза/некроза) или може имати значајну улогу у настанку великог броја хуманих обољења као што су кардиоваскуларна, гастроинтестинална, инфективна обољења, алергије, канцер, кожне болести, неуродегенеративне, неуромускуларне, респираторне болести и др. (Halliwell, 1994; Nelson и сар., 2006; Štajn и сар., 2007).

Иако ROS представљају токсичне нуспроизводе ћелијског метаболизма, имају улогу у регулацији различитих сигналних путева у ћелијама. Функционисање многих протеина зависи од редокс статуса ћелије. У физиолошким концентрацијама ROS регулишу молекуларне механизме

многобројних физиолошких процеса у ћелијама, штите организам од патогена, имају кључну улогу у имунском одговору, ћелијској пролиферацији, инфламацији, ћелијској адхезији, метаболичким процесима, старењу и апоптози (Sen, 1998; Droge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2006; Štajn и сар., 2007; Stanković и сар., 2011).

3.1.1. Супероксид анјон радикал ($O_2^{\cdot-}$)

Једноелектронском редукцијом молекулског кисеоника настаје супероксид анјон радикал, према следећој реакцији:



Супероксид анјон радикал настаје у готово свим аеробним ћелијама, а најзначајнији процес у коме се ствара је респираторни ланац митохондрија (Halliwell и Gutteridge, 1999; Andreyev и сар., 2005). Значајне количине се продукују у ендоплазматичном ретикулуму, реакцијама оксидаза (ксантинооксидаза, Р450 оксидаза, NAD(P)H оксидаза, липооксигеназа, циклооксигеназа, алдехидоксидаза). Могу настати дејством различитих лекова, најчешће цитостатика, зрачења, биотрансформацијом екзогенних и ендогенних супстрата (Liochev и Fridovich, 1994; Droge, 2002).

У физиолошким условима ензим супероксид дисмутаза (SOD) својом активношћу трансформише $O_2^{\cdot-}$ у мање реактиван H_2O_2 . Може бити вишеструко штетан за ћелију, учествујући у формирању других ROS, реакцијом са различитим биолошким супстратима као редукционо или оксидационо средство. Индукује пероксидацију липида, оштећује ензиме, ремети синтезу ДНК и учествује у процесу канцерогенезе и настанку многих болести (Žikić и сар., 2000; Droge, 2002).

У физиолошким концентрацијама $O_2^{\cdot-}$ имај значајну улогу у сигналној трансдукцији преко мембранских рецептора, контроли вентилације и активацији имунолошких функција (Droge, 2002; Dumitru и сар., 2007).

3.2. Азот моноксид и реактивне врсте азота (RNS)

Поред ROS, у организму се продукују и реактивне врсте азота (енгл. *Reactive Nitrogen Species*, RNS). Азот моноксид (енгл. *Nitric Oxide*, NO[•]), као извор свих RNS, је неполаран, високо дифузибилан сигнални молекул, који има особине слободних радикала јер садржи један неспарен електрон. Лако дифундује кроз ћелијске мембране и ствара комплексе са многим циљним молекулима у скоро свим системима органа (Ignarro, 1999). Механизми молекуларног дејства могу бити директни у којима директно интерагује са циљаним молекулима и индиректни где првобитно реагује са молекуларним кисеоником и $O_2^{\cdot-}$ са којима ствара RNS (Wink и Mitchell, 1998).

Азот моноксид настаје из L-аргинина активношћу ензима азот оксид синтетазе (енгл. *Nitric Oxide Synthetase*, NOS), при чему током оксидо-редукционог процеса првобитно долази до стварања L-цитрулина. Постоји неколико изоформи овог ензима: ендотелна (eNOS), неуронална (nNOS), индуцибилна (iNOS) и митохондријална (mtNOS) (Moncada и сар., 1991, Elfering и сар., 2002).

Азот моноксид представља важан унутарћелијски сигнални молекул, учествује у регулацији бројних физиолошких процеса и има улогу медијатора у многим молекулским механизмима који доводе до патолошких стања (Dedon и Tannenbaum, 2004). Тип хемијске реакције којој је подвргнут и микросредина одређују улогу NO као сигналног молекула или снажног цитотоксина (Jourdhueil и сар., 2001). Значајан је као вазодилататор, неуротрансмитер, антимикуробни молекул и имуномодулатор (Geller и Billiar, 1998) и велика група лекова из групе нитропрепарата остварује своје физиолошке ефекте у организму управо ослобађањем азот монооксида (Ignarro и сар., 2002; Marković и сар., 2006, 2007, 2014). Постоји неусаглашеност ставова о улози NO у физиолошким и патофизиолошким стањима јер биолошки ефекти зависе од продуката насталих у метаболизму и реакцијама са другим једињењима. Унутарћелијски NO брзо формира нитрите и нитрате, S-нитрозо-тиоле, нитроксил анјоне (NO⁻) или пероксинитрите (ONOO⁻) (Wink и Mitchell, 1998; Marković и сар., 2006, 2007). Метаболити NO могу бити генотоксични (Felley-Bosco, 1998), изазвати оштећења и модификације ДНК, најчешће формирањем пероксинитрита (Ambs и сар., 1997; Felley-Bosco, 1998). Ове реакције могу бити повезане са изазивањем апоптозе, инхибицијом ензима одговорних за поправку ДНК или липидном пероксидацијом (Wink и Mitchell, 1998; Felley-Bosco, 1998; Marković и сар., 2006, 2007).

3.3. Ефекти ROS и NO на канцер и апоптозу

Редокс регулација има кључну улогу у преживљавању ћелија, регулацији сигналних путева, метаболичким процесима, активацији различитих транскрипционих фактора. Оксидациони стрес се дефинише као поремећај прооксидационо-антиоксидационе (редокс) равнотеже. Ради се о озбиљно нарушеном балансу између продукције ROS и RNS са једне стране и антиоксидационе заштите са друге стране, при чему се фаворизују прооксиданси узрокујући потенцијална оштећења ћелија и многобројне патолошке појаве, укључујући и малигне болести (Droge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2006).

Иако апоптоза и канцерогенеза представљају два супротна процеса, ROS имају подједнако битну улогу у оба. Започињање процеса канцерогенезе је повезано са оксидационим оштећењима ДНК. Ћелије брзо реагују на дисбаланс редокс равнотеже на многобројне начине и ови рани

догађаји одређују да ли ће ћелија окончати живот некрозом, апоптозом или ће преживети и пролиферисати. Проканцерогена активност ROS укључује стимулацију и промоцију ћелијске пролиферације, инвазивност, ангиогенезу, метастазу и инхибицију апоптозе, док антитуморски ефекти подразумевају њихов утицај на застој ћелијског циклуса, изазивање апоптозе и некрозе, инхибицију ангиогенезе (Stanković и сар., 2011; Žižić и сар., 2011; Stojnev и сар., 2013). У процесу апоптозе иницијална оштећења изазвана оксидационим стресом не убијају ћелију директно, већ учествују у активацији сигналних путева који ћелију воде у смрт (Mates и сар., 2012).

Улога ROS у апоптози је доказана у многобројним студијама где додаток ниских доза ROS индукује апоптозу и чињеницом да различити антиоксиданси могу инхибирати апоптозу. Реактивне врсте кисеоника могу индуковати апоптозу преко спољашњег апоптотског пута, повећањем експресије рецептора смрти, као и преко унутрашњег, митохондријалног пута (Žlender, 2003; Ozben, 2007). Приликом интеракције рецептора смрти са лигандом и активације спољашњег апоптотског пута активира се и никотинамид аденин динуклеоти фосфат (NADPH) оксидаза која продукује ROS (Park и сар., 2012). Такође, активацијом NF-κappaB протеина (енгл. *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*, NF-κB) повећава се транскрипција антиапоптотских протеина FLIP (енгл. *FLICE Inhibitory Proteins*), који инхибирају каспазу 8 и 10, MnSOD, Bcl-X и IAP који блокирају апоптозу (Micheau и сар., 2001).

Показано је да дисфункција митохондрија има кључну улогу у изазивању апоптозе. Неправилна функција митохондрија доводи до смањења митохондријалног метаболизма, дисбаланса у мембранском потенцијалу митохондрија, смањене респирације и оксидативне фосфорилације, и коначно изазивања апоптозе (Simon и сар., 2000). Супероксид анјон радикал мења митохондријалну функцију и индукује апоптозу (Caro и Cederbaum, 2006; Ricci и сар., 2008). Повећана продукција O_2^- доводи до нарушавања редокс баланса у ћелији, интегритета митохондрија и интеракције са протеинима спољашње митохондријалне мембране. Протеини Bcl-2 фамилије одређују осетљивост ћелија на апоптозу регулишући баланс између проапоптотских (Bax, Bak, Bad, Vim и Bid) и антиапоптотских протеина (Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W). У присуству апоптотског стимулуса, као што је ROS, Bid протеин изазива Bax/Bak олигомеризацију која доводи до формирања пора на митохондријалној мембрани, ослобађања Cyt c и активације каспазе 9 што доводи до апоптозе (Lee и Wei, 2000).

Многбројне студије показују да бројне антитуморске супстанце и радиотерапија изазивају апоптозу захваљујући способности да продукују ROS у малигним ћелијама (Sánchez и сар., 2010; Brodská и Holoubek, 2011; Stanković и сар., 2011). Антитуморска једињења која стварају ROS у ћелијама доводе до трошења унутарћелијског антиоксидационог капацитета и када концентрација

ROS достигне одговарајући праг активирају се апоптотски сигнални путеви. У недостатку одговарајуће антиоксидационе заштите, настала оштећења и ROS доводе до активације апоптотских гена. Унутарћелијски повећана концентрација ROS може активирати редокс сензитиван SAPK/JNK (енгл. *Stress Activated Protein Kinases/Jun amino-terminal Kinases*) сигнални пут, често укључен у трансактивацију гена и посттранслациону обраду протеина неопходних за апоптозу. Показано је да веома високе концентрације ROS у малигним ћелијама изазивају некрозу (Ozben, 2007).

Механизми којима ROS постижу антиапоптотске ефекте нису комплетно истражени. Различите ефекте на ћелије у великој мери постижу регулацијом активности транскрипционих фактора, као што су HIF-1 α (енг. *Hypoxia Inducible Factor 1 alpha*), NF- κ B и други (Turraev, 2002; Asker и сар., 2006). Постоји хипотеза да ROS инактивирају каспазе, које садрже тиолну групу, веома осетљиву на редокс модулације оксидацијом и S-нитрозилацијом, а свака модификација доводи до инхибиције њихове активације (Curtin и сар., 2002).

Ефекти NO на канцер могу бити стимулативни и супресорни што зависи од врсте канцера и концентрације NO, настале (не)равнотежом између његове продукције и инактивације. Најчешће су последица промене редокс статуса у ћелијама и потенцијалне интеракције са O₂⁻, при чему настаје пероксинитрит који даље индукује оксидациони стрес и веома је токсичан за ћелије (Wink и Mitchell, 1998; Herdener и сар., 2000). За време почетног раста канцера, макрофаге убијају малигне ћелије NO зависним механизмом, али такође NO може подстаћи ангиогенезу, појачати раст канцера, инвазију и метастазу (Lala и Orucevic, 1998).

Апоптотски ефекти NO су дозно зависни и специфични за тип ћелијске линије, где може имати про- и антиапоптотске ефекте. Високе концентрације NO су углавном цитотоксичне, док ниске концентрације могу штитити ћелије од оштећења и апоптозе (Ambs и сар., 1997). Други фактор битан за процес апоптозе је експресија iNOS у различитим малигним ћелијама, која може створити високе концентрације NO у дужем временском периоду (Dimmeler и Zeiher, 1997).

Азот моноксид може директно изазвати повећање пропустљивости митохондријалне мембране, ослобађањем Cyt c, активирати каспазу 8 или изазвати цепање Bid што ћелију води у апоптозу (Brookes и сар., 2000). Проапоптотски ефекти NO и iNOS су повезани са акумулацијом p53 протеина у ћелији, смањеном експресијом антиапоптотског *bcl-2* и повећаном транскрипцијом проапоптотског *bax* гена, инактивацијом ензима протеин киназе C, настанком директних оштећења ДНК (процесом деаминације, нарочито у регионима богатим цитозином), инхибицијом синтезе ДНК, различитим оштећењима ћелија (Kosić и сар., 2003).

Са друге стране, показано је да NO штити поједине типове ћелија од апоптозе (Dimmeler и сар., 1997; Kwon и сар., 2001). Антиапоптотски ефекти се остварују инхибицијом активности каспаза, укључујући каспазу 3, 1 и 8. Активност каспаза се инхибира директно S-нитрозилацијом (Dimmeler и сар., 1997; Kim и сар., 1997; Mannick и сар., 2001). Други могући механизам блокирања апоптозе је спречавање везивања прокаспазе 9 за APAF 1 и немогућност формирања апоптозома. Показано је да се инхибицијом iNOS и смањењем концентрације NO повећава осетљивост малигних ћелија на третман, као што је цисплатина (Tang и Grimm, 2004). Обзиром на то, циљана инхибиција iNOS и самим тим смањење концентрације NO може бити ефективан терапеутски покушај у третману канцера.

3.4. Антиоксидациони заштитни систем (AOS)

Антиоксидациони заштитни систем настао је током еволуције како би се спречила, ограничила или „поправила“ оштећења настала деловањем реактивних врста. Антиоксиданси имају способност стабилизације, односно деактивације ROS (Droge, 2002; Halliwell и Gutteridge, 2006; Štajn и сар., 2007). Антиоксидациони заштитни систем се састоји од ензимских и неензимских компоненти. Неензимске компоненте AOS обухватају супстанце растворљиве у мастима (витамин А, провитамин А, витамин Е, коензим Q) и супстанце растворљиве у води (витамин Ц, глутатион, мокраћна киселина, хистидин и др.). Поред њих у ћелијама постоје антиоксидациони ензими, као што су супероксид дисмутаза (SOD), каталаза (CAT), глутатион пероксидаза (GSH-Px), глутатион редуктаза (GR), глутатион S-трансфераза (GST) и др. (Žikić и сар., 2000; Halliwell и Gutteridge, 2006; Štajn и сар., 2007).

Антиоксиданси играју кључну улогу у превенцији многих болести, укључујући и канцер. Антиоксидационе супстанце природног порекла имају велику предност у односу на синтетске, за које је утврђен низ нежељених ефеката, као и генотоксична активност. Лековитост великог броја биљака које се користе у фармацији и народној медицини последица је присуства различитих биоактивних једињења са изузетно високом антиоксидационом активношћу.

3.4.1. Глутатион (GSH)

Глутатион (GSH) је трипептид (γ -L-глутамил-L-цистеинил-глицин), који представља неензимску компоненту AOS и присутан је у свим ћелијама сисара као слободан или везан у цитосолу, једру, митохондријама или микрозомима (Žikić и сар., 2000). Синтезише се активношћу γ -глутамилцистеин синтетазе (GCS) и глутатион синтетазе (GS) у серији ензимских реакција (Meister и Anderson, 1983; Griffith, 1999). Глутатион у ћелијама постоји у редукованој (GSH) и

оксидованој форми (GSSG). Одржавање оптималног односа GSH:GSSG у ћелији је кључно за преживљавање ћелија, а дефицит GSH може довести до оксидационих оштећења (Schafer и Buettner, 2001; Marković и сар., 2010, 2011а, 2014).

Глутатион има многобројне улоге у ћелији: у синтези и деградацији протеина, у формирању дезоксирибонуклеотида, складиштењу и транспорту цистеина, регулацији ћелијског редокс баланса, заштити ћелија од слободних радикала и у детоксикацији, као кофактор ензима глутатион S-трансферазе. Многи ксенобиотици и електрофилни молекули конјугују са GSH и настали конјугати углавном се транспортују изван ћелије (Alary и сар., 2003; Ralat и сар., 2006). Заштитна улога GSH од оксидационог оштећења заснива се на способности да реагује сулфхидрилном групом (-SH) у директној и брзој реакцији са реактивним врстама (Žikić и сар., 2000; Marković и сар., 2010, 2011а, 2014). Одржавањем редокс хомеостазе у ћелији GSH доприноси регулацији функције целуларних протеина, ћелијског циклуса, апоптозе, некрозе и ћелијске сигнализације (Yuan и Kaplowitz, 2009). Може мењати активност многобројних гена одговорних за стрес, регулисати гене за ћелијску пролиферацију, диференцијацију и апоптозу (Wiseman и Halliwell, 1996; Arrigo, 1999).

Многи типови канцера имају повишен ниво ROS и RNS у поређењу са нормалним ткивом (Toyokuni и сар., 1995; Kawanishi и сар., 2006), као и повишен ниво антиоксидационих ензимских и неензимских компоненти, међу којима је и GSH (Goodwin и Baylin, 1982). Ово повећање може бити резултат адаптивног одговора на оксидациони стрес. Иако је GSH важан у детоксикацији од канцерогена, показано је да код многих типова канцера повећава резистенцију и смањује цитотоксичност многих хемиотерапеутских лекова и зрачења (Ganesaratnam и сар., 2004). Показано је да манипулација редокс статусом у малигним ћелијама може имати терапеутски значај, тако што повећање ROS или смањење антиоксидационе способности може бити токсично за малигне ћелије.

3.5. Глутатион S-трансфераза (GST)

Глутатион S-трансфераза припада великој фамилији функционално различитих ензима, који катализују конјугацију глутатиона са различитим електрофилним једињењима, делујући као везујући протеини за различите супstrate чиме се олакшава њихов транспорт и везују се ковалентно за неке канцерогене, антитуморске лекове и секундарне метаболите биљака (Gyamtfi и сар., 2004). На тај начин укључена је у детоксикацију многих ксенобиотика, канцерогена, епоксида и других супстанци.

Солубилна GST у ткивима је класификована у шест група: alpha, mu, pi, sigma, kappa и theta (Armstrong, 1997). Pi класа глутатион трансфераза (GSTP1) има битну улогу у одбрамбеном механизму ћелија од цитотоксичних и канцерогених лекова, а супстрати за GSTP1 су разни природни супстрати, као и хемијска једињења. Иако GST катализује реакције које штите ћелију од токсина и канцерогена, многа сазнања показују да је GST прихваћена као тумор маркер и укључена у појаву резистенције на лекове (Zhang и сар., 1998). Повишен ниво и активност GST у многим типовима канцера одговорни су за појаву резистенције на цитостатике и смањење ефикасности хемиотерапије. Прекомерно експримирана GST може обезбедити малигним ћелијама боље преживљавање у односу на здраве ћелије (Cullen и сар., 2003; Coruh и сар., 2007).

Обзиром на то да многе биљке могу мењати активност метаболичких ензима (Gyamfi и сар., 2004; Coruh и сар., 2007), испитивање и проналазак нових антиоксиданаса са инхибиторном активношћу на GST је веома важно због потенцијалног коришћења биљака у комбинованим терапијама. Циљање овог ензима са природним или синтетисаним малим молекулама пружа корист у превенцији и третману канцера.

GSTP1 има улогу у регулацији апоптозе, мењајући активност JNK киназе (енгл. *Jun N-terminal Kinase*) коју инхибира и на тај начин зауставља апоптозу (Adler и сар., 1999). Због тога инхибиција GSTP1 активности у појединим ћелијским линијама доводи до активације процеса апоптозе (Bernardini и сар., 2000).

3.6. Цитохром P450 ензими

Цитохром P450 (CYP450) ензими имају кључну улогу у метаболизму различитих врста ендогених и екзогених једињења, укључујући канцерогене материје из окружења, биљне токсине и различите врсте антитуморских лекова. Име "цитохром P450" потиче од чињенице да је обојен (*chrome*), ћелијски протеин (*cyto*), пигмент који апсорбује светлост на 450 nm (Meunier и сар., 2004). Цитохром P450 изоензими су подељени у две класе. Прву чине стероидни CYP ензими, углавном локализовани у митохондријама и одговорни за претварање одговарајућих супстанци у биолошки потребне конститuentе, као што су стероиди, холестерол и др. Ови ензими укључују фамилију CYP7, CYP11, CYP17, CYP19, CYP21 и CYP27. Другу групу чине ксенобиотички CYP ензими (фамилије CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4) који су локализовани на ендоплазматичном ретикулуму и одговорни су за биотрансформације ксенобиотика, као што су токсини, карциногени, лекови и мутагени (Hayes и Pulford, 1995). Друга група ензима има битну улогу у развоју и третману канцера и веома су заступљени у ткивима канцера дојке, колона, плућа,

оваријума итд. (Hashizume и сар., 2002). Изоформе CYP1A1 и CYP1B1 су идентификоване као главне форме CYP1, присутне у великом броју канцера (Murray и сар., 2001).

4. Употреба лековитих биљака у народној медицини

Поред тога што су корисне као извор минерала, витамина, биљних уља и великог броја важних органских једињења, биљке се користе као извор медикамената, у превенцији и лечењу многих болести. Употреба природних производа, посебно биљака у медицинске сврхе датира од најранијих корена цивилизације. Појам народна или традиционална медицина односи се на примену, приступ и веровање у употребу биљака и животиња и њихових продуката за превенцију и терапију многих болести (Ravelo и сар., 2004). Као медицински значајне, биљке су коришћене у многим земљама и велики број лекова у клиничкој употреби је добијен из биљака. Светска Здравствена Организација процењује да се 80% становника ослања на традиционалну медицину за своју примарну здравствену заштиту (Sakarkar и Deshmukh, 2011). Висока цена, штетни ефекти и резистенција на тренутно коришћене лекове води ка повећаној пажњи и коришћењу биљака као извора медикамената (Joy и сар., 2001). Повољни фактори су цена и њихова доступност, а циљ коришћења биљака као извора терапеутских агенаса је да се изолују биоактивне компоненте за директну употребу (нпр. морфин, таксол, винбластин, винкрестин), као и да се произведу биоактивна једињења нових или познатих структура са бољом активношћу и мањом токсичношћу на здраве ћелије (Fabricant и сар., 2002). Сарадња између традиционалне медицине и модерне биотехнологије треба да води ка развоју нових лекова.

4.1. Биљке са антитуморским својствима

Биљке, као извор биоактивних једињења, су одувек коришћене у превенцији и лечењу канцера. Велики број антитуморских лекова, чак 60%, потиче из природних извора (Newman и сар., 2003; Cragg и Newman, 2005).

Интензивна истраживања антитуморских супстанци почињу изолацијом винка алкалоида (винбластина и винкрестина) из биљке *Catharanthus roseus* G. Don. То су били први агенси у клиничкој употреби у третману канцера, примарно коришћени у комбинацији са другим хемиотерапеутицима (Gueritte и Fahu, 2005). Откриће паклитаксела (Taxol) из тисове коре *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) и других врста рода *Taxus* је друга потврда успеха природних супстанци у лечењу канцера. Паклитаксел је показао значајну активност на малигне ћелије пореклом из различитих органа (Kingston, 2005). Камптотецин, изолован из кинеског украсног дрвета

Camptotheca acuminata Decne (Nyssaceae) и иринотекан, синтетисан дериват камтотецина коришћени су за третмане карцинома оваријума, плућа и колоректалног карцинома (Rahier и сар., 2005). Епиподофилотоксин је изомер подофилотоксина који су изоловани из коренова биљака из рода *Podophyllum*. Етопсид и тенипосид су два широко синтетисана деривата епиподофилотоксина, коришћена у третману лимфома и карцинома простате (Lee и Xiao, 2005). Хомохаринготонин изолован из кинеског дрвета *Cephalotaxus harringtonia* var. *drupacea* Sieb и Zucc., такође је агенс природног порекла у клиничкој употреби (Cragg и Newman, 2005; Shoeb, 2006; Prakash и сар., 2013).

Осим наведених, изолован је и идентификован велики број биоактивних једињења из биљака. Неки од њих су у клиничкој употреби или у фази преклиничког тестирања. Истраживање нових антитуморских агенаса из природних извора се базира на испитивањима цитотоксичности на различитим ћелијским линијама и *in vivo* моделима (Dholwani и сар., 2008; Prakash и сар., 2013; Žižić и сар., 2013). Неки од могућих механизма дејства биљака на канцер су инхибиција пролиферације малигних ћелија директно стимулацијом макрофагних фагоцита повећањем активности "природних убица", повећавање броја леукоцита стимулацијом хематопоезне функције (Haddad и сар., 2005) и изазивање апоптозе малигних ћелија (Daniel и сар., 2006). Многе биљке показују активност тако што интерагују са тубулином и потпомажу деполимеризацију тубулина или инхибирају топоизомеразу I (Cragg и Newman, 2004). Са проналаском великог броја молекулских механизма који учествују у појави и развоју канцера повећао се број испитиваних једињења и њихових ефеката на различите компоненте сигналних путева.

Антитуморски ефекти биљних екстракта су углавном резултат кумулативне активности и синергистичких интеракција различитих компоненти присутних у биљци (Zhang и сар., 2003). За многе биљне врсте није потврђен молекуларни механизам њиховог антитуморског деловања и потенцијална антитуморска својства многих биљака нису испитана. Такође, нису испитане њихове међусобне интеракције и интеракције са хемиотерапеутицима приликом њихових евентуалних комбинација.

4.2. Биолошки активне компоненте биљака

Истраживања показују да исхрана намирницама које садрже фитохемикалије може имати повољан утицај на здравље људи (Woo и сар., 2009). Биолошки активне компоненте заступљене у биљкама су на првом месту фенолна једињења, фитоестрогени, фитостероли, лектини, олигосахариди и полинезасићене масне киселине (Gee и сар., 2001).

Поред примарног метаболизма у коме настају основни биомолекули као што су протеини, угљени хидрати и липиди (Kruger и сар., 1999; Smith и Guerinot, 2003), у биљкама се синтетички одређена једињења која немају нутритивну вредност, али показују одређена биолошки активна својства (Blumenthal и сар., 2000). Ова једињења се називају секундарни метаболити или фитохемикалије и углавном су резултат адаптације биљке на услове животне средине. Секундарни метаболити имају значајну улогу као одбрамбени механизми на биотичке и абиотичке утицаје, значајни су у еколошким интеракцијама биљака, као пигменти и имају многе друге улоге. Међусобно се разликују у погледу хемијске грађе и функције, заступљености код различитих биљака или таксона. Квантитативно-квалитативни састав се мења током вегетационог периода, годишњег доба, а зависи и од самог стања биљке, присуства или одсуства стреса и др. (Oh и сар., 2009; Khan и сар., 2011).

У односу на присуство или одсуство атома азота у свом молекулу секундарни метаболити биљака су подељени на две групе. Фенолна једињења и терпеноиди чине прву групу, која у својим молекулима не садржи атоме азота, док другој групи (алкалоиди и антибиотици) припадају секундарни метаболити који садрже атоме азота у својим молекулима (Wink, 2004; Mazid и сар., 2011).

Фенолна једињења или полифеноли представљају широко распрострањену групу метаболита биљака, која обухвата разноврсне биомолекуле као што су фенолне киселине, флавоноиди, кумарини, лигнани, танини и др. (Crozier и сар., 2006). Заједничка карактеристика фенолних једињења је да садрже ароматичан (бензенов) прстен са једном или више хидроксилних (ОН) група. Сложеније грађена фенолна једињења могу садржати већи број ароматичних прстенова од којих сваки садржи најмање једну хидроксилну групу (Quideau и сар., 2011). До данас је идентификовано неколико хиљада различитих врста фенолних једињења, која се у биљкама налазе у слободном облику, у облику гликозида или у комплексу са другим молекулима (Hattenschwiler и Vitousek, 2000; Boskou, 2006). Фенолна једињења су веома заступљена у воћу, поврћу, вину, као и у лековитим и ароматичним биљкама (Robbins, 2003).

Једна од веома бројних класа фенолних једињења заступљених у биљкама су **флавоноиди** (Nijveldt и сар., 2001). Идентификован је и описан велики број флавоноида биљног порекла са основном биолошком улогом пигмената (Tanaka и сар., 2008). За једињења ове групе је карактеристична хетероциклична молекулска структура типа С6-С3-С6 коју чине два бензенова прстена повезана алифатичним низом (Harborne и Williams, 2000; Taras и сар., 2008).

Фенолна једињења, укључујући и флавоноиде, се због своје ароме и лековитости употребљавају у медицини, фармацеутској, козметичкој и прехранбеној индустрији.

Фармаколошко деловање фенолних једињења повезано је са хемијском структуром њихових молекула. Пошто постоји велики број различитих хемијских структура ових једињења, веома је широк и спектар њихове активности и терапијске примене. Од биолошких ефекта у *in vitro* и *in vivo* условима испољавају антимикуробну, антиоксидациону, антитуморску и низ других активности због чега имају широку примену у фармацији (Rice-Evans и сар., 1997; Manach и сар., 2004; Merkl и сар., 2010; Quideau и сар., 2011).

Фенолна једињења постижу антиоксидациона својства уз помоћ неколико механизма. Поседују идеалну хемијску структуру за везивање слободних радикала због присуства фенолне хидроксилне групе која тежи да преда електрон другом слободном радикалу. Веома су добри хидроген донори, могу реаговати са реактивним врстама, као што су ROS и RNS (Ralston и сар., 2005). У овој реакцији са реактивним врстама, формира се радикалска форма која има много већу хемијску стабилност од почетних радикала. Фенолна једињења могу смањити или зауставити настајања реактивних врста инхибицијом ензима и способношћу хелирања прооксидационих металних јона (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} и Mg^{2+}) укључених у продукцију слободних радикала. Такође, фенолна једињења могу имати антиоксидациону активност регулацијом, одржавањем и заштитом антиоксидационих компоненти ћелије. Могу активирати антиоксидационе ензиме или инхибирати прооксидационе ензиме (липоксигеназе, NAD(P)H оксидазе, ксантин-оксидазе, цитохром P-450) (Dai и Mumper, 2010).

Осим улоге антиоксиданаса, феноли могу иницирати оксидационе процесе и под одређеним условима деловати као прооксиданси, тако што одржавају или повећавају каталитичку активност редукујућих метала и на тај начин повећавају њихову способност да формирају слободне радикале. Феноксид радикал може такође реаговати са кисеоником и створити хиноне ($\text{P} = \text{O}$) и O_2^- . Најчешће мала фенолна једињења која се лако оксидују, као што су кверцетин и гална киселина поседују прооксидациона својства, док молекули са великом молекулском масом, као што су танини, имају малу или уопште немају прооксидациону активност. Антиоксидациона активност у *in vivo* и *in vitro* условима се драматично разликују, јер се и услови средине у којима се реакције одвијају разликују (Dai и Mumper, 2010).

Епидемиолошке студије показују да исхрана богата воћем и поврћем значајно смањује ризик од настанка канцера, сугеришући да би одређени антиоксиданси могли бити ефективни агенси за превенцију ове болести (Fresco и сар., 2006). Последњих година, проналазак једињења добијених из биљака и њихово тестирање на антитуморску активност представља главну област експерименталног истраживања. Многобројне *in vivo* и *in vitro* студије наводе антитуморски потенцијал ових једињења. Велики број изолованих фенолних једињења укључујући

антоцијанине, кафеинску киселину, кампферол, кверцетин, естре кумаринске киселине, инхибирају раст ћелија различитих врста канцера (Volate и сар., 2005; Dai и Mumper, 2010; Rajendra Prasad и сар., 2011; Shukla и сар., 2011; Li и сар., 2014а, 2014б).

Феноли могу постићи инхибиторне ефекте у канцерогенези путем два механизма: модификацијом редокс статуса ћелија и интеракцијом са основним ћелијским функцијама (ћелијски циклус, апоптоза, ангиогенеза и метастаза). Главну хемопревентивну активност постижу способношћу да купе и смањују стварање слободних радикала одговорних за настанак оксидационих оштећења, као једног од главних фактора у процесу канцерогенезе (Камра и сар., 2007). Осим тога, могу инхибирати или спречити оксидациони стрес изазван токсинима, канцерогенима и зрачењем (Tobi и сар., 2002; Mantena и Katiyar, 2006; Tsoyi и сар., 2008). Са друге стране, антитуморска активност фенола се заснива и на њиховој способности регулације сигналних путева ћелијског раста и пролиферације, супресије онкогена, изазивања апоптозе, мењања активности ензима за детоксикацију, стимулације имуног система и ДНК репарације (Gopalakrishanan и сар., 2006). Показују ефекте на све фазе развоја канцера и мењају њихов ток, инхибирањем активности проканцерогена инхибицијом ензима фазе I и II метаболизма, као што је цитохром P450, убрзавајући детоксикацију и елиминацију канцерогена. Феноли показују инхибиторне ефекте на миграцију, инвазију, ангиогензу и метастазу малигних ћелија *in vitro* и *in vivo*. (Dai и Mumper, 2010).



Слика 6. Потенцијални антитуморски ефекти биљних фенола у свим фазама развоја канцера (модификовано из Dai и Mumper, 2010).

4.3. Екстракти биљака

Добијање биљних екстраката, односно екстракција биолошки активних једињења из биљака, је први и кључни корак за добијање једињења која се касније изолују и користе као додаци храни, медикаменти, у козметичкој индустрији и фармацији. Фитохемикалије се могу екстраховати из свежег, замрзнутог и сувог биљног материјала.

Најчешће коришћена екстракција, због своје ефикасности и широке применљивости, је екстракција помоћу одговарајућих растварача. Квалитет и састав биљног екстракта зависи од врсте растварача, његове поларности, времена екстракције, односа узорка и растварача, као и од хемијског састава и физичких карактеристика биљке која се екстрахује. Растворљивост фенола, као компоненти биљке са најбољим биолошким ефектима, зависи од његове хемијске структуре и поларности коришћеног растварача (Lapornik и сар., 2005; Sineiro и сар., 2008). Биљни материјал може садржати феноле који су присутни појединачно (фенолне киселине, антоцијанини) и високо полимеризоване супстанце (танине) у различитим количинама. Такође, могу бити повезани са другим биљним компонентама као што су карбохидрати и протеини. Екстракцијом се добија смеша фенола растворљивих у коришћеном растварачу која може садржати и неке нефенолне супстанце као што су шећери, органске киселине и масти. Растварачи, као што су метанол, етанол, етилацетат, ацетон и њихове комбинације су најчешће коришћени за екстракцију фенола из биљног материјала (Dai и Mumper, 2010). Бирање одговарајућег растварача утиче на количину и однос екстрахованих фенолних једињења (Xu и Chang, 2007). Постоји висока позитивна корелација између ефикасности екстракционе процедуре и биолошке активности. У пракси, метанол се показао као најефикаснији растварач за екстракцију фенолних једињења мање молекулске масе, док се фенолна једињења велике молекулске масе боље екстрахују ацетоном или водом (Dai и Mumper, 2010). Етанол је такође добар растварач фенолних једињења и безбедан је за људску употребу (Shi и сар., 2005). Различити растварачи екстрахују различите врсте фенолних једињења. Етилацетат екстрахује алкалоиде, агликоне и гликозиде, ацетон најбоље екстрахује флавоноле, алкалоиде и агликоне, док метанол екстрахује сапонине, танине, феноне, флавоне, шећере, аминокиселине, антоцијанине, терпеноиде, лактоне (Houghton и Raman, 1998; Gupta и сар., 2012).

На екстракцију фенолних једињења може да утиче и време екстракције, као и температура. Многа фенолна једињења се лако хидролизују или оксидизују. Дуго време екстракције и висока температура повећавају шансу оксидације фенолних једињења што смањује принос фенолних једињења у екстракту (Dai и Mumper, 2010).

4.4. Морфолошке, систематске и еколошке карактеристике изабраних врста биљака. Биолошка активност и употреба у народној медицини

Обзиром да се у превенцији и терапији колоректалног карцинома све више користе препарати биљног порекла, а недовољно су испитиване биљке флоре Србије, у докторској дисертацији је тестиран антитуморски потенцијал и механизми проапоптотског деловања лековитих биљака *Teucrium chamaedrys*, *Allium flavum*, *Gentiana punctata*, *Ligustrum vulgare* и *Centaureum erythrea*. Изабране врсте биљака припадају различитим фамилијама, али оно што је заједничко за њих је да се мање или више користе у народној медицини, као чајеви, алкохолни и безалкохолни напици, сирупи, тинктуре и биљне капи, мелеми против шуљева и улазе у састав препарата намењених третманима различитих дигестивних проблема. Делотворне су у ублажавању дигестивних тегоба, побољшању апетита и варења, смањењу мучнине, горушице и надимња.

4.4.1. *Teucrium chamaedrys* L. (подубица, дубац, дубчац)

T. chamaedrys је вишегодишња, полужбунаста биљка из породице *Lamiaceae*. Корен биљке је делимично дрвенаст, а развија и подземне столоне. Стабла су усправна или се издижу и разграната су. Старије гране обично леже на земљи, али се не укорјењавају, док су млађе усправне, високе 10-25 cm. Стабло и изданци су местимично покривени нежлезданим и жлезданим длакама. Листови са кратком лисном дршком су прилично густо распоређени на стаблу, јајастог или елиптичног облика, назубљени по ободу, наспрамно постављени и унакрсно распоређени. Наличје је светлије од лица листа. Цветови су дугачки 10-12 mm, стоје усправно на дугачким дршкама, сложени у пазуху приперака у привидне пршљенове тако да сви заједно граде привидне терминалне гроздове, често окренуте на једну страну. Плодови су ситне орашице, јајастог облика, са мрежастом површином (Diklić, 1974; Mišić и Lakušić, 1990).

Биљка расте на сушним камењарима, нарочито на кречњаку, на пашњацима, у светлим храстовим и боровим шумама, на ливадама и осипима. У фитогеографском погледу *T. chamaedrys* је медитеранско-средњоевропска врста, распрострањена на територији средње Европе, Средоземне области, западне Азије и северне Африке. Веома добро је распрострањена на територији Србије, заступљена у готово читавој јужној и источној Србији, као и у југозападним деловима. Одсуствује или је веома ретка у северним, равничарским деловима (Diklić, 1974, Stanković, 2012).



Слика 7. Хабитус биљке *Teucrium chamaedrys* L.

Врсте из рода *Teucrium* су веома популарне у народној медицини од самог почетка употребе биљака у лечењу болести, а користе се у медицини и фармацији дуже од 2000 година. Веома су богате биоактивним једињењима, највише фенолима са различитим биолошким активностима (Yin и сар., 2009; Hasani-Ranjbar, 2010; Stanković и сар., 2012б).

T. chamaedrys је познат у народу као подубица и представља једну од најпознатијих и широко коришћених лековитих биљака, употребљаваних у облику чаја. Биоактивне супстанце, горког укуса делују на органе за варење и испољавају терапеутску активност тако што стимулишу секрецију жучи, ублажавају последице појачаног лучења желудачног сока, ублажавају дијареју и хемороиде и побољшавају варења хране. Користи се и у лечењу малокрвности и пада имунитета (Sarić, 1998; Vagci и сар., 2010). Поседује антиинфламаторна, антиоксидациона, антиреуматска и антитуморска својства (Ulubelen, 2000; Kucuk, 2006; Stanković и сар., 2010а; Stanković и сар., 2011).

4.4.2. *Allium flavum* L.

Allium flavum L. је вишегодишња биљка, 10-60 cm висока из породице Alliaceae. Луковица је јајолика, са јако издуженом у горњем делу влакнасто издељеном туником. Стабло је овално, усправно или чешће повијено устајуће. Лишће са полуцилиндричним дршкама, касније шупљим, је узано линеарно, голо, са плавичастим пругама, до 2 mm широко. Цветне дршке су танке, готово кончасте, до 3 пута дуже од перигона. Листићи перигона су дугуљасте, жути, сјајни, дугачки 4-5 mm. Насељава сува, каменита станишта до субалпског појаса. Распрострањена је у Француској, Шпанији, Италији, Балканском полуострву, Кавказу и западној Азији. У Србији је, такође, распрострањена (Tatić, 1975).



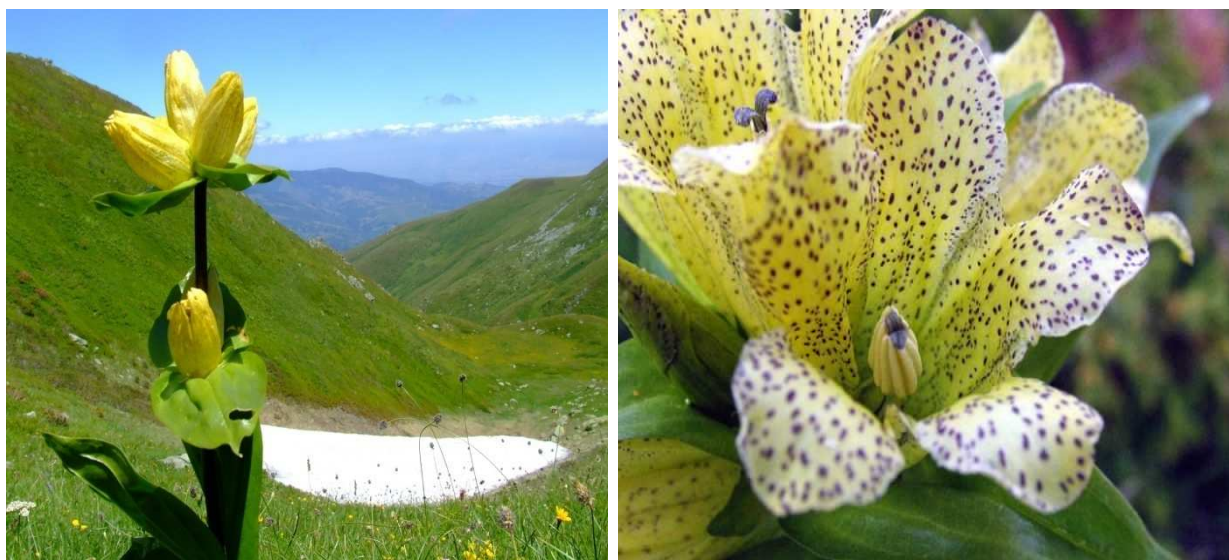
Слика 8. Хабитус биљке *Allium flavum* L.

Врсте из рода *Allium* су широко коришћене у свим деловима света, како у исхрани као ароматично поврће и извор витамина, тако и у народној медицини (Rivlin, 2001). Кроз читаву историју се знало да врсте из породице лукова на различите начине доприносе побољшању здравља, стимулишу имуни систем, убијају узрочнике болести и детоксикују канцерогене супстанце у организму. Потврђена су превентивна и терпеутска својства лукова на појаву и развој колоректалног карцинома на ћелијским линијама хуманог карцинома колона (Hirsch и сар., 2000; Bottone и сар., 2002) и животињским модел системима (Raghu и сар., 2012). Епидемиолошке студије показују да постоји позитивна корелација између конзумирања различитих врста из рода *Allium*, као додатака исхрани, и смањеног ризика од појаве колоректалног карцинома (Witte и сар., 1996). Лековита својства лукова на здравље људи почивају на њиховој веома доброј антиоксидационој (Ћурчић и сар., 2012б) антибактеријској активности (Ruddock и сар., 2005, Ћурчић и сар., 2012б), побољшању имунитета (Lau, 1989), антитуморским и ефектима у превенцији настанка канцера (Dion и Milner, 1997), њиховој способности да метаболишу и блокирају формирање супстанци које изазивају канцер (Shenou и Choughuley, 1992), повећају репарацију ДНК (L'vova и Zasukhina, 2002), инхибирају ћелијску пролиферацију или изазивају апоптозу малигних ћелија (Simin и сар., 2013) и друге фармаколошке ефекте (Yeh, 1996). Лукови садрже велики број једињења за која су потврђени антитуморски ефекти, као што је кверцетин, аликсин и велика група органосулфурних једињења, међу којима су најпознатији и најактивнији алицин и алил сулфиди (Block, 1985). Постоји пуно литературних података о биолошким ефектима различитих врста из рода *Allium*, али су недовољно испитани биолошки ефекти за врсту *A. flavum*.

4.4.3. *Gentiana punctata* L. (пегава линцура)

Gentiana punctata L. је вишегодишња биљка из породице Gentianaceae, са дебелим (1.5 cm), ваљкастим, косим или водоравним ризомом дужине и до 1 m и разгранатим кореном. Стабло је високо 20-60 cm, усправно, мало угласто, шупље и у горњем делу светло љубичасто обојено. Приземни листови су кратки, до 2 cm дугачки и на дршкама. Листови у горњем делу стабла су наспрамни, седећи, јајаста до елиптична, зашиљени на врху, дуги 6-9 cm и широки 2-6 cm, при основи срасли у кратак рукавац. Цветови су упадљиви, седећи, скупљени на врху стабла главичасто или привидно пршљенасто у пазуху листова. Круница је бледо жута са тамно љубичастим пегама (Јовановић-Дунјић, 1973a; Лакушић, 1990).

G. punctata расте на каменитим пашњацима, утринама и четинарским шумама (од 1400-2500 m надморске висине). Заступљена је у жбунастим заједницама (*Vaccinio-Juniperetum nanae*) и у смрчевим шумама. Чешћа је на кречњаку и глиновитим земљиштима са дубоком геолошком подлогом, али се може наћи и на силикатним подлогама. Распрострањена је у централној Европи, Балканском полуострву и припада средњоевропско-алпинском флорном елементу. Једино налазиште у Србији је Стара планина (Јовановић-Дунјић, 1973a; Лакушић, 1990).



Слика 9. Хабитус биљке *Gentiana punctata* L. (слика десно: http://luirig.altervista.org/schedeit/fo/gentiana_punctata.htm)

Род *Gentiana* је највећи род у фамилији Gentianaceae (Jensen и Schripsema, 2002) и обухвата око 300 врста (Georgieva и сар., 2005; Zhao и сар., 2010). У Европи постоји 29 врста од којих се 11 налази у Србији (Јовановић-Дунјић, 1973a). Биљке из овог рода су познате по горком укусу јер су богате горким гликозидима, најчешће секоиридоидима (свертиамарин, гентиопикрозид, сверозид и

амарогентин) (Jiang и сар., 2005), ксантонима и другим биоактивним супстанцама. Секоиридоиди добијени из рода *Gentiana* показују различите биолошке ефекте, као што је антитуморска (Isiguro и сар., 1986), антибактеријска, антигљивична (Siler и сар., 2010) и хепатопротективна активност (Jaishree и Badami, 2010). Према литературним подацима изоловани ксантони, такође, поседују широк спектар биолошких активности, као што је антиоксидациона (Ashida и сар., 1994), хипогликемијска (Basnet и сар., 1994), антивирусна (Chen и сар., 1996), антибактеријска (Finnegan и сар., 1973).

Ове биљке се користе у народној медицини и фармацеутској индустрији за израду фармацеутских препарата, дијеталних суплемената и у индустрији аперитива (ликери, горки тоници) (Lakušić, 1990). Неколико врста (*Gentiana lutea* L., *Gentiana punctata* L. и *Centaureum erythraea* Pers.) се користи у Србији за бољи апетит и дигестивне проблеме, као одличан горак тоник имају ефекта на апетит, стимулишу лучење желудачног сока, побољшавају варење. Сушено корење и ризоме се користе широм света као хепатопротективни агенси и за дигестивне проблеме (Szucs и сар., 2002; Jiang и сар., 2005).

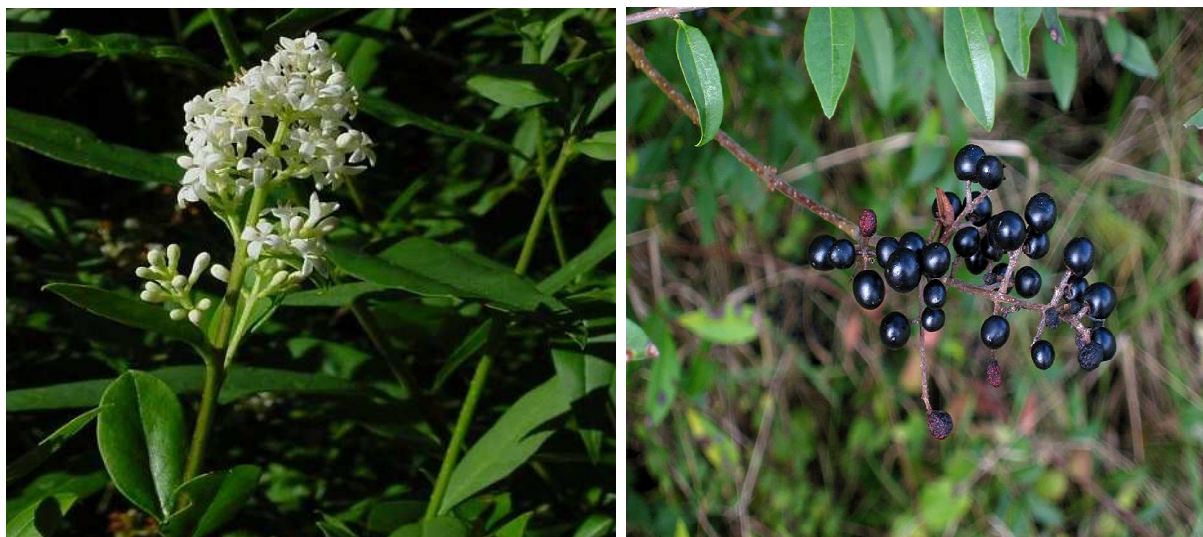
Обична генцијана (*G. lutea*, линцура) представља једну од најзначајнијих наших планинских лековитих биљака, највише је испитана и најчешће коришћена врста у фармацији. Корен линцуре улази у састав многих лекова који се производе у апотекама и фармацеутској индустрији на свим континентима и веома је тражен на домаћем и страном тржишту. Отуда и велико међународно значење те биљке у медицини, фармацији и привреди. Пегава линцура, *G. punctata*, је мања од обичне линцуре, поседује слична својства, али је недовољно испитана. *G. punctata* се гаји у култури биљних ћелија ради лакшег добијања одређених гликозида (Skrzypczak и сар., 1993).

4.4.4. *Ligustrum vulgare* L. (дивља калина)

Ligustrum vulgare је листопадни или полузимзелени жбун висок 5 m из породице Oleaceae. Пупољци су ситни, смеђи и са много љуспица. Лишће је ланцетасто или широко елиптично, дуго 2-7 cm, широко 0.5-2 cm, са клинастом основом. Лице листа је тамнозелене боје, а наличје светлозелено, кожасто, са мало повијеним ободом и лисним дршкама од 3-10 mm. Лишће опадне у јесен без јаче промене боје или презими у благим зимама. Цвасти су пирамидална метлица, дуге 4-10 cm, а цветови беличасти и миришљави. Плодови зру у септембру, округли су, црни, сјајни, са 2-4 коштице, дуги 6-8 mm. Плодови остају дуго на биљци после зрења (Јовановић и сар., 1973).

L. vulgare расте као жбун у бројним шумским заједницама у појасу храстова. Због свог полузимзеленог лишћа, великог броја изданака и крупних миришљавих цвасти употребљава се као

украшна врста, а често и као жива ограда у парковима и баштама. Распрострањен је у Средњој Европи, Медитерану, Кавказу, степама око Црног мора, Молдавији и западној Украјини. У Србији је ова врста, такође, распрострањена (Јовановић и сар., 1973).



Слика 10. Хабитус биљке *Ligustrum vulgare* L. (слика лево: <http://www.imagines-plantarum.de/>, слика десно: http://es.wikipedia.org/wiki/Ligustrum_vulgare)

Биљке из рода *Ligustrum* веома су богате биоактивним супстанцама и због тога су често коришћене и у фармацији (Wu и сар., 2011). Листови биљке *L. vulgare* годинама су коришћени за превенцију и лечење многих болести (Pieroni и сар., 2000), најчешће због његовог имуномодулаторног (Baróniková и сар., 1999), антибактеријског (Jantova и сар., 2001), антидијабетског (Andrade-Cetto и сар., 2005) и антитуморског ефекта (Jantova и сар., 2001; Ćurčić и сар., 2012a). Показано је да различити екстракти добијени из листова и плодова ове биљке поседују изузетна антиоксидациона својства (Sersen и сар., 2005). Многобројни *in vitro* есеји показују велики фармаколошки потенцијал за који је одговорно присуство флавоноида, фенилпропаноида, секоиридоида (олеуропеин и лигустрозид), кампоферол гликозида, кверцетин гликозида (Pieroni и сар., 2000; He и сар., 2003).

Обзиром на антипролиферативни потенцијал на малигним ћелијама и употребу у лечењу хроничних цревних проблема, улцерација, колоитиса и чирева, *L. vulgare* би могао да буде потенцијални кандидат за испитивање његових ефеката на колоректални карцином.

4.4.5. *Centaurium erythrea* Rafn. (syn. *Centaurium umbellatum* Gilib., кичица, црвени кантарион)

Centaurium erythrea је двогодишња зељаста бика, висока 10-15 cm из породице Gentianaceae. Стабло је усправно, једноставно или у горњем делу 4-угласто гранато. Приземни листови су у розети, јајастог облика до јајасто-елиптични, при основи сужени уз дршку и зелене боје за време цветања. Листови на стаблу су наспрамни, седећи, дугуљасто јајасте, до ланцеоласто-елиптични, по ободу цели и глатки. Цветови су у рачвастој, штитасто-гроздастој цвасти, збијеној, по горњој површини равној јер су цветови увек на истој висини. Цвета од јуна до септембра. Плод је уско цилиндрична чаура, а семе ситно са мрежно-жиличастом опном (Jovanović-Dunjić, 1973б; Mišić и Lakušić, 1990).

Врло је честа на шумским стаништима, пашњацима, по ивицама путева и њива, на голим падинама. Расте од низија до планинског појаса (до 1400 m надморске висине), обично на кречним, сувим земљиштима, али и на иловастим, пешчаним и мочварнијим. Широко је распрострањена по скоро читавој Европи (изузев севера), Кавказу, Персији, северној Африци и као унесена врста у Северној Америци. Припада европско-медитеранском флорном елементу. У Србији је распрострањена и честа (Jovanović и Dunjić, 1973б).



Слика 11. Хабитус биљке *Centaurium erythrea* Rafn. (слика десно: [://www.vulgaris-medical.com/phytotherapie/erythrea-centaurium](http://www.vulgaris-medical.com/phytotherapie/erythrea-centaurium)).

Велики број веома значајних биљака коришћених у народној медицини и фармацији припада овој фамилији, веома су богате секундарним метаболитима са изузетним биолошким активностима (Daniel и Sabnis, 1978) и најчешће су коришћене у третманима дигестивног система. *C. erythrea* је позната као медицинска биљка у многим деловима Европе, а у народној медицини се

примењује још од античког доба. Најчешће је припремана као чај, али улази у састав многих препарата за лечење стомачних тегоба (Votian и сар., 2005), поремећаја варења (губитак апетита, стомачних тегоба, надимања, лошег варења). Осим тога коришћена је и у третманима астме, реуматизма, рана и посекотина, жутице, ублажавању болова, код болести јетре, као и за смањење мишићног спазма гастроинтестиналних мишића (Carasso и сар., 1983; Bisset, 1994; Tyler, 1994; Tahraoui и сар., 2010). Употреба кичице у народној медицини описана је у бројним фармакопејама (Natjimanoli и Debelmas, 1977).

Фитохемијске студије (Nikolova-Damyanova и Handjieva, 1996; Valentao и сар., 2000, 2002; Kumarasamy и сар., 2003; Valentao и сар., 2003) показују присуство различитих секундарних метаболита у кичици, укључујући секоиридоидне гликозиде за које је показано антитуморско дејство, ксантоне, фенолне киселине и њене деривате, флавоноид гликозиде, ксантоне и терпеноиде (Valentao и сар., 2002; Stefkov и сар., 2014).

На основу прегледа литературе и наведених литературних података о биолошким ефектима изабраних врста биљака, недовољно података о антитуморском потенцијалу и веома мало података о ефектима и механизмима деловања на колоректални карцином јавља се потреба за овим истраживањима. Због тога су изабране врсте биљака тестиране као потенцијални антитуморски препарати (екстракти) на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама колоректалног карцинома.



II ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Обзиром на то да су испитивања нових антитуморских једињења и све чешће коришћење биљака и супстанци природног порекла у превенцији и терапији колоректалног карцинома веома актуелне теме у области молекуларне и ћелијске биологије, постављени су **општи циљеви** докторске дисертације:

- Испитивање антитуморског потенцијала екстраката лековитих биљака флоре Србије, традиционално коришћених у третманима различитих дигестивних поремећаја (*Teucrium chamaedrys*, *Allium flavum*, *Gentiana punctata*, *Ligustrum vulgare* и *Centaurium erythrea*) на НСТ-116 и SW480 ћелијама колоректалног карцинома и здравим фибробластима коже.
- Испитивање потенцијалних синергистичких ефеката екстраката биљака *A. flavum* и *G. punctata* и новосинтетисаног Pd(II) комплекса.
- Испитивање молекуларних механизма проапоптотске активности изабраних врста биљака у појединачним и комбинованим третманима на НСТ-116 и SW480 ћелијама, укључујући и механизме редокс зависне модулације процеса апоптозе и иРНК експресију протеина чији протеински производи учествују у метаболизму антитуморских супстанци.

На основу изнетог, изведени су **специфични циљеви** истраживања:

- Добијање биљних екстраката из биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum*, *G. punctata*, *L. vulgare* и *C. erythrea* уз коришћење органских растварача различите поларности (метанол, етилацетат и ацетон).
- Одређивање квантитативног и квалитативног састава фенолних једињења и флавоноида, као потенцијалнио активних компоненти.

- *In vitro* испитивања биолошких ефеката и молекуларних механизма деловања екстраката биљака и новосинтетисаног Pd(II) комплекса (Паладијум(II) комплекс са лигандом 3-[(2-хидроксипензилиден) амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он) у појединачним и комбинованим третманима, као и њиховог синергистичког ефекта на изабраним модел системима [хумане ћелије карцинома колона (HCT-116 и SW480 ћелијске линије) и здраве ћелије (фибробласти коже)].
 - Испитивање цитотоксичних ефеката на HCT-116, SW480 ћелијским линијама и фибробластима коже;
 - Испитивање типа ћелијске смрти и молекуларних механизма апоптозе, активације унутрашњег и спољашњег апоптотског пута (праћењем активности каспаза укључених у процес апоптозе - каспазе 8 и 9, као и протеинске експресије Fas рецептора на мембрани ћелија) у појединачним и комбинованим третманима;
 - Испитивање ефеката третмана на редокс статус ћелија, праћењем одређених параметара оксидационо-антиоксидационог система, као и њихове корелације са цитотоксичним и проапоптотским ефектима. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$); концентрације нитрита (NO_2^-), протеинске експресије iNOS; концентрације неензимске компоненте антиоксидационог заштитног система - редуковани глутатион (GSH);
 - Испитивање ефеката третмана на иРНК експресију *CYP1A1*, *GSTP1* и *MRP2* гена, чији су протеински производи укључени у метаболизам ксенобиотика и лекова и појаву резистенције малигних ћелија на терапију антитуморским супстанцама.



III МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ ИСТРАЖИВАЊА

Експериментални део истраживања реализован је у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију, Институт за биологију и екологију, Природно-математички факултет у Крагујевцу, Универзитет у Крагујевцу. У оквиру исте институције, ботанички део експерименталног истраживања реализован је у Лабораторији за физиологију биљака. Истраживања су реализована у оквиру научно-истраживачког пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС, ИИИ 41010), и међународног ФП7 пројекта (*Centre for preclinical testing of active substances* - СРСТАС, GA206809).

Хемикалије и реагенси

Коришћене хемикалије и реагенси набављени су од различитих произвођача. Метанол, етилацетат, ацетон, натријум нитрит (NaNO_3) и натријум хидроген карбонат (NaHCO_3) су набављени од “Зорка фарма“ Шабац, Србија. Гална киселина, хидрогенска киселина, рутин хидрат, 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB), сулфаниламид, сулфанилна киселина и трипан плаво од Sigma Chemicals CO., St Louis, MO, USA. Акридин оранж од Acros organics, New Jersey, USA. Медијум за гајење ћелија (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, DMEM), физиолошки раствор са фосфатним пуфером (*Phosphate Buffer Saline* - PBS) од GIPCO, Invitrogen, USA. Фетални говеђи серум (*Fetal Bovine Serum*, FBS), 0.25% трипсин-EDTA, пеницилин и стрептомицин од PAA, The cell culture company, Аустрија. Диметил-сулфоксид (DMSO), етидијум бромид, 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид (MTT), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) и говеђи албумин из серума (*Bovine Serum Albumine*, BSA), хлороформ, етанол и изопропанол PCR чистоће од SERVA, Немачка. Поливинил алкохол медијум, *Folin-Ciocalteu* реагенс, 3-терц-бутил-4-хидроксианизол (ВНА), алуминијум хлорид (AlCl_3), N-1-нафтлетилендиамин дихидрохлорид од Fluka Analytical, Швајцарска. Параформалдехид од Merck, Немачка. Каспаза 8 и 9 колориметријски китови, примарна антитета за iNOS и Fas од RD Systems, USA. Секундарно антителио коњуговано са Cy3 и Alexa 448, DAPI (*Diamidino-2-phenylindole*) боја

за детекцију једара од Thermo Scientific, USA. Китови за превођење РНК у комплементарну ДНК (*Quanti Tect Rev. Transcription Kit*) и *PCR Kit (Sensiscript RT Kit)* од Qiagen, Немачка. Вода PCR чистоће и TRIzol од Ambion, USA.

1. Узорковање, обрада и анализе биљног материјала

Биљни материјал је узоркован на различитим локалитетима (Табела 1), идентификован и искоришћен за припрему екстракта биљака, а након тога су одрађене *in vitro* анализе.

1.1. Узорковање и припрема биљног материјала

Испитиване врсте биљака (*Teucrium chamaedrys*, *Allium flavum*, *Gentiana punctata*, *Ligustrum vulgare* и *Centaureum erythrea*) узорковане су током периода цветања, почев од јуна до септембра месеца, у фази када је две трећине цветова било отворено. Узорковање је вршено по сувом и сунчаном времену. Озлеђене и оболеле јединке, као и јединке на којима је евидентно присуство паразитских гљива и инсеката, нису узорковане за анализу. Одговарајући примерци (*T. chamaedrys* и *A. flavum*) узорковани су одсецањем целог надземног дела биљке у доњем делу стабла, при самој површини подлоге. Од биљке *L. vulgare* сакупљани су листови и плодови, а од биљке *G. punctata* корен. Сакупљен биљни материјал је спакован у папирне кесе, обележен и транспортован до Лабораторије за физиологију биљака. Биљни материјал врсте *C. erythrea* набављен је из комерцијалних извора.

Табела 1. Локалитети са којих су узорковане испитиване биљне врсте и карактеристике станишта за узорковане биљне врсте.

Биљна врста	Локалитет	Биљни део	Карактеристике станишта
<i>Teucrium chamaedrys</i>	Дајићко брдо, планина Голија	Цела биљка	Термофилни камењар
<i>Allium flavum</i>	Жичка река, планина Столови	Цела биљка	Термофилни серпентински камењар
<i>Gentiana punctata</i>	Копрен, Стара планина	Корен	Планински пашњак
<i>Ligustrum vulgare</i>	Шумарице, Крагујевац	Лист	Обод храстове шуме
<i>Ligustrum vulgare</i>	Шумарице, Крагујевац	Плод	Обод храстове шуме
<i>Centaureum erythrea</i>	Биљни материјал набављен из комерцијалних извора		

1.1.1. Идентификација биљног материјала

Идентификација узоркованог биљног материјала извршена је на основу стандардне ботаничке литературе (Tutin и Wood, 1972; Diklić, 1974). Хербаријумски примерци узоркованих врста биљака су депоновани у Хербаријум Института за ботанику и Ботаничке баште "Јевремовац", Биолошки факултет, Универзитет у Београду. Ваучер хербаријумски примерци

депоновани су под следећим колекцијским бројевима: *Teucrium chamaedrys* - 16695, *Allium flavum* - 16698, *Ligustrum vulgare* - 16696, *Gentiana punctata* - 16699.

Узорковани биљни материјал је у лабораторијским условима припремљен за процес сушења. Биљни материјал је осушен у танком слоју на промајном и тамном месту, где се температура кретала од 18 до 22 °C, а влажност ваздуха од 55 до 65%. Процес сушења је редовно контролисан, при чему су уклањани оштећени примерци и они који су променили боју. После процеса сушења, суви биљни материјал је уситњен и спакован у тамне стаклене посуде до процеса екстракције.

1.1.2. Поступак припреме биљних екстраката

Растварачи коришћени за екстракцију су метанол, етилацетат и ацетон. Од припремљеног биљног материјала одмерено је 10 g узорка који је екстрахован са 100 ml растварача помоћу Soxhlet апаратуре (Soxhlet extraction apparatus НЕМС – 77-515). После 24 сата екстракт је профильтриран помоћу Whatman No. 1 филтер папира, а процес мацерације поновљен са још 100 ml растварача. После 48 сати поступак филтрирања је поновљен, а екстракт сједињен са екстрактом добијеним при предходној филтрацији. Тако добијен екстракт упараван је на ротационом вакуум упаривачу (ИКА Rotary Evaporator - WU-28710-00), при температури од +40 °C до сувог стања. Добијени екстракти су чувани у стакленим бочицама, на тамном месту у фрижидеру, на температури од +4 °C до употребе.

1.2. Анализе биљног материјала *in vitro*

1.2.1. Одређивање укупне количине фенолних једињења

Садржај укупних фенолних једињења у екстрактима одређиван је спектрофотометријском методом, коришћењем Folin-Ciocalteu реагенса (Singleton и сар., 1990). Метода се заснива на одређивању редукујућег капацитета фенолних једињења из раствореног екстракта. Дисосовањем фенолних једињења настаје протон и феноксидни анјон који редукује Folin-Ciocalteu реагенс до јона који даје плаво обојење.

За анализу је коришћен метанолни раствор екстракта, концентрације 1 mg/ml. Узорак је припремљен мешањем 0.5 ml метанолног раствора екстракта (0.5 ml метанола у контролном узорку), 2.5 ml 10% Folin-Ciocalteu реагенса раствореног у води и 2.5 ml раствора NaHCO₃ концентрације 7.5%. Узорци су инкубирани 15 минута у термостату, на температури од 45 °C.

Апсорбанца је очитавана на спектрофотометру (ISKRA, MA 9523-SPEKOL 211), на таласној дужини од 765 nm. За сваку анализу припремана су три узорка и добијена је средња вредност апсорбанце. Исти поступак је поновљен за стандардни раствор галне киселине и конструисана је калибрациона крива. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве очитана је количина фенолних једињења у екстрактима изражена као еквивалент галне киселине (mg/ml GA/g екстракта).

1.2.2. Одређивање количине флавоноида

Количина флавоноида у испитиваним екстрактима одређивана је спектрофотометријском методом, коришћењем $AlCl_3$ (Quettier и сар., 2000). Метода се заснива на реакцији флавоноида и метала где као резултат реакције настају металокомплекси. У коришћеној методи, флавоноиди из раствора екстракта реагују са јонима алуминијума по додавању $AlCl_3$.

За анализу је коришћен метанолни раствор екстракта концентрације 1 mg/ml. Узорак је припремљен мешањем 0.5 ml метанолног раствора екстракта и 1 ml 2% раствора $AlCl_3$ раствореног у метанолу. Узорци су инкубирани 1 сат на температури од 22 °C. Апсорбанца је очитавана на спектрофотометру (ISKRA, MA 9523-SPEKOL 211), на таласној дужини од 415 nm. За сваку анализу припремљена су три узорка и добијена је средња вредност апсорбанце. Поступак је поновљен за стандардни раствор рутина и конструисана стандардна калибрациона крива. На основу измерених апсорбанци, са калибрационе криве очитана је количина флавоноида у екстрактима изражена као еквивалент рутина (mg Ru/g екстракта).

2. Ћелијско молекуларне анализе

2.1. Ћелијске линије као модел систем

Гајење ћелија у култури подразумева поступак гајења ћелија у контролисаним условима, најсличнијим условима средине из које су ћелије изоловане. Ћелије за свој раст и размножавање захтевају одговарајућу температуру, влажност ваздуха, рН, концентрацију CO_2 .

Рад са ћелијским линијама захтева стерилне услове у циљу спречавања настанка контаминација. Стерилан рад подразумева рад у ламинарној комори са вертикалним струјањем ваздуха и филтерима који пречишћавају ваздух, коришћење стерилног лабораторијског посуђа и прибора за рад, стреилисање радних површина UV лампом.

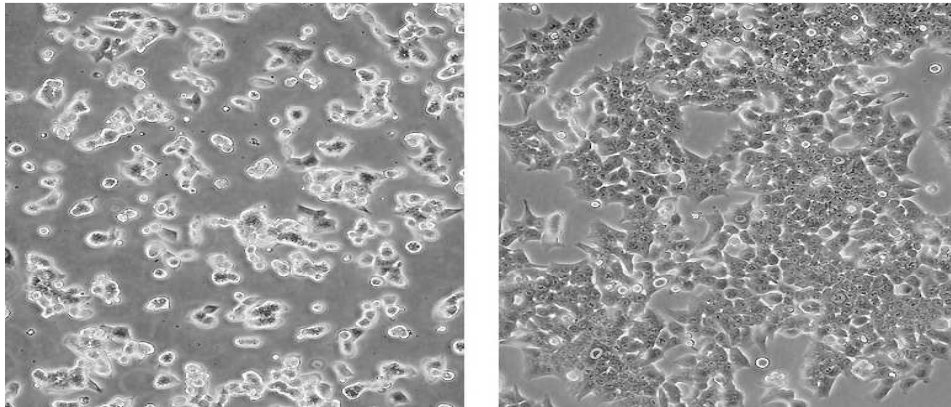
Ћелије су гајене у стерилним флашковима (Т-25 и Т-75 cm^2) у хранљивом DMEM медијуму, обогаћеном са 10% FBS-а, 100 IU/ml пеницилина и 100 $\mu g/ml$ стрептомицина. Услови у

инкубатору су прецизно дефинисани и подразумевају температуру од 37 °С, влажну атмосферу и концентрацију CO₂ од 5%.

2.1.1. Коришћене ћелијске линије

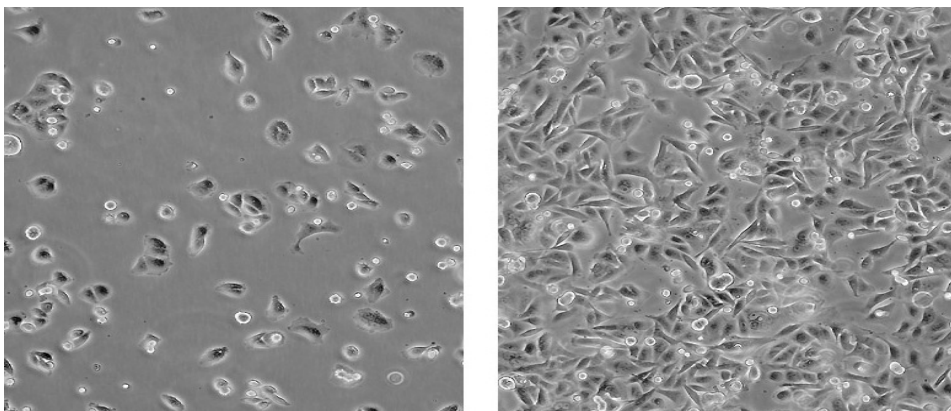
За истраживања су коришћене две имортализоване ћелијске линије карцинома колона, НСТ-116 и SW480 ћелијске линије, као и примарна ћелијска линија здравих фибробласта коже.

НСТ-116 је имортализована, адхерентна ћелијска линија, колоректалног карцинома. Ове ћелије имају епителну морфологију, експримиране гене за трансформишући фактор раста β1 и β2 и мутацију у кодону 13 за *ras* протоонкоген;



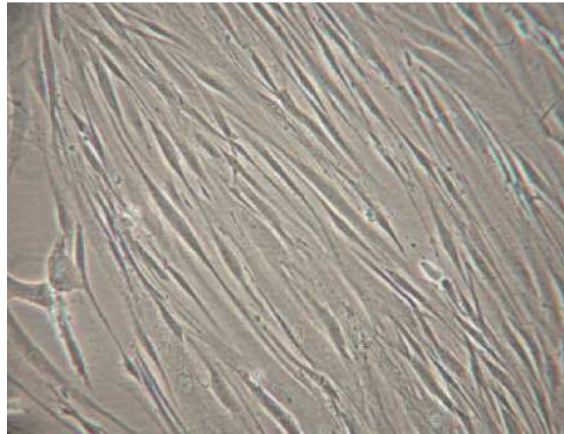
Слика 12. Морфолошки изглед НСТ-116 ћелија на инвертном микроскопу (*American Type Culture Collection - ATCC*; <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

SW480 је имортализована, адхерентна ћелијска линија, колоректалног аденокарцинома. Има експрирани ген за епидермални фактор раста и мутацију у кодону 12 за *ras* протоонкоген;



Слика 13. Морфолошки изглед SW480 ћелија на инвертном микроскопу (*American Type Culture Collection - ATCC*; <http://www.lgcstandards-atcc.org>)

Као здрава ћелијска линија коришћени су фибробласти коже, добијени примарном култивацијом (Milosavljević и Ljujić, 2010). Примарна култура фибробласта успостављена је коришћењем узорка здраве коже препуцијума донатора. Фибробласти су култивисани у DMEM медијуму, на 37 °C, са 5% CO₂.



Слика 14. Морфолошки изглед фибробласта коже на инвертном микроскопу.

Ћелијске линије колоректалног карцинома су добијене љубазнишћу др Данијеле Вигњевић из Института Кири, Париз, (набављене из "банке ћелија" *American Type Culture Collection*, ATCC), док су фибробласти коже култивисани и добијени из лабораторије професора др Зорана Милосављевића, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу.

2.1.2. Одлеђивање ћелија

Криотубе са залеђеним ћелијама чувају се у контејнеру са течним азотом (Spectrum series 20), на -196 °C. За потребе експеримента одлеђена је суспензија ћелија из криотубе и ресуспендована у 5 ml медијума. Суспензија ћелија је центрифугирана 10 минута на 1200 rpm. Медијум је аспириран, а талог ћелија је ресуспендован у 5 ml медијума и ћелије су засејане у флак Т-25 cm². Наредног дана је замењен медијум (Mazur, 1970).

2.1.3. Трипсинизација

НСТ-116, SW480 ћелије и фибробласти су адхерентне ћелијске линије, које расту формирајући везе са дном посуде у којој се гаје. Због тога је приликом пасажирања, засејавања и било какве манипулације ћелијама неопходно раскинути ове везе, како би ћелије достигле одговарајући број за потребе експеримента. Процес трипсинизације подразумева: одстрањивање медијума из флашка, испирање ћелија са 1 ml 0.25% трипсина, додавање 1 ml 0.25% трипсина на

фласк Т-25 cm² или 3 ml 0.25% трипсина на фласк Т-75 cm². Потребно је сачекати неколико минута да се ћелије одлепе и груписане фино диспергују. Процес трипсинизације се прекида додатком медијума за гајење, чиме се постиже разређивање ћелија и неутрализација трипсина.

2.1.4. Пасажирање ћелија

Након засејавања, ћелије се лепе за површину суда у коме се гаје, почињу да расту и деле се. Својим растом и увећавањем броја испуњавају слободну површину и црпе хранљиве материје из медијума. Када испуне површину суда у коме расту и достигну велики број, контакт између ћелија успорава њихов раст такозваном контактном инхибицијом и долази до умирања и накупљања мртвих ћелија. Да би се то избегло, пасажирање се врши када ћелије достигну конфлуентност од 80-90%. Пасажирање представља пребацивање мањег броја ћелија у други фласк са новим хранљивим медијумом (Freshney, 1983). Најпре се одстрани медијум у којима су расле и ћелије се одлепе додатком трипсина (1 ml трипсина на фласк Т-25 cm² или 3 ml 0.25% трипсина на фласк Т-75 cm²). Након трипсинизације, ћелије се ресуспендују у 5 ml медијума и пребаце у нови фласк Т-25 cm² са додатком новог хранљивог медијума до 12 ml у фласк Т-75 cm². На тај начин ћелије се гаје дуже време у лабораторијским условима.

2.1.5. Одређивање броја и вијабилности ћелија

У експериментима су коришћене само живе (вијабилне) ћелије. Број ћелија је одређиван тестом са трипан плавим. Трипан плаво је боја која улази у цитоплазму ћелија са оштећеном мембраном и отуда се мртве виде под микроскопом као плаво обојене, док живе ћелије остају необојене. Ћелијска суспензија је мешана са бојом у односу 1:1 (по 10 μl) и наливана на коморицу за бројање ћелија (хемцитометар). Ћелије су бројане у 2 велика дијагонална квадрата, површине 0.0003 mm², на хемцитометру под светлосним инвертним микроскопом. Средње вредности броја из два квадрата коришћене су у прерачуна за одређивање броја ћелија у милилитру суспензије, узимајући у обзир разблажење и димензије коморе.

Број ћелија по милилитру = средња вредност броја ћелија из оба квадрата x разблажење x 10⁻⁴ (корекциони фактор - дубина коморе и запремина у 1 ml)

Након одређивања броја расположивих ћелија у 1 ml прерачунаван је њихов број потребан за експериментални рад.

Вијабилност ћелија је израчуната према следећој формули:

Број живих ћелија/укупан број ћелија (живе и неживе) x 100 = % живих ћелија.

Вијабилност ћелија коришћених у експериментима била је већа од 90%.

2.2. Методе испитивања биолошких ефеката

2.2.1. Третмани

У појединачним третманима ћелија кошишћени су метанолни, етилацетатни и ацетонски екстракти биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum*, *L. vulgare*, *G. punctata* и *C. erythrea*, као супстанце природног порекла и новосинтетисани Pd(II) комплекс и лиганд тиохидантоинског типа, коришћен у његовој синтези. У комбинованим третманима коришћени су екстракти биљака *A. flavum* и *G. punctata* у комбинацији са ниским дозама Pd(II) комплекса (0.1 и 10 μM концентрације).

2.2.1.1. Прављење раствора биљних екстраката

Биљни екстракти су првобитно растварани у малој запремини концентрованог DMSO-а, а након тога разблаживани са медијумом за гајење ћелија у одговарајућој запремини, тако да раствор (шток) буде концентрације 1 mg/ml. Концентрација DMSO-а у највишој коришћеној концентрацији је 0.5%, јер се према нашим истраживањима DMSO у концентрацијама вишим од 1% показао као токсичан за коришћене ћелијске линије. Тако добијен шток је сајцован, односно провлачен кроз стерилан филтер, са порама од 0.2 μm . Стерилан раствор је разблаживан стерилним хранљивим медијумом за гајење ћелија до одговарајућих концентрација коришћених у различитим експерименталним методама.

2.2.1.2. Прављење раствора паладијума

Pd(II) комплекс са лигандом 3-[(2-хидроксибензилидин)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он (3) и одговарајући лиганд коришћен за синтезу добијени су у кристалном стању од др Биљане Шмит, Природно-математички факултет у Крагујевцу, а њихова синтеза је дата у Прилогу 1. Раствори Pd(II) комплекса различитих концентрација прављени су идентично растворима екстраката биљака, где је почетни шток био концентрације 1 mM.

2.2.1.3. Појединачни третмани

За одређивање цитотоксичности (МТТ тест), НСТ-116, SW480 ћелије и здрави фибробласти коже су засејани у микротитар плоче са 96 отвора (1×10^5 ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације у инкубатору, ћелије су третиране са 100 μl метанолног, етилацетатног и ацетонског екстракта биљака (концентрација 1, 10, 50, 100, 250 и 500 $\mu\text{g/ml}$) и раствором Pd(II)

комплекса и одговарајућег лиганда (концентрација 0.1, 1, 10, 50, 100 и 500 μM). Нетретираним (контролним) ћелијама је замењен свеж медијум.

За одређивање типа ћелијске смрти (АО/ЕБ микроскопска метода), НСТ-116 и SW480 ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 отвора (1×10^5 ћелија по бунарићу). Након 24 сата инкубације у инкубатору, ћелије су третиране са 100 μl екстракта биљака (концентрација 50 и 250 $\mu\text{g/ml}$) и раствором Pd(II) комплекса (концентрација 0.1, 10, 50 и 250 μM). Контролним ћелијама је замењен свеж медијум.

За одређивање протеинске експресије Fas рецептора на мембрани и iNOS имунофлуоресценцом, НСТ-116 и SW480 ћелије су засејане на покровно стакло у микротитар плочи са 6 отвора (5×10^4 ћелија по бунару). Након постизања 80% конфлуентности, ћелије су третиране са 2 ml одговарајућег раствора, а контролним ћелијама је замењен медијум. Ћелије су третиране са по 2 ml метанолног екстракта биљака, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$, а Pd(II) комплексом у концентрацијама 0.1 и 10 μM .

За одређивање активности каспаза 8 и 9, НСТ-116 и SW480 ћелије су засејане у микротитар плоче са 6 отвора (1×10^6 ћелија по бунару) и третиране са 2 ml метанолног екстракта биљака, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$, а Pd(II) комплексом у концентрацијама 0.1 и 10 μM .

За одређивање концентрација параметара редокс статуса, НСТ-116 и SW480 ћелије су засејане у микротитар плоче са 96 отвора (1×10^5 ћелија по бунарићу за NBT (концентрација $\text{O}_2^{\cdot-}$) Griess (концентрација нитрита) тест и 5×10^5 ћелија по бунарићу за одређивање концентрације GSH). Ћелије су третиране исто као код МТТ теста, али су коришћене 4 концентрације биљних екстраката (10, 50, 100 и 250 $\mu\text{g/ml}$) и 4 концентрације Pd(II) комплекса (0.1, 10, 50 и 250 μM).

За PCR методу, НСТ-116 и SW480 ћелије су засејане у флашкове T-25 cm^2 (10×10^5 ћелија по фласку) и инкубиране у инкубатору док нису достигле конфлуентност преко 90%. Када су достигле одговарајућу конфлуентност ћелије су третиране са 5 ml метанолног екстракта биљака, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$, а Pd(II) комплексом у концентрацијама 0.1 и 10 μM . Контролним ћелијама је замењен свеж медијум.

2.2.1.4. Комбиновани третмани

За испитивање потенцијалних синергистичких цитотоксичних ефеката између изабраних врста биљака и Pd(II) комплекса НСТ-116, SW480 ћелије и здрави фибробласти коже су третираны са 50 μl метанолног, етилацетатног и ацетонског екстракта биљака одговарајућих концентрација (2, 20, 100, 200 и 500 $\mu\text{g/ml}$) и 50 μl одговарајућих концентрација Pd(II) комплекса (0.2 и 20 μM)

истовремено. Финалне концентрације биљних екстраката у комбинованим третманима су 1, 10, 50, 100 и 250 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

За одређивање типа ћелијске смрти, НСТ-116 и SW480 ћелије су третиране са 50 μl метанолног, етилацетатног и ацетонског екстракта биљака, концентрације 100 $\mu\text{g/ml}$ и 50 μl Pd(II) комплекса одговарајућих концентрација (0.2 и 20 μM) истовремено. Финална концентрација биљних екстраката у комбинованим третманима је 50 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

За одређивање протеинске експресије Fas рецептора на мембрани и iNOS имунофлуоресценцом, НСТ-116 и SW480 ћелије су третиране са 1 ml метанолног екстракта биљака, концентрације 100 $\mu\text{g/ml}$ и 1 ml Pd(II) комплекса, концентрација 0.2 и 20 μM истовремено, тако да је у комбинованим третманима финална концентрација екстраката биљака 50 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

За одређивање активности каспаза 8 и 9, НСТ-116 и SW480 ћелије су третиране са 1 ml метанолног биљног екстракта, концентрације 100 $\mu\text{g/ml}$ и 1 ml Pd(II) комплекса, концентрација 0.2 и 20 μM истовремено, тако да у комбинованим третманима финална концентрација екстракта биљака буде 50 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

За одређивање концентрација O_2^- , нитрита и GSH, НСТ-116 и SW480 ћелије су третиране са 50 μl метанолног, етилацетатног и ацетонског биљног екстракта одговарајућих концентрација (20, 100, 200 и 500 $\mu\text{g/ml}$) и 50 μl одговарајуће концентрације Pd(II) комплекса (0.2 и 20 μM) истовремено. Финалне концентрације биљних екстраката у комбинованим третманима су 10, 50, 100 и 250 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

За PCR методу, НСТ-116 и SW480 ћелије су третиране са 2.5 ml метанолног биљног екстракта, концентрације 100 $\mu\text{g/ml}$ и 2.5 ml Pd(II) комплекса, концентрација 0.2 и 20 μM истовремено, тако да је у комбинованим третманима финална концентрација биљног екстракта 50 $\mu\text{g/ml}$, односно 0.1 и 10 μM за Pd(II) комплекс.

2.2.2. Испитивање цитотоксичности и механизма апоптозе

2.2.2.1. МТТ тест цитотоксичности

За одређивање цитотоксичности коришћена је колориметријска метода, МТТ тест (Mosmann, 1983). 3-[4,5-диметилазол-2]-2,5-дифенилтетразолијум бромид је жуто обојена тетразолијумова со, која се у живим ћелијама под дејством митохондријаних редуктаза редукује у љубичасто обојен формазан. Интензитет боје може се квантификовати мерењем на

спектрофотометру на одређеној таласној дужини. По завршетку третмана у контролне и третиране ћелије је додаван раствор МТТ-а (5 mg/ml) у запремини од 25 μ l. Након инкубације од 2 сата на 37 °C, раствор МТТ је аспириран и формазан је растваран у 150 μ l DMSO-а. Апсорбанце су мерене на 550 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C). Бунарићи у којима је био само медијум без ћелија, касније аспириран и додат DMSO, служили су као слепа проба ("blank"). Добијене вредности апсорбанци су пропорционалне интензитету ћелијске респирације, односно броју живих ћелија. Процент живих ћелија је израчунаван као однос апсорбанци третираних ћелија и апсорбанце контролних ћелија, помножен са 100.

2.2.2.2. Акридин оранж/етијидијум бромид микроскопска метода

За одређивање типа ћелијске смрти коришћена је акридин оранж/етијидијум бромид (АО/ЕБ) микроскопска метода (Baskić и сар., 2006). Акридин оранж је боја која улази у живе и мртве ћелије емитујући зелену флуоресценцу када се веже за двоструке ланце нуклеинских киселина (ДНК) или црвену флуоресценцу ако се веже за једноланчану нуклеинску киселину (РНК). Етијидијум бромид улази само у мртве ћелије и емитује црвену флуоресценцу везивањем за ДНК. Разликују се четири типа ћелија у зависности од флуоресцентне боје и морфолошког аспекта (кондензације хроматина у обојеним нуклеусима). (1) Живе ћелије су једнолично зелено обојене. (2) Ћелије у раној апоптози (још увек имају неразграђену нуклеусну мембрану, али је започето цепање ДНК) имају зелене нуклеусе, али долази до кондензације и фрагментације хроматина, па се на микроскопу уочавају зелени фрагменти. (3) Ћелије у касној апоптози имају наранџасто или црвено једро са кондензованим или фрагментисаним хроматином. (4) Некротске ћелије су кондензоване и униформно црвене боје. Након истека времена инкубације ћелија са третманима у бунариће са третираним и контролним ћелијама додавана је мешавина раствора (10 μ l АО и 10 μ l ЕБ у дестилованој води). АО и ЕБ су растварани у дестилованој води, 100 μ g у 1 ml дестиловане воде. Одмах након додавања АО/ЕБ ћелије су посматране и бројане под флуоресцентним микроскопом (Ti-Eclipse, Nikon), на увећању 400x. Бројано је најмање 300 ћелија по бунарићу. Као резултат се добија проценат живих ћелија, ћелија у раној и касној апоптози, као и проценат некротских ћелија.

2.2.2.3. Одређивање протеинске експресије Fas рецептора на мембрани

Имунофлуоресценца је техника која се користи за маркирање појединих ћелијских делова флуоресцентним бојама. Техника се заснива на принципу антиген-антитело. Специфичност реакције антиген антитело омогућава да се овом методом тачно и прецизно прати како присуство и

локализација, тако и дистрибуција одређеног протеина у ћелији или ткиву. Антитело као индикаторни молекул обележено је флуоресцентном бојом са различитим таласним дужинама екситације и емисије, а детекција се врши флуоресцентним микроскопом. Након истека времена инкубације ћелија са третманима (24 сата), ћелије су испране PBS-ом. Затим су фиксиране 4% параформалдехидом, раствореним у PBS-у, 20 минута на собној температури. Након фиксације, ћелије су три пута испране PBS-ом и пермеабелизоване 2 минута хладним метанолом (-20 °C). Након пермеабелизације ћелије су испране три пута PBS-ом и блокиране 20 минута са 1% BSA. Овако фиксиране ћелије су инкубирани сат времена са специфичним примарним антителом. Парче парафилма је стављено у петри кутију, дезинфиковано 75% алкохолем, на њега је нанета кап од 60 µl раствора примарног антитела (анти-Fas (RD Systems) у PBS-у, концентрације 20 µg/ml. На кап је постављена покривна плочица тако да страна на којој су ћелије буде окренута ка парафилму. Након инкубације са примарним антителом, покривне плочице су враћене у бунариће, испране три пута по 15 минута PBS-ом и иста процедура је поновљена за инкубацију са секундарним антителом конјугованим са Cy3 (Thermo Scientific). Секундарно антитело разблажено је у PBS-у у односу 1:200. За визуелизацију плаво обојених једара коришћена је DAPI боја, у разблажењу 1:1000. Након инкубације са секундарним антителом покривне плочице су враћене у бунариће, испране три пута по 15 минута PBS-ом и залепљене на предметно стакло уз помоћ поливинил алкохол медијума. Препарати су остављани преко ноћи да се осуше и након тога посматрани на флуоресцентном микроскопу (Ti-Eclipse), на филтерима одређених таласних дужина и увеличању 600x (Higuchi и сар., 2001).

2.2.2.4. Одређивање активности каспаза 8 и 9

Активности каспаза 8 и 9 у третираним и контролним ћелијама мерене су колориметријским китом (RD Systems), према приложеном протоколу. Након истека времена инкубације ћелија са третманима (24 сата) ћелије су центрифугиране 10 минута на 250 rpm, супернатант је одбачен, а талог је ресуспендован у 50 µl пуфера за лизирање ћелија. Ћелијски лизат је инкубиран 10 минута на леду и центрифугиран 1 минут на 10 000 rpm. Супернатанти, у запремини од 50 µl, су пребачени у микротитар плочу са 96 отвора, дотато је 50 µl реакционог реагенса (садржи 10 mM DTT (дитиотреитол)) и 5 µl IETD-pNA (*Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-p-nitroaniline*) супстрата за каспазу 8 и LEHD-pNA (*Ac-Leu-Glu-His-Asp-p-Nitroaniline*) супстрата за каспазу 9. Микротитар плоча је инкубирана 2 сата на 37 °C. Апсорбанце су мерене на 405 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C). Ниво ензимске активности директно је пропорционалан интензитету боје.

2.2.3. Испитивање параметара редокс статуса

2.2.3.1. Одређивање концентрације супероксид анјон радикала (NBT есеј)

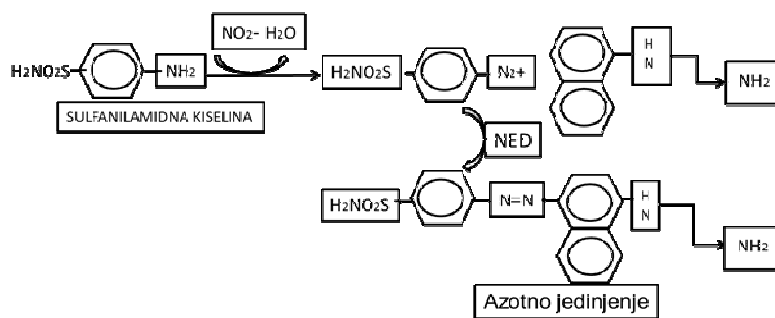
Концентрација супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot -}$) је одређивана спектрофотометријски, NBT тестом (Auclair и Voisin, 1985). Метода се заснива на редукцији нитроблу-тетразолијума (NBT) до нитроблу-формазана у присуству $O_2^{\cdot -}$. NBT тест се користи као мера стварања $O_2^{\cdot -}$ у хемијским и биолошким системима. Оксидована форма NBT је жута, а редукован формазан је плав до сиво-црн. У контролне и третиране ћелије је, по завршетку инкубације ћелија са третманима, додаван раствор NBT-а (5 mg/ml) у запремини од 10 μ l. Након инкубације од 45 минута на 37 $^{\circ}$ C, додато је 10 μ l DMSO-а и бојена реакција је читавана на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 550 nm. Добијене вредности апсорбанци су коришћене у даљем прерачуну, да би се добила концентрација $O_2^{\cdot -}$ изражена у pmol/ml. Вредности апсорбанци третираних и контролних ћелија су дељене са моларним екстинкционим коефицијентом за моноформазан ($15,000 M^{-1} cm^{-1}$).

$$pmol\ NBT/ml = A/0.015 \times V_{cuv} / V_{ex}$$

A - апсорбанца; V_{cuv} - укупна запремина раствора у бунарићу = 120 μ l; V_{ex} - запремина ћелија са третманом = 100 μ l.

2.2.3.2. Одређивање концентрације нитрита по Griess-у

Овај тест се базира на диазотизационој реакцији, коју је првобитно описао Griess P (1879):



Сулфаниламидна киселина и N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид, реагују са нитритима (NO_2^-), дајући стабилно азотно једињење, пурпурне боје. Концентрација нитрита је директно пропорционална пурпурној боји чији се интензитет мери на ELISA читачу, на таласној дужини од 550 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је по завршетку инкубације ћелија са третманима центрифугирана 10 минута на 300 rpm, како би се одстраниле партикуле из супернатанта. У бунариће за стандардну криву, додата је серија разблажења $NaNO_2$

концентрација 100 μM , 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.13 μM и 1.56 μM . У бунариће је додато 50 μl супернатанта. Уз помоћ осмоканалне пипете, додато је 50 μl сулфаниламидног реагенса у све бунариће, као и у бунариће са нитритним стандардом за стандардну криву. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Након тога је додато по 50 μl N-1-нафтилетилендиамин дихидрохлорид реагенса у све бунариће, укључујући и бунариће са нитритним стандардом за референтну криву. Плоче су инкубиране 10 минута на собној температури, заштићене од светла. Пурпуна боја се одмах развија. Апсорбанце су мерене на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C), на 550 nm. Концентрација нитрита се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве за нитрите и изражава се у nmol/ml .

$$\text{nmol NO}_2^-/\text{ml} = A/F \times R$$

R – разблажење

2.2.3.3. Одређивање протеинске експресије индуцибилне азот моноксид синтетазе

Протеинска експресија iNOS одређивана је имунофлуоресценцом (принцип и поступак методе су објашњени претходно под тачком 2.2.2.3.), при чему је коришћено примарно анти-iNOS антитело (RD Systems) у концентрацији од 20 $\mu\text{g/ml}$ и секундарно антитело Alexa448 (Thermo Scientific), у односу 1:200. За визуелизацију плаво обојених једара коришћена је DAPI боја, у разблажењу 1:1000.

2.2.3.4. Одређивање концентрације редукованог глутатиона

Концентрација редукованог глутатиона (GSH) у ћелијама мерена је спектрофотометријском методом (Baker и сар., 1990). Метода се занима на оксидацији GSH помоћу сулфидног реагенса 5,5'-дитио-бис(2-нитробензоева киселина) (DTNB) при чему се формира жути продукт 5'-тио-2-нитробензоева киселина (TNB), чији се интензитет боје мери на ELISA читачу на 405 nm. Микротитар плоча са контролним и третираним ћелијама је, по завршетку времена инкубације ћелија са третманом, центрифугирана 10 минута на 1000 rpm . Медијум из свих бунарића је аспириран и додато је 100 μl 2.5 % сулфосалицилне киселине. Микротитар плоча је инкубирана 15 минута на леду и након тога центрифугирана 15 минута на 1000 rpm . На другу микротитар плочу је одпипетирано 50 μl супернатанта и додато 100 μl реакционе смеше, која је припремљена непосредно пре почетка рада. Реакциона смеша представља 1 mM DTNB, растворен у DMSO-у и допуњен фосфатним пуфером до потребне запремине. Микротитар плоча је инкубирана 5 минута на собној температури и након тога апсорбанце су

мерене на 405 nm на ELISA читачу за микротитар плоче (RT-21000C). Концентрација GSH се прерачунава преко одговарајуће стандардне криве конструисане на основу познатих концентрација GSH, а изражава се у nmol/ml.

2.2.4. Испитивање експресије информационе РНК CYP1A1, GSTP1 и MRP2 гена

2.2.4.1. Екстракција RNK из ћелија

Након истека третмана (24 сата) РНК је екстрахована из НСТ-116 и SW480 ћелија методом по Chomczynski и Sacchi, 1987. Медијум са третманом је извучен из фласкова и сачуван, а ћелије су подигнуте из фласка трипсином, додате сачуваном медијуму и центрифугиране 10 минута на 1200 rpm. Талог са ћелијама је пребачен на лед, ресуспендован у 1 ml TRIzol-а у коме је хомогенизован пипетом и остављен у TRIzol-у на собној температури 5 минута. Након тога узорци су центрифугирани 5 минута на 12000 rpm, на 2-8 °C. Супернатант је пребачен у нове микротубе, додато је 200 µl хлороформа, након енергичног мешања 15 секунди остављен је на собној температури 2-3 минута и центрифугиран 15 минута на 12000 rpm, на 2-8 °C. Центрифугирањем се издвајају три видљиве фазе унутар микротубе. Водена фаза (налази се на врху) је пренета у нову микротубу, пазећи да се не помеша са осталим фазама. У издвојену водену фазу додато је 500 µl изопропанола и инкубирано на собној температури 10 минута. Након тога, узорци су центрифугирани 10 минута на 12000 rpm, на 2-8 °C, супернатант је уклоњен, талог РНК је испран са 1 ml 80% етанола и микротуба је центрифугирана 5 минута на 7500 rpm, на 2-8 °C. Супернатант је уклањан, преостали етанол осушен за 2-3 минута, РНК талог је ресуспендован у 20 µl PCR воде и инкубиран на 55 °C на термоблоку 2-3 минута. Концентрација сваког узорка је измерена на биофотометру (Eppendorf BioPhotometer plus).

2.2.4.2. Реверзна транскрипција (RT)

Једноланчана РНК се преписује у комплементарну ДНК (цДНК) по принципу комплементарности помоћу ензима реверзне транскриптазе (енгл. *Reverse Transcriptase*, RT) (Bustin, 2000). Коришћен је *QIAGEN Sensiscript RT Kit*. Микс (*Master Mix*) који се припрема садржи 2 µl 10x Buffer RT, 2 µl dNTP Mix-а (деоксирибонуклеотид трифосфати, појединачне концентрације 5 mM), 2 µl олиго-dT прајмера, 10 µl воде, 1 µl ензима *Sensiscript Reverse Transcriptase* и 2 µl изолованих узорка РНК. Узорци су постављени у Eppendorf PCR Mastercycler који је програмиран у складу са упутствима произвођача. Узорци комплементарне ДНК су чувани на -80 °C.

2.2.4.3. Ланчана реакција полимеразе (PCR)

Ланчана реакција полимеразе (енгл. *Polymerase Chain Reaction*, PCR) је техника која омогућава умножавање две или више секвенци ДНК паралелно у једној реакцији. Коришћена је за анализу експересије иРНК, при чему је комплементарна ДНК коришћена као полазни ДНК молекул (Zhai и сар. 2005), употребом *QIAGEN PCR Kit*-а. Након одмрзавања *PCR Master Mix*-а, компоненте су вортковане и направљена је реакциона смеша која садржи све компоненте потребне за PCR, осим цДНК. Реакциона смеша садржи 10 μ l 2x *QIAGEN PCR Master Mix*-а, 1.2 μ l микса прајмера (10x *Primer Mix*, тако да њихова финална концентрација буде 0.2 μ M) и 5.6 μ l воде без РНаза (PCR чистоте). Коришћени су прајмери за гене *CYP1A1*, *GSTP1*, *MRP2* и β -actin. Реакциона смеша је прављена за сваки ген појединачно. У епендорфицу са *PCR Master Mix*-ом додато је 2 μ l узорка цДНК, које су постављене у Eppendorf PCR Mastercycler, програмиран у складу са упутствима произвођача и програм је покренут. Сваки PCR програм мора почети са топлотним активационим кораком на 95 °C у трајању од 15 минута да би се активирала *HotStarTaq* ДНК полимеразе, након тога следе три корака амплификације: денатурација 30 секунди на 94 °C, везивање прајмера 90 секунди на 60 °C, екстензија прајмера 90 секунди на 72 °C. Завршна екстензија траје 10 минута на 72 °C. Добијени узорци за сваки ген појединачно електрофоретски су раздвојени на 1.5% агарозном гелу. Агароза је кувана у 100 ml ТАЕ пуфера (енгл. *Tris-acetate-EDTA*) у микроталасној пећници и након 2 минута хлађења додато је 5 μ l етидијум бромиде. Гелови су снимани на Транслуминатору (Vilber Lourmat Transilluminator 0725299) и фотографисани. Дебљина бендова добијених на геловима даље је мерена на фотографијама дензиометријски у ImageJ програму. Релативна експресија одређивана је поређењем са иРНК експресијом β -actin-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.

3. Статистичка обрада резултата

Сви појединачни експерименти рађени су у трипликату, а добијени резултати представљају средњу вредност три независна експеримента \pm стандардна грешка. Резултати су обрађени у SPSS (Chicago, IL) програму за статистичку обраду резултата (SPSS for Windows, ver. 17, 2008). Коришћена је ANOVA, при чему је $p < 0.05$ сматрана статистички значајном разликом.

IC₅₀ вредности (концентрација која убија 50% ћелија) прерачунате су из дозно зависних крива добијених у компјутерском програму *CalcuSyn*.

Потенцијални синергистички, адитивни и антагонистички ефекти биљних екстраката и Pd(II) комплекса добијени су поређењем ефеката (инхибиције ћелијског раста) добијених у

појединачним третманима са ефектима добијеним у комбинованим третманима. Вредности комбинационих индекса (CI), добијене у *CalcuSyn* сфтверском програму представљају квантитативне вредности које указују на синергизам, адитивни ефекти и антагонизам (Chou и Talalay, 1983). Вредности више од 1 указују на антагонистичке ефекте, вредности између 0.8-1 су адитивни ефекти, а вредности ниже од 0.8 означавају синергизам.

Ниво генске експресије у узорцима добијен PCR методом одређиван је дензиометријски, мерењем величине бендова узорака на фотографијама гелова, уз помоћ ImageJ програма (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).



IV РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

Након узорковања биљног материјала на различитим локалитетима, резултати истраживања обухватају прављење екстракта биљака коришћењем различитих растварача и одређивање концентрације фенолних једињења и флавоноида као потенцијално активних компоненти присутних у изабраним врстама биљака. Најбитнији аспект истраживања у оквиру докторске дисертације је испитивање цитотоксичности и механизма проапоптотских ефеката одабраних лековитих биљака у појединачним и комбинованим третманима са новосинтетисаним Pd(II) комплексом. У резултатима је приказана и редокс регулација ових механизма, као и ефекти на иРНК експресију гена чији су протеински производи укључени у метаболизам лекова и појаву резистенције малигнућ ћелија.

1. Концентрације фенолних једињења и флавоноида у екстрактима биљака

Узоркован и припремљен биљни материјал је подвргнут екстракцији коришћењем три растварача различите поларности: метанол (М у табелама), етилацетат (Е у табелама) и ацетон (А у табелама). Овакав избор растварача показао се као веома ефикасан приликом предходних истраживања (Stanković и сар., 2010; Stanković, 2012). Растварачи различите поларности су коришћени за добијање екстракта са више биоактивних компоненти и постизање најбоље биолошке активности. У Табели 2 приказане су вредности укупне количине фенолних једињења и флавоноида у екстрактима коришћених биљака.

Добијене вредности концентрација фенолних једињења и флавоноида у екстрактима биљке *T. chamaedrys* показују да је метанол најефикаснији растварач за њихову екстракцију, затим ацетон, а најслабији је етилацетат. Фенолна једињења и флавоноиди у биљци *A. flavum* највише су присутни у ацетонском екстракту, а знатно мање у метанолном и етилацетатном екстракту. Код биљке *G. punctata* ацетон је најбољи растварач за екстракцију фенолних једињења, док је метанол бољи за екстракцију флавоноида из ове биљке. Феноли и флавоноиди су највише заступљени у ацетонским екстрактима листова и плодова биљке *L. vulgare*, затим у метанолним, а најслабије у етилацетатним. Концентрације флавоноида у екстрактима листова највише су заступљени у етилацетаном, а у екстрактима плодова у ацетонском екстракту. Добијене вредности

концентрација фенолних једињења у екстрактима биљке *C. erythrea* показују да је метанол најефикаснији растварач за њихову екстракцију, затим етилацетат, а најслабији је ацетон. Флавоноиди су највише заступљени у метанолном екстракту, затим у ацетонском и најмање у етилацетатном екстракту.

Табела 2. Укупна концентрација фенолних једињења изражена као еквивалент галне киселине (mg Ga/g екстракта) и концентрација флавоноида као еквивалент рутина (mg Ru/g екстракта).

Биљка	Екстракт	Концентрација фенолних једињења (mg GaE/g)	Концентрација флавоноида (mg RuE/g)
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	179.38 ± 1.06	81.84 ± 1.23
	Е	53.80 ± 0.48	65.44 ± 0.59
	А	142.12 ± 1.12	71.26 ± 0.86
<i>Allium flavum</i>	М	54.53 ± 0.12	64.07 ± 0.19
	Е	42.29 ± 0.23	64.13 ± 0.36
	А	80.92 ± 0.31	95.71 ± 0.09
<i>Gentiana punctata</i>	М	48.64 ± 0.55	21.49 ± 0.56
	Е	38.40 ± 0.45	13.09 ± 0.84
	А	67.34 ± 0.36	16.62 ± 0.15
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	М	239.47 ± 1.12	43.78 ± 0.89
	Е	147.71 ± 0.66	90.42 ± 1.21
	А	268.54 ± 1.18	55.51 ± 0.79
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	М	180.83 ± 1.01	23.68 ± 0.96
	Е	233.52 ± 1.32	23.37 ± 0.98
	А	255.83 ± 1.03	43.96 ± 0.94
<i>Centaurium erythrea</i>	М	62.99 ± 0.18	90.93 ± 0.88
	Е	38.43 ± 0.95	64.31 ± 0.11
	А	34.02 ± 0.51	75.70 ± 0.25

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Када се упореде добијене вредности концентрација фенолних једињења у испитиваним врстама биљака, највише концентрације фенолних једињења присутне су у листовима и плодовима биљке *L. vulgare*, затим у биљкама *T. chamaedrys*, *A. flavum*, док биљке *C. erythrea* и *G. punctata* садрже најмање концентрације фенолних једињења. *A. flavum* и *T. chamaedrys* су биљке најбогатије флавоноидима, затим по концентрацији флавоноида следе *C. erythrea*, листови и плодови биљке *L. vulgare* и на крају *G. punctata* са најнижом концентрацијом флавоноида.

Резултати квалитативног садржаја фенолних једињења присутних у метанолним екстрактима испитиваних врста биљака дати су у Прилогу 2.

2. Биолошки ефекти испитиваних супстанци и механизми деловања

У оквиру биолошких ефеката испитиваних врста биљака у појединачним и комбинованим третманима испитивана је цитотоксичност и механизми проапоптотског деловања; промене у одговарајућим параметрима редокс статуса и њихова веза са сигналним путевима апоптозе;

промене експресије иРНК гена чији су протеински продукти укључени у метаболизам цитотоксичних супстанци у малигним ћелијама и појаву резистенције ћелија на антитуморске лекове.

2.1. Цитотоксичност и механизми проапоптотског деловања испитиваних супстанци

У овом поглављу представљени су резултати цитотоксичности испитиваних третмана на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама карцинома колона и здравим фибробластима коже, тип ћелијске смрти који ови третмани изазивају, као и ефекти на поједине компоненте апоптотског сигналног пута.

2.1.1. Цитотоксичност екстраката биљака у појединачним и комбинованим третманима са Pd(II) комплексом

Цитотоксичност испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса у појединачним и комбинованим третманима одређивана је МТТ тестом. Цитотоксичност је изражена преко IC₅₀ вредности (µg/ml), концентрације која убија 50% ћелија. IC₅₀ вредности испитиваних врста биљака на **НСТ-116 ћелијској линији** дате су у Табели 3.

Резултати су показали да све тестиране биљке, осим *G. punctata*, изазивају дозно и временски зависне цитотоксичне ефекте, а интензитет ефеката зависи од врсте биљке и екстракта (Табела 3, Прилог 3), уз одређене специфичности које ће бити наглашене у даљем тексту. Према критеријумима Америчког Националног Института за канцер (*American National Cancer Institute, NCI*) добром цитотоксичношћу биљних екстраката сматрају се IC₅₀ вредности ниже од 30 µg/ml (Suffness и Pezzuto, 1990). У односу на овај критеријум, након 24 сата третмана најбољу цитотоксичност показују екстракти биљке *A. flavum*, затим екстракти биљке *T. chamaedrys* и екстракти листова биљке *L. vulgare*. Продужавањем третмана до 72 сата, интензитет цитотоксичности се повећава (временски зависан ефекат, Табела 3), при чему је евидентирана и значајна цитотоксичност биљке *C. erythrea* (етилацетатни екстракт), што указује на антипролиферативни ефекат тестираних биљака. Изузетак у односу на временску зависност показују метанолни екстракти испитиваних биљака (Табела 3, Прилог 3). Метанолни екстракти биљака су показали добру цитотоксичност већ након 24 сата третмана, а продужењем третмана цитотоксичност ниских доза екстраката се смањује (више IC₅₀ вредности, Табела 3), што сугерише да се НСТ-116 ћелије адаптирају на ове третмане и чак пролиферишу.

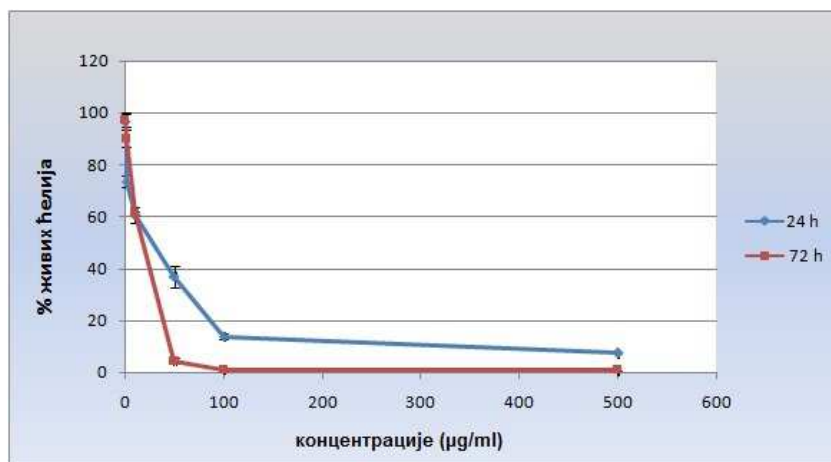
У односу на вид екстракције, резултати су показали да различите врсте екстраката показују разлике у цитотоксичности. Генерално, најбоље цитотоксичне ефекте показују метанолни екстракти већ након 24 сата третмана, што је претходно објашњено. Ацетонски екстракт се показао као најефикаснији у случају биљке *A. flavum*. Међу коришћеним растварачима, етилацетатни екстракти испитиваних врста биљака показују најслабију активност, осим у случају биљке *C. erythrea*.

Табела 3. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности (µg/ml) екстраката испитиваних биљака и Pd(II) комплекса у појединачним третманима на НСТ-116 ћелијској линији.

	Екстракт	24 h	72 h
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	25.36±0.98	30.77±1.39
	Е	292.01±5.12	96.63±3.64
	А	271.77±6.39	94.00±3.47
<i>Allium flavum</i>	М	28.29±0.99	35.09±1.87
	Е	84.76±1.21	35.00±1.39
	А	62.17±1.19	14.80±1.39
<i>Gentiana punctata</i>	М	>500	>500
	Е	>500	>500
	А	>500	>500
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	М	28.20±1.09	24.60±1.07
	Е	57.12±2.68	29.81±2.88
	А	133.52±3.64	54.05±2.09
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	М	47.40±2.46	108.00±2.94
	Е	154.96±5.79	104.50±3.48
	А	175±5.41	101.78±3.72
<i>Centaurium erythrea</i>	М	309±6.13	490.28±7.39
	Е	154.18±1.25	30.82±2.97
	А	624.32±4.78	94.50±2.56
Pd(II) комплекс		16.98±0.21	6.51±0.02
лиганд		336.75±2.20	>500

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Графикон 1. Цитотоксична активност Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији након 24 и 72 сата.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Pd(II) комплекс показује изузетно добру дозно и временски зависну цитотоксичност, са ниским IC₅₀ вредностима на НСТ-116 ћелијама (Табела 3, Графикон 1). Лиганд хидантоинског типа, коришћен у синтези Pd(II) комплекса, не показује цитотоксичну активност.

У циљу испитивања евентуалних синергистичких ефеката биљака са најбољом (*A. flavum*) и најслабијом цитотоксичном активношћу (*G. punctata*) и Pd(II) комплекса тестирани су њихови цитотоксични ефекти у комбинованим третманима. За комбиноване третмане коришћене су ниске концентрације Pd(II) комплекса, 0.1 и 10 µМ. У појединачним и комбинованим третманима коришћене су идентичне концентрације биљних екстраката и IC₅₀ вредности израчунаване у односу на ове концентрације, а резултати су приказани у Табели 4. У циљу испитивања потенцијалне синергистичке, адитивне или антагонистичке активности између екстраката биљака и Pd(II) комплекса поређени су ефекти сваке појединачне коришћене концентрације (инхибиција ћелијског раста), добијени у појединачним третманима са ефектима добијеним у комбинованим третманима, а вредности комбинационих индекса (Chou и Talalay, 1983) су дате у Прилогу 4. У појединачним третманима 0.1 µМ концентрација Pd(II) комплекса не изазива цитотоксичан ефекат, док 10 µМ концентрација убија 30-40% НСТ-116 ћелија након 24 и 72 сата. У комбинованим третманима екстракти биљака и Pd(II) комплекс показују синергистичке ефекте и смањују IC₅₀ вредности (Табела 4, Прилог 4).

Комбиновани третмани екстраката биљке *A. flavum* и 0.1 µМ концентрације Pd(II) комплекса снижавају IC₅₀ вредности у односу на појединачне третмане екстрактима биљке, а 10 µМ концентрација Pd(II) комплекса изазива још бољу цитотоксичност, са веома ниским IC₅₀ вредностима. Након дужег времена излагања комбинованим третманима екстраката биљке *A. flavum* и 0.1 µМ концентрације Pd(II) комплекса долази до временски зависне цитотоксичности, док у третману са 10 µМ концентрацијом Pd(II) комплекса долази до благог повећања IC₅₀ вредности, али не и пролиферације ћелија. Метанолни екстракт биљке *A. flavum* у комбинацији са Pd(II) комплексом изазива најбољу цитотоксичност и синергистичке ефекте у односу на остале екстракте.

Комбиновани третмани екстраката биљке *G. punctata* и 0.1 µМ концентрације Pd(II) комплекса делују синергистички и изазивају смањење вијабилности ћелија (Прилог 3), али су прерачунате IC₅₀ вредности више од 500 µg/ml. Комбиновани третмани са 10 µМ концентрацијом Pd(II) комплекса изазивају повећану цитотоксичност, са ниским IC₅₀ вредностима, чак 0.17 µg/ml за ацетонски екстракт након 24 сата, што уједно представља најбољу добијену цитотоксичност (Табела 4). Метанолни и етилацетатни екстракт у комбинацији са Pd(II) комплексом изазивају дозно и временски зависну цитотоксичност. Обзиром на високу цитотоксичност 10 µМ Pd(II)

комплекса прерачунате CI вредности показују углавном антагонистичке и адитивне, ређе синергистичке интеракције са метанолним и етилацетатним екстрактима биљке *G. punctata*, док ацетонски екстракт изазива углавном синергистичке цитотоксичне ефекте.

Табела 4. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности (µg/ml) екстраката испитиваних врста биљака у комбинованим третманима са Pd(II) комплексом на НСТ-116 ћелијској линији.

Биљка	Pd (µM)	Екстракт	24 h	72 h
<i>Allium flavum</i>	0.1	М	12.85±0.13	10.51±1.01
		Е	186.14±3.29	32.21±2.32
		А	17.07±0.49	16.84±0.89
	10	М	1.60±0.05	1.74±0.08
		Е	0.016±0.001	1.13±0.02
		А	2.49±0.12	3.74±0.02
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	М	>500	>500
		Е	>500	>500
		А	>500	>500
	10	М	61.95±2.65	35.85±1.53
		Е	>500	53.41±3.14
		А	0.17±0.05	29.54±2.58

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Испитиване врсте биљака, изузев екстракта биљке *G. punctata*, изазивају дозну и временски зависну цитотоксичност на **SW480 ћелијској линији** (Табела 5, Прилог 3).

Табела 5. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности (µg/ml) екстраката испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса у појединачним третманима на SW480 ћелијској линији.

	Екстракт	24 h	72 h
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	53.27±2.13	20.87±2.71
	Е	126.89±1.91	63.57±1.08
	А	163.44±2.69	36.13±0.93
<i>Allium flavum</i>	М	22.20±1.13	20.87±1.37
	Е	22.99±1.36	13.03±1.01
	А	2.24±0.35	1.64±0.19
<i>Gentiana punctata</i>	М	>500	>500
	Е	>500	>500
	А	225.29±7.93	222.86±6.85
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	М	29.85±2.49	27.78±1.12
	Е	54.76±3.45	28.88±1.05
	А	53.38±3.97	0.64±0.15
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	М	43.94±2.94	29.07±1.87
	Е	158.23±2.17	72.79±3.69
	А	29.82±1.87	3.08±0.37
<i>Centaurium erythrea</i>	М	>500	286.32±7.31
	Е	86.41±1.28	36.05±2.01
	А	42.30±1.81	25.33±0.99
Pd(II) комплекс		15.73±0.25	8.89±0.36
лиганд		>500	366.00±2.55

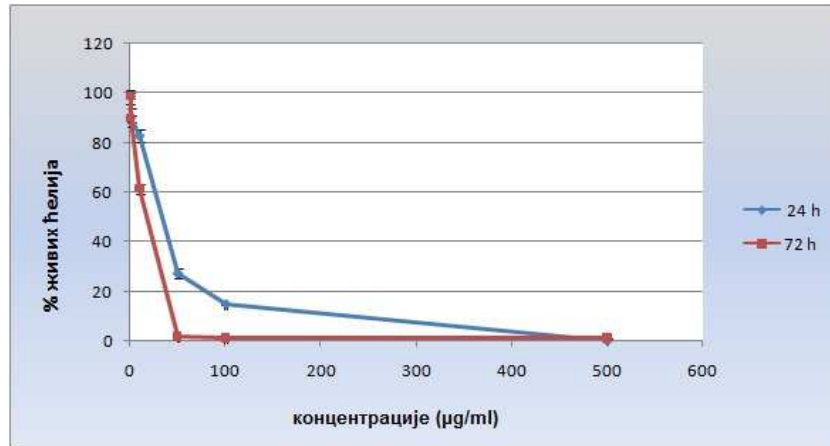
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Након 72 сата повећавају се цитотоксични ефекти, што указује на антипролиферативну активност тестираних биљака на SW480 ћелијама. Најбоље ефекте показују екстракти биљке *A. flavum* (све IC₅₀ вредности су ниже од 30 µg/ml), док биљка *G. punctata* не показује цитотоксичне ефекте (IC₅₀ вредности су веће од највише испитиване концентрације, 500 µg/ml, осим у третману ацетонским екстрактом). У односу на NCI критеријум добру цитотоксичност показује и метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys*, екстракти листова и плодова биљке *L. vulgare*, ацетонски екстракт биљке *C. erythrea*.

Уочене су разлике у цитотоксичности међу различитим врстама екстраката на SW480 ћелијама. Метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys* је ефикаснији у односу на етилацетатни и ацетонски екстракт. На SW480 ћелијама ацетонски екстракт изазива најбоље ефекте у случају биљке *A. flavum*, екстракта листова (подједнако као метанол) и плодова биљке *L. vulgare* и *C. erythrea*.

Pd(II) комплекс показује изузетно добру дозно и временски зависну цитотоксичност, са ниским IC₅₀ вредностима на испитиваној SW480 ћелијској линији (Табела 5, Графикон 2).

Графикон 2. Цитотоксична активност Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији након 24 и 72 сата.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табела 6 приказује IC₅₀ вредности комбинованих третмана екстраката изабраних врста биљака и Pd(II) комплекса на SW480 ћелијама. У појединачним третманима 0.1 µM концентрација Pd(II) комплекса не изазива цитотоксичне ефекте, а 10 µM концентрација убија 17% SW480 ћелија након 24 сата и 38% ћелија након 72 сата. Све IC₅₀ вредности у комбинованим третманима екстраката биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса су ниже од 30 µg/ml. Комбиновани третмани екстраката биљке *G. punctata* са обе концентрације Pd(II) комплекса изазивају синергистичко повећање цитотоксичности, односно смањења IC₅₀ вредности у односу на појединачне третмане

(Прилог 4). На SW480 ћелијама уочавају се разлике у интеракцији у различитим временима излагања, након 72 долази до синергистичких ефеката међу испитиваним супстанцама.

Табела 6. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности (µg/ml) екстраката испитиваних врста биљака у комбинованим третманима са Pd(II) комплексом на SW480 ћелијској линији.

Биљка	Pd (µM)	Екстракт	24 h	72 h
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	7.49±0.08	9.43±0.25
		E	18.88±2.79	25.21±4.38
		A	3.55±0.09	6.17±1.00
	10	M	4.10±0.04	0.066±0.001
		E	21.40±1.97	1.88±0.03
		A	1.06±0.06	0.074±0.001
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	393.01±2.18	235.18±3.13
		E	>500	493.35±3.28
		A	251.32±2.47	223.45±4.21
	10	M	109.54±5.43	0.40±0.01
		E	340.52±2.22	42.29±0.99
		A	13.05±1.09	2.01±0.02

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

У Табели 7 су приказане IC₅₀ вредности испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса на здравој ћелијској линији, **фибробластима коже**.

Табела 7. Цитотоксичност - IC₅₀ вредности (µg/ml) екстраката испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса у појединачним третманима на здравим фибробластима коже.

	Екстракт	24 h	72 h
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	>500	>500
	E	>500	>500
	A	>500	>500
<i>Allium flavum</i>	M	222.25±2.65	208.08±1.87
	E	>500	235.31±4.21
	A	201.36±1.98	198.12±0.12
<i>Gentiana punctata</i>	M	>500	>500
	E	>500	>500
	A	>500	>500
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	M	>500	>500
	E	>500	>500
	A	>500	>500
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	M	>500	>500
	E	>500	>500
	A	>500	>500
<i>Centaurium erythraea</i>	M	>500	>500
	E	>500	>500
	A	>500	>500
Pd(II) комплекс		63.43±0.95	24.41±0.99
лиганд		>500	>500

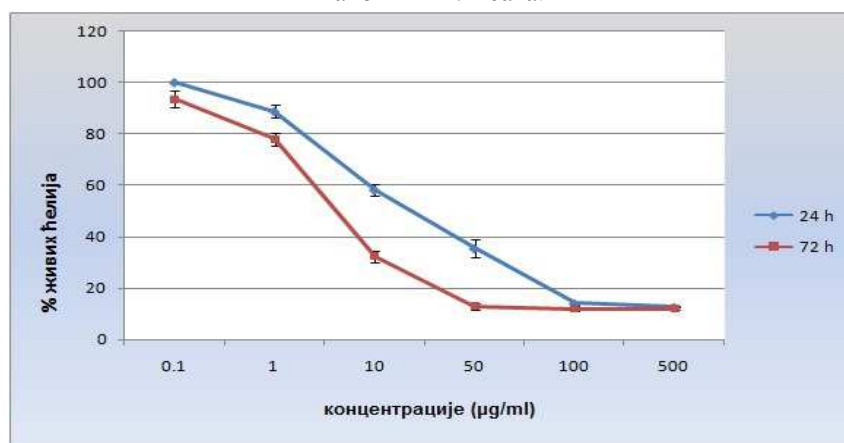
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

За разлику од осталих биљака, *A. flavum* показује одређену цитотоксичност у високим концентрацијама, што није значајно у односу на усвојен критеријум за IC₅₀ вредности ниже од 30

$\mu\text{g/ml}$ (Suffness и Pezzuto, 1990). Остале врсте биљака не показују цитотоксичну активност на фибробластима коже, са IC_{50} вредностима већим од $500 \mu\text{g/ml}$.

Pd(II) комплекс изазива дозно и временски зависну цитотоксичност на здравим фибробластима коже, нарочито након 72 сата (Табела 7, Графикон 3).

Графикон 3. Цитотоксична активност **Pd(II)** комплекса на здравим фибробластима коже након 24 и 72 сата.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Резултати цитотоксичности комбинованих третмана на здравим фибробластима коже приказани су у Табели 8. Концентрација $10 \mu\text{M}$ Pd(II) комплекса убија 48% здравих фибробласта коже након 24 сата и 68% након 72 сата. Комбиновани третмани не показују синергистичке ефекте (Прилог 4), односно смањују цитотоксичност у односу на појединачне третмане Pd(II) комплексом на здравим фибробластима коже, супротно од ефекта комбинованих третмана на ћелијским линијама канцера.

Табела 8. Цитотоксичност - IC_{50} вредности ($\mu\text{g/ml}$) екстраката испитиваних врста биљака у комбинованим третманима са Pd(II) комплексом на здравим фибробластима коже.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	24 h	72 h
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	332.74 ± 1.22	265.85 ± 1.58
		E	>500	>500
		A	360.37 ± 5.12	>500
	10	M	356.07 ± 0.87	254.26 ± 3.14
		E	277.68 ± 3.54	268.81 ± 2.87
		A	203.63 ± 1.33	108.21 ± 3.21
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	>500	>500
		E	>500	>500
		A	>500	>500
	10	M	>500	321.04 ± 1.04
		E	>500	>500
		A	>500	279.08 ± 2.87

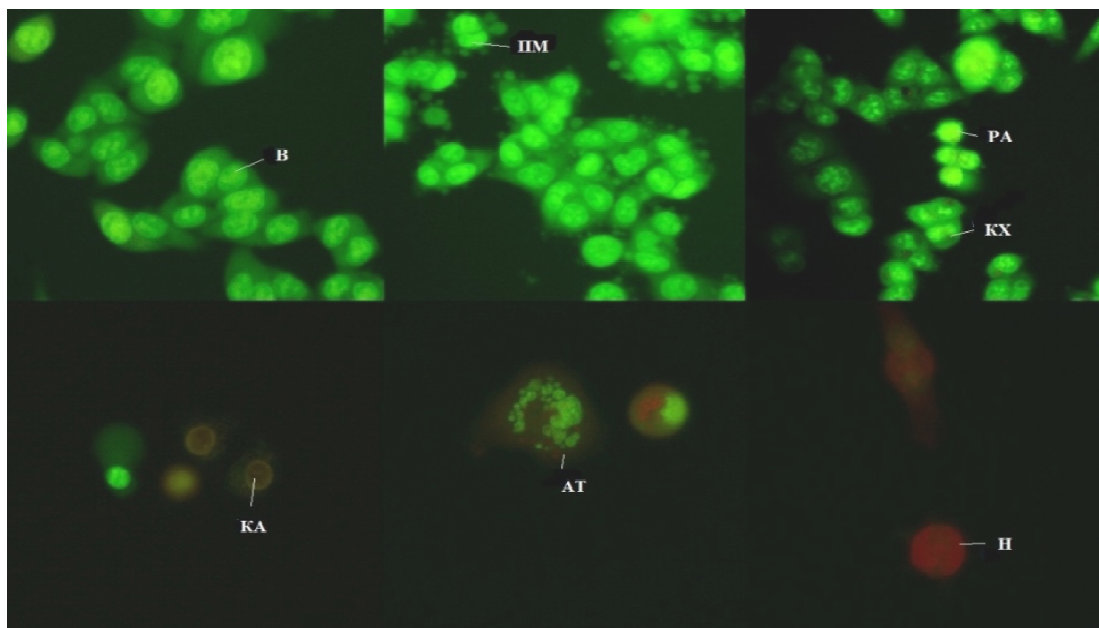
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

У комбинованим третманима екстраката биљке *A. flavum* и 0.1 μM концентрације Pd(II) комплекса смањује се цитотоксичност у односу на појединачне третмане екстрактами биљке *A. flavum*. Комбиновани третмани екстраката биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса не доводе до промене цитотоксичности у односу на појединачне третмане екстрактами, осим у случају метанолног и ацетонског екстракта у комбинацији са 10 μM концентрацијом Pd(II) комплекса након 72 сата. Обзиром на велику цитотоксичност 10 μM концентрације Pd(II) комплекса интеракције са екстрактами биљака су антагонистичке. Синергистички ефекат се јавља само у случају комбинованих третмана 0.1 μM концентрацијом Pd(II) комплекса и појединих концентрација екстраката биљке *G. punctata*.

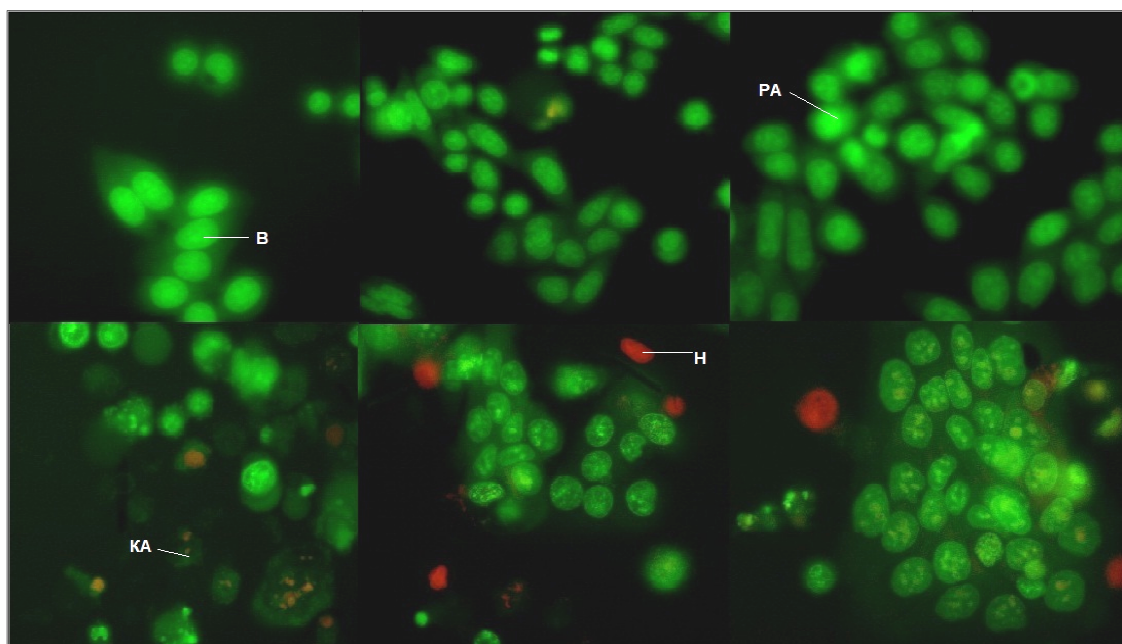
Резултати показују (Прилог 4) да комбиновани третмани изазивају углавном синергистичке ефекте на ћелијама колоректалног карцинома, што зависи од коришћене концентрације, врсте комбинованог третмана и времена излагања. Генерално, боље синергистичке ефекте комбиновани третмани постижу на НСТ-116 ћелијама у поређењу са ефектима на SW480 ћелијама. Добијене CI вредности за комбиноване третмане екстраката биљака и Pd(II) комплекса на здравим фибробластима коже показују углавном антагонистичке и ређе адитивне цитотоксичне ефекте.

2.1.2. Тип ћелијске смрти изазване појединачним и комбинованим третманима биљних екстраката и Pd(II) комплекса

Обзиром да су испитивани екстракти лековитих биљака и Pd(II) комплекса показали цитотоксичност на тестираним ћелијским линијама карцинома колоне, у даљем испитивању је одређиван тип ћелијске смрти, коришћењем АО/ЕБ микроскопске методе. Појединачни и комбиновани третмани испитиваних биљних екстраката и Pd(II) комплекса изазивају морфолошке промене карактеристичне за процесе апоптозе и некрозе (Слике 15 и 16). Карактеристичне морфолошке промене за процес апоптозе су пупљење ћелијске мембране, кондензација хроматина, смањење ћелијске запремине, фрагментација једра, формирање апоптотских тела. Некротске ћелије су кондензоване и униформно црвене боје.



Слика 15. Типичне морфолошке промене HCT-116 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увеличање 400×. На слици су приказане репрезентативне слике добијене у појединачним третманима екстрактима испитиваних биљака.
 В - вијабилне (живе) ћелије; ПА - рана апоптоза; КА - касна апоптоза; Н - некроза; КХ - кондензација хроматина; АТ - апоптотска тела; ПМ - пуњење мембране



Слика 16. Типичне морфолошке промене SW480 ћелија, добијене флуоресцентним бојењем АО/ЕБ методом на микроскопу, увеличање 400×. На слици су приказане репрезентативне слике добијене у појединачним третманима екстрактима испитиваних биљака.
 В - вијабилне (живе) ћелије; ПА - рана апоптоза; КА - касна апоптоза; Н - некроза

У Табелама 9, 10 и 11 приказани су проценти живих ћелија, ране и касне апоптозе и некрозе НСТ-116 ћелија, а ефекти зависе од врсте биљке, врсте и концентрације екстракта и времена излагања.

Третмани биљним екстрактима углавном изазивају апоптозу, у процентима који су у корелацији са њиховом цитотоксичношћу. Након 72 сата у третманима метанолним екстрактима биљака *T. chamaedrys L. vulgare* и *C. erythrea*, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$ долази до слабијих проапоптотских ефеката, што је у скаладу са резултатима добијеним МТТ тестом цитотоксичности и опоравком ћелија. На НСТ-116 ћелијама сва три екстракта биљке *L. vulgare* изазивају некрозу у већем проценту у односу на третмане осталим биљкама, где се некроза јавља у веома ниским процентима.

Табела 9. Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана метанолним екстрактом испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	концентрације ($\mu\text{g/ml}$)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.10 \pm 0.28	2.9 \pm 0.02	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	38.92 \pm 1.28	56.29 \pm 3.81	2.16 \pm 0.41	2.63 \pm 0.78
	250	7.54 \pm 0.67	20.13 \pm 0.19	64.20 \pm 1.58	8.13 \pm 0.21
<i>Allium flavum</i>	50	12.67 \pm 1.00	19.21 \pm 1.52	63.00 \pm 2.81	5.12 \pm 1.01
	250	2.50 \pm 0.20	11.01 \pm 0.05	80.17 \pm 4.17	6.32 \pm 0.47
<i>Gentiana punctata</i>	50	95.47 \pm 1.98	4.53 \pm 1.98	-	-
	250	87.17 \pm 3.99	12.83 \pm 3.99	-	-
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	47.68 \pm 2.91	51.74 \pm 3.12	0.28 \pm 0.03	0.28 \pm 0.03
	250	13.36 \pm 0.71	41.05 \pm 1.82	18.04 \pm 0.27	27.54 \pm 2.91
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	62.96 \pm 2.99	37.04 \pm 2.99	-	-
	250	15.07 \pm 3.91	54.21 \pm 3.01	8.41 \pm 0.99	22.31 \pm 2.13
<i>Centaurium erythrea</i>	50	82.67 \pm 4.12	16.98 \pm 4.47	0.11 \pm 0.001	0.232 \pm 0.08
	250	67.76 \pm 3.63	24.71 \pm 3.88	5.64 \pm 0.15	1.88 \pm 0.02
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.09 \pm 2.12	2.91 \pm 0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	45.45 \pm 2.98	45.64 \pm 1.99	2.01 \pm 0.15	6.82 \pm 1.67
	250	3.04 \pm 0.03	55.65 \pm 2.15	38.26 \pm 2.14	3.04 \pm 0.01
<i>Allium flavum</i>	50	5.28 \pm 0.55	10.16 \pm 1.02	83.65 \pm 4.34	0.91 \pm 0.01
	250	2.13 \pm 0.13	3.89 \pm 0.81	91.79 \pm 2.98	2.19 \pm 0.90
<i>Gentiana punctata</i>	50	90.26 \pm 4.12	9.47 \pm 4.12	-	-
	250	82.17 \pm 5.13	17.56 \pm 2.98	0.27 \pm 0.05	-
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	73.96 \pm 3.08	26.04 \pm 3.08	-	-
	250	6.20 \pm 0.11	8.81 \pm 0.11	61.06 \pm 2.32	24.03 \pm 1.47
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	85.83 \pm 3.91	24.17 \pm 3.91	-	-
	250	5.13 \pm 1.12	19.12 \pm 1.19	47.85 \pm 2.19	27.28 \pm 2.02
<i>Centaurium erythrea</i>	50	88.33 \pm 4.03	11.67 \pm 4.03	-	-
	250	72.73 \pm 2.87	27.07 \pm 2.87	-	-

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Етилацетатни екстракти испитиваних биљака изазивају дозно и временски зависну проапоптотску активност на НСТ-116 ћелијама, изузев биљке *T. chamaedrys* са бољом проапоптотском активношћу након 24 сата (Табела 10). Етилацетатни екстракти показују најслабију проапоптотску активност, пропорционално најслабијој цитотоксичности, у поређењу са осталим коришћеним екстрактима. Изузетак је етилацетатни екстракт биљке *C. erythrea*.

Табела 10. Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана етилацетатним екстрактом испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	концентрације (µg/ml)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.10±0.28	2.9±0.02	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	67.64±1.07	30.46±6.17	1.05±0.32	0.83±0.39
	250	35.25±1.01	35.66±3.47	2.49±0.05	2.07±0.39
<i>Allium flavum</i>	50	73.07±7.07	24.32±4.98	1.84±0.72	0.74±0.04
	250	30.54±2.88	64.20±6.13	2.81±0.61	2.45±0.18
<i>Gentiana punctata</i>	50	82.43±5.55	17.83±5.13	-	0.24±0.001
	250	80.87±8.28	27.27±2.70	-	0.41±0.01
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	67.32±0.69	31.24±1.25	0.17±0.03	0.88±0.02
	250	12.54±1.12	8.69±1.18	14.54±2.01	38.85±2.81
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	74.47±2.91	25.04±2.91	-	-
	250	20.01±0.47	15.14±2.22	43.80±1.87	21.05±3.47
<i>Centaurium erythrea</i>	50	77.06±5.56	20.65±3.39	1.18±0.03	1.12±0.07
	250	41.43±5.89	56.57±5.12	0.58±0.02	1.42±0.22
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.09±2.12	2.91±0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	78.28±1.60	21.28±2.05	0.44±0.01	-
	250	53.72±3.45	42.09±2.87	3.33±1.09	1.86±0.13
<i>Allium flavum</i>	50	66.23±2.04	33.76±2.04	-	-
	250	20.01±0.52	64.59±4.33	1.66±0.001	0.73±0.02
<i>Gentiana punctata</i>	50	74.56±2.31	25.44±2.31	-	-
	250	65.20±0.59	27.21±3.08	-	0.17±0.01
<i>Ligustrum vulgare</i> - листви	50	55.56±3.62	44.44±3.62	-	-
	250	15.43±1.98	17.13±1.06	52.85±4.13	14.59±2.87
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	71.09±1.17	28.91±1.17	-	-
	250	13.12±0.12	2.18±0.07	63.39±3.31	21.49±2.99
<i>Centaurium erythrea</i>	50	72.52±4.12	26.26±1.12	0.46±0.01	0.76±0.02
	250	20.35±2.49	74.83±3.01	4.83±1.12	-

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Ацетонски екстракти испитиваних биљака изазивају дозно и временски зависну проапоптотску активност на НСТ-116 ћелијама, изузев екстракта плода биљке *L. vulgare* која бољу активност постиже након 24 сата (Табела 11). Поређењем проапоптотске активности различитих врста екстраката ацетонски екстракт биљке *G. punctata* показују најбољу проапоптотску активност у поређењу са метанолним и етилацетатним у оба испитивана времена (Табела 11).

Табела 11. Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана **ацетонским** екстрактом испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	концентрације ($\mu\text{g/ml}$)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.10 \pm 0.28	2.9 \pm 0.02	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	73.58 \pm 4.91	22.04 \pm 2.98	3.08 \pm 1.00	1.26 \pm 0.13
	250	58.83 \pm 5.12	29.81 \pm 4.81	11.10 \pm 1.10	0.25 \pm 0.25
<i>Allium flavum</i>	50	49.13 \pm 3.81	36.51 \pm 3.33	12.30 \pm 2.11	2.15 \pm 0.18
	250	19.55 \pm 0.87	34.12 \pm 1.98	36.89 \pm 2.91	0.26 \pm 0.02
<i>Gentiana punctata</i>	50	87.05 \pm 4.89	12.06 \pm 2.18	0.51 \pm 1.29	0.38 \pm 0.16
	250	84.71 \pm 3.91	14.71 \pm 2.89	0.22 \pm 0.12	0.34 \pm 0.07
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	79.53 \pm 4.91	18.78 \pm 3.09	0.34 \pm 0.98	1.35 \pm 0.12
	250	18.16 \pm 2.12	43.71 \pm 2.19	4.66 \pm 1.02	33.48 \pm 2.41
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	68.79 \pm 2.32	42.91 \pm 2.12	2.38 \pm 0.67	1.98 \pm 0.98
	250	20.68 \pm 1.13	50.34 \pm 4.90	20.75 \pm 3.98	28.23 \pm 2.90
<i>Centaurium erythrea</i>	50	86.23 \pm 3.34	13.77 \pm 3.34	-	-
	250	61.13 \pm 2.13	30.87 \pm 2.13	-	-
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.09 \pm 2.12	2.91 \pm 0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	75.89 \pm 5.12	24.11 \pm 5.12	-	-
	250	27.05 \pm 1.98	49.09 \pm 1.09	18.86 \pm 1.03	-
<i>Allium flavum</i>	50	30.54 \pm 2.11	55.44 \pm 3.81	11.72 \pm 1.11	2.30 \pm 0.12
	250	0.98 \pm 0.01	3.13 \pm 0.16	94.02 \pm 1.43	1.87 \pm 0.01
<i>Gentiana punctata</i>	50	87.09 \pm 4.18	12.15 \pm 1.03	0.38 \pm 0.01	0.38 \pm 0.01
	250	85.09 \pm 3.37	5.35 \pm 0.18	0.37 \pm 0.01	0.55 \pm 0.02
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	73.14 \pm 3.12	25.82 \pm 1.91	0.69 \pm 0.12	0.35 \pm 0.01
	250	10.87 \pm 2.03	34.13 \pm 1.29	20.65 \pm 4.12	34.35 \pm 4.01
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	77.18 \pm 3.91	22.38 \pm 3.19	-	-
	250	36.72 \pm 4.19	60.31 \pm 3.19	1.81 \pm 0.02	1.15 \pm 0.03
<i>Centaurium erythrea</i>	50	83.13 \pm 2.09	16.87 \pm 2.09	-	-
	250	45.70 \pm 2.17	43.31 \pm 1.05	9.06 \pm 0.59	1.93 \pm 0.07

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Pd(II) комплекс индукује апоптозу, али и високе проценте некрозе НСТ-116 ћелија у свим концентрацијама изузев најниже (0.1 μM), која не индукује цитотоксичност (Табела 12).

Екстракти биљака са најбољом и најслабијом апоптотском активношћу коришћени су у комбинованим третманима са 0.1 и 10 μM концентрацијом Pd(II) комплекса. Иако 10 μM концентрација Pd(II) комплекса изазива некрозу, у комбинованом третману са биљним екстрактима смањује се проценат живих ћелија, појачава се апоптотска активност у односу на појединачне третмане биљним екстрактима и смањује некротска активност у односу на појединачни третман Pd(II) комплексом на НСТ-116 ћелијама (Табела 13).

Табела 12. Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана различитим концентрацијама **Pd(II)** комплекса. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

Pd (μM)	V	EA	LA	N
24 h				
Контролне ћелије	97.10±0.28	2.9±0.02	-	-
0.1	96.10±1.25	2.25±0.01	0.36±0.03	1.02±0.01
10	58.91±2.25	13.43±0.98	4.55±0.06	23.11±0.25
50	29.52±1.62	10.68±0.43	17.42±1.09	42.38±2.12
250	9.13±0.99	7.81±0.01	4.93±0.04	78.13±2.98
72 h				
Контролне ћелије	97.09±2.12	2.91±0.13	-	-
0.1	95.23±2.36	4.77±0.87	-	-
10	53.42±1.25	4.37±0.12	19.13±0.25	23.08±1.33
50	3.41±0.98	40.30±1.87	31.41±1.76	25.87±1.05
250	0.51±0.05	14.83±0.09	14.41±0.99	70.25±2.91

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табела 13. Проценти живих, апоптотских и некротских НСТ-116 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након **комбинованих третмана** испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

Биљке	Pd (μM)	Екстракт	V	EA	LA	N
24 h						
Контролне ћелије			97.10±0.28	2.9±0.02	-	-
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	30.13±1.11	24.49±1.09	44.13±2.07	1.25±0.08
		E	75.72±3.12	24.28±0.07	-	-
		A	35.68±1.08	60.42±3.22	2.38±0.01	1.52±0.07
	10	M	20.82±1.98	19.16±0.88	58.21±1.55	1.81±0.01
		E	28.19±1.09	67.67±2.86	2.13±0.07	2.01±0.001
		A	17.20±0.99	63.25±1.71	11.45±0.19	8.03±0.01
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	67.25±1.31	53.74±2.79	-	-
		E	78.47±2.90	8.26±0.04	9.43±0.08	3.38±0.21
		A	74.83±2.21	19.90±0.05	3.29±0.01	1.97±0.07
	10	M	48.39±1.32	47.33±1.91	2.84±0.07	1.42±0.11
		E	65.36±1.10	28.77±0.08	3.63±0.08	2.23±0.21
		A	34.00±0.67	46.99±0.45	15.91±0.98	3.09±0.01
72 h						
Контролне ћелије			97.09±2.12	2.91±0.13	-	-
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	19.03±1.11	24.41±1.91	56.56±1.02	-
		E	88.01±2.23	11.99±0.11	-	-
		A	57.06±2.91	42.93±1.13	-	-
	10	M	8.41±0.98	1.87±0.98	85.05±2.02	4.67±0.19
		E	38.31±1.11	56.82±3.01	3.88±0.32	0.99±0.06
		A	19.44±1.01	24.44±2.01	37.50±0.81	18.61±0.93
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	92.75±3.98	7.25±0.02	-	-
		E	81.74±4.91	18.25±0.02	-	-
		A	91.73±4.11	8.27±0.16	-	-
	10	M	50.63±3.03	35.25±1.52	12.03±0.38	2.09±0.11
		E	41.95±2.22	35.92±1.38	21.63±0.72	0.50±0.01
		A	43.51±2.77	38.52±2.11	17.46±0.79	0.53±0.01

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табеле 14, 15 и 16 приказују проценте живих ћелија, ране и касне апоптозе и некрозе **SW480 ћелија** изазване екстрактима испитиваних биљака. Третмани биљним екстрактима изазивају апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти, док се некроза јавља у веома ниским процентима. Најбољу проапоптотску активност, сходно цитотоксичним ефектима, показују екстракти биљке *A. flavum*, а најслабију екстракти биљке *G. punctata*.

Метанолни екстракти испитиваних врста биљака показују дозно и временски зависну проапоптотску активност, изузев екстракта биљке *G. punctata*, са слабијом проапоптотском активношћу након 72 сата (Табела 14). Метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys* индукује највеће проценте апоптозе у поређењу са осталим екстрактима.

Табела 14. Проценти живих, апоптотских и некротских SW480 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана **метанолним** екстрактима испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	концентрације (µg/ml)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	98.02±3.12	1.98±0.03	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	82.63±3.58	16.26±2.13	0.92±0.10	0.19±0.09
	250	23.03±1.15	67.21±1.09	4.05±0.91	5.71±0.89
<i>Allium flavum</i>	50	20.01±1.72	10.82±2.91	67.19±2.90	1.98±0.13
	250	19.98±1.67	5.31±1.90	72.59±2.18	2.12±0.98
<i>Gentiana punctata</i>	50	84.39±4.28	15.60±4.28	-	-
	250	77.14±2.13	22.85±2.13	-	-
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	46.30±3.12	53.69±3.12	-	-
	250	31.65±3.81	25.37±3.81	40.97±2.11	2.01±0.12
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	54.25±5.33	45.74±5.34	-	-
	250	48.92±2.07	51.08±2.07	-	-
<i>Centaureum erythraea</i>	50	84.63±2.61	15.37±2.61	-	-
	250	72.98±6.81	25.37±5.91	0.81±0.05	0.91±0.04
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.30±2.12	2.70±0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	66.78±3.89	20.54±2.89	4.96±1.12	1.71±0.23
	250	10.10±0.55	50.20±1.55	34.62±2.14	5.08±1.14
<i>Allium flavum</i>	50	3.21±0.23	20.12±1.87	74.67±2.31	2.00±0.27
	250	0.88±0.01	2.89±0.06	93.45±3.45	2.78±0.78
<i>Gentiana punctata</i>	50	91.08±5.12	3.05±0.12	3.00±0.11	2.87±0.19
	250	88.56±4.71	4.19±0.87	3.12±0.28	4.13±0.13
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	43.29±2.09	40.34±4.98	14.34±1.09	2.03±0.91
	250	29.06±1.02	31.90±3.12	33.03±1.28	5.07±0.28
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	49.61±3.12	26.40±1.09	2.69±0.21	1.275±0.32
	250	30.32±2.01	40.53±1.99	27.54±0.98	1.60±0.13
<i>Centaureum erythraea</i>	50	72.09±4.98	13.69±2.06	13.90±1.13	0.32±0.01
	250	70.32±6.09	16.92±2.09	11.89±1.09	0.87±0.02

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Етилацетатни екстракти биљака индукују дозно и временски зависну, али најслабију проапоптотску активност, пропорционално најслабијој цитотоксичности, у поређењу са остала два коришћена екстракта (Табела 15).

Табела 15. Проценти живих, апоптотских и некротских SW480 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана етилацетатним екстрактом испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	концентрације ($\mu\text{g/ml}$)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	98.02 \pm 3.12	1.98 \pm 0.03	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	75.27 \pm 5.07	24.34 \pm 5.91	0.28 \pm 0.07	0.096 \pm 0.005
	250	50.85 \pm 3.98	46.62 \pm 2.91	1.83 \pm 0.12	0.70 \pm 0.08
<i>Allium flavum</i>	50	58.94 \pm 4.69	35.72 \pm 2.61	2.42 \pm 0.90	0.25 \pm 0.02
	250	25.25 \pm 3.15	68.75 \pm 6.7	1.80 \pm 0.08	0.096 \pm 0.01
<i>Gentiana punctata</i>	50	68.50 \pm 8.57	29.31 \pm 6.9	1.36 \pm 0.12	0.89 \pm 0.15
	250	64.31 \pm 5.30	35.38 \pm 5.20	-	0.99 \pm 0.03
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	60.55 \pm 5.82	39.33 \pm 5.90	-	0.11 \pm 0.01
	250	25.74 \pm 1.24	73.42 \pm 6.01	0.42 \pm 0.12	0.40 \pm 0.02
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	76.38 \pm 2.15	23.41 \pm 2.26	-	0.22 \pm 0.08
	250	25.95 \pm 4.07	73.95 \pm 6.91	-	0.58 \pm 0.01
<i>Centaureum erythraea</i>	50	72.18 \pm 2.21	24.32 \pm 5.13	0.81 \pm 0.07	2.08 \pm 0.85
	250	37.07 \pm 2.71	62.03 \pm 3.38	0.12 \pm 0.03	0.77 \pm 0.04
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.30 \pm 2.12	2.70 \pm 0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	74.42 \pm 7.13	23.97 \pm 6.38	2.79 \pm 0.09	-
	250	46.29 \pm 1.19	42.86 \pm 5.9	10.03 \pm 2.40	0.81 \pm 0.02
<i>Allium flavum</i>	50	61.63 \pm 4.29	35.94 \pm 3.50	2.22 \pm 0.70	0.16 \pm 0.03
	250	13.06 \pm 1.72	48.48 \pm 1.27	37.45 \pm 5.63	0.99 \pm 0.01
<i>Gentiana punctata</i>	50	79.92 \pm 3.27	14.77 \pm 0.83	5.13 \pm 1.61	0.18 \pm 0.02
	250	60.21 \pm 0.21	38.52 \pm 0.88	1.18 \pm 0.58	0.085 \pm 0.01
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	54.08 \pm 2.39	41.72 \pm 2.01	4.19 \pm 0.93	-
	250	22.84 \pm 4.29	60.99 \pm 0.19	7.94 \pm 4.22	0.23 \pm 0.02
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	69.88 \pm 1.98	28.98 \pm 1.39	2.067 \pm 1.02	-
	250	30.04 \pm 2.09	24.12 \pm 2.61	13.46 \pm 3.54	1.63 \pm 0.15
<i>Centaureum erythraea</i>	50	72.37 \pm 3.25	25.13 \pm 3.96	2.31 \pm 0.81	0.21 \pm 0.04
	250	31.75 \pm 1.25	59.41 \pm 1.34	8.31 \pm 2.40	0.53 \pm 0.18

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Ацетонски екстракти биљака показују најбољу дозно и временски зависну проапоптотску активност у поређењу са осталим екстрактима у оба испитивана времена (Табела 16), изузев у случају биљке *T. chamaedrys*.

Табела 16. Проценти живих, апоптотских и некротских SW480 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана **ацетонским** екстрактом испитиваних врста биљака. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

24 h	Концентрације (µg/ml)	V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	98.02±3.12	1.98±0.03	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	84.51±5.69	14.66±5.38	0.26±0.04	0.57±0.12
	250	43.62±3.71	51.50±0.12	2.27±0.27	2.11±0.56
<i>Allium flavum</i>	50	21.81±0.51	54.78±1.08	20.55±1.33	2.80±0.50
	250	2.01±0.15	1.83±0.13	96.16±0.98	-
<i>Gentiana punctata</i>	50	64.85±4.97	35.15±4.97	-	-
	250	60.55±0.45	39.44±0.45	-	-
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	67.95±5.13	30.00±4.81	1.03±0.12	1.03±0.12
	250	27.50±1.43	59.64±2.12	10.00±0.97	2.86±0.78
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	60.22±4.89	39.55±3.98	-	0.24±0.01
	250	28.03±0.36	67.69±0.87	1.49±0.21	2.78±0.21
<i>Centaureum erythraea</i>	50	69.17±5.99	30.43±0.87	0.27±0.05	0.13±0.02
	250	18.30±1.89	81.18±1.09	0.17±0.02	0.34±0.11
72 h		V	EA	LA	N
Контролне ћелије	0	97.30±2.12	2.70±0.13	-	-
<i>Teucrium chamaedrys</i>	50	68.34±0.23	28.74±0.69	2.11±0.14	1.58±0.37
	250	13.15±3.28	84.89±4.76	0.58±0.01	-
<i>Allium flavum</i>	50	9.31±0.10	40.12±2.14	46.55±2.55	4.02±0.04
	250	2.93±0.01	32.13±0.18	61.19±4.47	3.75±0.22
<i>Gentiana punctata</i>	50	62.01±5.12	37.99±5.12	-	-
	250	54.71±4.98	45.29±4.98	-	-
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	50	20.57±3.56	61.83±5.02	16.40±1.12	1.26±0.27
	250	18.78±2.17	59.98±6.08	18.89±3.12	2.36±0.56
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	50	28.40±1.21	48.15±4.12	21.34±2.02	2.11±0.05
	250	17.94±3.01	48.33±4.12	31.20±2.09	2.53±0.12
<i>Centaureum erythraea</i>	50	56.92±2.99	42.4±2.01	0.89±0.12	0.71±0.11
	250	15.81±3.01	71.79±2.92	11.63±0.40	0.69±0.01

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Табела 17. Проценти живих, апоптотских и некротских SW480 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након третмана различитим концентрацијама **Pd(II)** комплекса. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

Pd (µM)	V	EA	LA	N
24 h				
Контролне ћелије	98.02±3.12	1.98±0.03	-	-
0.1	96.32±2.31	5.68±0.23	-	-
10	78.13±2.31	3.05±0.02	3.64±0.02	15.18±0.13
50	19.63±0.76	18.13±1.03	10.10±0.99	52.14±1.92
250	0.15±0.05	15.02±0.87	8.13±0.91	76.70±2.09
72 h				
Контролне ћелије	97.30±2.12	2.70±0.13	-	-
0.1	96.13±2.58	3.87±0.21	-	-
10	59.82±1.25	14.53±0.59	10.13±1.11	15.52±0.58
50	5.00±0.04	29.88±1.64	30.07±1.00	35.05±2.01
250	2.32±0.49	25.23±1.12	20.34±1.04	52.11±2.81

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Pd(II) комплекс у испитиваним концентрацијама, изузев најниже 0.1 μM , изазива високе проценте некрозе (Табела 17).

У комбинованим третманима смањује се проценат живих ћелија, појачава се апоптотска активност у односу на појединачне третмане биљним екстрактима и смањује некротска активност у односу на појединачни третман 10 μM концентрације Pd(II) комплекса (Табела 18).

Табела 18. Проценти живих, апоптотских и некротских SW480 ћелија мерених АО/ЕВ методом на флуоресцентном микроскопу, након **комбинованих третмана** испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса. Проценти ћелија су мерени 24 и 72 сата након третмана.

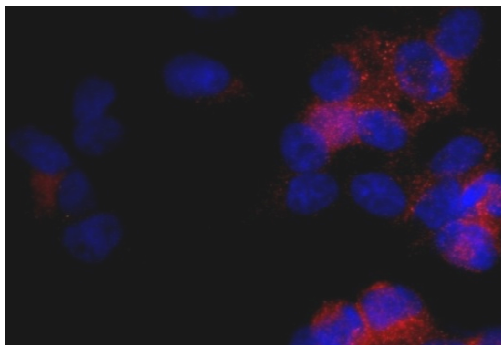
Биљка	Pd (μM)	Екстракт	V	EA	LA	N
24 h						
Контролне ћелије			98.02 \pm 3.12	1.98 \pm 0.03	-	-
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	28.91 \pm 1.45	38.10 \pm 1.78	29.71 \pm 0.17	3.28 \pm 0.12
		E	73.05 \pm 3.81	26.52 \pm 0.65	0.43 \pm 0.02	-
		A	35.35 \pm 1.42	61.82 \pm 1.42	2.51 \pm 0.02	0.32 \pm 0.09
	10	M	20.01 \pm 1.44	18.82 \pm 1.11	60.12 \pm 2.28	1.05 \pm 0.06
		E	50.13 \pm 1.12	43.97 \pm 0.99	3.58 \pm 0.09	2.32 \pm 0.02
		A	29.81 \pm 0.43	52.48 \pm 0.98	7.13 \pm 1.89	10.58 \pm 0.02
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	69.57 \pm 2.04	30.03 \pm 0.88	0.39 \pm 0.09	-
		E	72.13 \pm 1.09	25.98 \pm 0.35	1.89 \pm 0.07	-
		A	73.81 \pm 2.39	26.19 \pm 2.13	-	-
	10	M	50.71 \pm 2.12	45.51 \pm 2.76	2.83 \pm 0.11	0.94 \pm 0.02
		E	50.22 \pm 2.92	43.66 \pm 2.11	5.20 \pm 0.13	2.26 \pm 0.22
		A	40.54 \pm 1.03	48.82 \pm 2.06	7.64 \pm 0.26	2.99 \pm 0.55
72 h						
Контролне ћелије			97.30 \pm 2.12	2.70 \pm 0.13	-	-
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	5.05 \pm 0.13	2.13 \pm 0.02	92.82 \pm 2.29	-
		E	77.81 \pm 1.71	22.19 \pm 0.77	-	-
		A	26.82 \pm 1.74	70.60 \pm 1.94	2.58 \pm 0.28	-
	10	M	2.51 \pm 0.22	2.99 \pm 0.99	93.51 \pm 3.01	0.99 \pm 0.02
		E	25.18 \pm 0.09	63.77 \pm 3.02	10.13 \pm 0.35	0.92 \pm 0.02
		A	13.51 \pm 0.98	62.62 \pm 3.42	22.35 \pm 1.11	1.52 \pm 0.07
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M	85.51 \pm 2.65	12.18 \pm 1.14	2.31 \pm 0.07	-
		E	78.41 \pm 3.51	19.04 \pm 1.03	2.55 \pm 0.01	-
		A	79.18 \pm 4.91	20.82 \pm 2.21	-	-
	10	M	32.58 \pm 1.18	63.49 \pm 2.99	2.85 \pm 0.18	1.08 \pm 0.04
		E	30.13 \pm 2.91	64.74 \pm 3.01	3.58 \pm 0.73	1.55 \pm 0.04
		A	20.02 \pm 1.03	41.42 \pm 1.39	36.98 \pm 1.03	1.76 \pm 0.13

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

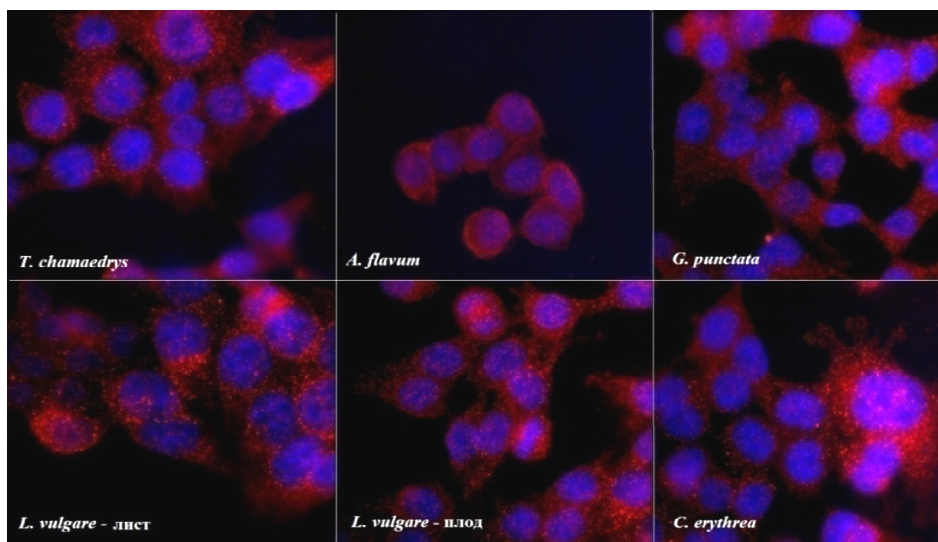
На основу резултата цитотоксичне и апоптотске активности екстраката испитиваних врста биљака уочава се да метанолни екстракти показују најбољу или добру активност у поређењу са етилацетатним и ацетонским екстрактом. Из тих разлога метанолни екстракти су коришћени за даља испитивања механизма апоптозе.

2.1.3. Експресија Fas рецептора на ћелијској мембрани

Протеинска експресија Fas рецептора, као једне од првих активираних компоненти у спољашњем апоптотском сигналном путу, детектована је имунофлуоресценцом. Fas рецептори су експримирани на нетретираним **НСТ-116 ћелијама** (Слика 17).



Слика 17. Протеинска експресија Fas рецептора у НСТ-116 **контролним** (нетретираним) **ћелијама**. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антителио конјуговано са Су3).

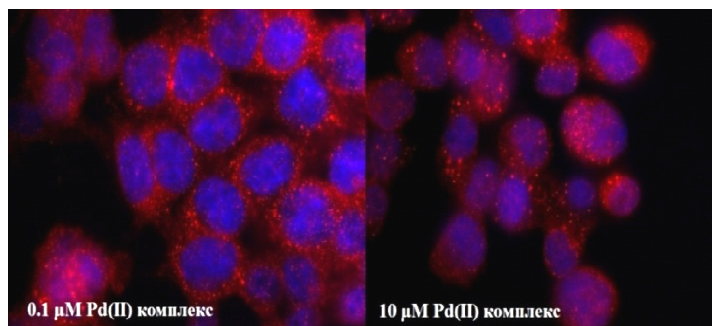


Слика 18. Протеинска експресија Fas рецептора у НСТ-116 ћелијама третираним метанолним екстрактима испитиваних **врста биљака**, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антителио конјуговано са Су3).

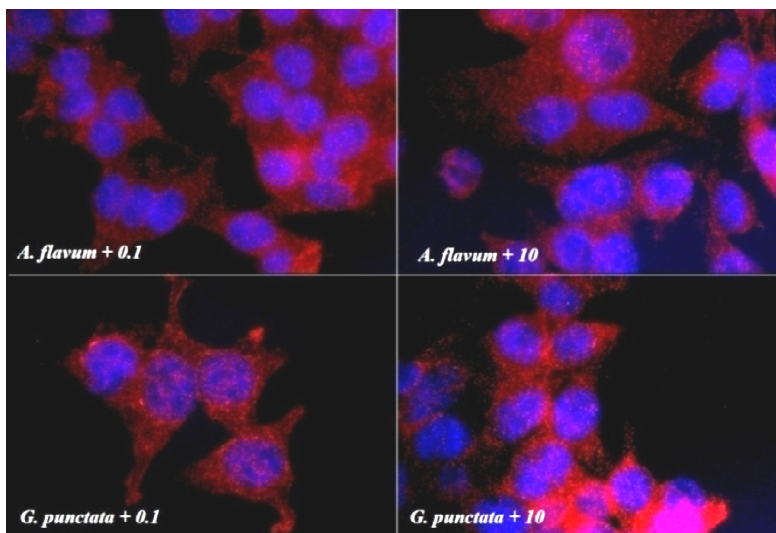
Након 24 сата трајања третмана метанолним екстрактима биљака долази до повећане експресија Fas рецептора у односу на нетретиране, контролне НСТ-116 ћелије (Слика 18). Протеинска експресија Fas рецептора је највише изражена у третману метанолним екстрактом биљке *L. vulgare*. Остале биљке доводе до приближно истог повећања протеинске експресије Fas

рецептора у односу на контролу, укључујући и биљку *G. punctata*, која показује најслабије проапототске ефекте.

Испитиване концентрације Pd(II) комплекс доводе до повећања протеинске експресије Fas рецептора у односу на нетретирани хелије, као и у односу на третмане биљним екстрактима (Слика 19).



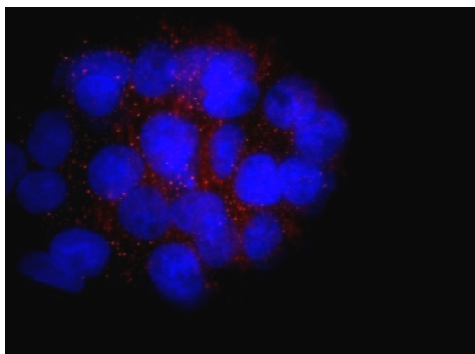
Слика 19. Протеинска експресија Fas рецептора у НСТ-116 хелијама третираним различитим концентрацијама Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



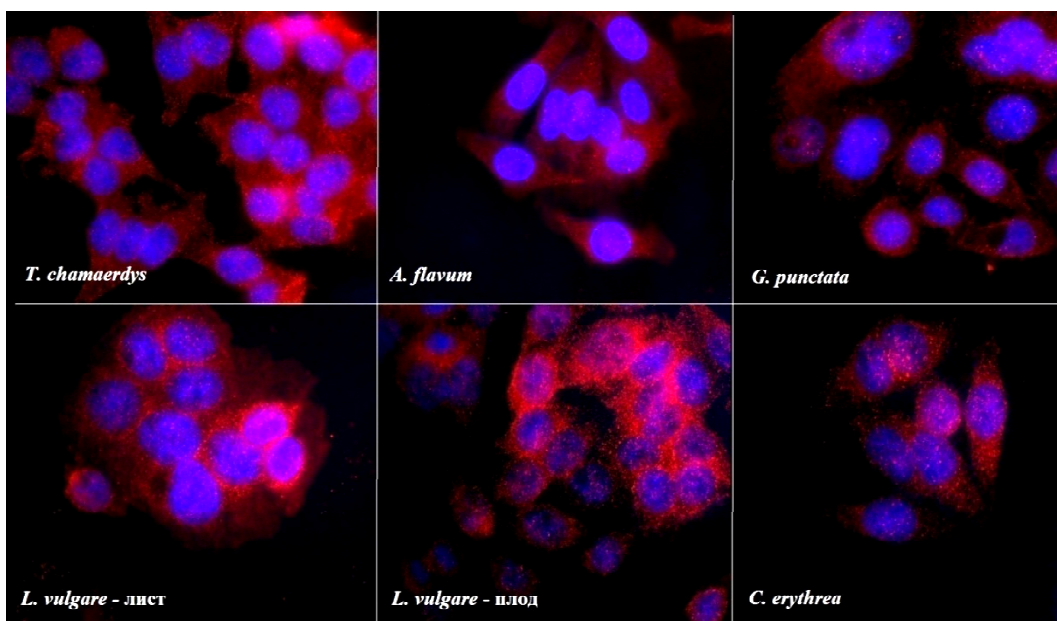
Слика 20. Протеинска експресија Fas рецептора у НСТ-116 хелијама након **комбинованих третмана** метанолних екстраката испитиваних врста биљака, концентрације 50 μg/ml и различитих концентрација Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

Комбиновани третмани доводе до повећања протеинске експресије Fas рецептора у односу на појединачне третмане (Слика 20).

Након третмана метанолним екстрактима биљака долази до повећане протеинске експресија Fas рецептора (Слика 22) у односу на нетретирани **SW480 хелије** (Слика 21).



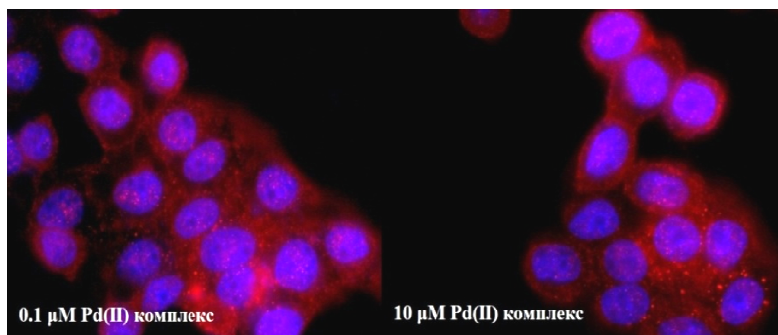
Слика 21. Протеинска експресија Fas рецептора у SW480 контролним (нетретираним) ћелијама. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).



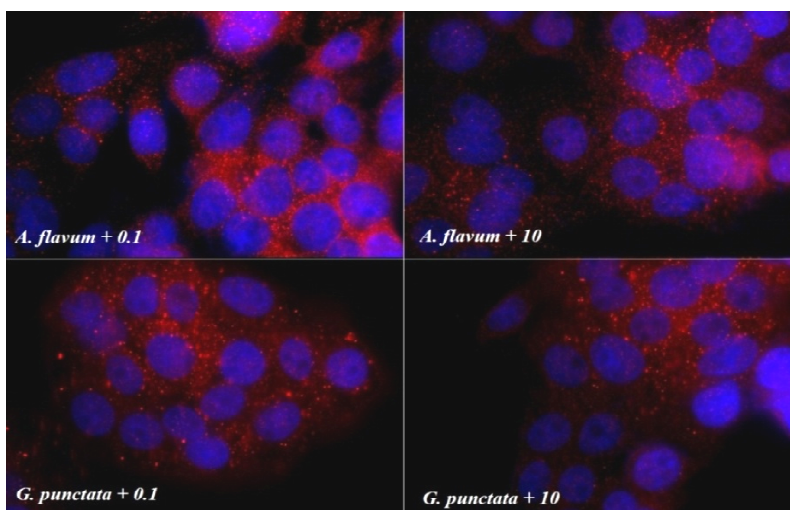
Слика 22. Протеинска експресија Fas рецептора у SW480 ћелијама третираним метанолним екстрактима испитиваних **врста биљака**, концентрације 50 µg/ml. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Су3).

Протеинска експресија Fas рецептора је највише изражена у третманима метанолним екстрактима биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum* и *L. vulgare*, које показују најбољу и проапоптотску активност. Нешто слабије изражена протеинска експресија Fas рецептора јавља се у третманима биљкама са слабом цитотоксичношћу, *G. punctata* и *C. erythrea*.

Pd(II) комплекс изазива повећану протеинску експресију Fas рецептора у односу на нетретиране ћелије, као и у односу на третмане биљним екстрактима (Слика 23).



Слика 23. Протеинска експресија Fas рецептора у SW480 ћелијама третираним различитим концентрацијама **Pd(II) комплекса**. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увељчању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).



Слика 24. Протеинска експресија Fas рецептора у SW480 ћелијама након **комбинованих третмана** метанолних екстраката испитиваних врста биљака, концентрације 50 μg/ml и различитих концентрација Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увељчању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а Fas рецептори црвено (секундарно антитело конјуговано са Cy3).

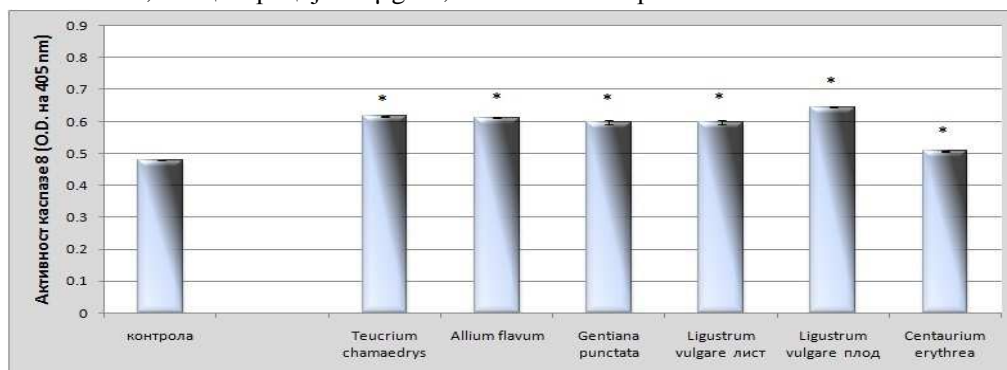
У комбинованим третманима (Слика 24) биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса долази до повећане протеинске експресије Fas рецептора у односу на контролу, али смањене у односу на појединачне третмане биљним екстрактом и Pd(II) комплексом. Комбиновани третмани биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса доводе до повећања протеинске експресије Fas рецептора у односу на појединачне третмане биљком, али слабије у односу на појединачне третмане Pd(II) комплексом.

2.1.4. Активност каспазе 8

Резултати добијени мерењем активности једне од иницијаторских ензима у спољашњем апоптотском сигналном путу (каспазе 8) у цитосолу контролних и третираних **НСТ-116 ћелија**

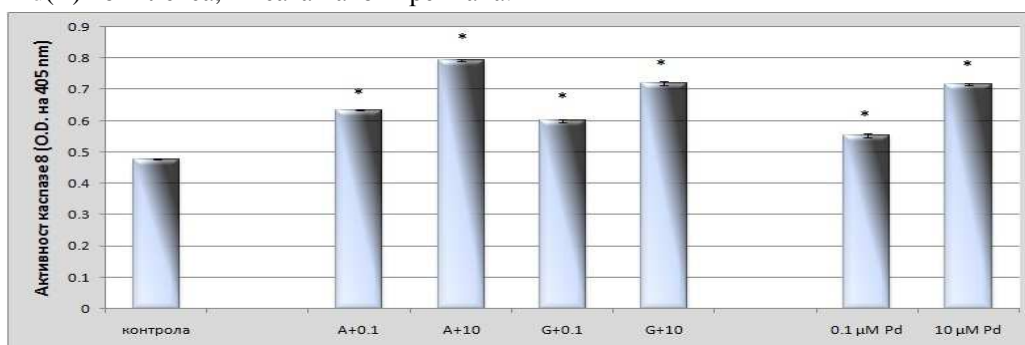
показују да све испитиване врсте биљака доводе до статистички значајног повећања активности овог ензима у односу на контролне ћелије (Графикон 4). Метанолни екстракт плодова биљке *L. vulgare* изазива највећу активност каспазе 8, док *C. erythrea* изазива најслабију активност. Све остале биљке приближно једнако активирају каспазу 8 у НСТ-116 ћелијама.

Графикон 4. Активност каспазе 8 у НСТ-116 контролним ћелијама и ћелијама третираним екстрактима испитиваних биљака, концентрације 50 µg/ml, 24 сата након третмана.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Графикон 5. Активност каспазе 8 у НСТ-116 ћелијама, након **комбинованих третмана** екстрактима биљака и Pd(II) комплекса, 24 сата након третмана.

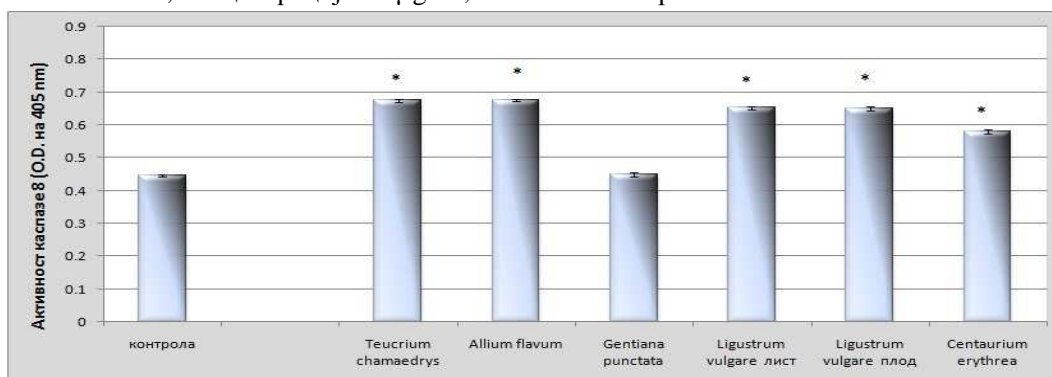


A+0.1 - *A. flavum* и 0.1 µM Pd(II) комплекс; A+10 - *A. flavum* и 10 µM Pd(II) комплекс; G+0.1 - *G. punctata* и 0.1 µM Pd(II) комплекс; G+10 - *G. Punctata* и 10 µM Pd(II) комплекс. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Pd(II) комплекс изазива највише повећање активности каспазе 8 у поређењу са контролним ћелијама и појединачним третманима екстрактима биљака (Графикон 5). У комбинованим третманима долази до повећања активности каспазе 8 у односу на контролу и појединачне третмане екстраката биљака и Pd(II) комплекса (Графикон 5).

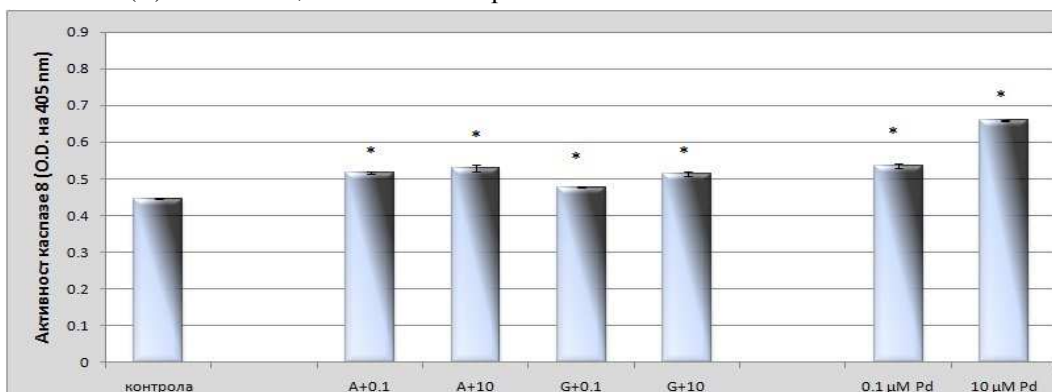
У **SW480 ћелијама** испитиване врсте биљака доводе до статистички значајног повећања активности каспазе 8 у односу на контролне ћелије, изузев екстракта биљке *G. punctata* (Графикон 6). Повећање активности каспазе 8 је у корелацији са проапоптотском активношћу, метанолни екстракти *T. chamaedrys*, *A. flavum* и *L. vulgare* изазивају највећу активност каспазе 8 (Графикон 6).

Графикон 6. Активност каспазе 8 у контролним SW480 ћелијама и ћелијама третираним екстрактима испитиваних биљака, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$, 24 сата након третмана.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Графикон 7. Активност каспазе 8 у SW480 ћелијама, након **комбинованих третмана** испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса, 24 сата након третмана.



A+0.1 - *A. flavum* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; A+10 - *A. flavum* и 10 μM Pd(II) комплекс; G+0.1 - *G. punctata* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; G+10 - *G. punctata* и 10 μM Pd(II) комплекс. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

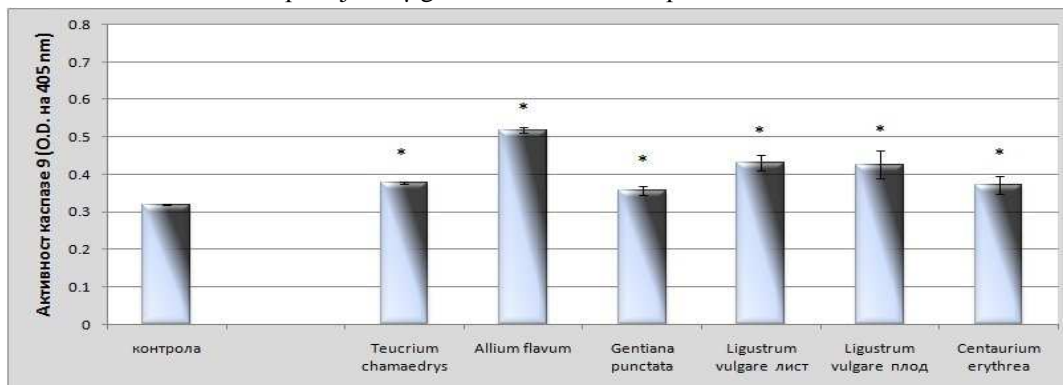
Pd(II) комплекс, у концентрацији 10 μM изазива највишу активност каспазе 8 (Графикон 6). У комбинованим третманима биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса активност каспазе 8 је мања у односу на појединачне третмане. У комбинованим третманима биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса активност каспазе 8 је већа у односу на појединачни третман биљком, а мања у односу на појединачни третман Pd(II) комплексом.

2.1.5. Активност каспазе 9

Резултати добијени мерењем активности каспазе 9, један од иницијаторских ензима унутрашњег апоптотског сигналног пута, у цитосолу контролних и третираних **НСТ-116** ћелија показују да испитиване врсте биљака доводе до повећања активности овог ензима у односу на контролне ћелије (Графикон 8). Активност каспазе 9 је у корелацији са цитотоксичношћу и

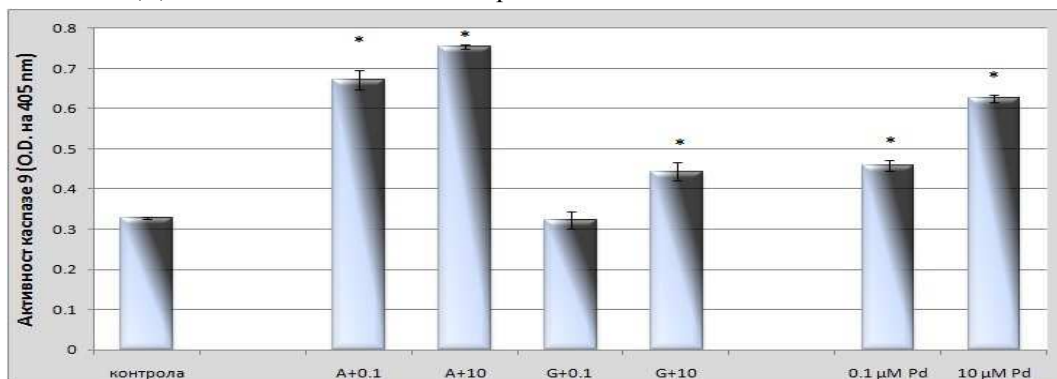
проапототском активношћу тестираних биљака: најјаче ефекте показују *A. flavum*, *T. chamaedrys* и *L. vulgare*, док је најмање повећање активности каспазе 9 евидентирано код третмана екстрактима биљака *C. erythraea* и *G. punctata*.

Графикон 8. Активност каспазе 9 у НСТ-116 контролним ћелијама и ћелијама третираним екстрактима испитиваних биљака, концентрације 50 $\mu\text{g/ml}$, 24 сата након третмана.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Графикон 9. Активност каспазе 9 у НСТ-116 ћелијама, након **комбинованих третмана** испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса, 24 сата након третмана.

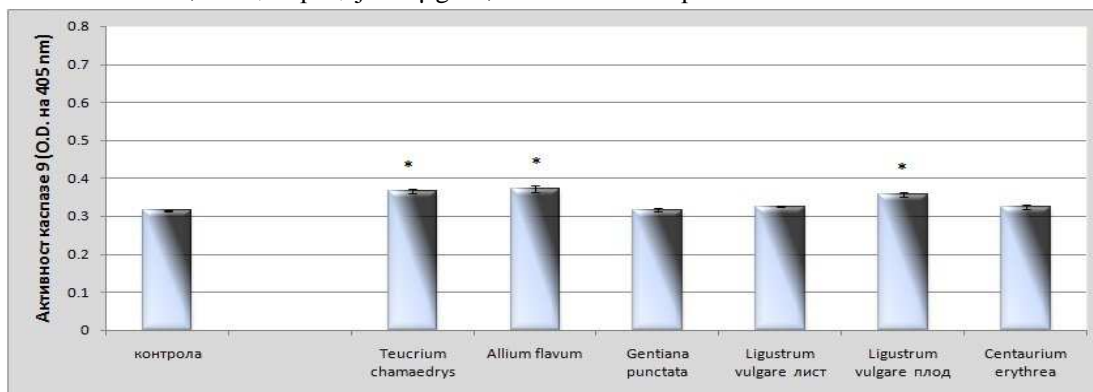


A+0.1 - *A. flavum* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; A+10 - *A. flavum* и 10 μM Pd(II) комплекс; G+0.1 - *G. punctata* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; G+10 - *G. Punctata* и 10 μM Pd(II) комплекс. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка

Pd(II) комплекс изазива највећу активност каспазе 9 (Графикон 9). У комбинованим третманима (Графикон 8) метанолним екстрактном биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса, активност каспазе 9 је већа у односу на појединачне третмане. Обрнута ситуација је у комбинованим третманима екстрактном биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса - активност каспазе 9 је мања у односу на појединачне третмане.

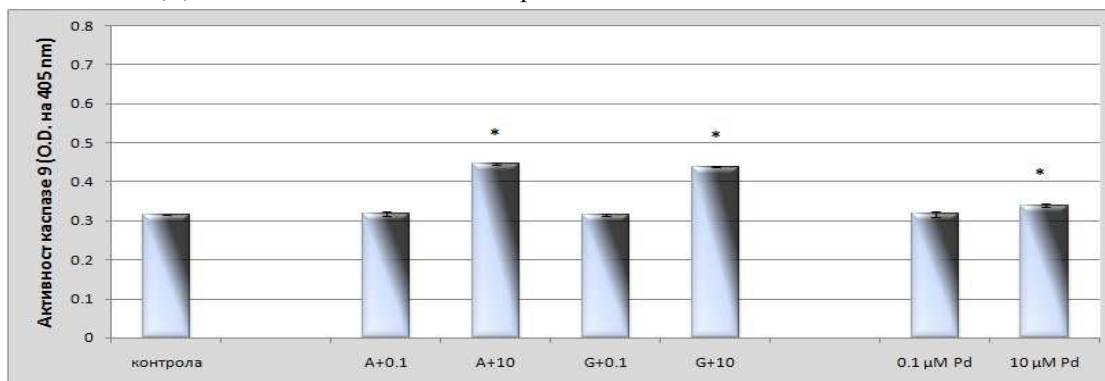
У **SW480** ћелијама све испитиване врсте биљака доводе до статистички значајног повећања активности каспазе 9 у односу на контролне ћелије (Графикон 10). Метанолни екстракт биљке *A. flavum* индукује највеће повећање активности каспазе 9.

Графикон 10. Активност каспазе 9 у контролним SW480 ћелијама и ћелијама третираним екстрактима испитиваних биљака, концентрације 50 µg/ml, 24 сата након третмана.



Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Графикон 11. Активност каспазе 9 у SW480 ћелијама, након **комбинованих третмана** испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса, 24 сата након третмана.



A+0.1 - *A. flavum* и 0.1 µM Pd(II) комплекс; A+10 - *A. flavum* и 10 µM Pd(II) комплекс; G+0.1 - *G. punctata* и 0.1 µM Pd(II) комплекс; G+10 - *G. punctata* и 10 µM Pd(II) комплекс. Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка

Pd(II) комплекс у концентрацији од 0.1 µM не доводи до значајних промена активности каспазе 9, док 10 µM концентрација Pd(II) комплекса значајно повећава активност овог ензима (Графикон 11). У комбинованим третманима биљака са 0.1 µM концентрацијом Pd(II) комплекса активност каспазе 9 је мања у односу на појединачне третмане биљака и Pd(II) комплексом (Графикон 11). У комбинованим третманима са 10 µM концентрацијом Pd(II) комплекса активност каспазе 9 је већа у односу на појединачне третмане.

2.2. Параметри прооксидационо/антиоксидационог статуса

У овом одељку представљени су резултати одговарајућих параметара редокс статуса у ћелијама третираним биљним екстрактима у појединачним и комбинованим третманима са Pd(II)

комплексом. Ови параметри обухватају концентрацију O_2^- , концентрацију нитрита, протеинску експресију iNOS и концентрацију GSH.

2.2.1. Концентрација супероксид анјон радикала

Концентрација O_2^- у контролним ћелијама и ћелијама третираним појединачним и комбинованим третманима биљних екстраката и Pd(II) комплексом одређивана је спектрофотометријски, након 24 и 72 сата.

Табела 19. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала (O_2^-), изражену у pmol/ml, **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 μg/ml	10 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	28.00±0.22	28.96±0.32	30.70±1.88*	33.28±0.08*	30.48±1.36*
	Е		28.09±0.40	28.60±0.04	29.52±1.28	28.28±0.12
	А		29.88±1.32	33.52±1.60*	36.52±1.48*	33.00±4.92*
<i>Allium flavum</i>	М		29.24±0.44	29.92±1.68	30.20±0.16*	31.48±0.88*
	Е		28.68±1.32	29.72±0.72	30.64±2.12*	30.44±1.00*
	А		40.08±2.08*	36.40±0.36*	31.64±0.04*	32.88±2.52*
<i>Gentiana punctata</i>	М		28.52±0.68	31.48±0.12*	28.88±0.08	30.05±0.96
	Е		29.68±0.48	28.56±0.24	29.12±0.16	29.56±0.20
	А		31.52±0.08*	31.76±0.24*	28.08±1.44	28.40±0.24
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		28.76±0.04	29.04±1.76	29.24±2.52	32.00±1.48*
	Е		30.84±0.28*	28.50±2.28	29.88±1.68	28.88±1.92
	А		30.10±2.00	32.76±0.36*	31.64±1.24*	28.60±1.40
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		33.20±1.36*	32.12±0.20*	36.04±0.12*	32.04±1.32*
	Е		38.56±1.92*	30.52±1.80*	35.00±3.96*	29.32±1.40
	А		33.28±1.22*	33.72±0.28*	33.20±3.52*	30.52±0.20*
<i>Centaurium erythraea</i>	М	30.91±1.16*	30.44±1.00*	29.24±0.14*	29.99±1.38	
	Е	30.16±0.32	31.84±1.04*	30.01±1.12	29.52±0.96	
	А	31.00±0.32*	30.01±0.12	29.44±1.54	29.44±0.16	

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли

Добијене вредности за контролне **НСТ-116 ћелије** и ћелије третиране биљним екстрактима су приказане у Табелама 19 и 20. Сви екстракти делују пророксидационо, односно изазивају повећање концентрације O_2^- , чак и до 30% у односу на контролне НСТ-116 ћелије, након 24 сата. Повећање концентрације O_2^- зависи од врсте биљке коришћене у третману и типа екстракта. Екстракти са добром цитотоксичношћу изазивају већу продукцију O_2^- у односу на биљке са слабом цитотоксичношћу, а највећу продукцију изазива ацетонски екстракт биљке *A. flavum*. Екстракти плодова биљке *L. vulgare*, такође, изазивају значајно повећање концентрације O_2^- .

Након 72 сата (Табела 20) поједине ниске концентрације биљних екстраката делују антиоксидационо и доводе до смањења концентрације O_2^- у односу на контролу, док високе делују

прооксидационо и повећавају O_2^- концентрацију. Концентрација O_2^- има незнатно ниже вредности у контролним ћелијама након 72 у односу на 24 сата. Када се упореде вредности концентрација O_2^- у два различита времена излагања у већини третмана постоји статистички значајна разлика. Уочавају се мање промене у концентрацији O_2^- између контролних и третираних ћелија након 72 у односу на 24 сата, односно јачи прооксидациони ефекат након 24 сата.

Табела 20. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала (O_2^-), изражену у pmol/ml, 72 сата након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	26.48±0.42	25.10±0.60#	27.00±0.68#	28.12±1.08#	30.24±0.40*
	E		25.84±0.08#	26.40±0.40	26.04±0.60#	27.16±0.44
	A		23.70±0.56*#	25.96±0.44#	27.52±1.84#	28.76±0.76#
<i>Allium flavum</i>	M		21.08±0.04*#	27.28±2.16#	26.76±0.04#	31.84±0.08*
	E		24.16±1.32#	23.80±0.76*#	25.00±0.52#	28.16±0.40#
	A		27.12±0.72#	28.40±0.88#	29.80±0.28*#	29.92±1.04*#
<i>Gentiana punctata</i>	M		25.64±0.12#	25.28±0.32#	25.72±0.04#	27.32±0.68#
	E		23.88±0.12*#	23.52±1.28*#	25.50±0.92#	26.60±1.40#
	A		21.80±1.80*#	23.70±0.64*#	26.60±1.08	25.88±0.36#
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	M		24.28±2.28#	26.04±1.24#	26.60±0.60#	28.48±0.80#
	E		26.88±0.48#	25.96±1.00#	26.88±0.32#	27.20±0.40
	A		27.24±0.84#	28.60±0.92#	28.40±0.40#	29.12±0.96
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	M		27.80±0.56#	28.80±0.8#	36.44±0.52*	30.76±0.04*
	E		28.40±1.04#	24.24±0.64#	27.48±0.44#	27.88±0.76
	A		27.44±3.04#	29.60±0.08#	28.84±0.36#	29.92±0.80*
<i>Centaurium erythraea</i>	M		23.80±0.56#	23.96±1.00#	24.84±0.28#	28.00±0.56#
	E		25.64±1.40#	24.76±1.64#	25.36±0.24#	27.32±1.96#
	A		27.92±0.08#	25.68±1.68#	27.52±1.92#	26.88±1.04#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Pd(II) комплекс индукује дозно зависно повећање концентрације O_2^- (чак 35% у концентрацији од 250 μM) у третираним НСТ-116 ћелијама у односу на контролне, након 24 и 72 сата (Табела 21). Повећање концентрације O_2^- у односу на контролне ћелије је мање након 72 у односу на 24 сата, осим у третману највишом испитиваном концентрацијом.

Табела 21. Ефекти Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала (O_2^-), изражену у pmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 μM	0.1 μM	10 μM	50 μM	250 μM
24 h	28.00±0.22	34.96±1.36*	36.16±0.52*	36.32±0.48*	39.24±0.04*
72 h	26.48±0.42	30.44±0.28*#	30.88±0.32*#	32.84±1.80*#	43.04±4.48*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Табела 22. Ефекти комбинованих третмана испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала (O_2^-), изражену у pmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 μg/ml	10 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml
24 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	28.00±0.22	32.20±0.60*	29.72±1.28	28.36±1.72	30.48±0.24
		E		29.56±0.28*	27.50±0.32	29.16±0.68	27.36±0.24
		A		30.60±0.52*	31.52±0.72*	30.44±0.76*	30.64±0.40*
	10	M		32.60±1.40*	32.19±0.48*	32.40±1.52*	34.12±0.68*
		E		34.44±0.28*	33.28±0.64*	32.48±0.96*	32.32±0.32*
		A		33.68±0.32*	32.60±0.28*	32.32±0.24*	32.24±0.08*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		32.72±0.68*	33.40±1.96*	34.00±1.20*	33.40±0.52*
		E		31.16±0.12*	30.92±1.96*	30.40±0.96*	29.08±0.92
		A		33.06±0.56*	34.08±0.56*	34.44±0.04*	36.44±2.20*
	10	M		32.96±0.40*	34.16±0.76*	34.92±0.76*	33.52±0.88*
		E		31.88±0.28*	33.28±0.24*	32.96±2.00*	32.88±0.72*
		A		33.80±0.68*	34.36±0.04*	36.36±1.24*	33.00±0.24*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	26.48±0.42	19.92±1.44*#	25.04±0.60#	25.60±0.40#	27.92±0.20#
		E		24.24±1.52*#	20.88±1.36*#	21.16±1.00*#	27.04±0.64
		A		28.44±0.21	25.36±0.08*#	29.64±0.84*	27.04±0.40#
	10	M		26.04±0.52#	25.48±0.28#	25.70±0.32#	28.60±1.00#
		E		28.32±0.08#	28.56±0.24#	26.40±0.32#	27.12±0.80#
		A		31.20±0.40*	27.44±0.16#	29.77±0.12*	27.08±0.80#
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		21.28±0.40*	21.68±0.08*	24.28±1.40*	23.88±0.12*
		E		24.80±0.18*	23.32±0.24*	23.22±0.08*	22.12±0.28*
		A		27.20±0.40	28.12±0.12*	28.80±0.56*	27.80±0.20*
	10	M		28.72±1.12*#	28.04±0.44*#	27.76±0.24#	27.14±1.00#
		E		27.40±0.04#	26.70±0.44#	28.08±0.64#	27.12±0.40#
		A		28.56±0.32*#	28.76±0.96*#	28.84±0.72*#	27.24±0.08#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Концентрације Pd(II) комплекса (0.1 и 10 μM концентрације) у појединачним третманима повећавају концентрацију O_2^- . Продукција O_2^- у комбинованим третманима је већа у односу на појединачне третмане након 24 сата. Након 72 сата поједини комбиновани третмани изазивају смањење концентрације O_2^- (Табела 22).

Табеле 23 и 24 приказују концентрације O_2^- у контролним **SW480 ћелијама** и ћелијама третираним биљним екстрактима. Све испитиване биљке делују пророксидационо, односно изазивају повећање концентрације O_2^- у односу на контролне SW480 ћелије, након 24 и 72 сата. Повећање продукције O_2^- зависи од врсте биљке коришћене у третману и типа екстракта и углавном је дозно зависно. Третмани екстрактима биљака које не показују цитотоксичне ефекте (*G. punctata*) или изазивају слабије цитотоксичне ефекте (*C. erythrea*) продукују ниже вредности O_2^- , за разлику од изузетно цитотоксичних екстраката биљака *A. flavum*, *T. chamaedry* и *L. vulgare*.

Табела 23. Ефекти екстраката испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), изражену у nmol/ml, **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	35.12±0.13	37.54±0.30	38.68±0.32*	39.28±0.80*	43.80±4.44*
	E		37.80±0.52*	37.88±2.52*	37.68±0.72	37.96±3.24*
	A		36.84±2.28	38.72±3.66*	38.20±1.72*	38.96±2.08*
<i>Allium flavum</i>	M		38.04±1.56*	38.32±0.88*	38.12±0.12*	43.20±4.32*
	E		36.84±0.60	38.04±0.68*	39.00±0.92*	38.92±0.66*
	A		38.36±1.32*	38.92±2.36*	40.28±0.52*	42.80±5.28*
<i>Gentiana punctata</i>	M		35.70±0.24	36.28±0.28	34.72±0.40	38.00±0.72*
	E		36.06±1.56	36.00±1.04	35.24±0.12	37.12±0.08
	A		37.72±1.68	37.73±0.52	37.48±0.04	38.52±0.12*
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	M		36.16±0.56	36.70±0.92	40.28±1.00*	39.24±1.56*
	E		36.76±0.04	36.84±0.36	39.64±0.44*	39.00±0.12*
	A		40.16±0.64*	40.32±0.24*	40.12±0.08*	41.36±1.76*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	M		38.16±0.16*	40.80±2.40*	41.12±0.96*	40.48±2.41*
	E		37.48±0.12	38.12±0.04*	40.44±1.40*	39.00±0.06*
	A		36.28±0.12	35.88±0.12	36.80±0.40	39.80±3.16*
<i>Centaurium erythrea</i>	M		35.48±1.24	35.28±0.72	35.92±0.52	38.56±1.08*
	E		35.28±0.88	35.10±0.04	35.04±0.16	36.88±0.12
	A		36.52±1.20	35.48±0.76	36.12±0.44	35.08±0.08

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Све вредности концентрације $O_2^{\cdot-}$ су статистички значајно ниже ($p<0.05$) у односу на вредности након 24 сата; * статистички значајна разлика ($p<0.05$) у односу на вредности у контроли

Табела 24. Ефекти екстраката испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), изражену у nmol/ml, **72 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	25.12±0.34	26.32±2.84	29.08±4.20*	28.80±1.44*	34.92±4.92*
	E		26.12±0.80	27.20±0.84	28.76±3.28*	29.08±2.92*
	A		25.95±0.80	26.53±0.44	27.70±0.56*	29.12±2.60*
<i>Allium flavum</i>	M		30.00±0.56*	30.80±1.20*	28.44±0.76*	44.92±3.08*
	E		28.48±0.96*	29.64±0.76*	27.96±0.60	25.80±1.32
	A		32.68±0.60*	29.52±1.20*	29.36±0.40*	30.04±0.36*
<i>Gentiana punctata</i>	M		25.84±1.28	26.80±0.32	26.20±1.88	27.44±2.36
	E		27.12±0.96	27.40±0.40	25.72±0.80	25.52±1.32
	A		26.04±0.80	28.52±0.68*	28.40±0.48	26.56±0.88
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	M		28.08±1.76*	30.04±1.16*	30.20±1.56*	35.64±1.96*
	E		31.84±1.60*	32.84±0.36*	29.24±0.76*	29.88±0.92*
	A		35.92±1.52*	33.72±0.20*	30.72±0.40*	34.48±0.88*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	M		28.76±1.92*	28.56±0.92*	29.44±0.96*	29.96±2.64*
	E		28.00±0.24	28.72±0.16*	29.24±1.32*	29.32±1.64*
	A		28.68±0.24*	28.12±0.28	30.70±1.52*	31.44±1.20*
<i>Centaurium erythrea</i>	M		25.56±0.16	26.80±0.88	23.08±3.00*	32.04±1.16*
	E		27.48±1.16	26.12±0.04	27.52±0.64	25.32±1.24
	A		33.72±1.48*	29.50±0.72*	31.00±1.32*	29.84±1.96*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. Све вредности концентрације $O_2^{\cdot-}$ су статистички значајно ниже ($p<0.05$) у односу на вредности након 24 сата; * статистички значајна разлика ($p<0.05$) у односу на вредности у контроли

Pd(II) комплекс изазива дозно и временски зависно повећање концентрације O_2^- у третираним у односу на контролне SW480 ћелије, након 24 и 72 сата (Табела 25). Ове промене су пропорционалне цитотоксичним ефектима Pd(II) комплекса. Концентрације O_2^- у контролним и ћелијама третираним Pd(II) комплексом након 72 сата су статистички значајно ниже у поређењу са вредностима након 24 сата.

Табела 25. Ефекти Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију супероксид анион радикала (O_2^-), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 μM	0.1 μM	10 μM	50 μM	250 μM
24 h	35.12±0.13	36.04±0.60	36.20±0.04	38.20±0.44*	40.60±1.24*
72 h	25.12±0.34#	26.84±0.44#	27.41±2.00*#	29.32±0.66*#	32.24±1.36*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Табела 26. Ефекти комбинованих третмана испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију супероксид анион радикала (O_2^-), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
24 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	35.12±0.13	37.44±0.80	37.80±0.12	36.68±1.08	42.64±3.60*
		E		38.24±0.48	38.20±1.20	39.04±0.68*	39.52±1.36*
		A		39.70±1.84*	39.12±0.48*	41.40±2.48*	43.72±0.76*
	10	M		39.16±1.56*	39.96±1.64*	50.04±1.15*	45.04±0.72*
		E		38.88±0.64*	38.64±0.24*	39.28±0.72*	38.88±0.64*
		A		39.96±0.66*	39.96±0.72*	39.52±0.64*	39.90±1.48*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		37.04±0.24	37.64±0.84	38.20±0.04	38.70±0.28*
		E		37.68±0.24	37.56±0.12	37.92±0.80	37.96±0.08
		A		37.96±0.48	38.16±0.04	37.80±0.20	38.96±0.44*
	10	M		38.80±0.16*	38.16±0.40	38.60±0.28*	39.12±0.12*
		E		39.40±0.20*	38.32±0.56	39.28±0.23*	39.56±0.36*
		A		37.84±0.64	38.20±0.68	38.94±1.24*	39.28±0.08*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	25.12±0.34	24.32±0.72	23.80±0.12	27.36±0.32	31.24±1.16*
		E		25.08±0.68	25.70±0.42	24.88±0.08	27.52±0.80
		A		29.70±0.64	27.88±0.92	25.90±0.20	28.72±0.64
	10	M		27.24±0.92	29.08±0.44	29.32±1.56	31.32±0.04*
		E		29.64±1.32	28.76±2.32	26.12±3.04	31.20±2.28*
		A		31.64±0.28*	27.09±0.76	27.48±1.64	29.70±0.40
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		25.96±1.72	28.16±0.04	25.72±0.68	23.96±0.76
		E		27.88±0.44	29.52±0.08	28.04±1.08	27.60±0.56
		A		31.24±0.44*	32.12±0.44*	31.24±0.68*	31.76±2.32*
	10	M		30.44±1.96	31.64±0.44*	32.88±0.24*	37.36±0.08*
		E		32.00±0.80	31.50±0.60*	29.68±0.40	30.04±1.08
		A		34.44±2.84*	32.32±0.96*	32.00±2.60*	32.92±0.12*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Pd(II) комплекс у концентрацијама 0.1 и 10 μM повећава ниво O_2^- у појединачним третманима на SW480 ћелијској линији. У комбинованим третманима уочава се већа продукција O_2^- у односу на појединачне третмане након 24 сата, док продужењем времена третмана (72 сата) поједини комбиновани третмани изазивају смањење концентрације O_2^- (Табела 26). Комбиновани третмани биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса показују слабија прооксидациона својства у односу на комбиноване третмане биљке *A. flavum*, што је у складу са цитотоксичним ефектима ових третмана. Када се упореде вредности концентрација O_2^- у два различита времена излагања у контролним ћелијама и комбинованим третманима постоји статистички значајно нижа концентрација O_2^- након 72 у поређењу са 24 сата.

2.2.2. Концентрација нитрита

Концентрација нитрита, као индикатора NO, у контролним и третираним ћелијама одређивана је спектрофотометријски, након 24 и 72 сата. Испитивани екстракти биљака доводе до смањења концентрација нитрита у третираним **НСТ-116 ћелијама** у односу на контролне ћелије (Табеле 27 и 28). Смањење концентрације нитрита је углавном дозно зависно и зависи од врсте биљке коришћене у третману и типа екстракта.

Табела 27. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml , **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	18.43±0.23	13.37±1.43*	12.34±1.21*	11.37±0.25*	11.20±0.09*
	Е		17.01±1.23	15.87±0.31*	12.58±0.51*	11.53±0.98*
	А		17.59±2.57	14.21±0.17*	12.33±0.72*	11.42±0.51*
<i>Allium flavum</i>	М		14.04±0.09*	13.03±1.18*	10.21±0.55*	10.96±1.70*
	Е		16.32±0.94	14.53±0.76*	13.59±0.09*	13.21±0.20*
	А		16.05±2.64	15.58±0.91*	15.03±1.45*	14.79±0.69*
<i>Gentiana punctata</i>	М		12.54±0.53*	11.50±0.91*	12.96±1.11*	10.98±0.11*
	Е		13.32±0.81*	15.65±0.49	13.74±0.92*	14.64±1.40*
	А		15.49±0.47*	15.51±0.89	13.03±0.33*	12.38±0.04*
<i>Ligustrum vulgare</i> - листови	М		14.75±1.47*	15.26±0.46*	15.98±1.86	15.23±0.20*
	Е		18.09±0.91	14.15±0.69*	16.43±0.46	15.28±0.29*
	А		17.79±0.76	17.79±1.20	16.41±1.41	14.32±0.20*
<i>Ligustrum vulgare</i> - плодови	М	15.06±1.72*	15.73±2.32*	14.57±0.67*	10.48±0.25*	
	Е	15.38±0.62*	14.62±0.04*	13.90±0.58*	14.08±0.87*	
	А	14.80±1.23*	14.46±0.15*	16.18±0.93	12.49±0.29*	
<i>Centaurium erythrea</i>	М	14.12±0.36*	14.19±0.29*	14.01±0.46*	14.48±0.13*	
	Е	17.91±0.58	14.84±0.09*	14.54±0.20*	14.46±0.20*	
	А	17.44±0.53	16.41±0.04	15.99±0.96*	14.59±0.11*	

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Концентрација нитрита има незнатно ниже вредности у контролним ћелијама након 72 у односу на 24 сата, а сличне су промене и у третираним НСТ-116 ћелијама.

Табела 28. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml, **72 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	16.18±0.36	11.50±0.02*#	10.90±0.93*#	10.10±0.26*	10.88±0.02*
	Е		13.88±0.20#	12.87±0.53*#	12.13±0.49*	9.92±1.11*#
	А		16.45±0.31	15.94±0.24	13.01±0.55*	10.52±0.47*
<i>Allium flavum</i>	М		14.03±0.26*	13.05±1.25*	10.01±0.13*	10.62±0.11*
	Е		16.09±0.58	13.25±0.23*	13.45±1.83*	11.86±0.51*
	А		14.64±1.40	14.79±1.38	13.30±0.24*	12.94±0.60*
<i>Gentiana punctata</i>	М		15.42±0.40#	12.95±0.82*	13.13±0.80*	12.89±2.32*
	Е		15.44±0.55	13.94±1.34*	13.36±0.80*	12.53±0.55*
	А		11.93±0.80*#	15.09±1.49	14.48±0.49	14.32±0.20*
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		11.33±0.02*#	11.01±1.63*#	10.13±0.38*#	10.52±0.87*#
	Е		12.96±1.61*#	12.41±0.09*	13.41±0.89*#	10.48±0.15*#
	А		13.09±0.76*#	14.50±1.49#	14.12±0.40	12.05±0.02*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		11.35±0.53*#	11.07±0.60*#	12.01±0.13*	11.75±0.58*
	Е		11.60±0.67*#	11.86±0.11*#	13.21±0.02*	10.83±1.36*#
	А		14.50±0.02*	14.08±0.58*	14.35±1.34*	12.58±0.02*
<i>Centaurium erythraea</i>	М		10.97±0.96*#	12.09±0.69*	12.31±1.23*	12.00±1.16*
	Е		13.34±1.14*#	12.65±0.67*	12.04±0.20*	10.12±0.20*#
	А		13.27±0.93*#	14.71±1.79	10.99±1.20*#	11.48±1.87*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

Pd(II) комплекс у нижим концентрацијама (0.1 µM) смањује ниво нитрита или нема значајнијег утицаја, док више концентрације повећавају концентрацију нитрита у односу на контролу (Табела 29).

Табела 29. Ефекти Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 µM	0.1 µM	10 µM	50 µM	250 µM
24 h	18.43±0.23	16.94±0.58	18.14±0.11	22.60±1.49*	22.58±2.53*
72 h	16.18±0.36	14.02±0.23*#	16.92±0.58	16.98±0.39#	19.25±0.36*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

У комбинованим третманима, 0.1 µM концентрација Pd(II) комплекса показује бољи ефекат на снижавање концентрације нитрита у односу на појединачне третмане биљним екстрактима, док је овај ефекат слабији у комбинованим третманима са 10 µM Pd(II) комплексом. Након 72 сата комбиновани третмани углавном показују слабије ефекте на смањење

концентрације нитрита у односу на 24 сата и појединачне третмане биљним екстрактима (Табела 30).

Табела 30. Ефекти **комбинованих третмана** испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 μg/ml	10 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	18.43±0.23	12.76±0.38*	14.44±1.11*	11.01±0.15*	11.31±0.24*
		E		13.72±0.85*	11.66±0.04*	10.36±0.22*	10.50±0.93*
		A		13.52±0.20*	13.03±0.42*	10.68±0.09*	11.33±0.09*
	10	M		18.87±0.77	14.24±0.51*	13.68±1.47*	12.53±0.73*
		E		16.05±0.53	16.94±0.93	14.95±0.24*	13.97±1.18*
		A		19.70±0.15	14.50±1.06*	16.57±1.45	15.60±0.13*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		11.06±0.04*	10.07±0.69*	10.54±0.02*	10.51±0.38*
		E		14.75±0.62*	14.21±0.85*	11.82±0.02*	9.90±0.35*
		A		13.12±0.07*	12.60±0.35*	10.80±0.02*	9.90±0.35*
	10	M		15.33±0.51*	14.28±1.58*	13.65±0.91*	13.59±0.67*
		E		15.12±0.22*	14.28±1.58*	13.83±0.40*	12.53±0.51*
		A		19.45±4.06*	14.65±1.54*	13.72±0.38*	14.22±1.45*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	16.18±0.36	11.89±0.09*	11.68±0.24*#	10.39±0.55*	10.85±0.11*
		E		14.84±1.07	15.94±0.15#	12.78±0.35*#	12.51±0.53*
		A		12.06±0.04*	12.20±0.58*	12.04±0.02*	12.94±0.51*
	10	M		14.32±0.91*	13.49±0.25*	13.03±0.64*	12.47±1.02*
		E		17.23±0.73	13.36±0.31*#	13.30±0.15*	11.63±0.51*#
		A		14.57±1.56#	12.74±0.13*	11.62±0.22*#	13.97±0.38*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		14.71±1.02#	13.21±0.02*#	14.28±0.24#	13.48±0.78*#
		E		16.29±0.83	16.25±0.20	14.77±0.65#	14.61±0.38#
		A		16.79±0.40#	16.09±0.44#	13.92±1.14*#	13.07±0.04*#
	10	M		14.33±1.16	12.31±0.02*	14.28±0.24	13.34±0.92*
		E		16.61±0.82	16.25±0.20	14.73±0.77	14.01±0.38
		A		16.76±0.48#	16.53±0.41	13.92±1.14*	13.25±0.47*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

Испитивани екстракти биљака изазивају дозно зависно смањење концентрације нитрита у третираним **SW480 ћелијама** у односу на контролне ћелије након 24 и 72 сата (Табеле 31 и 32). Концентрације нитрита имју статистички значајно ниже вредности у контролним и третираним ћелијама након 72 у односу на 24 сата.

Табела 31. Ефекти екстракта испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у $\mu\text{mol/ml}$, **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	20.26±0.52	18.35±1.05	17.52±0.85*	15.31±0.02*	14.95±0.38*
	Е		19.09±0.49	16.45±2.86*	17.48±1.20*	13.27±0.04*
	А		18.70±1.36	18.22±0.06	17.88±2.22*	15.44±0.15*
<i>Allium flavum</i>	М		17.70±0.49*	17.79±0.08*	12.81±1.09*	11.82±0.73*
	Е		15.04±1.36*	14.10±0.05*	13.09±0.98*	11.19±0.87*
	А		14.95±0.17*	14.39±0.40*	13.21±0.87*	13.14±0.35*
<i>Gentiana punctata</i>	М		17.50±0.92*	16.67±0.85*	15.02±0.67*	10.88±1.67*
	Е		19.87±0.07	17.91±0.62*	17.23±0.24*	13.83±0.15*
	А		20.20±0.35	19.87±0.20	20.01±0.02	15.67±0.69*
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		18.17±0.63	14.91±1.58*	13.88±0.69*	11.97±2.55*
	Е		18.15±0.49	16.43±0.91*	11.89±0.93*	12.71±1.76*
	А		15.16±2.82*	15.00±0.31*	14.97±1.47*	13.15±1.25*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		16.99±0.36*	16.74±1.63*	14.08±0.44*	13.25±0.20*
	Е		11.08±0.04*	14.39±0.40*	13.21±0.87*	13.14±0.36*
	А		17.52±0.42*	19.54±0.02	17.79±2.91*	15.56±0.36*
<i>Centaurium erythrea</i>	М		14.55±0.11*	13.43±0.46*	13.38±1.67*	11.33±0.20*
	Е		19.54±0.04	19.96±0.02	16.41±2.30*	15.53±1.23*
	А		17.55±1.99*	16.81±1.11*	16.80±0.61*	16.18±1.21*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Табела 32. Ефекти екстракта испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у $\mu\text{mol/ml}$, **72 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	11.42±0.40#	10.43±0.02*#	10.42±0.21*#	10.12±0.20*#	10.52±0.47*#
	Е		10.51±0.03*#	10.45±0.04*#	10.18±0.13*#	10.10±0.25*#
	А		11.30±0.58#	10.48±0.47*#	10.15±0.34*#	10.34±0.24*#
<i>Allium flavum</i>	М		10.36±0.26*#	9.89±0.29*#	10.11±0.03*#	10.12±0.31*
	Е		9.83±0.22*#	10.14±0.09*#	10.23±0.22*#	10.21±0.20*
	А		10.03±0.25*#	10.15±0.44*#	9.92±0.27*#	10.02±0.26*#
<i>Gentiana punctata</i>	М		11.11±0.12#	10.04±0.51*#	10.58±0.42*#	10.11±0.31*#
	Е		11.01±0.05#	11.01±0.13#	10.52±0.21*#	10.30±0.48*#
	А		11.05±0.28#	11.01±0.13#	10.58±0.14#	10.91±0.23#
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		10.49±0.10#	10.16±0.20#	10.27±0.18#	10.30±0.11
	Е		10.18±0.13#	10.22±0.23#	9.93±0.26#	9.81±0.09#
	А		10.40±0.32#	10.17±0.24#	10.03±0.11#	9.51±0.07#
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		10.11±0.48*#	11.04±0.11#	11.33±0.20#	10.48±0.29*#
	Е		10.30±0.02*#	11.15±0.03#	10.99±0.18#	10.74±0.07#
	А		10.01±0.11*	10.74±0.13#	10.74±0.02#	10.50±0.13*#
<i>Centaurium erythrea</i>	М		11.40±0.16#	10.54±0.18#	10.05±0.22*#	10.02±0.06*
	Е		10.40±0.37*#	10.37±0.32*#	10.08±0.23*#	10.16±0.29*#
	А		10.31±0.16*#	10.21±0.02*#	10.46±0.26*#	10.37±0.28*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Након 24 сата Pd(II) комплекс снижава концентрацију нитрита у третираним SW480 ћелијама у односу на контролу (Табела 33), док након 72 сата више концентрације Pd(II) комплекса доводе до благог повећања концентрације нитрита у односу на контролне ћелије, супротно од ефеката биљних екстраката. Комбиновани третмани показују слабије ефекте на смањење концентрације нитрита у односу на појединачне третмане екстрактима биљака и Pd(II) комплексом (Табела 34).

Табела 33. Ефекти Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 μM	0.1 μM	10 μM	50 μM	250 μM
24 h	20.26 \pm 0.52	10.68 \pm 0.04*	14.75 \pm 1.07*	16.32 \pm 2.82*	16.82 \pm 0.22*
72 h	11.42 \pm 0.40#	10.72 \pm 0.04	11.45 \pm 0.04#	11.68 \pm 0.02*#	12.75 \pm 0.35*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

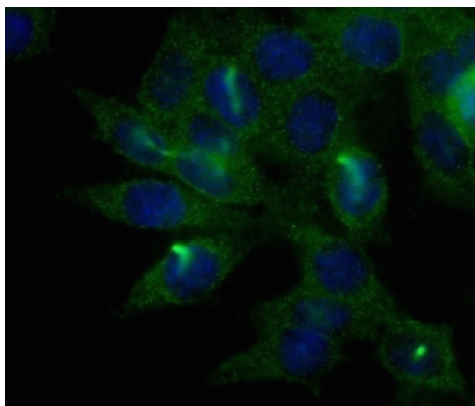
Табела 34. Ефекти комбинованих третмана испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију нитрита, изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	20.26 \pm 0.52	19.27 \pm 0.22*	19.23 \pm 0.22*	18.89 \pm 0.29*	19.29 \pm 0.15*
		E		19.36 \pm 0.22*	19.34 \pm 0.20*	19.07 \pm 0.24*	19.18 \pm 0.04*
		A		19.38 \pm 0.06*	19.09 \pm 0.64*	19.11 \pm 0.29*	18.98 \pm 0.20*
	10	M		19.59 \pm 0.07	19.45 \pm 0.31*	19.23 \pm 0.13*	19.40 \pm 0.09*
		E		19.09 \pm 0.08*	18.09 \pm 0.31*	18.85 \pm 0.15*	19.98 \pm 0.11
		A		19.72 \pm 0.09	18.85 \pm 0.15*	18.67 \pm 0.78*	18.35 \pm 0.16*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		19.34 \pm 0.25*	18.91 \pm 0.04*	18.85 \pm 0.29*	18.11 \pm 0.11*
		E		19.27 \pm 0.45*	19.07 \pm 0.25*	19.14 \pm 0.04*	19.16 \pm 0.07*
		A		19.14 \pm 0.35*	19.00 \pm 0.22*	19.07 \pm 0.42*	19.11 \pm 0.51*
	10	M		19.27 \pm 0.13*	19.11 \pm 0.02*	19.81 \pm 0.09	19.07 \pm 0.13*
		E		19.47 \pm 0.06*	19.34 \pm 0.17*	19.85 \pm 0.13	19.65 \pm 0.02
		A		19.18 \pm 0.04*	19.05 \pm 0.18*	19.40 \pm 0.22*	19.36 \pm 0.18*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	11.39 \pm 0.25#	10.14 \pm 0.04*#	9.89 \pm 0.15*#	10.39 \pm 0.11*#	10.17 \pm 0.35*#
		E		10.45 \pm 0.53*#	10.72 \pm 0.17*#	10.34 \pm 0.33*#	10.27 \pm 0.08*#
		A		11.15 \pm 0.02#	10.57 \pm 0.69*#	10.27 \pm 0.22*#	9.89 \pm 0.29*#
	10	M		10.70 \pm 0.24#	10.34 \pm 0.07*#	10.34 \pm 0.33*#	10.88 \pm 0.07#
		E		10.58 \pm 0.28*#	10.54 \pm 0.35*#	10.41 \pm 0.26*#	10.36 \pm 0.13*#
		A		10.97 \pm 0.02*#	10.59 \pm 0.26*#	10.16 \pm 0.02*#	9.56 \pm 0.40*#
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		10.90 \pm 0.67#	11.33 \pm 0.07#	10.70 \pm 0.20*#	10.55 \pm 0.14*#
		E		11.75 \pm 0.49#	11.76 \pm 1.11#	10.48 \pm 1.18*#	10.48 \pm 0.16*#
		A		11.75 \pm 0.76#	11.59 \pm 0.07#	10.81 \pm 0.49#	11.42 \pm 0.04#
	10	M		10.30 \pm 0.42*#	9.96 \pm 0.13*#	10.77 \pm 0.58#	10.43 \pm 0.07*#
		E		10.63 \pm 0.34*#	10.48 \pm 0.16*#	11.03 \pm 0.04#	10.72 \pm 0.04#
		A		10.34 \pm 0.24*#	10.21 \pm 0.24*#	11.20 \pm 0.22#	9.87 \pm 0.31*#

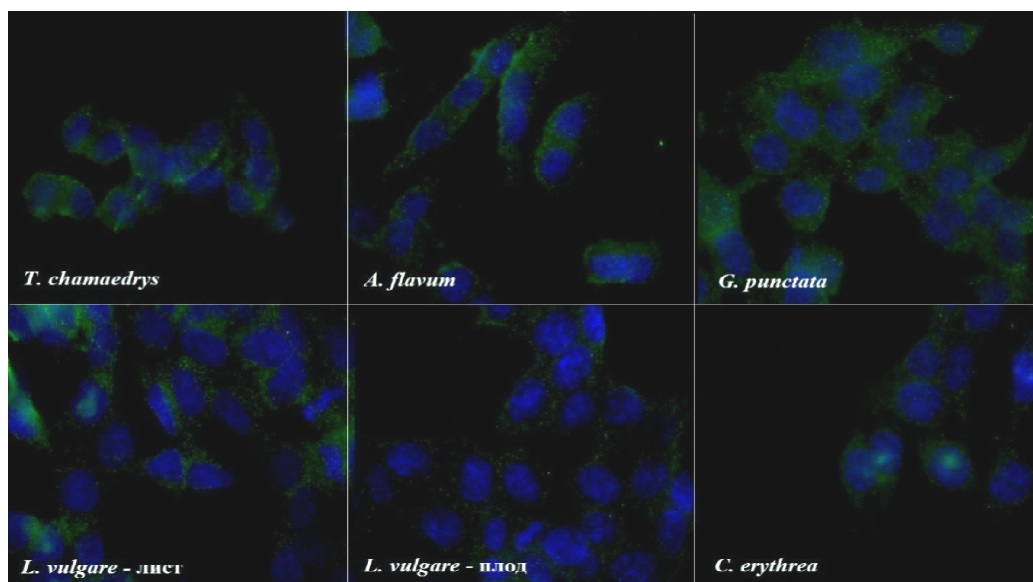
Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

2.2.3. Протеинска експресија iNOS

Протеинска експресија iNOS, ензима који ендогено синтетише NO, одређивана је имунофлуоресценцом и на Слици 25 је приказана експресија у нетретираним **НСТ-116 ћелијама**. Након 24 сата трајања третмана метанолним екстрактима биљака долази до смањења експресије iNOS у односу на нетретиране НСТ-116 ћелије (Слика 26), што је у корелацији са резултатима концентрације нитрита (у третманима где је ниво нитрита значајно смањен и експресија iNOS је смањена). Најслабија редукција протеинске експресије iNOS је у третману метанолним екстрактом биљке *G. punctata*.

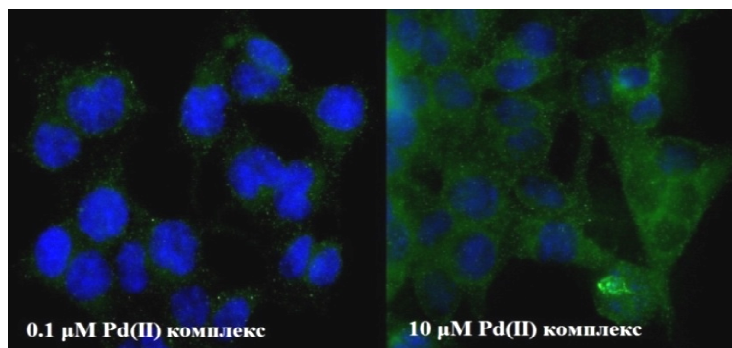


Слика 25. iNOS протеинска експресија у НСТ-116 **контролним** (нетретираним) **ћелијама**. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увељичању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS рецептори зелено (секундарно антитело Alexa448).

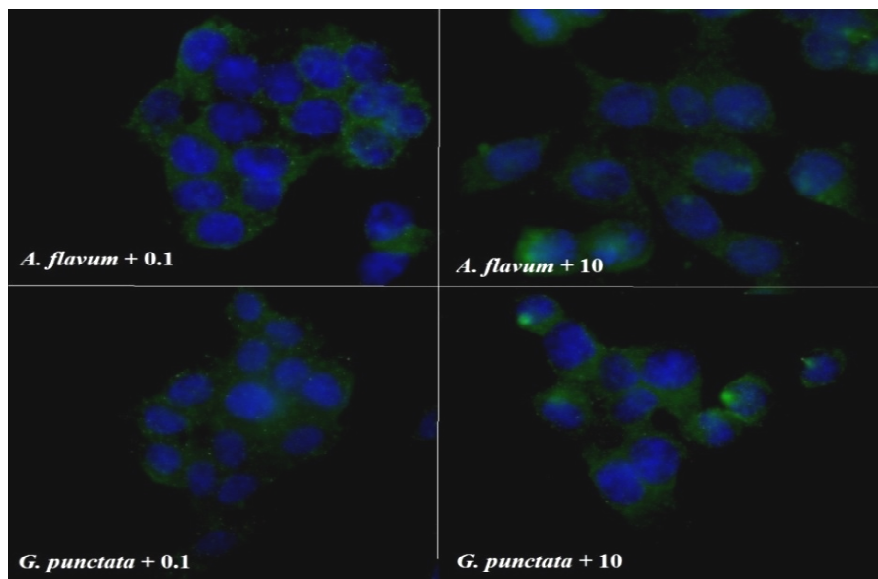


Слика 26. iNOS протеинска експресија у НСТ-116 ћелијама третираним метанолним екстрактима испитиваних **врста биљака** (50 µg/ml). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увељичању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антитело Alexa448).

Pd(II) комплекс у концентрацији од 0.1 μM , такође, смањује експресију iNOS у односу на контролу, али у мањој мери у поређењу са третманима биљним екстрактима. Pd(II) комплекс, концентрације 10 μM не доводи до значајне промене протеинске експресије iNOS у односу на контролу, што је у складу са концентрацијом нитрита у НСТ-116 ћелијама (Слика 27).



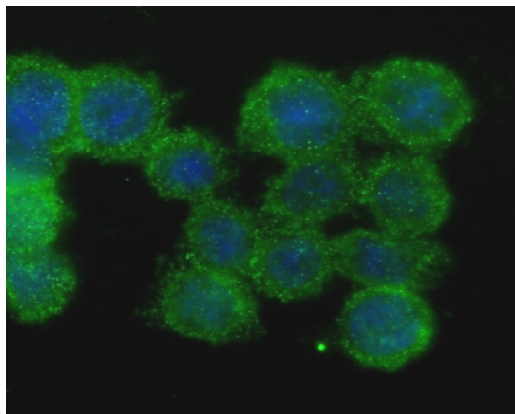
Слика 27. iNOS протеинска експресија у НСТ-116 ћелијама третираним различитим концентрацијама Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 \times , након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антителио Alexa448).



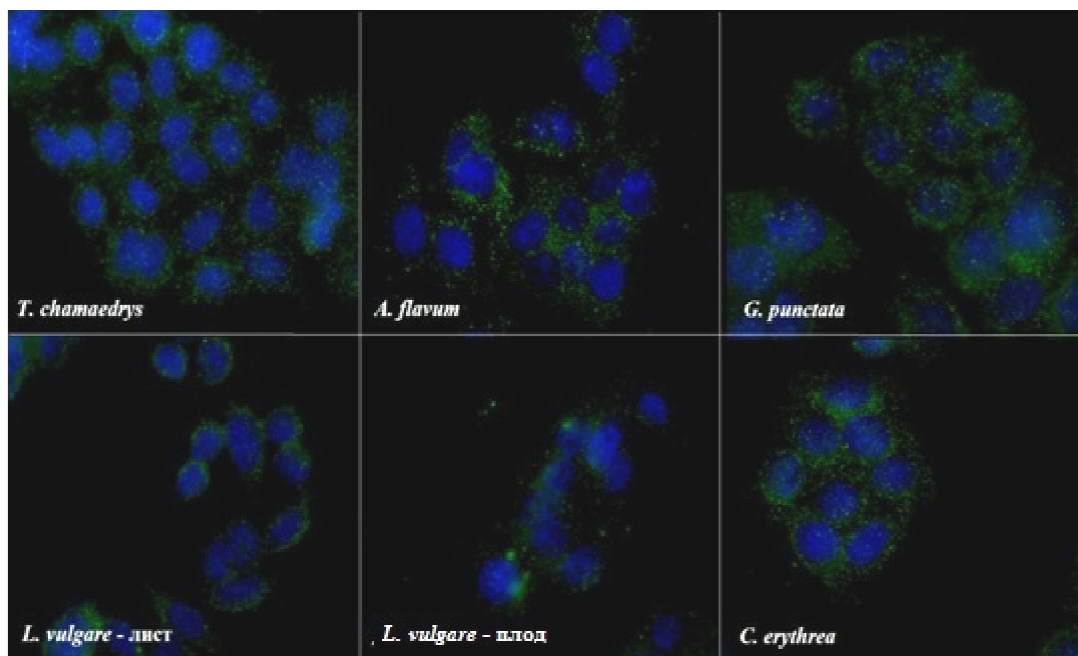
Слика 28. Протеинска експресија iNOS у НСТ-116 ћелијама након **комбинованих третмана** са 50 $\mu\text{g/ml}$ метанолним екстрактима испитиваних врста биљака и различитим концентрацијама Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600 \times , након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антителио Alexa448).

Комбиновани третмани доводе до редукције iNOS протеинске експресије у односу контролне НСТ-116 ћелије, али је та редукција слабија у односу на појединачне третмане биљкама (Слика 28).

У контролним **SW480 ћелијама** јавља се висока протеинска експресија iNOS (Слика 29). Након третмана метанолним екстрактима биљака у SW480 ћелијама долази до значајног смањења експресије iNOS (Слика 30). Најслабија редукција протеинске експресије iNOS је у третману метанолним екстрактом биљке *G. punctata*.

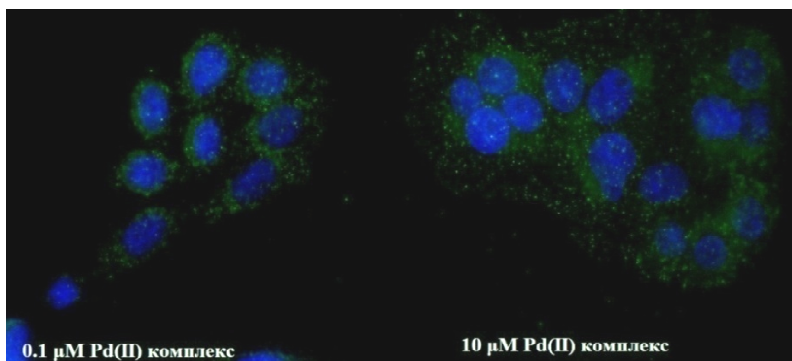


Слика 29. iNOS протеинска експресија у SW480 **контролним** (нетретираним) **ћелијама**. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS рецептори зелено (секундарно антитело Alexa448).



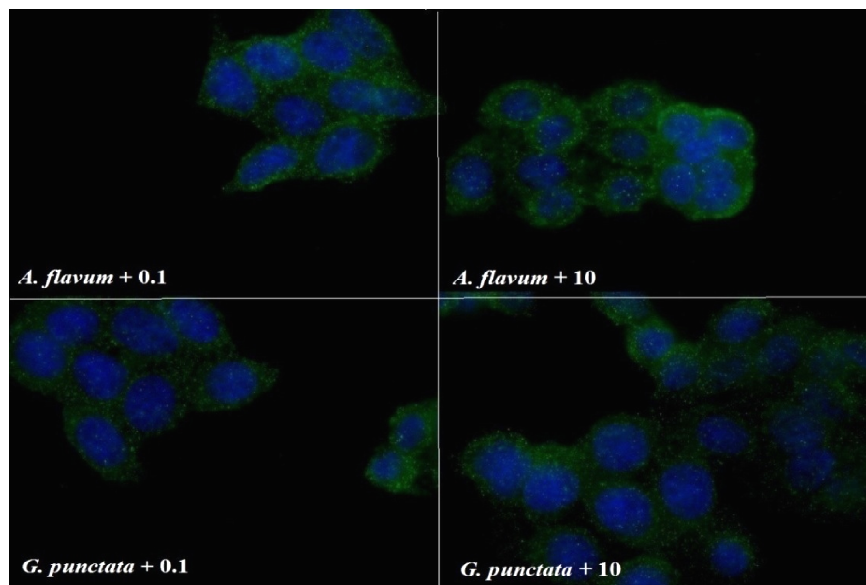
Слика 30. iNOS протеинска експресија у SW480 ћелијама третираним метанолним екстрактима испитиваних **врста биљака** (50 µg/ml). Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антитело Alexa448).

Испитиване концентрације Pd(II) комплекса (Слика 31) такође доводе до редукције експресије iNOS што је пропорционално смањењу концентрације нитрита.



Слика 31. iNOS протеинска експресија у SW480 ћелијама третираним различитим концентрацијама Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антитело Alexa448).

Комбиновани третмани (Слика 32) доводе до редукције iNOS протеинске експресије у односу на контролне SW480 ћелије, али је та редукција слабија у односу на појединачне третмане.



Слика 32. Протеинска експресија iNOS у SW480 ћелијама након **комбинованих третмана** са 50 μg/ml метанолним екстрактима испитиваних врста биљака и различитим концентрацијама Pd(II) комплекса. Сlike су добијене на флуоресцентном микроскопу, на увеличању 600×, након 24 сата инкубације са третманом. Једра су обојена плаво (DAPI боја), а iNOS зелено (секундарно антитело Alexa448).

2.2.4. Концентрација глутатиона

Концентрација редукованог глутатиона, молекула укљученог у антиоксидациону заштиту ћелија и метаболизам ксенобиотика, у контролним и третираним **НСТ-116 ћелијама** одређивана је спектрофотометријски. Третмани екстрактима биљака повећавају концентрацију GSH у односу на контролне ћелије, након 24 и 72 сата (Табеле 35 и 36).

Табела 35. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у pmol/ml, **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	15.09±0.30	16.01±1.49	17.35±2.19	15.95±0.79	15.57±2.26
	Е		23.91±2.46*	18.15±0.82*	17.80±1.87*	15.31±0.54
	А		31.01±1.91*	21.87±2.26*	25.70±1.17*	22.86±1.97*
<i>Allium flavum</i>	М		16.11±1.71	16.81±1.01	15.71±0.35	16.12±0.07
	Е		21.46±1.59*	16.94±1.14	22.57±0.35*	18.21±1.46*
	А		24.29±2.19*	19.23±0.06*	21.01±2.48*	23.94±3.24*
<i>Gentiana punctata</i>	М		21.21±0.12*	19.39±2.19	16.24±0.89	16.87±1.08
	Е		21.49±1.17*	20.85±3.02*	21.43±0.03*	18.21±0.95*
	А		22.48±1.52*	23.78±1.56*	22.00±0.15*	22.03±0.31*
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		18.37±0.16*	16.21±0.35	18.08±0.32	19.04±0.38*
	Е		22.42±1.33*	20.19±0.38*	20.17±1.17*	20.31±1.78*
	А		25.28±0.57*	25.57±1.17*	21.21±0.89*	23.8±0.60*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		21.49±3.40*	20.57±2.22*	17.32±0.06*	16.56±0.22
	Е		22.32±0.22*	15.94±0.09	20.44±0.38*	16.36±0.19
	А		23.0±0.15*	19.55±2.42*	20.12±0.38*	19.59±1.14*
<i>Centaurium erythraea</i>	М		17.96±0.57*	19.50±0.11*	15.85±0.13	16.97±0.03
	Е		18.59±0.38*	17.48±0.03	17.13±1.01	16.40±0.98
	А		21.46±2.10*	21.43±3.91*	20.09±1.56*	19.96±0.06*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли

Повећање концентрације GSH зависи од врсте биљке коришћене у третману и типа екстракта. Ацетонски екстракт изазива највеће промене у концентрацији GSH у поређењу са метанолним и етилацетатним. Промене концентрације GSH иду чак и до 50% у односу на контролу у третману ацетонским екстрактом биљке *T. chamaedrys* концентрације 10 µg/ml. Повећање концентрације GSH је углавном обрнуто сразмерно концентрацији екстракта. Када се упореде концентрације GSH у испитиваним временима, постоје статистички значајне разлике у вредностима, које су у зависности од врсте третмана ниже или више.

Табела 36. Ефекти екстраката испитиваних биљака на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, 72 сата након третмана.

Биљка	Екстракт	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	М	15.85±0.12	20.15±3.18*#	20.12±0.12*#	18.31±2.83*#	18.20±0.03*#
	Е		17.84±2.54#	18.50±0.28*	17.10±0.60	18.59±0.44*#
	А		20.44±2.55*#	20.36±1.65*	18.59±1.46*#	19.03±2.40*#
<i>Allium flavum</i>	М		20.25±2.80*#	19.90±0.73#	18.59±0.19*#	17.80±0.54
	Е		20.20±0.29*	19.82±0.23#	18.40±2.22*#	18.17±1.56*
	А		23.59±0.97*	23.50±0.82*#	18.87±0.41*#	20.95±0.95*#
<i>Gentiana punctata</i>	М		16.11±0.19#	17.73±1.75#	16.24±0.13	16.08±0.09
	Е		16.92±1.24#	17.16±2.45#	18.78±0.63*#	16.24±1.59
	А		17.42±0.66#	20.2±1.24*#	17.07±0.63#	18.91±3.31*#
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	М		20.47±0.98*#	20.03±0.85*#	18.91±0.06*	17.80±1.36
	Е		21.65±0.06*	21.45±1.84*	23.50±1.71*#	20.95±0.76*
	А		23.53±0.60*#	23.31±0.31*#	23.97±1.36*#	22.70±1.49*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	М		19.58±0.98*	17.70±0.06#	19.80±1.71*	17.03±1.81
	Е		22.55±1.68*	18.78±1.71*#	20.15±0.15*	15.98±0.38
	А		16.94±0.25#	17.70±2.29	20.47±3.08*	16.52±0.28#
<i>Centaurium erythrea</i>	М		21.17±1.30*#	20.22±2.32*#	19.42±1.65#	18.08±0.44*
	Е		21.57±0.12*#	20.9±1.65*#	20.71±1.14*#	19.72±0.25*#
	А		23.18±2.67*	19.84±1.75*	20.49±0.38*	19.74±4.14*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

Pd(II) комплекс у ниским концентрацијама доводи до повећања концентрације GSH, близу 50%, а само највиша концентрација снижава ниво GSH у НСТ-116 ћелијама након 24 и 72 сата (Табела 37).

Табела 37. Ефекти Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 µM	0.1 µM	10 µM	50 µM	250 µM
24 h	15.09±0.30	27.54±0.73*	23.40±0.16*	23.38±2.22*	14.36±0.03*
72 h	15.85±0.12	23.63±0.19*#	21.62±1.24*	17.83±0.13#	14.03±0.16*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

Ефекти комбинованих третмана на повећање концентрације GSH су бољи у односу на ефекте појединачних третмана. Након 24 сата, комбиновани третмани доводе до повећања концентрације GSH у односу на контролу, док након дужег времена (72 сата) поједини комбиновани третмани (са екстрактима биљке *G. punctata*) доводе до незнатног смањења нивоа GSH у односу на контролу (Табела 38). Поређењем различитих времена излагања ћелија комбинованим третманима, уочавају се ниже вредности концентрација GSH након 72 у односу на 24 сата.

Табела 38. Ефекти **комбинованих третмана** испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 μg/ml	10 μg/ml	50 μg/ml	100 μg/ml	250 μg/ml
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	15.09±0.30	20.25±1.08*	16.01±0.41	16.46±1.36	15.57±0.16
		E		22.80±1.44*	22.20±0.92*	23.62±1.71*	21.01±2.73*
		A		25.47±2.61*	23.05±1.27*	22.14±1.87*	24.11±1.56*
	10	M		21.81±0.98*	21.78±0.12*	20.60±1.43*	18.47±1.80
		E		21.08±3.69*	22.54±0.38*	21.77±0.19*	20.00±1.33
		A		28.78±0.28*	27.01±0.82*	22.77±0.03*	22.83±0.03*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		23.05±1.40*	21.59±0.70*	18.94±0.54	20.15±0.03*
		E		23.96±0.13*	24.17±0.79*	20.00±2.92*	21.40±1.40*
		A		25.92±2.29*	27.07±0.31*	26.33±1.30*	26.59±1.94*
	10	M		24.26±2.10*	17.86±0.60	24.90±0.06*	19.96±0.41*
		E		28.44±0.54*	24.49±1.62*	25.31±1.11*	21.84±0.76*
		A		28.89±1.84*	23.53±0.79*	23.47±0.22*	20.80±1.52*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	15.85±0.12	23.88±1.46*#	23.98±1.17*#	18.02±2.42	20.15±1.71#
		E		19.52±0.54#	18.66±2.67#	16.40±3.02#	17.42±0.35#
		A		21.54±2.01#	23.51±3.00	18.13±1.97#	19.26±2.89#
	10	M		21.07±2.77	19.24±1.08	18.43±3.28	20.12±2.99
		E		21.08±0.57*	24.52±2.50*	20.15±2.32*	21.94±1.56*
		A		29.45±2.51*	24.77±0.31*#	20.66±0.28*#	22.99±0.06*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		16.99±1.08#	17.63±0.82#	17.33±0.06	17.29±0.03#
		E		19.24±3.94#	14.68±2.67#	16.87±0.50#	14.96±0.25#
		A		21.87±0.47*#	24.17±0.79*#	18.63±3.40#	16.46±0.73#
	10	M		22.00±0.03*	18.50±1.49	18.81±2.92#	18.21±0.70
		E		24.33±0.70*#	19.77±0.60*#	17.91±0.57#	15.95±0.42#
		A		21.07±1.20#	18.46±1.43#	18.18±0.22#	17.51±0.13#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Промене у концентрацији GSH у контролним **SW480 ћелијама** и ћелијама третираним екстрактима биљака зависе од врсте биљке и типа екстракта (Табела 39). Екстракти биљке која не изазива цитотоксичне ефекте (*G. punctata*) и биљке са slabим цитотоксичним ефектима (*C. erythraea*) доводе до повећања концентрације, док биљке са добрим цитотоксичним ефектима углавном доводе до смањења концентрације GSH у односу на контролу. Највеће промене у концентрацији GSH изазива ацетонски екстракт у поређењу са метанолним и етилацетатним. Када се упореде концентрације GSH у испитиваним временима, постоје статистички значајне разлике у вредностима, које су у зависности од врсте третмана ниже или више.

Табела 39. Ефекти екстракта испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, **24 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	18.21±0.12	16.21±0.66	13.78±0.24*	15.19±0.13*	15.35±0.32*
	E		16.24±0.60	15.82±0.21*	16.84±0.13	16.36±0.06*
	A		19.61±0.13	17.10±0.89	17.16±0.87	19.07±0.41
<i>Allium flavum</i>	M		17.45±1.08	16.01±0.13*	15.15±0.03*	14.93±0.99*
	E		15.41±0.66	18.53±0.54	14.87±0.20*	13.24±0.10*
	A		16.75±0.81	16.51±0.11*	16.59±0.82	14.29±1.40*
<i>Gentiana punctata</i>	M		28.31±2.80*	19.29±1.91	19.38±2.28	19.87±2.12
	E		20.06±0.89*	26.94±0.07*	21.94±1.62*	17.54±2.19
	A		27.67±0.79*	23.43±0.25*	19.42±1.74	20.09±1.36*
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	M		21.52±0.82*	20.98±0.41*	16.15±1.08*	16.65±0.54
	E		21.11±0.60*	21.40±1.01*	18.05±1.77	17.99±1.56
	A		21.68±1.87*	20.38±2.10	25.09±1.59*	23.82±1.40*
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	M		17.96±0.63	17.16±0.92	17.40±1.56	15.22±0.19*
	E		18.28±0.31	16.78±0.54	16.87±1.59	15.19±0.03*
	A		24.90±1.52	21.62±1.62	19.96±0.28	17.77±0.50
<i>Centaurium erythraea</i>	M		23.02±0.76	21.57±0.41	27.29±0.22	20.22±0.47
	E		24.88±0.22	21.25±1.27	20.19±1.91	25.57±1.81
	A		21.68±1.17	22.51±1.11	21.97±0.19	24.52±2.10

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли

Табела 40. Ефекти екстракта испитиваних биљака на SW480 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, **72 сата** након третмана.

Биљка	Екстракт	0 µg/ml	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	250 µg/ml
<i>Teucrium chamaedrys</i>	M	17.13±0.02	16.52±1.30	17.46±1.89#	15.76±1.75	15.63±0.02
	E		18.21±0.63	19.49±0.63#	19.22±0.82#	18.66±1.13
	A		21.11±1.05	21.40±1.01#	21.33±1.40*#	20.98±1.03*
<i>Allium flavum</i>	M		20.19±1.14*#	17.57±0.03	16.28±0.38	15.73±1.81
	E		21.78±0.18*#	20.41±1.42*	20.41±1.10*#	15.47±0.63
	A		21.94±1.13*#	19.97±1.15*#	19.68±1.39*#	19.29±1.97#
<i>Gentiana punctata</i>	M		16.94±1.31#	15.12±0.79#	15.92±0.25#	14.49±0.73*#
	E		19.01±0.03	20.25±0.19*#	17.45±1.12#	15.98±1.46
	A		19.84±0.30*#	18.85±0.25#	22.00±1.93*#	19.29±1.33
<i>Ligustrum vulgare</i> -листови	M		25.25±0.98*#	21.84±1.88*	19.74±0.63*#	18.34±1.01
	E		20.38±0.13*	18.85±1.01#	19.58±0.03	18.94±0.68
	A		23.47±0.09*	22.07±0.35*	22.51±1.05*#	19.07±0.85#
<i>Ligustrum vulgare</i> -плодови	M		19.87±0.57*	18.45±1.19	18.47±1.27	15.54±1.01*
	E		20.44±1.46*	18.63±1.64	18.78±0.20	13.88±1.65*
	A		18.63±0.22#	14.23±0.60*#	17.51±1.73	13.56±0.19*#
<i>Centaurium erythraea</i>	M		15.41±0.57#	15.73±1.46#	16.62±0.57#	18.37±0.12
	E		20.36±1.16*#	15.85±1.71#	23.53±1.85*#	15.98±0.19#
	A		24.26±1.69*#	23.34±1.17*	24.01±1.97*#	21.40±1.94*#

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента ± стандардна грешка. * статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика (p<0.05) у односу на вредности након 24 сата

Pd(II) комплекс у најнижој концентрацији доводи до повећања нивоа GSH, док више концентрације снижавају GSH у SW480 ћелијама у испитиваним временима (Табела 41).

Табела 41. Ефекти Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Pd(II) комплекс	0 μM	0.1 μM	10 μM	50 μM	250 μM
24 h	18.21 \pm 0.12	20.54 \pm 0.73*	20.57 \pm 0.73*	17.38 \pm 0.38	15.50 \pm 0.66*
72 h	17.13 \pm 0.02	19.55 \pm 0.82*	16.62 \pm 0.19#	14.77 \pm 0.89*#	14.52 \pm 0.76*

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Табела 42. Ефекти комбинованих третмана испитиваних биљака и Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији на концентрацију редукованог глутатиона (GSH), изражену у nmol/ml, 24 и 72 сата након третмана.

Биљка	Pd (μM)	Екстракт	0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	18.21 \pm 0.12	23.59 \pm 0.16*	18.18 \pm 0.15	19.84 \pm 1.62	16.78 \pm 1.24
		E		19.17 \pm 0.66	21.05 \pm 0.98*	14.61 \pm 0.92*	23.82 \pm 0.95*
		A		20.66 \pm 1.11*	19.64 \pm 1.81	16.95 \pm 1.05	16.33 \pm 2.07
	10	M		20.26 \pm 0.57	23.59 \pm 1.13*	19.42 \pm 0.06	19.70 \pm 0.52*
		E		20.79 \pm 1.07*	19.93 \pm 0.67	22.22 \pm 0.63*	19.71 \pm 1.5
		A		29.42 \pm 2.23*	25.15 \pm 2.24*	22.03 \pm 2.18*	21.27 \pm 2.16*
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		18.43 \pm 0.47	19.84 \pm 0.22	20.19 \pm 1.01	23.59 \pm 1.85*
		E		15.82 \pm 0.35*	15.12 \pm 0.41*	21.05 \pm 1.81*	20.03 \pm 0.16
		A		19.49 \pm 0.38	19.58 \pm 0.47	22.10 \pm 0.89*	20.22 \pm 0.16
	10	M		20.00 \pm 1.16	25.25 \pm 0.92*	20.79 \pm 1.68*	20.82 \pm 0.44*
		E		25.66 \pm 1.25*	21.21 \pm 0.93*	24.80 \pm 1.66*	19.96 \pm 1.68
		A		27.19 \pm 1.50*	24.01 \pm 1.56*	20.82 \pm 0.76*	21.62 \pm 1.72*
72 h							
<i>Allium flavum</i>	0.1	M	17.13 \pm 0.02	18.53 \pm 1.78#	15.66 \pm 0.76#	15.76 \pm 0.60#	14.55 \pm 0.09*
		E		17.16 \pm 0.03	17.07 \pm 1.07#	18.15 \pm 1.12#	15.09 \pm 0.25*#
		A		15.31 \pm 1.94#	17.11 \pm 1.68	15.25 \pm 1.24*	16.43 \pm 1.65
	10	M		22.00 \pm 1.17*	19.42 \pm 1.94*#	15.41 \pm 1.03#	13.91 \pm 1.11*#
		E		18.28 \pm 1.35	17.16 \pm 0.85	18.30 \pm 0.96#	15.06 \pm 1.17*#
		A		19.07 \pm 0.98#	18.66 \pm 1.54#	18.34 \pm 1.05#	15.12 \pm 0.73#
<i>Gentiana punctata</i>	0.1	M		17.57 \pm 1.21	15.19 \pm 0.28#	18.56 \pm 1.21	18.40 \pm 1.40#
		E		20.38 \pm 1.91*#	20.9 \pm 0.50*#	22.07 \pm 0.28*	20.09 \pm 1.83*
		A		22.07 \pm 0.73*#	19.80 \pm 0.70*	23.43 \pm 0.82*	20.22 \pm 0.22*
	10	M		19.58 \pm 1.87*	15.92 \pm 1.12#	18.98 \pm 0.31	15.63 \pm 0.09#
		E		17.57 \pm 0.76#	16.65 \pm 1.24#	19.36 \pm 1.01#	16.33 \pm 0.35#
		A		20.88 \pm 0.71#	19.47 \pm 0.57#	23.18 \pm 0.07#	20.91 \pm 0.13

Резултати су представљени као средња вредност из 3 независна експеримента \pm стандардна грешка. * статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности у контроли; # статистички значајна разлика ($p < 0.05$) у односу на вредности након 24 сата

Након 24 сата, ефекти комбинованих третмана (Табела 42) екстраката биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса на повећање концентрације GSH су бољи у односу на појединачне третмане биљним екстрактима, док су након дужег времена излагања (72 сата) ови ефекти слабији. Ефекти комбинованих третмана екстраката биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса на повећање нивоа GSH бољи су у односу на појединачне третмане биљним екстрактима у оба испитивана времена.

Поређењем различитих времена излагања ћелија третману, уочавају се статистички значајне промене, у смислу повећања или снижавања концентрације GSH, у зависности од врсте третмана.

2.3. Испитивање експресије информационе РНК гена укључених у биотрансформационе процесе

У појединачним и комбинованим третманима, након 24 сата, испитиван је ниво експресије информационе РНК (иРНК) гена, чији су протеински производи укључених у метаболизам и транспорт антитуморских лекова у односу на нетретираних ћелија, као и у односу на β -actin као позитивне контроле у испитиваним узорцима.

2.3.1. Експресија β -actin-a

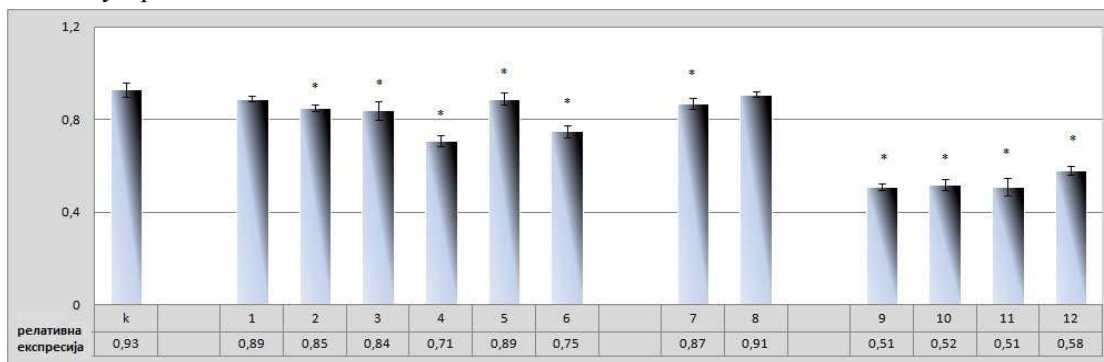
Експресија β -actin-a (позитивна контрола) праћена је у свим испитиваним узорцима (контролним НСТ-116 и SW480 ћелијама, као и у појединачним и комбинованим третманима). Резултати показују да је експресија иРНК β -actin-a стабилна, односно подједнако експримирана у свим испитиваним узорцима. Информациона РНК β -actin-a је приближно исто експримирана у различитим ћелијским линијама. Релативна експресија *CYP1A1*, *GSTP1* и *MRP2* је прерачуната у односу на експресију β -actin-a.

2.3.2. Експресија *CYP1A1*

Резултати релативне експресије показују да је иРНК *CYP1A1* гена, чији је протеински производ укључен у метаболизам лекова, високо експримирана у **НСТ-116 ћелијама** и представља чак 93% у односу на експресију β -actin-a у контролним ћелијама. Ниво иРНК експресије *CYP1A1* гена, у контролним НСТ-116 и ћелијама третираним екстрактима биљака представљен је на Графикону 12. Екстракт биљке *T. chamaedrys* не изазива статистички значајне промене иРНК експресије *CYP1A1*, за разлику од осталих биљака које статистички значајно смањују ниво експресије у односу на контролу, као и Pd(II) комплекс у концентрацији од 0.1 μ M. Pd(II) комплекс 10 μ M концентрације не доводи до битних промена у експресији *CYP1A1*.

У комбинованим третманима *CYP1A1* иРНК експресија је значајно инхибирана у односу на контролу и појединачне третмане (Графикон 12).

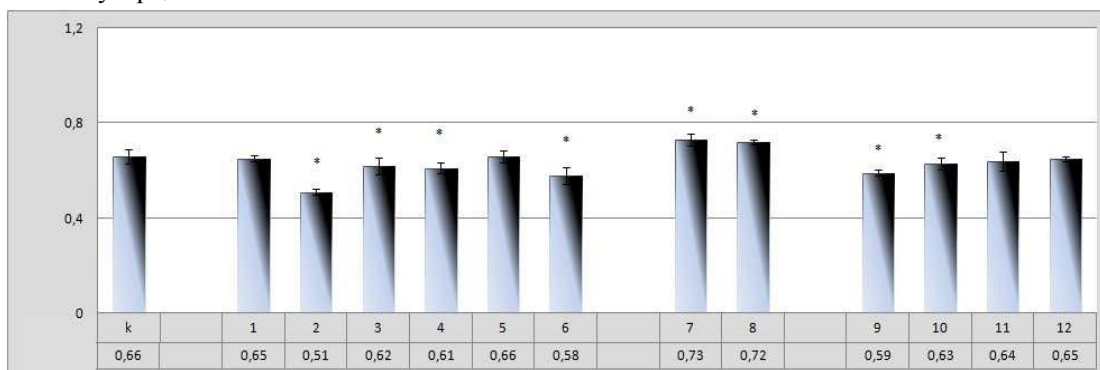
Графикон 12. Вредности експресије *CYP1A1* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **НСТ-116** ћелијама 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију β -actin-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.



k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 – 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 8 – 10 μ M Pd(II) комплекс; 9 – *A. flavum* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 10 – *A. flavum* и 10 μ M Pd(II) комплекс; 11 – *G. punctata* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 12 – *G. punctata* и 10 μ M Pd(II) комплекс

Релативна експресија иРНК *CYP1A1* гена у **SW480** ћелијама је мања у односу на релативну експресију у НСТ-116 ћелијама, представља 66% у односу на експресију β -actin-а у контролним ћелијама.

Графикон 13. Вредности експресије *CYP1A1* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **SW480** ћелијама 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију β -actin-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.



k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 – 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 8 – 10 μ M Pd(II) комплекс; 9 – *A. flavum* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 10 – *A. flavum* и 10 μ M Pd(II) комплекс; 11 – *G. punctata* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 12 – *G. punctata* и 10 μ M Pd(II) комплекс

Екстракти биљака *T. chamaedrys* и плодова биљке *L. vulgare* не доводе до промене експресије *CYP1A1*, док је у свим осталим третманима екстрактима биљака експресија

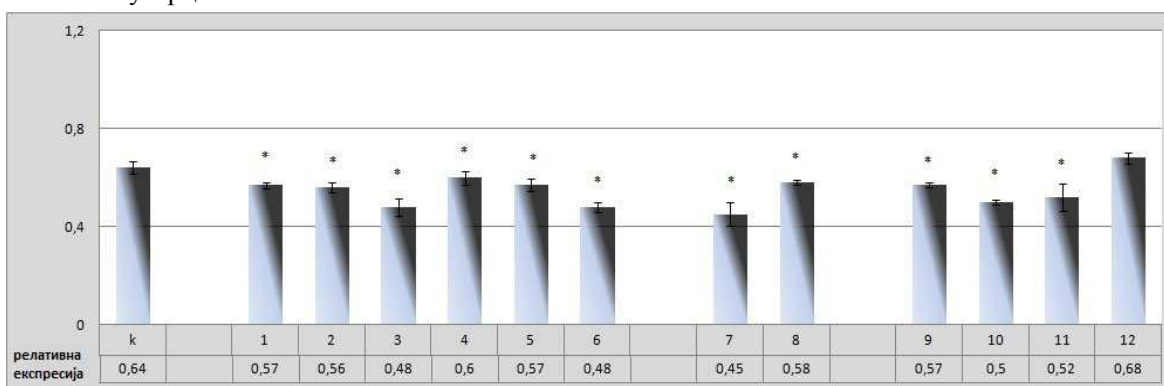
статистички значајно смањена у односу на контролне SW480 ћелије (Графикон 13). Pd(II) комплекс изазива повећање експресија *CYP1A1* иРНК у односу на контролу.

У комбинованим третманима *CYP1A1* експресија је инхибирана у односу на контролу. *A. flavum* у комбинованим третманима показује боље ефекте на смањење експресије у односу на комбиноване третмане са биљком *G. punctata*. Ефекти комбинованих третмана на инхибицију *CYP1A1* експресије бољи су у односу на ефекте појединачних третмана Pd(II) комплексом (Графикон 13).

2.3.3. Експресија *GSTP1*

Резултати релативне експресије показују да је иРНК *GSTP1* гена, чији је протеински продукт укључен у метаболизам ксенобиотика уз GSH као кофактор, експримирана у **НСТ-116 ћелијама** и представља 64% у односу на експресију β -*actin*-а у контролним ћелијама. Експресија *GSTP1* иРНК је статистички значајно инхибирана у ћелијама третираним биљним екстрактима у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Графикон 14). Најбољи ефекат на инхибицију *GSTP1* експресије показују третмани екстрактима биљака са slabим цитотоксичним ефектима, *G. punctata* и *C. erythrea*, што је у корелацији са највећим нивоом GSH. Обе коришћене концентрације Pd(II) комплекса инхибирају експресију *GSTP1* у односу на контролу и изазивају повећање нивоа GSH у третираним НСТ-116 ћелијама.

Графикон 14. Вредности експресије *GSTP1* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **НСТ-116 ћелијама** 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију β -*actin*-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.



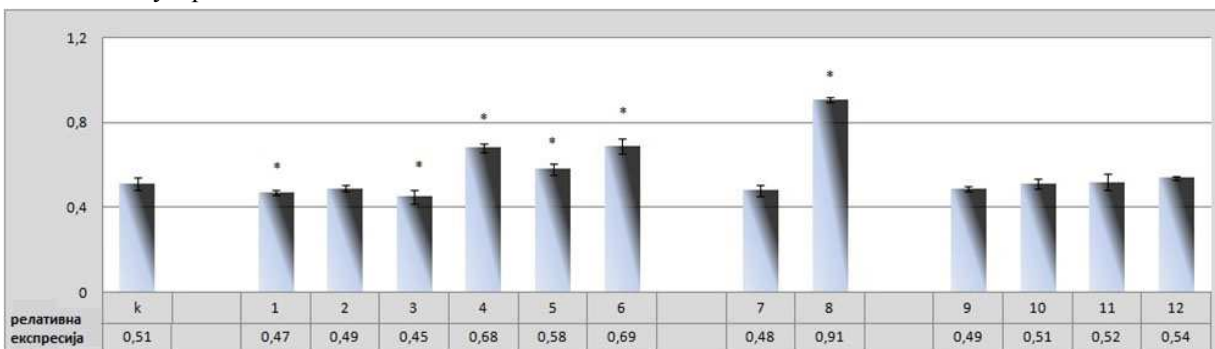
k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 - 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 8 - 10 μ M Pd(II) комплекс; 9 - *A. flavum* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 10 - *A. flavum* и 10 μ M Pd(II) комплекс; 11 - *G. punctata* и 0.1 μ M Pd(II) комплекс; 12 - *G. punctata* и 10 μ M Pd(II) комплекс

Комбиновани третмани инхибирају *GSTP1* иРНК експресију у односу на контролу, изузев комбинованог третмана биљке *G. punctata* и 10 μM концентрације Pd(II) комплекса. Комбиновани третмани изивају слабије ефекте на инхибицију *GSTP1* експресије у односу на појединачне третмане, са изузетком комбинованог третмана биљке *A. flavum* и 10 μM концентрације Pd(II) комплекса (Графикон 14).

Релативна иРНК експресија *GSTP1* гена у **SW480 ћелијама** је нешто нижа у односу на релативну експресију у НСТ-116 ћелијама и представља 51% у односу на експресију β -*actin*-а у контролним ћелијама. Резултати *GSTP1* експресије у SW480 ћелијама показују да екстракти биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum* и *G. punctata* инхибирају, док екстракт биљке *C. erythrea* и екстракти листова и плодова биљке *L. vulgare* стимулишу експресију *GSTP1* (Графикон 15). Концентрација GSH у ћелијама третираним екстрактима биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum* и *G. punctata* је смањена у односу на контролу, док је у третманима екстрактом биљке *C. erythrea* и екстрактима листова и плодова биљке *L. vulgare* повећана у односу на контролу (Табела 39).

Испитиване концентрације Pd(II) комплекса инхибирају *GSTP1* иРНК експресију и повећавају ниво GSH у односу на контролу. Комбиновани третмани не доводе до статистички значајних промена иРНК експресије *GSTP1* гена у односу на контролу, али показују боље инхибиторне ефекте у односу на третман 10 μM концентрациом Pd(II) комплекса. Остали комбиновани третмани изивају слабије ефекте на инхибицију *GSTP1* експресије у односу на појединачне (Графикон 15).

Графикон 15. Вредности експресије *GSTP1* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **SW480 ћелијама** 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију β -*actin*-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.



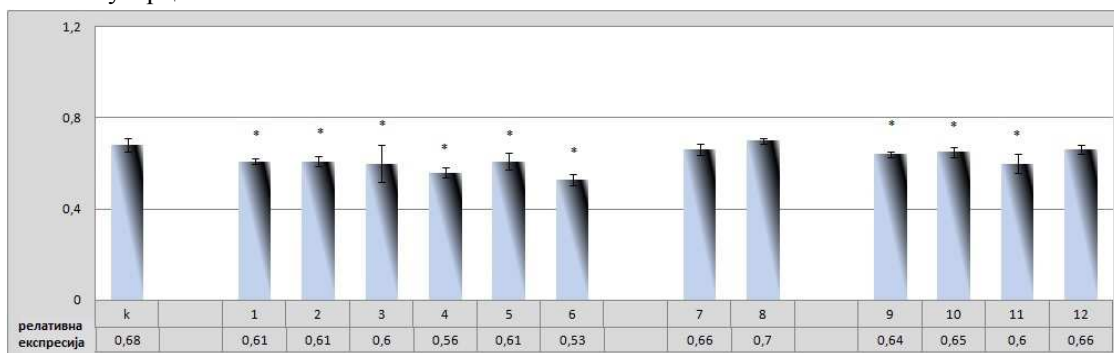
k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 – 0.1 μM Pd(II) комплекс; 8 – 10 μM Pd(II) комплекс; 9 – *A. flavum* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 10 – *A. flavum* и 10 μM Pd(II) комплекс; 11 – *G. punctata* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 12 – *G. punctata* и 10 μM Pd(II) комплекс

2.3.4. Експресија *MRP2*

MRP2 протеин је један од мембранских АВС транспортера одговорних за избацивање ксенобиотика, као и антитуморских супстанци из ћелије, па је у даљем испитивању праћена експресија иРНК *MRP2* гена одговорног за овај протеин. Резултати релативне експресије показују да је иРНК *MRP2* гена експримирана у **НСТ-116 ћелијама** и представља 68% у односу на експресију *β-actin*-а у контролним ћелијама. Екстракти биљака статистички значајно инхибирају *MRP2* иРНК експресију у односу на контролне НСТ-116 ћелије (Графикон 16). Pd(II) комплекс не доводи до битних промена у експресији *MRP2* у односу на контролне ћелије.

У комбинованим третманима, експресија *MRP2* је инхибирана у односу на контролу и у односу на ефекте Pd(II) комплекса у појединачним третманима (Графикон 16).

Графикон 16. Вредности експресије *MRP2* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **НСТ-116 ћелијама** 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију *β-actin*-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.

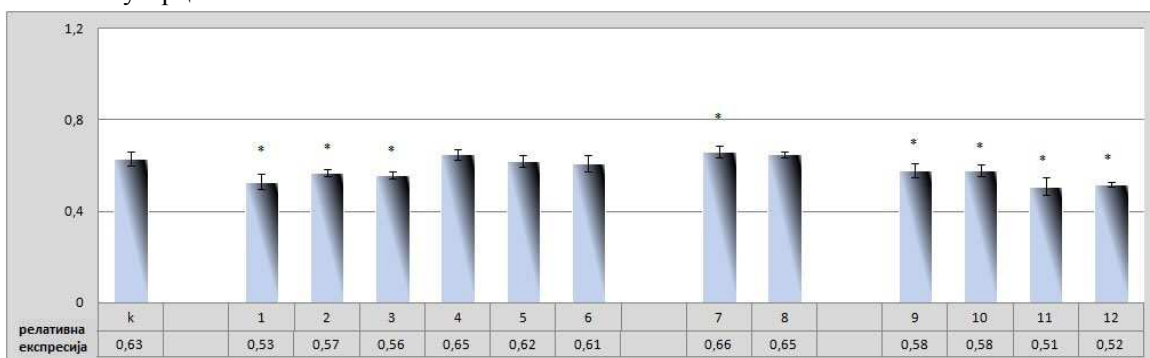


k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 – 0.1 μM Pd(II) комплекс; 8 – 10 μM Pd(II) комплекс; 9 – *A. flavum* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 10 – *A. flavum* и 10 μM Pd(II) комплекс; 11 – *G. punctata* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 12 – *G. punctata* и 10 μM Pd(II) комплекс

Релативна иРНК експресије *MRP2* гена у **SW480 ћелијама** је нешто нижа у односу на релативну експресију у НСТ-116 ћелијама и представља 63% у односу на експресију *β-actin*-а у контролним ћелијама. Екстракти биљака *T. chamaedrys*, *A. flavum* и *G. punctata* статистички значајно инхибирају експресију *MRP2* иРНК у односу на контролне **SW480 ћелије** (Графикон 17), екстракт листова биљке *L. vulgare* повећава експресију *MRP2*, док екстракти плодова биљке *L. vulgare* и *C. erythrea* не доводе до статистички значајних промена. Pd(II) комплекс изазива повећање *MRP2* експресије у односу на контролу.

Ефекти комбинованих третмана на инхибицију *MRP2* иРНК експресије бољи су у односу на ефекте појединачних третмана.

Графикон 17. Вредности експресије *MRP2* иРНК у контролним (k) и третираним (1-12) **SW480** ћелијама 24 сата након третмана (добијене помоћу ImageJ програма и представљене стубићима). Релативна експресија одређивана је у односу на експресију *β-actin*-а, као позитивне контроле у испитиваним узорцима.



k – контролне ћелије; 1 – *T. chamaedrys*; 2 – *A. flavum*; 3 – *G. punctata*; 4 – *L. vulgare* – лист; 5 – *L. vulgare* – плод; 6 – *C. erythrea*; 7 - 0.1 μM Pd(II) комплекс; 8 - 10 μM Pd(II) комплекс; 9 - *A. flavum* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 10 - *A. flavum* и 10 μM Pd(II) комплекс; 11 - *G. punctata* и 0.1 μM Pd(II) комплекс; 12 - *G. punctata* и 10 μM Pd(II) комплекс



V ДИСКУСИЈА

Колоректални карцином представља други по учесталости карцином код мушкараца и трећи код жена у Србији, у периоду од 1999. до 2009. године (Mihajlović и сар., 2013) и један од најчешћих узрочника смрти широм света (Boyle и Langman, 2000). У лечењу ове болести неопходно је истраживање нових медицинских агенаса, међу којима значајно место имају супстанце природног порекла, које могу да успоре или блокирају процес канцерогенезе, тако што интерагују са сигналним путевима укљученим у ћелијске функције и модификују сигналне путеве током канцерогенезе (Khan и сар., 2007). Због своје лековитости и ефикасности биљке се вековима примењују у лечењу многих болести. Повећаном интересу за коришћење биљака као извора лекова, воде ограничења у примени синтетских лекова због њихове цене, штетних ефеката и појаве резистенције (Joy и сар., 2001). Биљке садрже различите биоактивне супстанце са потврђеним антитуморским својствима. Велики број тренутно коришћених антитуморских агенаса изолован је из биљака, на основу њихове употребе у народној медицини (Reddy и сар., 2003; Cragg и Newman, 2005). Испитивања антитуморских својстава биљака обухватају многобројна *in vitro* и *in vivo* експериментална тестирања биљних екстраката, који представљају мешавину свеукупних биоактивних супстанци присутних у биљци, или њених изолованих и пречишћених компоненти.

Веома је ограничен број студија које се баве испитивањем антитуморских ефеката и механизма цитотоксичности биљака из флоре Србије, као и о њиховим ефектима на колоректални карцином. Обзиром на то, у оквиру докторске дисертације испитивана су антитуморска својства биљака, које се традиционално користе као чајеви или додаци храни у циљу лечења дигестивних проблема. Испитивани су екстракти пет биљака из флоре Србије: *Teucrium chamaedrys*, *Allium flavum*, *Gentiana punctata*, *Ligustrum vulgare* и *Centaurium erythrea*, а екстракти су добијени употребом различитих растварача (метанол, етилацетат и ацетон). Коришћени су екстракти биљака, јер представљају комплексну смешу различитих биоактивних једињења и као такви показују боље ефекте од изолованих компоненти због својих међусобних синергистичких интеракција. Такође су праћени евентуални синергистички ефекти биљака у котретманима са новосинтетисаним Pd(II) комплексом, потенцијалним хемиотерапеутиком. За потребе ових испитивања коришћене су две ћелијске линије карцинома колоне (HCT-116 и SW480) и здрави фибробласти коже као модел системи. Цитотоксичност и механизми проапоптотске активности

екстраката су испитивани са различитих аспеката, у циљу проналаска биљака са потенцијалним утицајем на превенцију и/или третман колоректалног карцинома.

У даљем тексту, у циљу сагледавања комплетног механизма цитотоксичности, односно проапототског деловања третмана, у првом делу су детаљно продискутовани ови аспекти на примеру биљке *A. flavum* која је показала најбољу цитотоксичност. Затим су дискутовани добијени резултати појединачно за сваку биљку, Pd(II) комплекс и комбиноване третмане у односу на специфичности третмана. У последњем делу дискусије направљен је општи преглед где су разматрани сви добијени резултати у односу на (а) тестиране ћелијске линије, (б) проапототске ефекте и механизме деловања биљних екстраката појединачно и у котретманима, (в) значај и потенцијалну примену добијених резултата.

Allium flavum

Међу испитиваним биљкама, најбољи антитуморски потенцијал на ћелијама колоректалног карцинома показује биљка *A. flavum*. Могућ узрок разлика у ефикасности и биолошкој активности различитих биљака јесу разлике њиховог фенолног састава. Бројни фактори утичу на разлике у концентрацији фенолних једињења у биљкама, пре свега присутност ових једињења као одлика врсте, зрелост биљке, време узорковања материјала, фактори средине, припрема и чување узорака. Фактори средине подразумевају састав земљишта, климу, изложеност сунцу и светлости која има највећи утицај на састав флавоноида, као једне од најактивнијих група фенолних једињења у узоркованом биљном материјалу (Macheix и сар., 1990). Због различитог квантитативног и квалитативног састава фенолних једињења у испитиваним врстама биљака очекивани су и различити цитотоксични ефекти, обзиром да постоји висока позитивна корелација између концентрације фенолних једињења и биолошких активности биљака (Stanković и сар., 2010а; Stanković, 2012). Фенолна једињења су најпознатија група секундарних метаболита са великим бројем фармаколошких активности. То су супстанце коришћене првенствено због својих антиоксидационих својстава, способности да неутралишу слободне радикале и тиме смање ризик од појаве различитих болести, укључујући и канцер. Многобројне студије показују инхибиторни ефекат различитих група фенолних једињења на раст малигних ћелија, као и способност да покрену механизам убијања ових ћелија (Davis и Lamson, 2000; Park и сар., 2008).

Избор растварача у екстракционој процедури врши се на основу врсте једињења која треба изоловати за постизање што бољег биолошког ефекта. Резултати укупне количине фенолних једињења и флавоноида у екстрактима биљке *A. flavum* указују на разлике у ефикасности растварача коришћених у екстракционој процедури. Варијације у квантитативном и

квалитативном саставу фенолних једињења, као и постизању биолошке активности последица су различите растворљивости фенолних једињења у различитим растварачима, као и разлике у поларности коришћених растварача (Lapornik и сар., 2005; Turkmen и сар., 2006; Sineiro и сар., 2008). Резултати показују да је ацетон, који углавном из биљака екстрахује флавоноле, алкалоиде и агликоне (Gupta и сар., 2012), најефикаснији растварач за екстраховање фенолних једињења из биљке *A. flavum*. Резултати су у корелацији са другим налазима (Норах и сар., 2010), који потврђују да мање поларни растварачи као што је ацетон боље екстрахују фенолна једињења из цветова и плодова него поларнији растварачи. Када се узме у обзир хабитус биљке *A. flavum* највећи део материјала представљају крупни, жуто обојени цветови, а јако мали део сачињавају уски листови и стабло.

Иако је *A. flavum*, заједно са осталим врстама из рода *Allium*, вековима коришћен као додатак храни због карактеристичног укуса или као чај, веома су ограничени подаци о његовом фенолном садржају и биолошким активностима. Позната су благотворна дејства на дигестивни систем и постојање негативне корелације између конзумирања биљака из рода *Allium* и настанка колоректалног карцинома, али не постоји научна потврда о антитуморским ефектима биљке *A. flavum* на ћелије колоректалног карцинома. На основу добијених резултата (Табеле 3 и 5), екстракти биљке *A. flavum* показују добру цитотоксичност на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама у односу на NCI критеријуме (Suffness и Pezzuto, 1990). На SW480 ћелијској линији све IC₅₀ вредности су ниже од 30 µg/ml и најбољу активност показује ацетонски екстракт који садржи највећу концентрацију укупних фенолних једињења и флавоноида. Нешто слабије, али такође добре цитотоксичне ефекте, екстракти ове биљке постижу на НСТ-116 ћелијској линији. Добијени резултати су у корелацији са резултатима који показују да ацетонски екстракт биљке *A. flavum* показује најбоље антиоксидационе и антимицробне ефекте (Ćurčić и сар., 2012б) и добру цитотоксичност биљке *A. flavum* на ћелијским линијама карцинома грлића материце, НТ-29 ћелијама аденокарцинома колона и ћелијама аденокарцинома дојке (Simin и сар., 2013).

Поред ћелијских линија колоректалног карцинома, за испитивање цитотоксичности коришћена је и здрава ћелијска линија (фибробласти коже) на којима екстракти биљке *A. flavum* не изазивају цитотоксичне ефекте. Обзиром на то да ефективне антитуморске супстанце треба да убију ћелије канцера без ефекта на здраве ћелије, антитуморска својства биљке *A. flavum* захтевају детаљнија испитивања. Ова разлика у ефектима на здравим и малигним ћелијама представља веома користан резултат, који сугерише да активне компоненте присутне у екстрактима биљке *A. flavum* делују искључиво на малигне ћелије, активирајући или интерагујући са сигналним путевима, без ефекта на здраве ћелије.

Након сагледавања резултата који указују на евидентну цитотоксичност, испитивани су механизми цитотоксичности екстраката биљке *A. flavum*. Изазивање ћелијске смрти може бити по типу апоптозе или некрозе, што је битно са становишта терапије канцера. Макрофаге веома брзо препознају ране промене настале у процесу апоптозе и спречавају појаву инфламације или имунског одговора у организму, док су некротске ћелије способне да активирају проинфламаторни и имуностимулативни одговор (Savill и Fadok, 2000; Henson и Bratton, 2001). Изазивање некрозе приликом терапије канцера повезано је са инфламацијом и оштећењима суседних ћелија, док је апоптоза ограничена на појединачну ћелију и представља жељени и боље организован процес уклањања старих, оштећених и ћелија канцера. Екстракти биљке *A. flavum* не изазивају некротске ефекте у третираним ћелијама колоректалног карцинома, већ индукују апоптозу као доминантан тип ћелијске смрти, у процентима који су пропорционални цитотоксичности ових екстраката у испитиваним временима.

Резултати HPLC анализе показују да је *A. flavum* биљка богата фенолним једињењима. Гликозиди кафеинске киселине су најзаступљенија једињења у метанолном екстракту биљке *A. flavum*. Као једна од доминантнијих фенолних једињења у екстракту присутни су рамнетин и његови деривати. Утврђено је присуство хиперозида, рутина, кампферола и кверцетина. Резултати присуства фенолних једињења у метанолном екстракту биљке *A. flavum* у корелацији су са претходно добијеним налазима Simin и сар. (2013). Сапонини претходно изоловани из *Allium tuberosum* идентификовани и у екстракту биљке *A. flavum*. Идентификована фенолна једињења су потенцијално одговорна за цитотоксичну и проапоптотску активност. Познато је да кафеинска киселина и њени гликозиди, доминантно присутни у метанолном екстракту биљке *A. flavum*, поседују бројне фармацеутске ефекте, укључујући инхибиторне ефекте на пролиферацију малигних ћелија (Rajendra Prasad и сар., 2011). Поред њих, рамнетин и његови деривати показују цитотоксичне ефекте на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама, као и хиперозид, који је цитотоксичан на ћелијама канцера бубрега (Li и сар., 2014б). Присутни рутин, кверцетин и кампферол изазивају цитотоксичне ефекте на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама (Volate и сар., 2005; El-Sharkawy и сар., 2013).

Међусобним поређењем испитиваних ћелијских линија, запажа се већа осетљивост SW480 ћелија на испитиване третмане, са нижим IC_{50} вредностима и бољом проапоптотском активношћу третмана у односу на НСТ-116 ћелије. У третману метанолним екстрактом биљке *A. flavum* показана је слабија цитотоксичност након 72 у односу на 24 сата на НСТ-116 ћелијама. Дужим излагањем метанолном екстракту смањује се осетљивост ћелија, што може указати на присуство адаптационих механизма у НСТ-116 ћелијама, док сви испитивани екстракти на SW480 ћелијама

показују временску зависност. Различита осетљивост ћелијских линија може бити последица тога што једињења присутна у биљним екстрактима могу активирати различите сигналне путеве и механизме цитотоксичности у различитим ћелијским линијама карцинома истог органа.

Обзиром на то да индукција апоптозе представља жељени пут постизања антитуморске активности и важан механизам хемопревенције и хемотерапије канцера (Galati и сар., 2000; Cragg и Newman, 2005), неопходно је испитати механизме апоптозе индуковане екстрактима биљке *A. flavum* на ћелијама колоректалног карцинома у *in vitro* условима. Испитивањем цитотоксичне и проапоптотске активности изабраних врста биљака, метанол се показао као генерално добар растварач за екстракцију фенолних једињења и обзиром на његову способност да екстрахује велики број једињења као потенцијалних антитуморских супстанци, метанолни екстракти су коришћени за испитивање механизма цитотоксичности и анализу квалитативног састава фенолних једињења. Обзиром да фенолна једињења, присутна у биљкама, утичу на активност великог броја ензима и ћелијских рецептора (Middelton и сар., 2000) праћен је њихов ефекат на компоненте апоптотског сигналног пута у испитиваним третманима.

Кључне компоненте апоптотског сигналног пута су протеолитички ензими (каспазе), присутне у ћелијама у облику инактивних прекурсорних молекула, који се активирају димеризацијом и/или протеолитичким цепањем при чему настаје активан ензим. Као одговор на терапеутски агенс каспазе могу бити активирани у спољашњем и/или унутрашњем апоптотском путу (Fulda и Debatin, 2004). Спољашњи апоптотски пут почиње везивањем лигананда за рецепторе смрти на мембрани, као што је Fas/CD95. Везивање лигананда (FasL) изазива тримеризацију рецептора и активацију каспазе 8. Активирана каспаза 8 у даљем сигналном путу може директно активирати ефекторну каспазу 3 (Salvesen и Dixit, 1997), или довести до цепања Bid, проапоптотског протеина из Bcl-2 породице протеина. Транслокација Bid у митохондрије изазива отварање пора на мембрани што узрокује ослобађање Cyt c и активацију каспаза 9 и 3 у даљем сигналном путу (Green и Kroemer, 1998).

Третман метанолним екстрактом биљке *A. flavum* изазива повећану експресију Fas рецептора на мембрани третираних ћелија и појачане активности каспазе 8 у односу на контролу, што указује на могуће покретање апоптозе активацијом рецептора на мембрани у обе ћелијске линије. Овакав резултат представља корисну информацију за могуће интеракције малигних ћелија колоректалног карцинома са имуним ћелијама организма, које су одговорне за синтезу FasL и могућу индукцију апоптозе малигних ћелија (Waring и Mullbacher, 1999). Поред тога за испитиване ћелијске линије показано је да и саме имају способност синтетисања, односно експресије FasL (Shiraki и сар., 1997; Ryan и сар., 2006), а самим тим и могућност покретања

апоптозе Fas рецепторима посредованим путем. У третманима метанолним екстрактом биљке *A. flavum* долази до повећане активности каспазе 9, што потврђује улогу митохондрија у процесу апоптозе у обе ћелијске линије.

Метанолни екстракт биљке *A. flavum* индукује извесне разлике у нивоу активирања појединих компоненти апоптотског пута између НСТ-116 и SW480 ћелија. Ниво различитих проапоптотских и антиапоптотских регулатора може утицати на то да ли ће ћелија извршити апоптозу доминантно спољашњим или унутрашњим путем. Већа активност каспазе 9 и слабија експресија Fas рецептора на мембрани уочена је у НСТ-116 ћелијама у односу на SW480, што је у складу са литературним налазима који показују смањено цепање Bid у SW480 ћелијама, доводећи до слабијег ослобађања Cyt c из митохондрија, а тиме и слабију активацију каспазе 9 у поређењу са НСТ-116 ћелијама (Ozoren и El-Deiry, 2002). У НСТ-116 ћелијама поред активирања каспазе 8, долази и до јако повишене активности каспазе 9, што показује да митохондрије имају активну улогу у процесу апоптозе. Митохондрије могу бити укључене у апоптотски сигнални пут цепањем и транслокацијом Bid под утицајем активираних каспаза 8 или нарушавањем редокс статуса, најчешће повећаном продукцијом O_2^- који доводи до отварања пора митохондријалне мембране, ослобађања Cyt c и активирања каспазе 9 (Green и Kroemer, 1998). У SW480 ћелијама активност каспазе 9 је повишена у третману у односу на контролне ћелије, али доста мање у односу на НСТ-116 ћелије, што указује на могућност директне активације ефекторних каспаза активношћу каспазе 8.

Испитивањем важности митохондрија у апоптози индукованој активацијом рецептора на мембрани показано је да постоје два типа ћелија: Тип I, независан од митохондрија за извршење процеса апоптозе и Тип II, у којима је улога митохондрија кључна (Scaffidi и сар., 1998). Према литературним подацима НСТ-116 ћелије припадају Типу II, и нису способне да окончају живот апоптозом услед додавања инхибитора каспазе 9, док SW480 ћелије умиру апоптозом иако је каспаза 9 инхибирана (Ozoren и El-Deiry, 2002). Поред тога НСТ-116 ћелије са недостатком Bax, једним од кључних протеина у митохондријалном апоптотском путу, резистентне су на апоптозу изазвану спољашњим путем, посредством рецептора (Burns и El-Deiry, 2001). Према литературним подацима ослобађање Cyt c је спорије у SW480 ћелијама, а ограничавајући корак у укључивању митохондрија у апоптози изазваној преко рецептора је цепање Bid (Ozoren и El-Deiry, 2002). Обзиром на овакве литературне податке и добијене резултате који потврђују активацију каспазе 9 у SW480 ћелијама, може се претпоставити да је Cyt c ослобођен из митохондрија као последица деловања O_2^- који је повећан у третманима екстрактом биљке *A. flavum*. Иако је ограничена улога

митохондрија у рецепторима покренутом апоптотском сигналном путу у SW480 ћелијама, оне ипак имају улогу у извршењу процеса апоптозе услед редокс модулације њихове функције.

Редокс регулација има битну улогу у преживљавању ћелија, процесу апоптозе и регулацији рзличитих сигналних путева у ћелији. Промене у ROS/RNS продукцији могу модификовати сигналне путеве у ћелији директном модификацијом биомолекула, нарочито протеина (England и Cotter, 2005), мењати функцију протеина регулацијом њихове експресије (регулацијом активности транскрипционих фактора, као што су NF- κ B, AP-1 (енгл. *Activator Protein 1*), HIF-1 α (Mates и сар., 2000; Турпаев, 2002; Acker и сар., 2006; Ozben, 2007) или посттранслационе модификације (Heneberg и Draber, 2005). Третмани екстрактима биљке *A. flavum* повећавају продукцију $O_2^{\cdot-}$ пропорционално њиховим цитотоксичним ефектима. Ацетонски екстракт биљке *A. flavum*, са најбољом цитотоксичном и проапоптотском активношћу, показује и најбољу прооксидациону активност. Многе биљке богате фенолним једињењима, нарочито флавоноидима, су веома богат извор антиоксиданаса. Фенолна група је добар дозор водоника који реагује са ROS и RNS (Valentao и сар., 2002). Међутим, поред антиоксидационих ефеката фенолна једињења могу деловати и као прооксиданси (Ohshima и сар., 2003). Истраживања показују да фенолна једињења присутна у биљним екстрактима углавном показују антиоксидациона својства у *in vitro* условима, мерена DPPH (2,2-дифенил-1-пикрилхидразил) методом, док у живим системима, као што су ћелијске линије могу показати прооксидациона својства (Stanković и сар., 2011; Žižić и сар., 2013). Продукција ROS игра важну улогу у цитотоксичним и проапоптотским ефектима појединих фенолних једињења на различитим ћелијским линијама (Nakagawa и сар., 2004; Vittal и сар., 2004), који се делимично остварују путем њихове прооксидационе активности (Yoshino и сар., 2004). Гликозиди кафеинске киселине и кверцетин, присутни у екстрактима биљке *A. flavum* показују прооксидациона својства (Robasykiewicz и сар., 2007; Pietsch и сар., 2011) и могу иницирати апоптозу као одговор на присуство повећане концентрације $O_2^{\cdot-}$ (Raina и сар., 2013), доводећи до мењања пермеабилности митохондријалне мембране или повећања експресије рецептора смрти (Ozben, 2007).

Прооксидациони ефекти су израженији након 24 сата изложености ћелија третману, док се након дужег времена прооксидациона својства смањују и вредности концентрација $O_2^{\cdot-}$ су приближније вредностима нетретираних ћелија. Слабија прооксидациона активност указује на могућност смањења оксидационог стреса услед дуже активности антиоксидационог заштитног система у ћелијама и адаптације самих ћелија на оксидациони стрес.

Хемијски медијатор, NO, са веома важним физиолошким активностима у организму (Nathan, 1992; Moncada и Higgs, 1993), синтетише се уз помоћ ензима нитрит оксид синтетаза. *In*

in vitro истраживања показују да NO има способност да штити малигне ћелије од апоптозе различитим механизмима, најчешће повећавајући стабилност антиапоптотских протеина Bcl-2 фамилије, смањењем експресије проапоптотских (Azad и сар., 2006) или инхибирањем активације каспазе 3 нитрозилацијом (Mannick и сар., 2001). Азот моноксид може регулисати експресију рецептора смрти на мембрани ћелија и ране сигнале везане за рецепторе смрти. Његовим утицајем на активност каспаза и формирања DISC долази до смањеног цепања Bid и смањене амплификације апоптотских сигнала преко митохондрија. Са тим у вези инхибицијом iNOS и смањењем концентрације NO повећава се осетљивост малигнућ ћелија на дејство појединих антитуморских супстанци (Tang и Grimm, 2004). Сходно томе, циљана инхибиција iNOS-а и iNOS-ом продукованог NO-а може бити ефикасна терапеутска стратегија у лечењу канцера који експримирају iNOS.

Третмани екстрактима биљке *A. flavum* доводе до смањења протеинске експресије iNOS, директно доводећи до смањења концентрације нитрита (индикатор концентрације NO у нашим експерименталним условима) на обе ћелијске линије. Добијени резултати потврђују налазе других аутора (Jeong и Jeong, 2010; Tae и Kim, 2012), сугеришући да су поједине компоненте у екстракту (најчешће фенолна једињења) повезане са унутраћелијским компонентама и молекулима укљученим у продукцију NO, доводећи до инхибиције стварања овог молекула смањењем експресије iNOS. Екстракти са присуством кверцетина, као екстракт биљке *A. flavum*, смањују продукцију NO у култури ћелија аastroцита (Soliman и Mazzio, 1998) инхибицијом iNOS или везивањем за протеине, мењајући њихову оријентацију. Азот моноксид има кратак полуживот у срединама богатим O_2^- који има велики афинитет за NO, при чему настају пероксинитрити (Wink и Mitchell, 1998), што последично може да редукује концентрацију NO у ћелијама третираним екстрактом биљке *A. flavum*.

Оксидациони стрес присутан у ћелијама углавном укључује промене у нивоу глутатионског система, као прве линије антиоксидационе одбране. У HCT-116 ћелијама третираним екстрактима биљке *A. flavum* запажа се повећан GSH ниво у оба испитивана времена. Тенденција раста GSH у третираним ћелијама сугерише да фенолна једињења присутна у овој биљци могу повећати антиоксидациони статус, односно сачувати ендогени ниво GSH у ћелијама (Wu и сар., 2004), или ћелије *de novo* синтетишу GSH као последицу повећане продукције реактивних метаболита, као што је O_2^- . У SW480 ћелијама третираним екстрактима биљке *A. flavum* долази до смањења концентрације GSH након 24 сата. Овакав резултат сугерише повећано коришћење GSH у срединама повишене концентрације O_2^- , коју продукују цитотоксичне супстанце. Трошење GSH у ћелијама током процеса апоптозе је уобичајна промена (Reza и сар.,

2011). Глутатион регулише активност ефекторних каспаза и његово трошење доводи до активације каспаза и извршења процеса апоптозе, а најчешћи механизам активације апоптозе услед трошења GSH се приписује његовој улози да Cyt c одржава у неактивној форми, а смањењем GSH нивоа услед оксидационог стреса долази до активације Cyt c и активације апоптозе (Fruehauf и Meyskens, 2007; Trachootham и сар., 2008).

Вредности испитиваних параметара редокс статуса указују на присуство оксидационог стреса и прооксидационе ефекте екстракта биљке *A. flavum* у ћелијским линијама карцинома колона, што последично узрокује изазивање или појачавање цитотоксичних и проапоптотских ефеката ових екстракта. Антиоксидациони капацитет је већи у HCT-116 ћелијама, са вишим GSH нивоом након третмана и нижим променама концентрација O_2^- и NO у односу на SW480 ћелије. Резултати показују да екстракти биљке *A. flavum* делују прооксидационо и антиоксидационо у испитиваним ћелијским линијама, што је вероватно последица хемијске структуре и својства фенола да истовремено реагују као редукујући и оксидирајући агенси у зависности од средине у којој се налазе (Malik и Mukherjee, 2014). Резултати такође показују јасну молекуларну модулацију механизма апоптозе променом редокс статуса у ћелијама третираним екстрактима биљке *A. flavum*. Могући узрок различитих ефеката на здравим и малигним ћелијама јесте способност ћелија да различито реагују на продукцију унутраћелијског ROS изазваног цитотоксичним супстанцама (Sandhya и сар., 2006). Малигне ћелије садрже знатно више концентрације ROS у поређењу са здравим ћелијама и ове редокс разлике могу бити искоришћене као база за синтезу нових терапеутика са селективним дејством. Умерене концентрације ROS стимулишу пролиферацију и преживљавање малигнућ ћелија, међутим веће концентрације могу изазвати летална оштећења и стимулирати апоптозу, што може бити искоришћено у терапији канцера, употребом супстанци са способношћу продукције ROS или једињења која смањују антиоксидациони систем у ћелијама (Trachootham и сар., 2008).

Метаболизам ксенобиотика, укључујући и антитуморске супстанце, у ћелијама се одиграва кроз неколико фаза. Фаза I подразумева оксидационе модификације, где се реакцијама хидроксилације, оксидације и редукције обрађују релативно хидрофобни ксенобиотици. Фаза I је катализована ензимима који припадају фамилији CYP протеина, најчешће укључених у метаболизам лекова и детоксикацију организма (Guengerich, 2007). У фази II се метаболишу углавном хидрофилна једињења, конјугацијом са глутатионом помоћу ензима GST. Створени производи, углавном мање токсични и много хидрофилнији, транспортују се кроз плазмамембрану ћелије уз помоћ мембранских ABC транспортера (фаза III), као што су P-гр, MRP1 и MRP2. Ови ензими и транспортни протеини имају кључну и примарну улогу у заштити здравих ћелија од

штетних ефеката канцерогена, међутим у малигним ћелијама могу довести до резистенције на антитуморске супстанце. Могућа терапија канцера подразумева проналазак или синтезу лекова који инхибирају њихову активност.

Циљање СYP ензима супстанцама природног порекла представља потенцијални успех у превенцији и терапији канцера. У развоју и третману канцера нарочито је важна СYP1 класа ових ензима и њени чланови СYP1A1, СYP1A2 и СYP1B1 (Androustopoulos и сар., 2013). Третман биљком *A. flavum* показује инхибиторна својства на експресију иРНК *CYP1A1* гена на обе ћелијске линије, што је предходно показано и за друге врсте биљака (Kaminsky и Zhang, 1997; Zhou и сар., 2007). Бројни флавоноиди, присутни у биљним екстрактима, могу бити супстрат за ове ензиме или су одговорни за њихову инхибицију (Androustopoulos и сар., 2011). Инхибиција експресије или утицај на смањење активности СYP1A1 ензима представља корисну информацију, која указује на могућност комбинованог аплицирања биљака или њихових биоактивних компоненти са одговарајућим цитостатиком, који се метаболише СYP ензимима.

Други механизам одговоран за постизање хемопревентивне улоге биоактивних компоненти биљака, као и појаву резистенције малигнућ ћелија је индукција ензима фазе II метаболизма, односно биотрансформационог система повезаног са глутатионом, као што је GST (Stavrovskaya, 2000). Посебно је GSTP1 класа ових ензима директно укључена у појаву резистенције на многим ћелијским линијама (Salinas и Wong, 1999; Zhou и сар., 2005). Појава резистенције зависи од врсте ћелија, коришћеног третмана и експресионог профила ензима и транспортера у различитим ћелијама. Из тих разлога инхибитори експресије или активности ових ензима се сматрају потенцијалним терапеутским агенсима (McFadyen и сар., 2004). Третман биљком *A. flavum* показује инхибиторна својства на експресију иРНК *GSTP1* гена на обе ћелијске линије. Познато је да биљни феноли инхибирају његову активност (Mukanganyama и сар., 2011) или смањују експресију *GSTP1* гена, попут кверцетина присутног у биљци *A. flavum* (Van Zanden и сар., 2003).

Транспорт GSH конјугата у ванћелијски простор остварује се АТФ зависним транспортом уз помоћ ABC транспортера, познатих као MRP 1 и 2 (Taniguchi и сар., 1996; Keppler и сар., 1997). Протеин MRP2 је, након Р-гликопротеина (MDR1), други идентификовани члан мембранских транспортера (Vorst и сар., 2000; Dean и сар., 2001), који за транслокацију супстрата кроз мембрану користи АТФ (Vorst и сар., 1999; Leonard и сар., 2003). Ови транспортери представљају главни механизам заштите ћелија од ксенобиотика, али такође инхибирају акумулацију антитуморских супстанци у малигним ћелијама па су и одговорни за настанак резистенције, по чему су и добили име. Добијени резултати показују да третман биљком *A. flavum* инхибира експресију иРНК *MRP2* гена на обе ћелијске линије. У литератури су показана инхибиторна

својства биљних фенола, нарочито флавоноида на експресију гена који кодирају транспортне протеине (Zhang и Wong, 1996; Netsch и сар., 2005). Различите компоненте биљака могу допринети смањењу резистентности, нпр. кверцетин, присутан у екстракту биљке *A. flavum*, инхибира пролиферацију ћелија MDR хуманог карцинома дојке (Scambia и сар., 1991). Флавоноиди, као што су кампферол, кверцетин и галагин, инхибирају експресију *MRP1* и 2 гена у малигним ћелијама, али такође могу деловати као стимулатори избацивања канцерогена из здравих ћелија, делујући хемопревентивно (Leslie и сар., 2001).

На основу свих продискутованих резултата, може се закључити да екстракти биљке *A. flavum* показују најбољу цитотоксичну и проапоптотску активност, при чему је апоптоза покренута преко рецептора на мембрани, тј. спољашњим апоптотским путем у обе ћелијске линије, док активност каспазе 9 потврђује улогу митохондрија у апоптози, доминантно у НСТ-116 ћелијама у односу на SW480 ћелије; евидентна је молекуларна модулација апоптозе у присуству ROS и RNS (повећање концентрације O_2^- , инхибиција протеинске експресије iNOS-а, смањење концентрације нитрита и повећање нивоа GSH), као и инхибиција иРНК експресије испитиваних ензима укључених у метаболизам и транспорт лекова.

Teucrium chamaedrys

T. chamaedrys је веома позната и широко коришћена лековита биљка, са многобројним терапеутским својствима (Velasco-Negueruela и Perez-Alonso, 1990; Ulubelen, 2000; Kucuk, 2006; Tuzlaci и Dogan, 2010). Његова лековитост углавном је везана за лечење проблема у дигестивном систему, са веома мало података о антитуморским својствима. Антитуморска и проапоптотска својства ове биљке су по први пут испитивана на НСТ-116 и SW480 ћелијским линијама.

T. chamaedrys садржи високе концентрације фенола и флавоноида, нарочито у метанолном екстракту, који уједно показује и најбољу цитотоксичну (Табеле 3 и 5) и проапоптотску активност на обе ћелијске линије (Табеле 9 и 14). Према литературним подацима метанол се углавном показао као најбољи растварач за екстракцију фенолних једињења из биљног материјала у поређењу са мање поларним растварачима, укључујући ацетон, хексан и хлороформ (Mohsen и Ammar, 2008; Zarena и сар., 2009; Mohammedi, 2011). Метанол веома добро деградира и разара ћелијски зид који има неполаран карактер, тиме доводи до ослобађања полифенола из биљних ћелија и екстрахује велики број једињења, укључујући сапонине, танине, феноле, флавоне, шећере, аминокиселине, антоцијанине, терпеноиде, лактоне, полифеноле (Houghton и Raman, 1998; Gupta и сар., 2012).

Због случајева хепатотоксичности и изазивања некрозе ћелија јетре, повезане са конзумирањем ове биљке, испитиван је квалитативни састав фенолних једињења. Дитерпеноиди присутни у биљци *T. chamaedrys* представљају групу природних токсина, и међу њима теукрин А и теукрохамедрин сматрају се главним присутним токсинима за људски организам (Lekehal и сар., 1996). Доминантно присутна фенолна једињења у метанолном екстракту биљке *T. chamaedrys* су деривати кафеинске киселине, која поседује антитуморска својства (Tanaka и сар., 1993; Vieira и сар., 1998). Присутна су и друга једињења са познатим својствима на испитиваним ћелијама карцинома колоне, као што је изорамнетин (Li и сар., 2014a). У екстракту су јако заступљени теукрозиди за које, према нашим налазима, нема података о антитуморским својствима.

Екстракти биљке *T. chamaedrys* не показују цитотоксичне ефекте на здравим фибробластима коже. На испитиваним ћелијским линијама екстракти биљке *T. chamaedrys* изазивају апоптозу, као доминантан тип ћелијске смрти, са око 5% некротских ћелија у третманима високим концентрацијама. Резултати даљих испитивања механизма апоптозе показују да *T. chamaedrys* изазива апоптозу активацијом компоненти спољашњег и унутрашњег апоптотског пута, слично ефектима екстраката биљке *A. flavum*, а пропорционално изазваној проапоптотској активности екстраката. Екстракти *T. chamaedrys* су показали прооксидационе ефекте (високе концентрације $O_2^{\cdot-}$), који су праћени апоптозом. Екстракти ове биљке изазивају повећање концентрација GSH у НСТ-116 ћелијама, док у SW480 ћелијама екстракти биљке *T. chamaedrys* смањују концентрацију GSH. Као одговор на дејство антитуморских супстанци могу се јавити различите промене у GSH нивоу у различитим ћелијским линијама (Herzmann и сар., 2014). Флавоноиди су важни регулатори нивоа унутраћелијског GSH у различитим типовима ћелија. Могу стимулирати транскрипцију гена одговорних за његову синтезу (Myhrstad и сар., 2002) или изазвати трошење GSH, што зависи од коришћеног третмана и ћелијске линије.

Метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys* не изазива статистички значајне промене експресије *CYP1A1* и РНК у ћелијама колоректалног карцинома, док су ефекти на друга два испитивана гена слични ефектима биљке *A. flavum*.

Gentiana punctata

Велики број познатих и медицински важних биљака припада фамилији Gentianaceae. Врсте из ове фамилије су веома богате секундарним метаболитима, одговорним за горак укус биљака, постизање изузетних биолошких активности (Daniel и Sabnis, 1978; Singh, 2008; Akileshwari и сар., 2012) и терапеутски значај у лечењу болести дигестивног система (Szucs и сар., 2002; Jiang и сар., 2005). Једна од најчешће коришћених биљака из рода *Gentiana* је линцура - *G. lutea* L., са већ

показаним цитотоксичним својствима и доминантно присутним гентиопикрином (Menković и сар., 1998) и изогентисином, који су цитотоксични на HeLa ћелијама (Balijagić и сар., 2012). Не постоје литературни подаци о антитуморским својствима врсте *G. punctata*, подједнако коришћене као *G. lutea*. На основу резулата и добијених IC₅₀ вредности, *G. punctata* не показује цитотоксичне ефекте на испитиваним ћелијским линијама колоректалног карцинома и здравим фибробластима коже, изузев ацетонског екстракта на SW480 ћелијама. Анализа фенолног састава метанолног екстракта биљке *G. punctata* показује присуство гликозида и дигликозида кафеинске киселине (у знатно мањим концентрацијама у поређењу са осталим испитиваним биљкама), изогентисина, логанилне киселине, као и квантитативно мали садржај осталих фенолних једињења, што је у корелацији са слабом цитотоксичношћу ове биљке. Главне хемијске компоненте у екстракту корена сродне биљке - *G. kurroo* су логанилна киселина, свертиамарин, гентиопикрозид, гентисин, изогентисин, који инхибирају раст НСТ-116 ћелија и индукују апоптозу (Wani и сар., 2013). Кампферол присутан у екстракту ове биљке инхибира раст НСТ-116 ћелија (El-Sharkawy и сар., 2013), као и гална киселина, али су у екстракту биљке *G. punctata* присутни у траговима (Faried и сар., 2007). Фенолни профил ове биљке је слабо испитиван, али је познато да као и остале биљке из ове фамилије садржи горак укус који потиче од иридоида (Rodriguez и сар., 1998), сверозида и амарогентина присутних у њима (Jiang и сар., 2005). Ова једињења се изолују из биљака које припадају фамилији Gentianaceae и користе за добијање препарата за побољшање апетита и ублажавање дигестивних тегоба, као додаци дијеталној храни, за прављење алкохолних и безалкохолних напитака (Aberham и сар., 2011). *G. punctata* се гаји у култури биљака ради лакшег добијања ових једињења (Butiuc-Keul и сар., 2005).

Екстракти биљке *G. punctata* изазивају цитотоксичне ефекте само у високим концентрацијама у којима индукују апоптозу, нарочито након 72 сата и на SW480 ћелијама (и до 45% апоптотских ћелија), што потврђује присуство фенолних једињења са проапоптотском активношћу у овој биљци, али у ниским концентрацијама (могуће доминантно присутних гликозида и дигликозида кафеинске киселине, изогентисина, као и осталих слабије заступљених фенолних једињења). Екстракти биљке *G. punctata* доводе до слабих промена испитиваних параметара унутрашњег и спољашњег апоптотског пута, пропорционално својој слабој проапоптотској активности у испитиваној концентрацији и фенолном саставу екстраката.

Прооксидациони ефекти екстраката биљке *G. punctata* слабији су у поређењу са ефектима биљака са добром цитотоксичношћу након 24 сата. Након дужег времена излагања у појединим концентрацијама екстракти биљке *G. punctata* показују антиоксидационе ефекте на обе ћелијске

линије. У третманима се јавља значајно смањење концентрације NO, могуће због присуства генистеина, одговорног за инхибицију активности iNOS (Feinstein и сар., 1994).

На НСТ-116 ћелијама екстракти биљке *G. punctata*, као и ацетонски екстракт биљке *T. chamaedrys*, доводе до највећег повећања концентрације GSH у поређењу са осталим испитиваним третманима биљкама, повећавајући на тај начин антиоксидациони капацитет ћелија. Ниво GSH је повећан јер се не троши за GST активност, чија је иРНК експресија потпуно инхибирана у третману биљком *G. punctata*. Због таквих ефеката биљка *G. punctata* поседује највећи антиоксидациони потенцијал од свих испитиваних врста биљака, могуће због присуства изогенистина за који је показано да стимулише преживљавање ћелија и смањење оксидационог стреса и оксидације ћелијских протеина (Schmieder и сар., 2007). Метанолни екстракт биљке *G. punctata* изазива сличне ефекте на иРНК експресију гена укључених у метаболизам његових биоактивних компоненти у ћелији, као и биљка *A. flavum*.

Ligustrum vulgare

Обзиром на највиши садржај фенола и флавоноида у екстрактима биљке *L. vulgare* очекивана је добра цитотоксична и проапоптотска активност на ћелијама колоректалног карцинома, као и у односу на литературне податке (Nagy и сар., 2009). Испитиване су разноврсне биолошке активности листова биљке *L. vulgare*, укључујући и антитуморска својства на HeLa ћелијама (Jantova и сар., 2001). Антитуморска својства екстраката добијених из листова и плодова биљке *L. vulgare* на НСТ-116 и SW480 ћелијама нису испитивана до сада. Обзиром да биолошки ефекти могу да зависе од различите заступљености фенолних једињења у различитим биљним деловима (Stanković и сар., 2010б), за испитивање су коришћени екстракти добијени из листова и плодова ове биљке.

Екстракти листова и плодова биљке *L. vulgare* нису цитотоксични на здравим фибробластима коже, док на ћелијама колоректалног карцинома изазивају временску и дозно зависну цитотоксичну и проапоптотску активност. Метанолни екстракт листова показује добру цитотоксичност на НСТ-116 ћелијама, као и етилацетатни екстракт након 72 сата (Табела 3). На SW480 ћелијама ацетонски екстракт показује добру цитотоксичну активност након 72 сата. Поред њега добру активност показује метанолни екстракт након 24 и 72 сата, као и етилацетатни након 72 сата (Табела 5). Биоактивне компоненте присутне у екстрактима активирају различите сигналне путеве у различитим ћелијским линијама, па су компоненте из ацетонског екстракта делотворније на SW480 ћелијама, док су компоненте присутне у метанолном екстракту активније на НСТ-116 ћелијама.

Екстракти плодова показују слабију цитотоксичну и проапоптотску активност на испитваним ћелијским линијама у поређењу са екстрактима листова. SW480 ћелије су осетљивије на третмане и у односу на NCI критеријуме добру активност показују ацетонски и метанолни екстракт (Табела 5). Ацетонски екстракт плода показује најбољи цитотоксичан ефекат у поређењу са другим врстама екстракта, могуће због способности ацетона да најбоље екстрахује флавоноиде из плодова (Ногач и сар., 2010). Резултати HPLC анализе (Прилог 2) показују да се квалитативни фенолни састави екстраката листова и плодова биљке *L. vulgare* не разликују. Уочавају се само квантитативне разлике у заступљености фенолних једињења, што потврђују и ниже измерене концентрације фенола и флавоноида у екстрактима плодова.

Доминантно присутна компонента метанолних екстраката листова и плодова биљке *L. vulgare* је олеуропеин, који заједно са лигстрозидом чини групу секоиридоида и представља најзаступљеније фенолно једињење у листовима и плодовима маслине и осталих биљака из фамилије Oleaceae. Олеуропеин је фенолно једињење, изоловано из биљака рода *Ligustrum*, са показаним инхибиторним ефектима на раст ћелија канцера (Menendez и сар., 2007). Многобројне студије показују широк спектар фармаколошких својстава и позитивних ефеката олеуропеина, укључујући антиаритмијско, кардиопротективно и антиинфламаторно дејство (Visioli и сар., 2002; Al-Azzawie и Alhamdani, 2006), као и способност инхибиције раста и инвазивности канцера у условима *in vitro* и *in vivo* (Hamdi и Castellon, 2005; Fabiani и сар., 2006). Hamdi и Castellon (2005) су показали инхибиторна својства олеуропеина на раст малигнућ ћелија пореклом из различитих органа. Такође је показано да олеуропеин смањује вијабилност MCF-7 ћелија, изазивајући апоптозу. Поред олеуропеина присутни су и деривати кафеинске киселине, као и многа друга потенцијално активна фенолна једињења. Добијени резултати фенолног састава су у корелацији са другим налазима (Tattini и сар., 2004; Миџаји и сар., 2011), где је у екстракту листова ове биљке утврђено присуство секоиридоида (олеуропеин, лигусталозиди А и Б и лигстрозиди) и флавоноида (кверцетин 3-*O*-рутинозид, лутеолин гликозиди, апигенин гликозиди).

Екстракти биљке *L. vulgare* изазивају апоптозу, као доминантан тип ћелијске смрти, али присутни су и значајни проценти некрозе, у поређењу са ефектима осталих биљака. Третмани екстрактом биљке *L. vulgare* активирају компоненте спољашњег и унутрашњег апоптотског пута на испитваним ћелијским линијама. У поређењу са осталим биљкама, екстракт биљке *L. vulgare* у НСТ-116 ћелијама доминантније индукује промене у спољашњем путу у односу на унутрашњи.

У НСТ-116 ћелијама, третираним екстрактима биљке *L. vulgare*, јављају се разлике у ефектима на редокс статус у односу на третмане осталим биљкама, у смислу јаче продукције O_2^- , као и слабије редукције концентрације NO, који могу међусобно реаговати и стварити

високореактиван ONOO⁻, који је могуће одговоран за некрозу ћелија третираних биљком *L. vulgare* (Vigag и сар., 2003). Овакав резултат указује да повећане концентрације ROS до одређеног нивоа стимулишу процес апоптозе, док неконтролисано повећање нивоа ROS и RNS доводи до непоправљивих оштећења биомолекула у ћелији и појаве некрозе (Hampton и Orrenius, 1997; Trachootham и сар., 2008). До оваквих промена у SW480 ћелијама не долази, екстракти не изазивају некрозу, већ је повећање концентрације O₂⁻ и смањење концентрације NO у складу са цитотоксичношћу ове биљке. Студија показује да олеуропеин, доминантно присутан у метанолном екстракту биљке *L. vulgare*, у здравим ћелијама изазива значајно смањење нивоа ROS, док на ћелијама канцера простате изазива дозно зависно повећање продукције ROS, односно понаша се као антиоксиданс у здравим ћелијама, а као прооксиданс у ћелијама канцера (Acquaviva и сар., 2012). Такође, показано је да олеуропеин има способност да редукује концентрацију NO (De la Puerta и сар., 2001).

Освртом на ефекте екстраката листова и плодова биљке *L. vulgare* на ензиме укључене у њихов метаболизам, јављају се значајне разлике у односу на третман биљком *A. flavum* у експресији иРНК *GSTP1* и *MRP2* гена у SW480 ћелијама. Третман метанолним екстрактом листова биљке *L. vulgare* изазива повећану експресију *GSTP1* и *MRP2* иРНК, као и концентрацију GSH, сугеришући да се приликом метаболизма компоненте екстракта конјугују са GSH и уз помоћ транспортних протеина кодираних *MRP2* геном избацују из ћелија. У НСТ-116 ћелијама такође је повећана експресија *GSTP1* у односу на контролне ћелије, мања у односу на SW480 ћелије, али је експресија *MRP2* инхибирана.

Centaurium erythrea

У оквиру докторске дисертације испитивана је цитотоксична и проапоптотска активност још једне биљке из фамилије Gentianaceae, широко коришћене лековите кичице - *C. erythrea*. Припремана као чај користи се за лечење органа за варење и болести јетре (Tahraoui и сар., 2010). Фитохемијске студије ове биљке (Nikolova-Damyanova и Handjieva, 1996; Kumarasamy и сар., 2003; Valentao и сар., 2003) показују присуство многобројних фитохемикалија укључујући centauroзид, центапикрин, флавоноиде, гентиопикрин, гентиопикрозид, изокумарин, фенолне киселине и њихове деривате, терпеноиде и ксантоне (Jensen и сар., 1975; Valentao и сар., 2000; Valentao и сар., 2002). Комерцијално набављен узорак ове биљке, није показао присуство наведених једињења, што указује на могућност неправилног узорковања или узгајања, сушења или складиштења ове биљке.

Резултати показују да етилацетатни екстракт биљке *C. erythrea* изазива добру цитотоксичну и проапоптотску анкивност на НСТ-116 ћелијама (Табеле 3 и 10) и SW480 ћелијама (Табеле 5 и 15) након 72 сата, као и ацетонски екстракт на SW480 ћелијама (Табеле 5 и 16). Остали екстракти не индукују цитотоксичнос или показују јако слабе ефекте на испитиваним ћелијским линијама.

Анализом концентрације фенолних једињења установљено је највеће присуство фенолних једињења у метанолном екстракту биљке *C. erythrea*, међутим етилацетатни екстракт показује најбољу активност и представља најбољи растварач за изоловање супстанци из ове биљке, које индукују цитотоксичност.

Иако се на основу добијених IC_{50} вредности *C. erythrea* генерално карактерише као слабо цитотоксична биљка, резултат није занемарљив јер изазива велике проценте апоптозе (и до 80%) у високој концентрацији, а не показује некротске ефекте ни цитотоксичност на здравим ћелијама што даје предлог за могуће коришћење ове биљке у комбинованим третманима са смањеним дозама одговарајућег хемиотерапеутика. Активација компоненти спољашњег и унутрашњег апоптотског пута у ћелијама третираним екстрактом биљке *C. erythrea* је пропорционална проапоптотским ефектима биљке и израженија је у SW480 ћелијама.

Третмани екстрактима биљке *C. erythrea* повећавају концентрацију O_2^- након 24 сата, док након дужег времена у појединим концентрацијама делују и антиоксидационо смањујући концентрацију O_2^- на испитиваним ћелијским линијама. Ове промене, као и смањење концентрације NO нису толико изражене као у третманима јако цитотоксичним биљкама.

У SW480 ћелијама *GSTP1* иРНК експресија је повећана у односу на контролу, због могућег метаболизма компоненти биљног екстракта са GSH.

***Pd(II)* комплекс**

Поред екстраката испитиваних биљака, ћелије карцинома колоне су третиране и новосинтетисаним Pd(II) комплексом. Синтетски агенси, првобитно једини коришћени у трапији канцера и даље имају широку примену. Један од најчешће коришћених цитостатика у терапији карцинома колоне је цисплатина (*cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂) (Florea и Busselberg, 2011). Антитуморска својства цисплатина постиже везивањем за базе у саставу ДНК. Међутим, цисплатина интерагује и са здравим ћелијама, углавном везујући се –SH групама, што доводи до нефротоксичности и других штетних ефеката (Hanigan и Davarajan, 2003; Florea и Busselberg, 2011). Због многобројних нуспојава, постоје покушаји да се синтетишу нови неплатински, метални комплекси са бољом растворљивошћу, лакшим проласком кроз ћелијску мембрану и саму ћелију, као и лакшим

везивањем за ДНК. Међу њима, доста је испитиван Pd(II) комплекс због структурне сличности са цисплатином (Abu-Surah и сар., 2008). Велики су интереси за синтезом Pd(II) комплекса који ће повећати активност и смањити токсичност на здравим ћелијама (Divsalar и сар., 2006; Kovalica-Demertzi и сар., 2007).

Новосинтетисани Pd(II) комплекс са додатком лиганда тиохидантоинског типа синтетисан је у циљу добијања једињења са бољом цитотоксичношћу и минималним штетним ефектима (Šmit и сар., 2013). Међу тиохидантоинима, 2-тиохидантоин је један од најпознатијих због своје примене као хербицид или фунгицид (Marton и сар., 1993), као терапеутски агенс (Kushev и сар., 2002) и због своје потенцијалне антитуморске активности (Al-Obaid и сар., 1996; Suzen и Buyukbingol, 2000). Познато је да повезивање ових тиохидантоинских једињења са прелазним металима може довести до повећања њихове антивирусне или антитуморске активности (Blanc и сар., 1992; Al-Obaid и сар., 1996).

Лиганд, коришћен у синтези Pd(II) комплекса, не изазива цитотоксичне ефекте на испитиваним ћелијским линијама колоректалног карцинома, док Pd(II) комплекс показује добру цитотоксичност, са ниским IC₅₀ вредностима (Табеле 3 и 5). Међутим, новосинтетисани Pd(II) комплекс изазива цитотоксичне ефекте и на здравим ћелијама.

Резултати добијени анализом типа ћелијске смрти показују да најнижа (0.1 μM) концентрација Pd(II) комплекса веома слабу цитотоксичност постиже изазивањем ниских процената апоптозе, 10 μM концентрација такође изазива апоптозу у нешто вишим процентима у поређењу са најнижом, али и високе проценте некрозе. Високе концентрације Pd(II) комплекса индукују цитотоксичне ефекте изазивањем некрозе. Показано је да моногбројни новосинтетисани комплекси палладијума изазивају некрозу на различитим ћелијским линијама (Kontek и сар., 2011; Ulukaа и сар., 2011).

Обзиром на показану апоптотску активност ниских концентрација Pd(II) комплекса даље су испитивани ефекти на сигналне путеве апоптозе, где су активирани компоненте спољашњег и унутрашњег апоптотског пута у испитиваним ћелијским линијама. У НСТ-116 ћелијама митохондрије играју значајну улогу у апоптози индукованој Pd(II) комплексом. Активност каспазе 9 је значајно повећана, што је пропорционално детектованој највишој концентрацији O₂^{•-} у поређењу са осталим испитиваним третманима. Показано је да Pd(II) комплекс активира митохондријални апоптотски пут тако што повећава продукцију ROS у ћелијама канцера простате помоћу регулације експресије Вах и Bcl-2 протеина (Valentini и сар., 2009). У SW480 ћелијама унутрашњи апоптотски пут је знатно мање активиран у односу на третмане биљним екстрактима и НСТ-116 ћелије, код којих је улога митохондрија кључна у апоптотском сигналном путу (Nap и

сар., 2013; Maillet и сар., 2013). Такође, повећање O_2^- у SW480 ћелијама је незнатно у ниским концентрацијама Pd(II) комплекса.

Високе концентрације Pd(II) комплекса имају супротне ефекте на промене концентрација нитрита у односу на третмане екстрактима биљака, повећавајући њихов ниво. Ове концентрације Pd(II) комплекса изазивају оксидациони стрес у ћелијама карцинома колона, тако што повећавају концентрације O_2^- и NO, који су појединачно или у форми пероксинитрита вероватно одговорни за изазване некротске ефекте (Virág и сар., 2003). Ниске концентрације Pd(II) комплекса нису довољне да изазову такав ниво оксидационог стреса, већ блаже промене уводе ћелије у апоптозу. У високим концентрацијама Pd(II) комплекс смањује концентрацију GSH, што указује на његово трошење у условима јаког оксидационог стреса услед неутрализације ROS и RNS. Смањен GSH ниво може да указже и на његово трошење услед метаболизма Pd(II) комплекса, док је у ниским концентрацијама GSH ниво повишен у обе ћелијске линије, јер не долази до његовог трошења за GST активност. Експресија иРНК *GSTP1* гена у тим концентрацијама је непромењена у односу на контролу. Сагледавањем добијених резултата евидентно је да Pd(II) комплекс у зависности од аплициране дозе индукује двојаке ефекте на параметре сигналног пута апоптозе и редокс статуса и због тога су ниске концентрације даље коришћене у комбинованим третманима.

За разлику од биљних екстраката, третмани Pd(II) комплексом показују различите ефекте на иРНК експресију гена чији су протеински производи укључени у метаболизам лекова и појаву резистенције малигних ћелија. Генерално, иРНК експресија је непромењена или повишена у третманима испитиваних концентрација Pd(II) комплекса што указује на нормалну или повишену активност и метаболизам овим ензимима. Јављају се разлика у ефектима Pd(II) комплекса на иРНК експресију испитиваних гена у HCT-116 и SW480 ћелијама, што може бити узрок различите цитотоксичности испитиваних концентрација на различитим ћелијским линијама (Графикони 1 и 2). Pd(II) комплекс повећава иРНК експресију *CYP1A1* у SW480 ћелијама, сугеришући да се метаболизам Pd(II) комплекса врши путем CYP ензима, као и иРНК експресију *GSTP1* и *MRP2* у односу на контролне SW480 ћелије, што указује на могућу конјугацију Pd(II) комплекса са GSH уз помоћ ензима *GSTP1* и транспорт конјугата помоћу транспортних протеина кроз плазмамембрану. Овакве промене иРНК експресије, до којих не долази у HCT-116 ћелијама су могућ узрок слабије цитотоксичности ниских концентрација Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији у односу на HCT-116.

Комбиновани третмани

Ради превазилажења нежељених ефеката услед терапије цитостатицима, токсичним на здраве ћелије у организму (Raghavan и сар., 1997) и појаве резистенције која ограничава успех терапије, развиле су се нове стратегије у терапији канцера. Последњих година постоји велики интерес за испитивањем синергистичких ефеката и комбинација различитих антитуморских супстанци (Vigano и сар., 2001; Pešić и сар., 2009; Ćurčić и сар., 2012a). Најчешће су комбинације супстанци природног порекла и различитих цитостатика у хемиотерапији, које могу повећати ефикасност терапије, а смањити штетне ефекте и токсичност на здраве ћелије (Hortobagyi, 2001; Tuagi и сар., 2002). Углавном се користе биљке, које саме по себи показују позитивне ефекте на здравље и веома су богате једињењима која имају потенцијалну улогу у превенцији и/или третману канцера (Kelloff, 2000). Многобројни су примери испитивања комбинације биљних екстраката и познатих цитотоксичних агенаса (Zhao и сар., 2007), нпр. испитивани су комбиновани третмани биљака *Phyllanthus emblica* L. и *Terminalia bellerica* Roxb. са доксорубицином и цисплатином на различитим ћелијским линијама (Pinmai и сар., 2008).

У циљу испитивања синергистичких ефеката испитивани су комбиновани третмани биљке са најбољом (*A. flavum*), као и биљке са најслабијом цитотоксичном активношћу (*G. punctata*) и ниских доза Pd(II) комплекса (0.1 и 10 μ M).

Појединачни третмани екстрактима биљке *A. flavum* показују веома добру цитотоксичност, која се у комбинованим третманима, услед истовременог аплицирања са ниским дозама Pd(II) комплекса повећава, односно смањују се IC₅₀ вредности у односу на појединачне третмане (Табеле 4 и 6). У испитивањима међусобних односа коришћених концентрација екстраката биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса углавном су запажени синергистички односи, затим адитивни, а само ретко у појединим концентрацијама и антагонистички ефекти. Добијени резултати указују на могућност смањења дозе цитостатика, као још једну од предности комбинованих третмана, при чему се постиже добар или бољи ефекат у односу на појединачни третман. Резултати наших истраживања указују на могућности даљих испитивања биолошких ефеката третмана лековитих биљака у комбинацији са комерцијално коришћеним цитостатицима као што је 5-флуороурацил, цисплатина и др. у *in vitro* и *in vivo* условима.

За разлику од комбинованих третмана на ћелијама карцинома колона, у комбинованим третманима на здравим фибробластима коже не долази до синергистичких ефеката између екстраката биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса. Биљни екстракти у комбинацији са цитотоксичном дозом Pd(II) комплекса смањују цитотоксичност на здравим ћелијама, тако да комбиновани третмани изазивају слабије ефекте од појединачних третмана Pd(II) комплексом. Додатком

биљних екстраката, токсичност Pd(II) комплекса се смањује на здравим, а сасвим супротно повећава на малигним ћелијама, што препоручује ове комбинације третмана као ефикасне антитуморске агенсе. Екстракти биљке у комбинованим третманима спречавају изазивање некрозе услед дејства Pd(II) комплекса и синергистички индукују веће проценте апоптозе у односу на појединачне третмане. Може се претпоставити да биљке иницијално уводе ћелије у апоптозу, а Pd(II) комплекс синергистички појачава овај ефекат. Екстракти биљака и фенолна једињења изолована из њих показују протективна својства, односно спречавају оштећења ћелија изазвана индукованим оксидационим стресом, услед дејства цитотоксичних агенаса (Carrasco-Pozo и сар., 2010). Истим механизмима могуће да екстракти биљке *A. flavum* смањују оштећења изазвана Pd(II) комплексом и на тај начин фаворизују процес апоптозе у односу на некрозу.

Комбиновани третмани екстраката биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса подједнако повећавају активност компоненти спољашњег и унутрашњег апоптотског пута у НСТ-116 ћелијама, интензивније у односу на појединачне третмане. Комбиновани третмани у SW480 ћелијама активирају митохондријални сигнални пут пре него Fas посредован пут, активирајући каспазу 9 доминантније у односу на повећање експресије Fas и активације каспазе 8. Активација каспазе 9 је вероватно последица високе продукције O_2^- у односу на појединачне третмане, као и концентрације нитрита у комбинованом третману са 10 μM Pd(II) комплексом. Механизми међусобног дејства екстраката биљке и Pd(II) комплекса нису разјашњени, могућ узрок синергистичке активности може бити модулација процеса апоптозе ROS зависним механизмима у ћелијама канцера, док су ове модулације смањене у здравим ћелијама (Sandhya и сар., 2006) или инхибиција ензима укључених у метаболизам Pd(II) комплекса, што резултира повећањем сензитивности ћелија на третман.

Метаболизам антитуморске супстанце или лека може бити модификован другом супстанцом и ове интеракције су показале велики клинички значај. Интеракције између лекова и природних производа могу бити конкурентне, без ефеката или неконкурентне у смислу инхибиције или индукције ензима одговорних за њихов метаболизам (Delgoda и Westlake, 2004). Многе биљке и дијетални производи показали су добре ефекте у комбинацији са лековима који су супстрати CYP и GSTP1 ензима приликом метаболизма. Идентификација лекова и природних продуката који међусобно интерагују је веома важна у развоју лекова, при чему је неопходно пратити међусобне интеракције између биљке и лека, као и биљке и ензима. Поред експресије гена укључених у I и II фазу метаболизма антитуморских супстанци, праћена је експресија гена чији генски продукт учествује у транспорту антитуморских лекова ван ћелије, из разлога што модулација њихове активности може имати значајан фармаколошки успех. Ако је лек супстрат за

метаболичке ензиме и транспортне протеине, биљке које су такође супстрат могу истиснути лек из везивног места јер се синергистички или антагонистички ефекти између биљака и лекова заснивају на конкуренцији за исто циљно место (Hu и сар. 2005). Биљке или биоактивне компоненте биљака (најчешће флавоноиди) могу инхибирати експресију транспортних протеина (Fugh-Berman, 2000).

У комбинованим третманима екстракта биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекса експресија иРНК гена чији су протеински производи укључени у метаболизам антитуморских супстанци је генерално смањена у односу на појединачне третмане на обе ћелијске линије. Ове промене су израженије на SW480 ћелијама, које су и осетљивије на испитиване комбиноване третмане. Овакав резултат даје објашњење повећане цитотоксичности Pd(II) комплекса у комбинованим третманима у односу на појединачне, могуће због слабијег трошења Pd(II) комплекса услед метаболизма овим ензимима у присуству биљке *A. flavum* која инхибира њихову експресију или смањеног транспорта Pd(II) комплекса кроз мембрану у присуству биљног екстракта чиме је омогућен бољи ефекат на циљане молекуле.

Приликом комбинованих третмана екстракта биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса, такође, долази до међусобних синергистичких цитотоксичних и проапоптотских ефеката, као и смањене некротске активности Pd(II) комплекса. Иако нецитотоксична, *G. punctata*, у комбинованим третманима са 10 μM концентрацијом Pd(II) комплекса изазива значајна смањења IC₅₀ вредности у односу на појединачне третмане (Табеле 4 и 6) на испитиваним ћелијама колоректалног карцинома, док на здравим фибробластима не индукује појачани ефекат. Механизми индуковања апоптозе су веома слични за обе коришћене биљке у комбинованим третманима, пропорционално њиховој цитотоксичности.

Обзиром да је *G. punctata* биљка са најјачим антиоксидационим потенцијалом, уочавају се мале разлике у ефектима на редокс статус третираних ћелија у односу на котремане са биљком *A. flavum*. Комбиновани третмани са биљком *G. punctata* изазивају слабије промене параметара редокс статуса (слабије повећање концентрације O₂⁻ и мање промене у концентрацији NO). *G. punctata* у комбинованим третманима изазива повећање GSH у испитиваним ћелијским линијама, као и повећање *GSTP1* иРНК експресије у комбинованом третману са 10 μM концентрацијом Pd(II) комплекса у односу на контролне НСТ-116 ћелије.

Општи преглед и значај резултата у односу на циљ и хипотезе истраживања

Изабране врсте биљака су предмет истраживања докторске дисертације због дугогодишњег коришћења у народној медицини и благотворних својстава на дигестивни систем, ублажавајући различите врсте поремећаја у функцији ових органа и због тога што су ефекти ових биљака на

колоректални карцином неиспитани. Показана цитотоксична и проапоптотска својства испитиваних врста биљака на ћелијама колоректалног карцинома дају научну потврду антитуморског потенцијала ових биљака и предлог њиховог коришћења у пракси и даљим експерименталним истраживањима.

На основу добијених резултата уочава се нешто већа осетљивост SW480 у односу на НСТ-116 ћелије, али испитивани третмани показују активност на обе ћелијеке линије пореклом из истог органа, без ефеката на здраве ћелије што потврђује њихову антитуморску активност и повећава потребу њиховог даљег испитивања. Неједнака осетљивост се може приписати активацији различитих сигналних путева у различитим ћелијским линијама (доминантније активираниг унутрашњег митохондријалног апоптотског пута у НСТ-116 ћелијама, односно спољашњег - рецепторима посредованог пута у SW480 ћелијама), различитог одговора на оксидациони стрес (већи антиоксидациони капацитет НСТ-116 ћелија, са вишим GSH нивоом након третмана и нижим променама концентрација O_2^- и NO у односу на SW480 ћелије), неједнаке експресије иРНК гена чији су протеински производи укључени у метаболизам испитиваних третмана (нешто више вредности експресије у контролним НСТ-116 ћелијама), као и многих других могућих механизма. НСТ-116 ћелије имају грешку у ДНК репаративном систему, са мутацијом на *hMLH1* гену (Boyer и сар., 1995), која је одговорна за смањену осетљивост ове ћелијске линије (Samimi и сар., 2000). SW480 ћелије немају ову мутацију у репаративном систему (Sergent и сар., 2002) због чега су потенцијално осетљивије на третмане у поређењу са НСТ-116 ћелијама.

Цитотоксична и проапоптотска активност испитиваних врста биљака зависе од концентрације фенолних једињења присутних у екстрактима, као и од разлика у квалитативном саставу фенолних једињења. Биљке са високим концентрацијама фенолних једињења (*L. vulgare* и *T. chamaedrys*) показују добру цитотоксичну активност, док биљка са најнижом концентрацијом фенолних једињења (*G. punctata*) не индукује цитотоксичност. Значај квантитативног састава фенолних једињења најбоље се уочава на примеру екстракта листова и плодова биљке *L. vulgare*, који имају исти квалитативни састав, стим што екстракти листова садрже већу концентрацију ових једињења и показују бољу цитотоксичност на обе ћелијске линије. Важност квалитативног састава фенолних једињења у биљакама најбоље запажа на примеру биљке *A. flavum*, која садржи квантитативно нижу концентрацију укупних фенолних једињења од биљака *L. vulgare* и *T. chamaedrys*, али је богата флавоноидима, као једном од биолошки најактивнијих група фенолних једињења са потврђеним антитуморским својствима (Park и сар., 2008). Овакав резултат истиче значај флавоноида за постизање изузетне цитотоксичне и проапоптотске активности на ћелијама колоректалног карцинома. Поред тога, иако *A. flavum* садржи мању концентрацију укупних

фенолних једињења од екстракта биљке *T. chamaedrys* и плодова биљке *L. vulgare*, на HPLC хроматограмима се уочава да садржи више гликозида кафеинске киселине од ова два екстракта, указујући да није битна само укупна концентрација фенолних једињења већ концентрација појединачних једињења одговорних за постизање биолошких ефеката.

Постигнути ефекти испитиваних врста биљака варирају и од врсте екстракта коришћеног у третманима. Метанол се показао као генерално добар растварач за екстракцију фенолних једињења и постизање добре цитотоксичне активности, као и ацетон, док етилацетатни екстракт екстрахује најмању количину фенолних једињења у поређењу са остала два коришћена растварача и показује најслабију цитотоксичну активност, изузев етилацетатног екстракта биљке *C. erythraea*. Метанолни екстракти испитиваних биљака не изазивају временски зависну цитотоксичност на НСТ-116 ћелијама.

Резултати испитивања проапоптотских ефеката и сигналних путева апоптозе дају корисне информације и подлогу даљим истраживањима у циљу изолације или модификације потенцијалних антитуморских једињења са проапоптотским деловањем, присутних у овим биљкама. Познавање механизма дејства потенцијалних лекова и механизма ћелијске смрти у различитим ткивима може допринети дизајну боље терапијске стратегије за убијање малигнух и заштиту здравих ћелија. Када се упореди цитотоксичност природних супстанци (биљни екстракти) и синтетских агенаса (Pd(II) комплекс), добијена је боља цитотоксичност у третману Pd(II) комплексом. Међутим, ове супстанце различито убијају малигне ћелије, екстракти испитиваних биљака доминантно индукују апоптозу, са јасном редокс модулацијом процеса апоптозе у присуству ROS и RNS и не делују на здраве фибробласте, док Pd(II) комплекс доминантно изазива некрозу, са цитотоксичним ефектима на здраве фибробласте коже. Оштећења ћелија изазвана оксидационим стресом су могућ узрок некротске активности високих концентрација Pd(II) комплекса. Овакав резултат даје предност природним производима у терапији карцинома колона.

Међу испитиваним биљкама *A. flavum* показује најбољу активност и на основу тога може бити разматрана као потенцијални извор биоактивних компоненти са антитуморским својствима у будућим истраживањима, као суплемент исхрани или додатак хемиотерапији. У прилог томе иду и нарочито корисни резултати дисертације, а то су синергистички ефекти биљке *A. flavum*, као и биљке *G. punctata* са новосинтетисаним Pd(II) комплексом, смањење штетних ефеката (некротских) Pd(II) комплекса у комбинованим третманима, могућност смањења доза приликом аплицирања комбинованих третмана и смањена иРНК експресија гена чији протеински производи учествују у метаболизму антитуморских супстанци у комбинованим третманима, услед чега долази до повећане цитотоксичности комбинованих третмана могуће због слабијег метаболисања

Pd(II) комплекса у присуству биљних екстраката који инхибирјуа њихову експресију или смањеног транспорта Pd(II) комплекса кроз мембрану чиме је омогућен бољи ефекат на циљане молекуле. Разматрањем ефеката испитиваних врста биљака, уз посебан осврт на њихову инхибиторну активност на експресију метаболичких ензима, неопходно је истаћи могућност комбинованог аплицирања ових биљака или њихових пречишћених компоненти и одговарајућег цитостатика у циљу смањивања резистенције малигних ћелија, као једног од највећих проблема у терапији тумора.



VI ЗАКЉУЧЦИ

На основу резултата истраживања докторске дисертације могу се издвојити

Општи закључци:

- Екстракти испитиваних врста лековитих биљака (*T. chamaedrys*, *A. flavum*, *G. punctata*, *L. vulgare* и *C. erythrea*) делују цитотоксично на ћелијским линијама колоректалног карцинома (HCT-116 и SW480 ћелијским линијама), док на здравим фибробластима коже не показују овакве ефекте, што потврђује антитуморска својства испитиваних биљака. SW480 ћелије су осетљивије на третмане у односу на HCT-116 ћелије.
- Интензитет цитотоксичности зависи од врсте биљке, квантитативног и квалитативног састава фенолних једињења присутних у њима и коришћеног растварача у екстракционој процедури. Међу испитиваним врстама екстраката, метанолни и ацетонски екстракт показују подједнако добру цитотоксичну активност, док етилацетатни екстракт има најслабију активност, што је у корелацији са садржајем укупних фенола и флавоноида у екстрактима.
- Цитотоксични ефекти испитиваних врста биљака су последица индуковане апоптозе, као доминантно присутног типа ћелијске смрти, активирањем компоненти спољашњег (рецепторима посредованог) и унутрашњег (митохондрија зависног) апоптотског сигналног пута. Третмани екстрактима биљака изазивају дисбаланс редокс статуса и повећање O_2^- , што може бити један од узрока њиховог проапоптотског деловања. Екстракти испитиваних биљака углавном показују инхибиторне ефекте на експресију гена, чији су протеински производи укључени у метаболизам ксенобиотика и лекова и појаву резистенције малигнућ ћелија на терапију антитуморским супстанцама.
- Pd(II) комплекс изазива добру цитотоксичност на ћелијама колоректалног карцинома, али и високе проценте некрозе и цитотоксичне ефекте на здравим фибробластима коже.

Оштећења ћелија изазвана оксидационим стресом су могућ узрок некротске активности Pd(II) комплекса. Комбиновани третмани екстраката биљака *A. flavum* и *G. punctata* и Pd(II) комплекса смањују токсичност Pd(II) комплекса на здравим ћелијама, а супротно повећавају цитотоксичност на малигним, при чему долази до међусобних синергистичких ефеката. У комбинованим третманима у односу на појединачни третман Pd(II) комплексом смањују се проценти некрозе, повећава се цитотоксичност изазвана апоптозом и смањује експресија иРНК испитиваних гена.

Специфични закључци:

- Екстракти биљке *A. flavum* показују најбољу цитотоксичну и проапоптотску активност на ћелијама колоректалног карцинома, са изузетно ниским IC₅₀ вредностима и најбољом активношћу ацетонског екстракта. У ћелијама третираним метанолним екстрактом биљке *A. flavum* повећана је експресија Fas рецептора на мембрани и активност каспазе 8 у спољашњем апоптотском путу у обе испитиване ћелијске линије. Повећана активност каспазе 9 потврђује улогу митохондрија у апоптози, доминантно у HCT-116 ћелијама у односу на SW480. Евидентна је молекуларна модулација апоптозе у присуству ROS и RNS (повећање концентрације O₂⁻, инхибиција протеинске експресије iNOS-a, смањење концентрације нитрита и повећање нивоа GSH), као и инхибиција иРНК експресије испитиваних ензима укључених у метаболизам и транспорт лекова.
- Метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys* показује добру цитотоксичну и проапоптотску активност на испитиваним ћелијским линијама. Апоптоза је посредована активацијом компоненти спољашњег и унутрашњег апоптотског пута, вероватно као последица прооксидационих ефеката (висок ниво O₂⁻). *T. chamaedrys* не изазива статистички значајне промене иРНК експресије *CYP1A1* гена у ћелијама колоректалног карцинома, док инхибира иРНК експресију *GSTP1* и *MRP2* гена.
- Екстракти биљке *G. punctata* не изазивају цитотоксичне ефекте на испитиваним ћелијским линијама, мада индукују значајне проценте апоптозе у високим концентрацијама, након дужег времена третмана у SW480 ћелијама. У односу на остале тестиране биљке, *G. punctata* изазива слабије прооксидационе ефекте, док након дужег времена излагања

показује антиоксидационе ефекте на обе ћелијске линије, повећавајући ниво GSH. *G. punctata* значајно инхибира експресију метаболичких ензима.

- Екстракти листова биљке *L. vulgare* изазивају добре цитотоксичне и проапоптотске ефекте на испитиваним ћелијама, док екстракти плодова показују добре, али нешто слабије ефекте у односу на екстракте листова. У поређењу са осталим биљкама, екстракти листова и плодова биљке *L. vulgare* у НСТ-116 ћелијама доминантније индукују промене у спољашњем путу апоптозе у односу на унутрашњи и већи проценат некрозе као последицу јаче продукције ROS и RNS одговорне за некротске ефекте. Метанолни екстракти листова и плодова биљке *L. vulgare* изазивају повећану иРНК експресију *GSTP1* и екстракт листова повећава иРНК експресију *MRP2* гена у SW480 ћелијама, као и концентрацију GSH, сугеришући да се приликом метаболизма компоненте екстракта конјугују са GSH и уз помоћ транспортних протеина избацују из ћелија.
- Биљка *C. erythrea* је показала слабе цитотоксичне и релативно добре проапоптотске ефекте, у зависности од врсте екстракта и концентрације. Након дужег времена у појединим концентрацијама *C. erythrea* показује антиоксидационе ефекте, смањујући концентрацију $O_2^{\cdot -}$. У SW480 ћелијама иРНК експресија *GSTP1* гена значајно је повећана у односу на контролу, због могућег метаболизма компоненти екстракта биљке *C. erythrea* овим ензимом.
- **Pd(II) комплекс** изазива значајну цитотоксичност на ћелијама колоректалног карцинома, али и високе проценте некрозе и цитотоксичне ефекте на здравим фибробластима коже. У НСТ-116 ћелијама митохондрије играју значајну улогу у апоптози индукованој Pd(II) комплексом; активност каспазе 9 је значајно повећана пропорционално највишој концентрацији $O_2^{\cdot -}$ у поређењу са осталим третманима. Pd(II) комплекс у зависности од аплициране дозе индукује двојаке ефекте на параметре сигналног пута апоптозе и редокс статуса. Високе концентрације Pd(II) комплекса изазивају оксидациони стрес у ћелијама карцинома колоне, што је могућ узрок индуковане некрозе, док ниске концентрације уводе ћелије у апоптозу. Експресије иРНК испитиваних гена за метаболичке ензиме су непромењене или негде повећане, што указује на метаболизам Pd(II) комплекса овим ензимима, могућу конјугацију Pd(II) комплекса са GSH уз помоћ ензима *GSTP1* и транспорта конјугата помоћу транспортних протеина кроз мембрану.

- **Комбиновани третмани Pd(II) комплекса и екстраката биљака *A. flavum* и *G. punctata*** смањују токсичност Pd(II) комплекса на здравим ћелијама, а супротно повећавају цитотоксичност на малигним ћелијама, при чему долази до међусобних синергистичких ефеката. У комбинованим третманима смањује се проценат некрозе у односу на појединачни третман Pd(II) комплексом, а повећава се цитотоксичност изазвана апоптозом. У SW480 ћелијама комбиновани третмани активирају митохондријални пут пре него Fas посредован пут, повећавајући продукцију O_2^- у односу на контролу и појединачне третмане. У комбинованим третманима екстраката биљака и Pd(II) комплекса експресија иРНК гена чији су протеински производи укључени у метаболизам антитуморских супстанци је генерално смањена у односу на појединачне третмане на обе ћелијске линије, што резултира повећаном цитотоксичношћу Pd(II) комплекса због његовог слабијег метаболитања и транспорта кроз мембрану у присуству биљака које инхибирају експресију ових протеина.

Коначан закључак:

- На основу изнетих резултата може се закључити да испитиване врсте биљака, коришћене у народној медицини у третманима дигестивних болести, поседују изузетан антитуморски потенцијал, изазивајући цитотоксичне и проапоптотске ефекте у појединачним и комбинованим третманима са Pd(II) комплексом на ћелијама колоректалног карцинома у зависности од њиховог фенолног састава. Резултати квантитативног и квалитативног састава фенолних једињења од великог су значаја за потврду лековитости испитиваних врста биљака, као и њихову промоцију, јер се неке од њих мање користе у народној медицини и фармацији на нашим просторима. Активне компоненте испитиваних врста биљака, са посебним нагласком на биљку *A. flavum*, неопходно је додатно изоловати, тестирати и одредити начин аплицирања приликом терапије у будућим *in vitro* и *in vivo* експерименталним истраживањима и посебно истаћи њихову могућност коришћења у различитим видовима комбинованих третмана у лечењу карцинома колоне.



VII ЛИТЕРАТУРА

1. Aberham A, Pieri V, Croom J. EM, Ellmerer E, Stuppner H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthonenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 54: 517-525.
2. Abu-Surah AS, Al-Sa'doni H, Abdalla MY. Palladium-based chemotherapeutic agents: Routes toward complexes with good antitumor activity. *Cancer Ther.* 2008; 6: 1-10.
3. Acker T, Fandrey J, Acker H. The good, the bad and the ugly in oxygen-sensing: ROS, cytochromes and prolyl-hydroxylases. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 195-207.
4. Acquaviva R, Di Giacomo C, Sorrenti V, Galvano F, Santangelo R, Cardile V, Gangia S, D'Orazio N, Abraham NG, Vanella L. Antiproliferative effect of CD52 oleuropein in prostate cell lines. *Int J Oncol.* 2012; 41(1): 31-38.
5. Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* 1999; 18(5): 1321-1334.
6. Akileshwari C, Muthenna P, Nastasijević B, Joksić G, Patrash JM, Reddy GB. Inhibition of aldose reductase by *Gentiana lutea* extracts. *Exp Diabetes Res.* 2012; 2012: 147965.
7. Alary J, Guéraud F, Cravedi JP. Fate of 4-hydroxynonenal *in vivo*: disposition and metabolic pathways. *Mol Aspects Med.* 2003; 24: 177-187.
8. Al-Azzawie HF, Alhamdani MS. Hypoglycemic and antioxidant effect of oleuropein in alloxan-diabetic rabbits. *Life Sci.* 2006; 78: 1371-1377.
9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5th Ed. Garland Science, New York, 2008.
10. Allen DD, Caviedes R, Cárdenas AM, Shimahara T, Segura-Aguilar J, Caviedes PA. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2005; 31(8): 757-768.
11. Al-Obaid AM, El-Subbagh HI, Khodair AI, Elmazar MMA. 5-substituted-2-thiohydantoin analogs as a novel class of antitumor agents. *Anticancer Drugs.* 1996; 7(8): 873-880.

12. Anderson ME, Bridges RJ, Meister A. Direct evidence for inter-organ transport of glutathione and that the non-filtration renal mechanism for glutathione utilization involves gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980; 96: 848-853.
13. Andrade-Cetto A, Henrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2005; 99: 325-348.
14. Ambs S, Hussain SP, Harris CC. Interactive effects of nitric oxide and the *p53* tumor suppressor gene in carcinogenesis and tumor progression. *FASEB J.* 1997; 11: 443-448.
15. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry.* 2005; 70: 200-214.
16. Androutsopoulos VP, Papakyriakou A, Vourloumis D, Spandidos DA. Comparative CYP1A1 and CYP1B1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids. *Bioorg Med Chem.* 2011; 19(9): 2842-2849.
17. Androutsopoulos VP, Spyrou I, Ploumidis A, Papalampros AE, Kyriakakis M, Delakas D, Spandidos DA, Tsatsakis AM. Expression profile of CYP1A1 and CYP1B1 enzymes in colon and bladder tumors. *PLoS One.* 2013; 8(12): e82487.
18. Arber N, Hibshoosh H, Yasui W, Neugut AI, Hibshoosh A, Yao Y, Sgambato A, Yamamoto H, Shapira I, Rosenman D, Fabian I, Weinstein IB, Tahara E, Holt PR. Abnormalities in the expression of cell cycle-related proteins in tumors of the small bowel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(12): 1101-1105.
19. Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol.* 1997; 10: 2-18.
20. Arrigo AP. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biol Med.* 1999; 27(9-10): 936-944.
21. Ashida S, Noguchi SF, Suzuki T. Antioxidative components, xanthone derivatives in *Swertia japonica* Makino. *J Am Oil Chem Soc.* 1994; 71: 1095-1099.
22. Auclair C, Voisin E. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA. Eds. Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, 1985.
23. Avendano C, Meuendz C. Medicinal chemistry of anticancer drugs. Ed. Elsevier, Amsterdam, 2008, pp. 9-51.
24. Azad N, Vallyathan V, Wang L, Tantishaiyakul V, Stehlik C, Leonard SS, Rojanasakul Y. S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis. *J Biol Chem.* 2006; 10: 34124-34134.

25. Bagci E, Yazgin A, Hayata S, Cakilcioglu U. Composition of essential oil of *Teucrium chamaedrys* L. (Lamiaceae) from Turkey. *J Med Plant Res.* 2010; 4(23): 2588-2590.
26. Balijagić J, Janković T, Zdunić G, Bosković J, Savikin K, Godevac D, Stanojković T, Jovancević M, Menković N. Chemical profile, radical scavenging and cytotoxic activity of yellow gentian leaves (*Genitaneae luteaefolium*) grown in northern regions of Montenegro. *Nat Prod Commun.* 2012; 7(11): 148714-148790.
27. Baker MA, Cerniglia GJ, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biological samples. *Anal Biochem.* 1990; 190: 360-365.
28. Baróniková S, Nagy M, Grančai D. Changes in immunomodulatory activity of human mononuclear cells after cultivation with leaf decoctions from the genus *Ligustrum* L. *Phytother Res.* 1999; 13: 692-695.
29. Baskić D, Popović S, Ristić P, Arsenijević NN. Analysis of cyclohexamide-induced apoptosis in human leukocytes: Fluorescence microscopy using annexin V/propidium iodide versus acridin orange/ethidium bromide. *Cell Biol Int.* 2006; 30: 924-932.
30. Basnet P, Kadota S, Shimizu M, Namba T. Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)- induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Med.* 1994; 60: 507-511.
31. Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med.* 1996; 334: 1717.
32. Bernardini S, Bernassola F, Cortese C, Ballerini S, Melino G, Motti C, Bellincampi L, Iori R, Federici G. Modulation of glutathione *S*-transferase P1-1 activity by polymerization during apoptosis. *J Cell Biochem.* 2000; 77: 645-653.
33. Bertram JS. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2000; 21(6): 167-223.
34. Bisset NG. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. CRC Press, New York, 1994.
35. Blanc M, Cussac M, Boucherle A, Leclerc G. Synthesis of 2 thiohydantoin derivatives with potential immunomodulating and anticancer activities. *Eur J Med Chem.* 1992; 27(3): 267-275.
36. Block E. The chemistry of garlic and onions. *Sci Am.* 1985; 252: 114-119.
37. Blumenthal M, Goldberg A, Brinckman J. Herbal medicine: expanded commission E monographs. Lippincott Williams & Wilkins, Newton, MA, 2000.
38. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1461: 347-357.

39. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92: 1295-1302.
40. Boskou D. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006; 17: 505-512.
41. Botion LM, Ferreira AVM, Côrtes SF, Lemos VS, Braga FC. Effects of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina® on lipid metabolism and intestinal tonus. *J Ethnopharmacol.* 2005; 102: 137-142.
42. Bottone FE, Baek SJ, Nixon JB and Eling TE. Diallyl disulfide (DADS) induce the antitumorigenic NSAID-activated gene (NAG-1) by p53- dependent mechanism in human colorectal HCT 116 cells. *J Nutr.* 2002; 132(2): 733-738.
43. Boue SM, Cleveland TE, Carter-Wientjes C, Shih BY, Bhatnagar D, McLachlan JM, Burow ME. Phytoalexin-enriched functional foods. *J Agric Food Chem.* 2009; 57: 2614-2622.
44. Boyer JC, Umar A, Risinger JI, Lipford JR, Kane M, Yin S, Barrett JC, Kolodner RD, Kunkel TA. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 1995; 55: 6063-6070.
45. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ.* 2000; 321(7264): 805-808.
46. Brodská B, Holoubek A. Generation of reactive oxygen species during apoptosis induced by DNA-damaging agents and/or histone deacetylase inhibitors. *Oxid Med Cell Longev.* 2011; 2011: 253529.
47. Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2000; 275: 20474-20479.
48. Burger AM, Fiebig H. Preclinical screening for new anticancer agents. In: Figg WD, McLeod HL. Eds. Handbook of anticancer pharmacokinetics and pharmacodynamics. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.
49. Burns TF, El-Deiry WS. Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL sensitive colon carcinoma cell line, SW480, using a genetic approach. *J Biol Chem.* 2001; 276: 37879-37886.
50. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol.* 2000; 25: 169-193.
51. Butiuc-Keul A, Suteu A, Deliu C. *In vitro* organogenesis of *Gentiana punctata*. *Not Bot Hort Agrobiot.* 2005: XXXIII.

52. Butour JL, Wimmer S, Wimmer F, Castan P. Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: a comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA *in vitro*. *Chem Biol Interact.* 1997; 104(2-3): 165-178.
53. Capasso F, Mascolo N, Morrica P, Ramundo E. Phytotherapeutic profile of some plants used in folk medicine. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1983; 59(10): 1398-1404.
54. Caro AA, Cederbaum AI. Role of cytochrome P450 in phospholipase A2 and arachidonic acid-mediated cytotoxicity. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 364-375.
55. Carrasco-Pozo C, Gotteland M, Speisky H. Protection by apple peel polyphenols against indometacin-induced oxidative stress, mitochondrial damage and cytotoxicity in Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol.* 2010; 62(7): 943-950.
56. Chabner BA, Amrein PC, Druker B, Michaelson MD, Mitsiades CS, Goss PA, Ryan DP, Ramachandra S, Richardson PG, Supko JG, Wilson WH. Antineoplastic Agents. In: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman and Gilman's Pharmacologic Basis of Therapeutics. Eds. The McGraw-Hill Companies, New York, 2006, pp.1315-1404.
57. Chen SX, Wan M, Loh BN. Active constituents against HIV-1 protease from *Garcinia mangostana*. *Planta Med.* 1996; 62: 381-382.
58. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162: 156-159.
59. Chou T, Talalay P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. *Trends Pharmacol Sci.* 1983; 4: 450-454.
60. Chu C, Xu J, Cheng D, Li X, Tong S, Yan J, Li Q. Antiproliferative and apoptosis-inducing effects of camptothecin-20(s)-O-(2-pyrazolyl-1)acetic ester in human breast tumor MCF-7 cells. *Molecules.* 2014; 19: 4941-4955.
61. Clarens CD. Molecular genetics of colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig.* 2004; 96: 48-59.
62. Coleman WB, Tsongalis GJ. Molecular mechanisms of human carcinogenesis. *EXS.* 2006; 96: 321-349.
63. Coruh N, Celep SAG, Ozigokce F. O. Antioxidant properties of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., *Chaerophyllum macropodium* Boiss. and *Heracleum persicum* Desf. from Apiaceae family used as food in Eastern Anatolia and their inhibitory effects on glutathione-S-transferase. *Food Chem.* 2007; 100: 1237-1242.
64. Covini D, Tardito S, Bussolati O, Chiarelli LR, Paschetto MV, Digilio R, Valentini G, Scotti C. Expanding targets for a metabolic therapy of cancer: L-asparaginase. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2012; 7(1): 4-13.

65. Cragg GM, Newman DJ. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *J Nat Prod.* 2004; 67: 232-244.
66. Cragg GM, Newman DJ. Plants as source of anticancer agents. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 72-79.
67. Crozier A, Clifford NM, Ashihara H. Plant secondary metabolites: Occurrence, structure, and role in the human diet. Wiley-Blackwell Publishing, Oxford, 2006.
68. Cullen KJ, Newkirk KA, Biaglow JE, Morse-Gaudio M, Zachgo E. Glutathione S-transferase {pi} amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res.* 2003; 63(23): 8097-8102.
69. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods.* 2002; 265(1-2): 49-72.
70. Ćurčić M, Stanković M, Mrkalić E, Matović Z, Banković D, Cvetković D, Đačić D, Marković S. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *Int J Mol Sci.* 2012a; 13(2): 2521-2534.
71. Ćurčić M, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić Lj, Topuzović M, Djačić D, Marković S. Biological effects, total phenolic content and flavonoid concentrations of fragrant yellow onion (*Allium flavum* L.). *Med Chem.* 2012b; 8(1): 46-51.
72. Dai J, Mumper JR. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties *Molecules.* 2010; 15: 7313-7352.
73. Daniel M, Sabins SD. Chemical systematics of family gentianaceae. *Cur Sci.* 1978; 47 (4): 109-111.
74. Daniel PT, Koert U, Schuppan J. Apoptolidin: induction of apoptosis by a natural product. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2006; 45(6): 872-893.
75. Davis W, Lamson MS, Matthew S, Brignall ND. Antioxidants and cancer III: quercetin. *Altern Med Rev.* 2000; 5: 196-208.
76. Dean, M, Allikmets R. Evolution of ATP-binding cassette transporter genes. *Curr Opin Genet Dev.* 1995; 5: 779-785.
77. Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 2001; 11: 1156-1166.
78. Dedon PC, Tannenbaum SR. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. *Arch Biochem Biophys.* 2004; 423: 12-22.

79. De la Puerta R, Dominguez MEM, Ruiz-Gutierrez V, Flavill JA, Hoult JRS. Effects of olive oil phenolics on scavenging of reactive nitrogen species and upon nitregeric neurotransmission. *Life Sci.* 2001; 69: 1213-1222.
80. Delgoda R, Westlake A. Herbal Interactions involving cytochrome P450 enzymes. *Toxicol Rev.* 2004; 23: 239-249.
81. Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR. A review on plant-derived natural products and their analogs with anti-tumor activity. *Indian J Pharmacol.* 2008; 40(2): 49-58.
82. Diklić N. *Teucrium* L. U: Josifović M. Flora Republike Srbije. VI izdanje. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 1974, str. 353-354.
83. Dimmelder S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher, A. M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 1997; 185: 601-607.
84. Dimmeler S, Zeiher A. M. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1997; 1: 275-281.
85. Dion ME, Milner JA. Formation and bioactivation of nitrosomorpholine is inhibited by S-allyl cystein. *Exp Biol.* 1996; 96: 41-62.
86. Divsalar A, Saboury AA, Mansoori-Torshizi H, Hemmatinejad B. Comparative and structural analysis of the interaction between β -lactoglobulin type A and B with a new anticancer component (2,2'-bipyridin n-hexyl dithiocarbamate Pd (II) nitrate). *Bull Korean Chem Soc.* 2006; 27: 1801-1808.
87. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002; 82: 47-95.
88. Dumitru CA, Zhang Y, Li X, Gulbins E. Ceramide: a novel player in reactive oxygen species-induced signaling? *Antioxid Redox Signaling.* 2007; 9: 1535-1540.
89. Đorđević V, Pavlović D, Kocić G. Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet, Niš, 2000.
90. Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem.* 2002; 277(41): 38079-3886.
91. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007; 35: 495-516.
92. El-Sharkawy ER, Matloub AA, Atta EM. Cytotoxicity of new flavonoid compound isolated from *Farsetia aegyptia*. *Int J Pharm Sci Invent.* 2013; 2(1): 23-27.
93. England K, Cotter TG. Direct oxidative modifications of signaling proteins in mammalian cells and their effects on apoptosis. *Redox Rep.* 2005; 10: 237-245.

94. Fabiani R, De Bartolomeo A, Rosignoli P, Servili M, Selvaggini R, Montedoro GF, Di Saverio C, Morozzi G. Virgin olive oil phenols inhibit proliferation of human promyelocytic leukemia cells (HL60) by inducing apoptosis and differentiation. *J Nutr.* 2006; 136: 614-619.
95. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ Health Perspect.* 2002; 109(1): 69-75.
96. Faried A, Kurnia D, Faried LS, Usman N, Miyazaki T, Kato H, Kuwano H. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *Int J Oncol.* 2007; 30(3): 605-613.
97. Feinstein DL, Galea E, Reis DJ. Suppression of glial iNOS expression by tyrosine kinase inhibitors. *Ann NY Acad Sci.* 1994; 738: 325-328.
98. Felley-Bosco E. Role of nitric oxide in genotoxicity: implication for carcinogenesis. *Cancer Metast Rev.* 1998; 17: 25-37.
99. Finnegan RA, Merkel KE, Patel JK. Constituents of *Mammea americana* L. XII: biological data for xanthenes and benzophenones. *J Pharm Sci.* 1973; 62: 483-485.
100. Florea AM, Büsselberg D. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers.* 2011; 3(1): 1351-1371.
101. Fojo T, Bates S. Strategies for reversing drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22: 7512-7523.
102. Fresco P, Borges F, Diniz C, Marques MP. New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Med Res Rev.* 2006; 26: 747-766.
103. Freshney RI. Culture of animal cells. A manual of basic technique. New York, Alan R. Liss Inc., 1983.
104. Fruehauf JP, Meyskens FL Jr. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res.* 2007; 13(3): 789-794.
105. Fugh-Berman A. Herb-drug interactions. *Lancet.* 2000; 355 (9198): 134-138.
106. Fujino H, Toyomura K, Chen XB, Regan JW, Murayama T. Prostaglandin E₂ regulates cellular migration via induction of vascular endothelial growth factor receptor-1 in HCA-7 human colon cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81: 379-387.
107. Fulda S, Debatin KM. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004; 4: 569-576.
108. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharma Des.* 2003; 9 (25): 2078-2089.

109. Galati G, Teng S, Moridani MY, Chan TS, O'Brien PJ. Cancer chemoprevention and apoptosis mechanism induced by dietary polyphenolics. *Drug Metabol Drug Interact.* 2000; 17: 311-349.
110. Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju J, Thorson JS, Shen B. Antitumor antibiotics: bleomycin, enediyne, and mitomycin. *Chem Rev.* 2005; 105(2): 739-758.
111. Ganesaratnam K, Balendiran, Dabur R, Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct.* 2004; 22(6): 343-352.
112. Gee J, Hurrell R, Leth T, Sandberg AS. Food for Health – an insight into natural bioactive compounds of plants. In: Frolich W, Dokkum WV, Chesson A. Eds. Cost 916 Action, Office for Official Publications of the European Communities, 2001.
113. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metast Rev.* 1998; 17: 7-23.
114. Georgieva E, Handjieva N, Popov S, Evstatieva L. Comparative analysis of the volatiles from flowers and leaves of three *Gentiana* species. *Biochem Syst Ecol.* 2005; 33: 938-947.
115. Goodwin G, Baylin SB. Relationships between neuroendocrine differentiation and sensitivity to gamma radiation in culture line oh-1 of human small cell lung carcinoma. *Cancer Res.* 1982; 42(4): 1361-1367.
116. Gonzalez-Angulo AM, Morales-Vasquez F, Hortobagyi GN. Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 608: 1-22.
117. Gopalakrishnan A, Xu CJ, Nair SS, Chen C, Hebbar V, Kong AN. Modulation of activator protein-1 (AP-1) and MAPK pathway by flavonoids in human prostate cancer PC3 cells. *Arch Pharmaceut Res.* 2006; 8: 633-644.
118. Gottesman MM, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu Rev Biochem.* 1993; 62: 385-427.
119. Gaudens E, Boulanger V, Mollard C, Mariage-Samson R, Barlet X, Grémy G, Couillault C, Lajémi M, Piatier-Tonneau D, Zaborski P, Eveno E, Auffray C, Imbeaud S. Deciphering cellular states of innate tumor drug responses. *Genome Biol.* 2006; 7(3): R19.
120. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 267-271.
121. Gribben JG, Hallek M. Rediscovering alemtuzumab: current and emerging therapeutic roles. *Br J Haematol.* 2009; 144(6): 818-831.
122. Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselky und Benedikt Ueber einige Azoverbindungen. *Ber Dtsch Chem Ges.* 1879; 12: 426-428.

123. Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med.* 1999; 27: 922-935.
124. Guengerich FP. Cytochrome P450 and chemical toxicology. *Chem Res Tox.* 2007; 21(1): 70-83.
125. Gueritte F, Fahy J. The vinca alkaloids. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer agents from natural products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 7, pp. 23.
126. Gupta A, Naraniwal M, Kothari V. Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *IJANS.* 2012; 1(1): 8-26.
127. Gyamfi AM, Ohtani II, Shinno E, Aniya Y. Inhibition of glutathione S-transferase by thoningianin A, isolated from the African medicinal herb, *Honingia sangvinea*, in vitro. *Food Chem Toxicol.* 2004; 42: 1401-1408.
128. Haddad PS, Azar GA, Groom S, Boivin M. Natural health products, modulation of immune function and prevention of chronic diseases. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005; 2(4): 513-520.
129. Hainsworth JD, Johnson DH, Greco FA. Cisplatin-based combination chemotherapy in the treatment of poorly differentiated carcinoma and poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site: results of a 12-year experience. *J Clin Oncol.* 1992; 10(6): 912-922.
130. Hall MD, Okabe M, Shen DW, Liang XJ, Gottesman MM: The role of cellular accumulation in determining sensitivity to platinum-based chemotherapy. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008; 48: 495-535.
131. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet.* 1994; 344: 721-724.
132. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 3rd Ed. Oxford University Press Inc., New York, 1999.
133. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th Ed. Clarendon Press, Oxford, 2006.
134. Hamdi K, Castellon R. Oleuropein, a non-toxic olive iridoid, is an anti-tumor agent and cytoskeleton disruptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 334: 769-778.
135. Hamilton S. Pathology and biology of colorectal cancer. In: Young G, Levin B, Rozen A. Eds. Prevention and early detection of colorectal cancer. WB Saunders, London, 1996, pp. 3-23.
136. Hampton MB, Orrenius S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett.* 1997; 414: 552-556.

137. Han MH, Kim GY, Yoo YH, Choi YH. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Lett.* 2013; 220(2): 157-166.
138. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell.* 1996; 86: 353-364.
139. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011; 144(5): 646-674.
140. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 2003; 1: 47-61.
141. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochem.* 2000; 55: 481-504.
142. Harris TJ, Drake CG. Primer on tumor immunology and cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2013; 1: 12.
143. Harrison MA, Rae IF. General techniques of cell culture. Cambridge University Press, Cambridge, US, 1997.
144. Hasani-Ranjbar S, Nayebi N, Larijani B, Abdollahi M. A systematic review of the efficacy and safety of *Teucrium* species; from anti-oxidant to anti-diabetic effect. *Int J Pharm.* 2010; 6: 315-325.
145. Hashizume T, Imaoka S, Mise M. Involvement of CYP2J2 and CYP2F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300: 298-301.
146. Hatjimanoli M, Debelmas AM. Etude de *Centaureum umbellatum* Gil. Identification des acides phénols. *Ann Pharm Fr.* 1977; 35: 107-111.
147. Hattenschwiler S, Vitousek PM. The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends Ecol Evol.* 2000; 15(6): 238-242.
148. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1995; 30(6): 445-600.
149. He ZD, Lau KM, But PP, Jiang RW, Dong H, Ma SC, Fung KP, Ye WC, Sun HD. Antioxidative glycosides from the leaves of *Ligustrum robustum*. *J Nat Prod.* 2003; 66: 851-854.
150. Hegarty M, Chisholm D. Chemotherapy and anaesthesia. *Curr Anaesth Crit Care.* 2002; 13: 168-174.
151. Heneberg P, Draber P. Regulation of cys-based protein tyrosine phosphatases via reactive oxygen and nitrogen species in mast cells and basophils. *Curr Med Chem.* 2005; 12: 1859-1871.

152. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001; 11: 795-805.
153. Herdener M, Heigold S, Saran M, Bauer G. Target cell-derived superoxide anions cause efficiency and selectivity of intercellular induction of apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2000; 29(12): 1260-1271.
154. Hermann G, Heffeter P, Kryeziu K, Berger W, Hann S, Koellensperger G. The study of reduced versus oxidized glutathione in cancer cell models employing isotopically labelled standards. *Anal Methods*. 2014; 6: 3086-3094.
155. Higuchi H, Bronk SF, Takikawa Y, Werneburg N, Takimoto R, El-Deiry W, Gores GJ. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-Receptor 2/DR5 expression and apoptosis. *J Biol Chem*. 2001; 276: 38610-38618.
156. Hirsch K, Danilenko M, Giant J, Miron T, Rabinkov A, Wilchek M, Mirelmen D, Levy J, Sharoni Y. Effect of purified allicin, the major ingredient of freshly crushed garlic on cancer cell proliferation. *Nutr Cancer*. 2000; 38(2): 245-254.
157. Horax R, Hettiarachchy N, Chen P. Extraction, quantification, and antioxidant activities of phenolics from pericarp and seeds of bitter melons (*Momordica charantia*) harvested at three maturity stages (immature, mature and ripe). *J Agric Food Chem*. 2010; 58: 4428-4433.
158. Horneber MA, Bueschel G, Huber R, Linde K, Rostock M. Mistletoe therapy in oncology. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (2): CD003297.
159. Hortobagyi GN. Progress in systemic chemotherapy of primary breast cancer: an overview. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2001; 30: 72-79.
160. Houghton PJ, Raman A. Laboratory handbook for the fractionation of natural extracts. Chapman and Hall, London, 1998.
161. Hu Z, Yang X, Ho PC, Chan SY, Heng PW, Chan E, Duan W, Koh HL, Zhou S. Herb-drug interactions: a literature review. *Drugs*. 2005; 65(9): 1239-1282.
162. Hua H, Li M, Luo T, Yin Y, Jiang Y. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68(23): 3853-3868.
163. Ignarro LJ, Cirino G, Casini A, Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999; 34(6): 879-886.
164. Ignarro LJ, Napoli C, Loscalzo J. Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide. An overview. *Circ Res*. 2002; 90: 21-28.
165. Isiguro K, Yamaki M, Takagi S, Ikeda Y, Kawakami K, Ito K. Studies on iridoid-related compounds. IV. Antitumor activity of iridoid aglycones. *Chem Pharm Bull*. 1986; 34: 2375-2379.

166. Jaishree V, Badami S. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin from *Enicostemma axillare* against D-galactosamine induced acute liver damage in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010; 130: 103-106.
167. Janković S. Klinička farmakologija. Medicinski fakultet, Kragujevac, 2003.
168. Jantova S, Nagy M, Ruzeková L, Grancai D. Antibacterial activity of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother Res.* 2000; 14: 601-603.
169. Jantova S, Nagy M, Ruzekova L, Grancai D. Cytotoxic activity of plant extracts from the families Fabaceae, Oleaceae, Philadelphaceae, Rosaceae and Staphyleaceae. *Phytother Res.* 2001; 15: 22-25.
170. Jensen SR, Schripsema J. Chemotaxonomy and pharmacology of Gentianaceae. In: Struwe L, Albert VA. Eds. *Gentianaceae systematics and natural history*. Eds. Cambridge University Press, Cambridge, New York, 2002, pp. 573-631.
171. Jensen SR, Nielsen BJ, Dahlgren R. Iridoid compounds, their occurrence and systematic importance in the Angiosperms. *Botaniska Notiser.* 1975; 128: 148-180.
172. Jeong JB, Jeong HJ. Rheosmin, a naturally occurring phenolic compound inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression in RAW264.7 cells by blocking NF-kappaB activation pathway. *Food Chem Toxicol.* 2010; 48:2148-2153.
173. Jevtić VV, Radić GP, Šeklić DS, Živanović MN, Marković SD, Trifunović SR. Part XVI – stereospecific ligands and their complexes. Synthesis, characterization and in vitro antiproliferative activity of new platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against breast cancer (MDA-MB-231) and colon cancer (HCT-116 and SW-480) cell lines. *Maced J Chem Chem Eng.* 2014; 33: 53-58.
174. Jiang RW, Wong KL, Chan YM, Xu HX, But PPH, Shaw PC. Isolation of iridoid and secoiridoid glycosides and comparative study on *Radix gentianae* and related adulterants by HPLC analysis. *Phytochemistry.* 2005; 66: 2674-2680.
175. Jovanović B. *Ligustrum*. U: Josifović M. Flora Republike Srbije. V izdanje. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 1973, str. 456-457.
176. Jovanović-Dunjić R. *Centaureum* L. U: Josifović M. Flora Republike Srbije. V izdanje. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 1973b, str. 409-412.
177. Jovanović-Dunjić R. *Gentiana* L. U: Josifović M. Flora Republike Srbije. V izdanje. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 1973a, str. 412-426.
178. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW,

- Zúñiga-Pflücker JC, Kroemer G, Penninger JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001; 410(6828): 549-554.
179. Jourdeuil D, Jourdeuil F, Kutchukian PS, Musab RA, Wink DA, Grisham MB. Reaction of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. *J Biol Chem*. 2001; 276: 28799-28805.
180. Joy PP, Thomas J, Mathew S, Jose G, Joseph J. Medicinal plants. In: Bose TK, Kabir J, Das P, Joy PP. Eds. Tropical Horticulture Vol. 2. Calcutta, Naya Prokash, 2001, pp. 449-632.
181. Jurišić, Živančević-Simonović S. U: Živančević-Simonović S, Đukić A, Đurđević P, Jurišić V, Mijatović Lj. Opšta patološka fiziologija. Medicinski fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2002, str. 463-485.
182. Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: Apoptosis versus necrosis. *Int J Oncol*. 2002; 21(1): 165-170.
183. Kamal A, Faazil S, Malik MS. Apoptosis-inducing agents: a patent review (2010-2013). *Expert Opin Ther Pat*. 2014; 24(3): 339-354.
184. Kaminsky LS, Zhang ZY. Human P450 metabolism of warfarin. *Pharmacol Ther*. 1997; 73 (1): 67-74.
185. Kampa M, Nifli AP, Notas G, Castanas E. Polyphenols and cancer cell growth. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 2007; 159: 79-113.
186. Katić V, Kutlešić Č, Stojanović D, Petrović S, Dimov D, Tasić D, Gligorijević J, Mihailović D, Živković V, Jovičić-Milentijević M. Opšta patologija, udžbenik za studente medicine i stomatologije, Prosveta, Niš, 1996.
187. Kawanishi S, Hiraku Y, Pinlaor S, Ma N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological Chem*. 2006; 387(4): 365-372.
188. Kelloff GJ. Perspectives on cancer chemoprevention research and drug development. *Adv Cancer Res*. 2000; 78: 199-334.
189. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G. Transport of glutathione conjugates and glucuronides by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Biol Chem*. 1997; 378: 787-791.
190. Khan N, Afaq F, Mukhtar H. Apoptosis by dietary factors: the suicide solution for delaying cancer growth. *Carcinogenesis*. 2007; 28(2): 233-239.
191. Khan TA, Mazid M, Mohammad F. Status of secondary plant products under abiotic stress: an overview. *J Stress Physiol Biochem*. 2011; 7(2): 75-98.

192. Khuhaprema T, Srivatanakul P. Colon and rectum cancer in Thailand: an overview. *Jpn J Clin Oncol.* 2008; 38: 237-243.
193. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 1997; 272: 31138-31148.
194. Kingston DG. Taxol and its analogs In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer agents from natural products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 6, pp. 89.
195. Kingston DG. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *J Nat Prod.* 2009; 72(3): 507-515.
196. Kocić G, Pavlović D, Đorđević VB, Bjelaković G, Stojanović I. Role of nitric oxide and peroxynitrite in apoptosis relation to endonuclease activity. *Jugoslav Med Biochem.* 2003; 22: 93-100.
197. Kontek R, Matławska-Wasowska K, Kalinowska-Lis U, Kontek B, Ochocki J. Evaluation of cytotoxicity of new trans-palladium(II) complex in human cells *in vitro*. *Acta Pol Pharm.* 2011; 68(1): 127-136.
198. Komarova AE, Gudkov VA. Chemoprotection from p53-dependent apoptosis: potential clinical applications of the p53 inhibitors. *Biochem Pharmacol.* 2001; 62: 657-667.
199. Komarova NL, Wodarz D. Drug resistance in cancer: Principles of emergence and prevention. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102(27): 9714-9719.
200. Kopnin BP. Targets of oncogenes and tumor suppressors: key for understanding basic mechanisms of cancerogenesis. *Biochemistry.* 2000; 65: 2-27.
201. Kostova I. Platinum complexes as anticancer agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2006; 1: 1-22.
202. Kovala-Demertzi D, Boccarelli A, Demertzis MA, Coluccia M. *In vitro* antitumor activity of 2-acetyl pyridine 4N-ethyl thiosemicarbazone and its platinum(II) and palladium(II) complexes. *Chemotherapy.* 2007; 53: 148-152.
203. Kruger NJ, Hill SA, Retcliffe. Regulation of primary metabolic pathways in plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Proceedings of the Phytochemical Society of Europe , 1999, pp. 173-193.
204. Kucuk M, Gulec C, Yasar A, Ucuncu O, Yayli N, Coskuncelebi K, Terzioglu S, Yayli N. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils of *Teucrium chamaedrys* subsp. *chamaedrys*, *T. orientale* var. *puberulens* and *Teucrium chamaedrys* subsp. *Lydium Pharm Biol.* 2006; 44: 592-598.

205. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Neoplasia. In: Robbins, Cotran. Pathologic basis of disease. 7th Ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2005, pp. 269.
206. Kumar S, Dorstyn L. Analysing caspase activation and caspase activity in apoptotic cells. In: Erhardt P, Toth A. Eds. Apoptosis methods and protocols. 2nd Ed. Humana Press, New York, 2009, pp. 4.
207. Kumarasamy Y, Nahar L, Sarker SD. Bioactivity of gentiopicroside from the aerial parts of *Centaurium erythraea*. *Fitoterapia*. 2003; 74: 151-154.
208. Kushev D, Gorneva G, Enchev V, Naydenova E, Popova J, Taxirov S, Maneva L, Grancharov K, Spassovska N. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antitumor activity of platinum(II) complexes of 3-aminocyclohexanespiro-5-hydantoin. *J Inorg Biochem*. 2002; 89(3-4): 203-211.
209. Kwon YG, Min JK, Kim KM, Lee DJ, Billiar TR, Kim YM. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem*. 2001; 276: 10627-10633.
210. Lakušić R. Planinske biljke. III izdanje. "Svjetlost"- Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990, str. 108.
211. Lala PK, Orucevic A. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. *Cancer Metast Rev*. 1998; 17(1): 91-106.
212. Lapornik B, Prosek M, Wondra A G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J Food Eng*. 2005; 71: 214-222.
213. Lau BHS. Detoxifying, radio-protective and phagocyte-enhancing effects of garlic. *Int Clinic Nutr Rev*. 1989; 9: 27-31.
214. Lawen A. Apoptosis - an introduction. *Bioessays*. 2003; 25(9): 888-896.
215. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci*. 2000; 7: 2-15.
216. Lee KH, Xiao Z. Podophyllotoxins and analogs. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer agents from natural products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 5, pp. 71.
217. Lekehal M, Pessayre D, Lereau JM, Moulis C, Fouraste I, Fau D. Hepatotoxicity of the herbal medicine Germander: metabolic activation of its furano diterpenoids by cytochrome P450 3A depletes cytoskeleton associated protein thiols and forms plasma membrane blebs in rat hepatocytes. *Hepatology*. 1996; 24: 212-218.
218. Leonard GD, Fojo T, Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist*. 2003; 8(5): 411-424.

219. Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG, Cole SP. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol*. 2001; 59(5): 1171-1180.
220. Li C, Yang X, Chen C, Cai S, Hu J. Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway. *Mol Med Rep*. 2014a; 9(3): 935-40.
221. Li W, Liu M, Xu YF, Feng Y, Che JP, Wang GC, Zheng JH. Combination of quercetin and hyperoside has anticancer effects on renal cancer cells through inhibition of oncogenic microRNA-27a. *Oncol Rep*. 2014b; 31: 117-124.
222. Liochev S, Fridovich I. Role of O_2^- in the production of OH *in vivo* and *in vitro*. *Free Rad Biol Med*. 1994; 16: 29-33.
223. Lorusso D, Petrelli F, Coiru A, Raspagliesi F, Barni S. A systematic review comparing cisplatin and carboplatin plus paclitaxel-based chemotherapy for recurrent or metastatic cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2014; 133(1): 117-123.
224. L'vova GN, Zasukhina GD. Modification of repair DNA synthesis in mutagen-treated human fibroblasts during adaptive response and the antimutagenic effect of garlic extract. *Genetika*. 2002; 38(3): 306-309.
225. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. Conference and Workshop on Apoptosis and Disease. *EMBO Reports*. 2004; 5(7): 674-678.
226. Macheix J, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. FL:CRC Press, Boca Raton, 1990.
227. Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012; 12(1): 19-29.
228. Maillet A, Yadav S, Loo YL, Sachaphibulkij K, Pervaiz S. A novel Osmium-based compound targets the mitochondria and triggers ROS-dependent apoptosis in colon carcinoma. *Cell Death Dis*. 2013; 4: e653.
229. Majkić-Singh N. Tumorski marker: biohemija i klasifikacija. *Jugoslov Med Biohem*. 2006; 25 (2): 79.
230. Malik P, Mukherjee TK. Structure function elucidation of antioxidative and prooxidative activities of the polyphenolic compound curcumin. *Chin J Biolog*. 2014: ID 396708.
231. Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79: 727-747.
232. Mannick JB, Schonhoff C, Papeta N, Ghafourifar P, Szibor M, Fang K, Gaston B. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *J Cell Biol*. 2001; 17: 1111-1116.

233. Mansuri-Torshizi H, Srivastava TS, Parekh HK, Chitnis MP. Synthesis, spectroscopic, cytotoxic, and DNA binding studies of binuclear 2,2'-bipyridine-platinum(II) and -palladium(II) complexes of meso-alpha, alpha'-diaminoadipic and meso-alpha, alpha'-diaminosuberic acids. *J Inorg Biochem.* 1992; 45: 135-148.
234. Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-kappaB signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 1603-1614.
235. Marković SD, Đačić DS, Cvetković DM, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Effects of acute *in vivo* cisplatin and selenium treatment on hematological and oxidative stress parameters in red blood cells of rats. *Biol Trace Elem Res.* 2011a, 142: 660-670.
236. Marković SD, Đorđević NZ, Čurčić MG, Štajn AŠ, Spasić MB. Biotransformation and nitroglycerin-induced effects on antioxidative defense system in rat erythrocytes and reticulocytes. *Gen Physiol Biophys.* 2014; 33(4): in press.
237. Marković SD, Obradović AD, Žižić JB, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB. Glutathione status in the blood of rats after reticulocytosis induced by phenylhydrazine and bleeding. *Arch Biol Sci.* 2010; 62: 589-594.
238. Marković SD, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Spasić MB. The effects of nitroglycerine on the redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Physiol Res.* 2006; 55: 389-396.
239. Marković SD, Vukajlović MDj, Ognjanović BI, Štajn AŠ, Žikić RV, Saičić ZS, Radojičić RM, Jones DR, Spasić MB. A comparative study of the effects of molsidomine and 3-morpholinosydnonimine on redox status of rat erythrocytes and reticulocytes. *Cell Biochem Funct.* 2007; 25: 251-258.
240. Marković SD, Žižić JB, Đačić DS, Obradović AD, Čurčić MG, Cvetković DM, Đorđević NZ, Ognjanović BI, Štajn AŠ. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vivo* treatment of cisplatin and selenium. *Arch Biol Sci.* 2011b; 63 (4): 991-999.
241. Marques MPM. Platinum and palladium polyamine complexes as anticancer agents: The structural factor. *ISRN Spectroscopy.* 2013; 2013; 29.
242. Marton J, Enisz J, Hosztafi S, Timár T. Preparation and fungicidal activity of 5-substituted hydantoins and their 2-thio analogs. *J Agric Food Chem.* 1993; 41: 148-152.
243. Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Oxidative stress in apoptosis and cancer: an update. *Arch Toxicol.* 2012; 86(11): 1649-665.
244. Matesanz AI, Pérez JM, Navarro P, Moreno JM, Colacio E, Souza P. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-benzyl bis(thiosemicarbazone). *J Inorg Biochem.* 1999; 76(1): 29-37.

245. Mazid M, Khan TA, Mohammad F. Role of secondary metabolites in defense mechanism of plants. *Biolog Medicin*. 2011; 3(2): 232-249.
246. Mazur P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*. 1970; 168 (934): 939-949.
247. McFadyen MC, Melvin WT, Murray GI. Cytochrome P450 enzymes: novel options for cancer therapeutics. *Mol Cancer Ther*. 2004; 3: 363.
248. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Ann Rev Biochem*. 1983; 52(1): 711.
249. Menendez JA, Vazquez-Martin A, Colomer R, Brunet J, Carrasco-Pancorbo A, Garcia-Villalba R, Fernandez-Gutierrez A, Segura-Carretero A. Olive oil's bitter principle reverses acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin™) in HER2- overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2007; 7: 80.
250. Menkovic N, Savikin Fodulovic K, Vinterhalter B, Vinterhalter D, Grubisic D. Secoiridoid content of naturally grown and *in vitro* cultured *Gentiana punctata*. *Pharmaceut Pharmacol Lett*. 1998; 8(3): 110-111.
251. Merkl R, Hradkova I, Filip V, Šmidrkal J. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J Food Sci*. 2010; 28(4): 275-279.
252. Meunier BS, Visser P, Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chem Rev*. 2004; 104 (9): 3947-3980.
253. Micheau O, Lens S, Gaide O, Alevizopoulos K, Tschopp J. NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol*. 2001; 21(16): 5299-2305.
254. Middelton E, Kandawami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implantations for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52: 673-751.
255. Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Miladinov-Mikov M, Živković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999–2009. *BMC Cancer*. 2013; 13:18.
256. Milić A, Damwanović I. Primena nesteroidnih antiinflamatornih lekova u hemoprevenciji karcinoma kolona. *Racionalna Terapija*. 2013; V(1): 17-20.
257. Milosavljević Z, Ljijić B. *In vitro* production of human dermal equivalent. *Med Pregl*. 2010; LXIII (7-8): 459-464.
258. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić Lj, Đačić D, Ćurčić M, Marković S. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *Int J Mol Sci*. 2011; 12(8): 5428-5448.

259. Mišić Lj, Lakušić R. Livadske biljke. I izdanje. "Svjetlost"- Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Sarajevo, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 1990.
260. Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, Cocca C, Martín G, Cricco G, Medina V, Rivera E, Bergoc R. Mitochondrial apoptotic pathways. *Biocell*. 2005; 29(2): 149-161.
261. Mohammedi Z. Impact of solvent extraction type on total polyphenols content and biological activity from *Tamarix aphylla* L. karst. *Int J Pharm Bio Sci*. 2011; 2(1): 609-615.
262. Mohsen SM, Ammar ASM. Total phenolic contents and antioxidant activity of corn tassel extracts. *Food Chem*. 2009; 112: 595-598.
263. Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest*. 1991; 21: 361-374.
264. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991; 43: 109-142.
265. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth*. 1983; 65: 55-63
266. Mučaji P, Záhradníková A, Bezáková L, Cupáková M, Rauová D, Nagy M. HPLC determination of antilipoxygenase activity of a water infusion of *Ligustrum vulgare* L. leaves and some of its constituents. *Molecules*. 2011; 16: 8198-8208.
267. Mukanganyama S, Bezabih M, Robert M, Ngadjui BT, Kapche GF, Ngandeu F, Abegaz B. The evaluation of novel natural products as inhibitors of human glutathione transferase P1-1. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2011; 26(4): 460-467.
268. Murray GI, Melvin WT, Greenlee WF, Melvin WT. The regulation, function and tissue specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 2001; 41: 297-316.
269. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug J. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Radic Biol Med*. 2002; 32(5): 386-393.
270. Nagy M, Križková L, Mučaji P, Kontšeková Z, Šeršeň F, Krajčovič J. Antimutagenic activity and radical scavenging activity of water infusions and phenolics from *Ligustrum* plants leaves. *Molecules*. 2009; 14: 509-518.
271. Nakagawa K, Hasumi JT, Woo K, Nagai M, Wachi. Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*. 2004; 25: 1567-1574.
272. Nathan C, Xie Q. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994; 269: 13725-13728.

273. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase *in vivo*: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 341-347.
274. Netsch MI, Gutmann H, Luescher S, Brill S, Schmidlin CB, Kreuter MH, Drewe J. Inhibitory activity of a green tea extract and some of its constituents on multidrug resistance-associated protein 2 functionality. *Planta Med.* 2005; 71(2): 135-141.
275. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod.* 2003; 66: 1022-1037.
276. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74(4): 418-425.
277. Nikolova-Damyanova B, Handjieva N. Quantitative determination of swertiamarin and gentiopicoside in *Centaurium erythraea* and *C. turcicum* by densitometry. *Phytochem Anal.* 1996; 7: 140-142.
278. Obradović A, Žižić J, Trišović N, Božić B, Ušćumlić G, Božić G, Marković S. Evaluation of antioxidative effects of twelve 3-substituted-5,5-diphenylhydantoin on human colon cancer cell line HCT-116. *Turk J Biol.* 2013; 37: 741-747.
279. Oh M, Trick HN, Rajashekar CB. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *J Plant Physiol.* 2009; 166: 180-191.
280. Ohshima H, Tatemichi M, Sawa T. Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2003; 417: 3-11.
281. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis *Cell Prolif.* 2012; 45: 487-498.
282. Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci.* 2007; 96: 2181-2196.
283. Ozoren N, El-Deiry WS. Defining characteristics of types I and II apoptotic cells. *Neoplasia.* 2002; 4(6): 551-557.
284. Park KJ, Lee CH, Kim A, Jeong KJ, Kim CH, Kim YS. Death receptors 4 and 5 activate Nox1 NADPH oxidase through riboflavin kinase to induce reactive oxygen species-mediated apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 2012; 287(5): 3313-3325.
285. Park SJ, Myoung H, Kim YY, Paeng JY, Park JW, Kim MJ, Hong SM. Anticancer effects of genistein, green tea catechins, and cordycepin on oral squamous cell carcinoma. *J Korean Oral Maxillofac Surg.* 2008; 34: 1-10.

286. Pesić M, Andjelković T, Banković J, Marković ID, Rakić L, Ruzdijić S. Sulfinosine enhances doxorubicin efficacy through synergism and by reversing multidrug resistance in the human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Invest New Drugs*. 2009; 27(2): 99-110.
287. Pieroni A, Pachaly P, Huang Y, van Poel B, Vlietinck AJ. Studies on anti-complementary activity of extracts and isolated flavones from *Ligustrum vulgare* and *Phillyrea latifolia* leaves (Oleaceae). *J Ethnopharmacol*. 2000; 70: 213-217.
288. Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Stürzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CEW. Hormetins, antioxidants and prooxidants: Defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid- mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology*. 2011; 12: 329-334.
289. Pinmai K, Chunlaratthanabhorn S, Ngamkitidechakul C, Soonthornchareon N, Hahnvajjanawong C. Synergistic growth inhibitory effects of *Phyllanthus emblica* and *Terminalia bellerica* extracts with conventional cytotoxic agents: Doxorubicin and cisplatin against human hepatocellular carcinoma and lung cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(10): 1491-1497.
290. Prakash O, Kumar A, Kumar P, Ajeet. Anticancer potential of plants and natural products: A review. *Am J Pharmacol Sci*. 2013; 1(6), 104-115.
291. Podolski-Renić A, Jadranin M, Stanković T, Banković J, Stojković S, Chiourea M, Aljančić I, Vajs V, Tešević V, Ruždijić S, Gagos S, Tanić N, Pešić M. Molecular and cytogenetic changes in multi-drug resistant cancer cells and their influence on new compounds testing. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013; 72(3): 683-697.
292. Popović O. Tumori tankog i debelog creva. U: Manojlović D. Interna medicina. III izdanje. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd, 2003, str. 723-728.
293. Quettier DC, Gressier B, Vasseur J, Dine T, Brunet C, Luyckx MC, Cayi JC, Bailleul F, Trotin F. Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *J Ethnopharmacol*. 2000; 72: 35-42.
294. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouyegu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Nat Product*. 2011; 50: 586-621.
295. Raghavan D, Koczwara B, Javle M. Evolving strategies of cytotoxic chemotherapy for advanced prostate cancer. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 566-574.
296. Raghu R, Lu K, Sheen L. Recent research progress on Garlic as a potential anticarcinogenic agent against major digestive cancers. *J Tradit Complement Med*. 2012; 2; 192-201.
297. Raina K, Tyagi A, Kumar D, Agarwal R, Agarwal C. Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. *Food Chem Toxicol*. 2013; 61: 187-195.

298. Rahier NJ, Thomas CJ, Hecht SM. In: Cragg GM, Kingston DGI, Newman DJ. Eds. Anticancer agents from natural products. Brunner-Routledge Psychology Press, Boca Raton, 2005, Chapter 2, pp. 5.
299. Rajendra Prasad N, Karthikeyan A, Karthikeyan S, Reddy BV. Inhibitory effect of caffeic acid on cancer cell proliferation by oxidative mechanism in human HT-1080 fibrosarcoma cell line. *Mol Cell Biochem.* 2011; 349: 11-19.
300. Ralat LA, Manevich Y, Fisher AB, Colman RF. Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry.* 2006; 45: 360-372.
301. Ralhan R, Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy. *Expert Opin Ther Pat Expert.* 2007; 17(9): 1061-1075.
302. Ralston L, Subramanian S, Matsuno M, Yu O. Partial reconstruction of flavonoid and isoflavonoid biosynthesis in yeast using soybean type I and type II chalcone isomerases. *Plant Physiol.* 2005; 137: 1375-1388.
303. Rastogi RP, Richa R, Sinha P. Apoptosis: Molecular mechanism and pathogenicity. *EXCLI J.* 2009; 8: 155-181.
304. Rau T, Alsfasser R, Zahl A, van Eldik R. Structural and kinetic studies on the formation of Platinum(II) and Palladium(II) complexes with L-cysteine-derived ligands. *Inorg Chem.* 1998; 37: 4223-4230.
305. Ravelo AG, Estévez-Braun A, Chávez-Orellana H, Pérez-Sacau E, Mesa-Siverio D. Recent studies on natural products as anticancer agents. *Curr Top Med Chem.* 2004; 4(2): 241-265.
306. Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Natural products for cancer prevention: global perspective. *Pharmacol Ther.* 2003; 99: 1-13.
307. Reed JC. Bcl-2 family proteins. *Oncogene.* 1998; 17: 3225-3236.
308. Rennie A, Voigt W, Mueller T, Fruehauf A, Schmoll HJ, Beyer C, Dempke W. Resistance mechanisms following cisplatin and oxaliplatin treatment of the human teratocarcinoma cell line 2102EP. *Anticancer Res.* 2005; 25(2A): 1147-1155.
309. Reza H, Ashtiani A, Bakhshandi AK, Rahbar M, Mirzaei A, Malekpour A, Rastegar H. Glutathione, cell proliferation and differentiation. *Afr J Biotechnol.* 2011; 10(34): 6348-6363.
310. Ricci C, Pastukh V, Leonard J, Turrens J, Wilson G, Schaffer D, Schaffer SW. Mitochondrial DNA damage triggers mitochondrial-superoxide generation and apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294: 413-422.

311. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996; 20: 933-956.
312. Rivlin RS. Historical perspective on the use of garlic. *J Nutr.* 2001; 131: 951S-954S.
313. Robasykiewicz A, Balcerczyk A, Bartosz G. Antioxidative and prooxidative effects of quercetin on A549 cells. *Cell Biol Int.* 2007; 31: 1245-1250.
314. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agr Food Chem.* 2003; 51(10): 2866-2887.
315. Rodriguez SA, Marston J, Wolfender L, Hostettman K. Iridoids and secoiridoids in the Gentianaceae. *Curr Organic Chem.* 1998; 2: 627-648.
316. Rosenberg B, VanCamp L. The successful regression of large solid sarcoma 180 tumors by platinum compounds. *Cancer Res.* 1970; 30(6): 1799-1802.
317. Ruddock PS, Liao M, Foster BC, Lawson L, Arnason JT, Dillon JA. Garlic natural health products exhibit variable constituent levels and antimicrobial activity against *Neisseria gonorrhoeae*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*. *Phytother Res.* 2005; 19(4): 327-334.
318. Ryan AE, Lane S, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM. Fas ligand expression in human and mouse cancer cell lines; a caveat on over-reliance on mRNA data. *J Carcinog.* 2006; 5: 5.
319. Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. *Chemother Res Pract.* 2012; 2012: 282570.
320. Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. *Internat J PharmTech Res.* 2011; 3(1): 0974-4304.
321. Salinas AE, Wong MG. Glutathione S-transferases a review. *Curr Med Chem.* 1999; 6(4): 279-309.
322. Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell.* 1997; 91: 443-446.
323. Samimi G, Fink D, Varki NM, Husain A, Hoskins WJ, Alberts DS, Howell SB. Analysis of MLH1 and MSH2 expression in ovarian cancer before and after platinum drug-based chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2000; 6: 1415-1421.
324. Sanchez Y, Simón GP, Calviño E, de Blas E, Aller P. Curcumin stimulates reactive oxygen species production and potentiates apoptosis induction by the antitumor drugs arsenic trioxide and lonidamine in human myeloid leukemia cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010; 335(1): 114-123.
325. Sandhya T, Lathika KM, Pandey BN, Mishra KP. Potential of traditional ayurvedic formulation, Triphala, as a novel anticancer drug. *Cancer Lett.* 2006; 231: 206-214.

326. Sankari SL, Masthan KMK, Babu NA, Bhattacharjee T, Elumalai M. Apoptosis in cancer - an update. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012; 13(10): 4873-4878.
327. Sarić RM. Lekovito bilje SR Srbije, Srpska akademija nauke i umetnosti, Beograd, 1988, str. 640.
328. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000; 407(6805): 784-788.
329. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Feng L, Friesen C, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. *EMBO J.* 1998; 17: 1675-1687.
330. Scambia G, Ranelletti FO, Benedetti Panici P, Piantelli M, Bonanno G, De Vincenzo R, Ferrandina G, Pierelli L, Capelli A, Mancuso S. Quercetin inhibits the growth of a multidrug-resistant estrogen receptor negative MCF-7 human breast cancer cell line expressing type II estrogen binding sites. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1991; 28: 255-258.
331. Schafer FQ, Buettner GR. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1191-1212.
332. Schmieder A, Schwaiger S, Csordas A, Backovic A, Messner B, Wick G, Stuppner H, Bernhard D. Isogentisin A novel compound for the prevention of smoking-caused endothelial injury. *Atherosclerosis.* 2007; 194 (2): 317-325.
333. Sen CK. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol.* 1998; 55: 1747-1758.
334. Sergent C, Franco N, Chapusot C, Lizard-Nacol S, Isambert N, Correia M, Chauffert B. Human colon cancer cells surviving high doses of cisplatin or oxaliplatin in vitro are not defective in DNA mismatch repair proteins. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2002; 49: 445-452.
335. Sersen F, Mucaji P, Grancai D, Nagy M. Antioxidative properties of methanol extracts from leaves and fruits of *Ligustrum vulgare* L. *Acta Facult Pharm Univ Comeniana.* 2005; 52: 204-209.
336. Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet.* 2001; 7: 677-685.
337. Shenoy NR, Choughuley AS. Inhibitory effect of diet related sulphhydryl compounds on the formation of carcinogenic nitrosamines. *Cancer Lett.* 1992; 65(3): 227-232.
338. Shi J, Nawaz H, Pohorly J, Mittal G, Kakuda Y, Jiang Y. Extraction of polyphenolics from plant material for functional foods-engineering and technology. *Food Rev Int.* 2005; 21: 139-166.
339. Shiraki K, Tsuji N, Shioda T, Isselbacher KJ, Takahashi H. Expression of Fas ligand in liver metastases of human colonic adenocarcinomas. *Proc Natl Acad Sci.* 1997; 94(12): 6420-6425.
340. Shoeb M. Anticancer agents from medicinal plants. Bangladesh. *J Pharmacol.* 2006; 1: 35-41.

341. Shukla Y, Kalra N. Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer Lett.* 2007; 247: 167-181.
342. Skrzypczak L, Wesołowska M, Skrzypczak E. *Gentiana* species: *In vitro* culture, regeneration, and production of secoiridoid glucosides. In: Bajaj YPS. Eds. Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 21, Medicinal and aromatic plants IV. Springer, Berlin-Heidelberg, 1993, pp. 172-186.
343. Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol.* 1991; 8: 211-218.
344. Siler B, Misi D, Nestorovi J, Banjanac T, Glamoclija J, Sokovi M, Ciri A. Antibacterial and antifungal screening of *Centaureum pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Nat Prod Commun.* 2010; 10: 1525-1530.
345. Simin N, Orcic DZ, Cetojević-Simin DD, Mimica-Dukić NM, Anackov GT, Beara IN, Mitić-Ćulafić D, Božin B. Phenolic profile, antioxidant, antiinflammatory and cytotoxic activities of small yellow onion (*Allium flavum* L. Subsp *flavum*, Alliaceae). *LWT Food Sci Technol.* 2013; 54(1): 139-146.
346. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis.* 2000; 5(5): 415-418.
347. Sineiro J, Franco D, Rubilar M, Sánchez M, Jerez M, Pinelo M, Costoya M, Núñez CM. Polyphenols from plant materials: extraction and antioxidant power. *EJFAF Che.* 2008; 7 (8): 3210-3216.
348. Singh A. Phitochemicals of Gentianaceae: A Review of pharmacological properties. *Internat J Pharmaceut Sci Nanotechn.* 2008; 1(1): 33-36.
349. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela RRM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 1999; 299: 152-178.
350. Smith A, Guerinot ML. Physiology and metabolism. Primary metabolism and nutrient assimilation: achieving a balanced diet. *Curr Opin Plant Biol.* 2003; 6: 205-207.
351. Soliman KF, Mazzi EA. *In vitro* attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998; 218(4): 390-397.
352. Stanković M. Biološki efekti sekundarnih metabolite vrsta iz roda *Teucrium* L. flore Srbije. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, 2012.
353. Stanković M, Ćurčić M, Žižić J, Topuzović M, Solujić S, Marković S. *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *Int J Mol Sci.* 2011; 12(7): 4190-4205.

354. Stanković M, Radojević I, Ćurčić M, Vasić S, Topuzović M, Čomić Lj, Marković S. Evaluation of biological activities of goldmoss stonecrop (*Sedum acre* L.). *Turk J Biol.* 2012a; 36: 580-588.
355. Stanković M, Stefanović O, Čomić Lj, Topuzović M, Radojević I, Solujić S. Antimicrobial activity, total phenolic content and flavonoid concentrations of *Teucrium* species. *Cent Eur J Biol.* 2012b; 7(4): 664-671.
356. Stanković M, Topuzović M, Marković A, Pavlović D, Solujić S, Nićiforović N, Mihailović V. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of different *Teucrium chamaedrys* L. extracts. *Biotechnol Biotec Eq.* 2010a; 24(2): 82-86.
357. Stanković M, Topuzović M, Mihailović V. Antioxidant activity and concentration of phenols and flavonoids in the whole plant and plant parts of *Teucrium chamaedrys* L. var. *glanduliferum* Haussk. *J Med Plants Res.* 2010b; 4(20): 2092-2098.
358. Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochem (Mosc).* 2000; 65(1): 112-126.
359. Stefkov G, Miova B, Dinevska-Kjovkarovska S, Stanoeva JP, Stefova M, Petrusevska G, Kulevanova S. Chemical characterization of *Centaurium erythrea* L. and its effects on carbohydrate and lipid metabolism in experimental diabetes. *J Ethnopharmacol.* 2014; 152(1): 71-77.
360. Stevović DM. Karcinomi kolona i rektuma. U: Dragović M, Gerzić Z. Osnovi hirurgije. Beograd, Medicinska knjiga, 1994.
361. Stojković D, Jevtić V, Radić G, Đačić D, Ćurčić M, Marković S, Đinović V, Petrović V, Trifunović S. Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *J Mol Struct.* 2014; 1062: 21-28.
362. Stojnev S, Ristić-Petrović A, Janković-Velicković L. Reactive oxygen species, apoptosis and cancer. *Vojnosanit Pregl.* 2013; 70(7): 675-658.
363. Suffness M, Pezzuto JM. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Eds. *Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity.* Academic Press, London, 1990, pp. 71-133.
364. Susin SA, Daugas E, Ravagnan L, Samejima K, Zamzami N, Loeffler M, Costantini P, Ferri KF, Irinopoulou T, Prévost M, Brothers G, Mak TW, Penninger J, Earnshaw WC, Kroemer G. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 2000; 192(4): 571-580.
365. Suzen S, Buyukbingol E. Anti-cancer activity studies of indolalithiohydantoin (PIT) on certain cancer cell lines. *Farmacol.* 2000; 55(4): 246-148.

366. Szucs Z, Ddnos B, Nyirecty S. Comparative analysis of the underground parts of *Gentiana* species by HPLC with diode-array and mass spectrometric detection. *Chromatographia*. 2002; S19-23.
367. Šmit B, Pavlović R, Radosavljević-Mihajlović A, Došen A, Ćurčić M, Šeklić D, Živanović M. Synthesis, characterization and cytotoxicity of palladium(II) complex of 3-[(2-hydroxybenzylidene)-amino]-2-thioxo-imidazolidin-4-one. *J Serb Chem Soc*. 2013; 78(2): 217-227.
368. Štajn ŠA, Žikić VR, Saičić SZ. Ekofiziologija i ekotoksikologija životinja. Prirodno matematički fakultet, Kragujevac, 2007, str. 1-449.
369. Tae K, Kim J. Inhibition of iNOS and DNA Oxidation by Methanol Extract of *Schizonepeta tenuifolia*. *Trop J Pharm Res*. 2012; 11: 397-404.
370. Tagi T, Matsui T, Kikuchi S, Hoshi S, Ochiai T, Kokuba Y, Kinoshita-Ida Y, Kisumi-Hayashi F, Morimoto K, Imai T, Imoto I, Inazawa J, Otsuji E. Dermokine as a novel biomarker for early-stage colorectal cancer. *J Gastroenterol*. 2010; 45(12): 1201-1211.
371. Tahraoui A, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and sub-chronic toxicity of a lyophilised aqueous extract of *Centaureum erythraea* in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132(1): 48-55.
372. Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, Wang A, Suzui M, Okamoto K, Mori H. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*. 1993; 14(7): 1321-1325.
373. Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J*. 2008; 54: 733-749.
374. Tang C, Grimm EA. Depletion of endogenous nitric oxide enhances cisplatin-induced apoptosis in a p53-dependent manner in melanoma cell lines. *J Biol Chem*. 2004; 279: 288-298.
375. Taniguchi K, Wada M, Kohno K, Nakamura T, Kawabe T, Kawakami M, Kagotani K, Okumura K, Akiyama S, Kuwano M. A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res*. 1996; 56(18): 4124-4129.
376. Tapas AR, Sakarkar DM, Kakde RB. Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Top J Pharmaceut Res*. 2008; 7(3): 1089-1099.
377. Tatić, B. *Allium*. U: Josifović M. Flora Republike Srbije. VII izdanje. Srpska Akademija Nauke i Umetnosti, Beograd, 1975, str. 588.
378. Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol*. 2004; 163: 547-561.

379. Timmer-Bosscha H, Mulder NH, De Vries EG: Modulation of cisdiamminedichloro platinum(II) resistance: a review. *Br J Cancer*. 1992; 66(2): 227-238.
380. Tobi SE, Gilbert M, Paul N, McMillan TJ. The green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. *Int J Cancer*. 2002; 102: 439-444.
381. Tol J, Punt CJ. Monoclonal antibodies in the treatment of metastatic colorectal cancer: a review. *Clin Ther*. 2010; 32(3): 437-453.
382. Torigoe T, Izumi H, Ishiguchi H, Yoshida Y, Tanabe M, Yoshida T, Igarashi T, Niina I, Wakasugi T, Imaizumi T, Momii Y, Kuwano M, Kohno K. Cisplatin resistance and transcription factors. *Curr Med Chem Anticancer Agents*. 2005; 5(1): 15-27.
383. Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*. 1995; 358(1): 1-3.
384. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(8): 1343-1374.
385. Trišović N, Božić B, Obradović A, Stefanović O, Marković S, Čomić Lj, Božić B, Ušćumlić G. Structure-activity relationships of 3-substituted-5,5-diphenylhydantoins as potential antiproliferative and antimicrobial agents. *J Serb Chem Soc*. 2011; 76: 1597-1606.
386. Tsoyi K, Park HB, Kim YM, Chung JI, Shin SC, Shim HJ, Lee WS, Seo HG, Lee JH, Chang KC, Kim HJ. Protective effect of anthocyanins from black soybean seed coats on UVB-induced apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *J Agric Food Chem*. 2008; 56: 10600-10605.
387. Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry*. 2002; 67: 281-292.
388. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effect of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem*. 2006; 99: 838-841.
389. Tutin TG, Wood D. *Teucrium*. In: Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore D, Valentine D, Walters S. Eds. *Flora Europaea*. 1st Ed. Cambridge University Press, Cambridge, England, 1972, pp. 129-135.
390. Tyagi AK, Singh RP, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R. Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth Inhibition, G2-Marrest, and apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 3512-3519.
391. Tuzlaci E, Dogan A. Turkish folk medicinal plants, IX: Ovacık (Tunceli). *Marmara Pharm J*. 2010; 14: 136-143.

392. Tyler VE. Herbs of Choice: The therapeutic use of phytomedicinals. Howarth Press, New York/London/Norwood, 1994.
393. Ulubelen A, Topcu G, Sonmez U. Chemical and biological evaluation of genus *Teucrium*. *Stud Nat Prod Chem*. 2000; 23: 591-648.
394. Ulukaya E, Ari F, Dimas K, Sarimahmut M, Guney E, Sakellaridis N, Yilmaz VT. Cell death-inducing effect of novel palladium(II) and platinum(II) complexes on non-small cell lung cancer cells *in vitro*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; 137(10): 1425-1434.
395. Valentini A, Conforti F, Crispini A, De Martino A, Condello R, Stellitano C, Rotilio G, Ghedini M, Federici G, Bernardini S, Pucci D. Synthesis, oxidant properties, and antitumoral effects of a heteroleptic palladium(II) complex of curcumin on human prostate cancer cells. *J Med Chem*. 2009; 52(2): 484-491.
396. Valentao P, Areias F, Amaral J, Andrade P, Seabra R. Tetraoxygenated xanthenes from *Centaureum erythraea*. *Natur Prod Lett*. 2000; 14: 319-323.
397. Valentao P, Andrade PB, Silva E, Vicente A, Santos H, Bastos ML, Seabra RM. Methoxylated xanthenes in the quality control of small centaury (*Centaureum erythraea*) flowering tops. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 460-463.
398. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. *J Agric Food Chem*. 2002; 50: 4989-4993.
399. Valentao P, Fernandes E, Carvalho F, Andrade PB, Seabra RM, Bastos ML. Hydroxylradical and hypochlorous acid scavenging activity of small centaury (*Centaureum erythraea*) infusion. A comparative study with green tea (*Camellia sinensis*). *Phytomedicine*. 2003; 10: 517-522.
400. Van Zanden JJ, Ben Hamman O, van Iersel ML, Boeren S, Cnubben NH, Lo Bello M, Vervoort J, van Bladeren PJ, Rietjens IM. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chem Biol Interact*. 2003; 145(2): 139-148.
401. Velasco-Negueruela A, Pérez-Alonso MJ. The volatiles of six *Teucrium* species from the Iberian peninsula and the Balearic islands. *Phytochem*. 1990; 29: 1165-1169.
402. Vieira O, Laranjinha J, Madeira V, Almeida L. Cholesteryl ester hydroperoxide formation in myoglobin-catalyzed low density lipoprotein oxidation. Concerted antioxidant activity of caffeic and *p*-coumaric acids with ascorbate. *Biochem Pharmacol*. 1998; 55(3): 333-340.
403. Vigano L, Locatelli A, Grasselli G and Gianni I. Drug interactions of paclitaxel and docetaxel and their relevance for the design of combination therapy. *Invest New Drugs*. 2001; 19: 179-196.

404. Virág L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 2003; 140-141: 113-124.
405. Visioli F, Poli A, Gall C. Antioxidant and other biological activities of phenols from olives and olive oil. *Med Res Rev.* 2002; 22: 65-75.
406. Vittal R, Selvanayagam ZE, Sun Y, Hong J, Liu F, Chin KV, Yang CS. Gene expression changes induced by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate in human bronchial epithelial 21BES cells analyzed by DNA microarray. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(9): 1091-1099.
407. Volarević V, Vujić JM, Milovanović M, Kanjevac T, Volarević A, Trifunović SR, Arsenijević N. Cytotoxic effects of palladium (II) and platinum (II) complexes with O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-(4-methyl) pentanoic acid on human colon cancer cell lines. *J BUON.* 2013; 18(1): 131-137.
408. Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). *Carcinogenesis.* 2005; 26: 1450-1456.
409. Wani BA, Ramamoorthy D, Rather MA, Arumugam N, Qazi AK, Majeed R, Hamid A, Ganie SA, Ganai BA, Anand R, Gupta AP. Induction of apoptosis in human pancreatic MiaPaCa-2 cells through the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) by *Gentiana kurroo* root extract and LC-ESI-MS analysis of its principal constituents. *Phytomedicine.* 2013; 20(8-9): 723-733.
410. Waring P, Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol.* 1999; 77(4): 312-317.
411. Wecksler AT, Hwang SH, Wettersten HI, Gilda JE, Patton A, Leon LJ, Carraway KL, Gomes AV, Baar K, Weiss RH, Hammock BD. Novel sorafenib-based structural analogues: in-vitro anticancer evaluation of t-MTUCB and t-AUCMB. *Anticancer Drugs.* 2014; 25(4): 433-446.
412. Weinberg RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 1989; 49(14): 3713-3721.
413. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25: 434-456.
414. Wink M. Phytochemical diversity of secondary metabolites. *Encycloped Plant Crop Sci.* 2004; 915-919.
415. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996; 313(1): 17-29.
416. Witte JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frank, HD, Haile RW. Relation of vegetable fruit and grain to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol.* 1996; 114: 1015-1025.

417. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011; 30: 87.
418. Wu C, Hseu Y, Lien J, Lin Y, Lin L, Ching H. Triterpenoid contents and anti-inflammatory properties of the methanol extracts of *Ligustrum* species leaves. *Molecules.* 2011; 16: 1-15.
419. Xu BJ, Chang SK. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. *J Food Sci.* 2007; 72: S159-166.
420. Yeh YY. Garlic phytochemicals in disease prevention and health promotion: an overview. *New Drug Clin.* 1996; 45: 441-450.
421. Yin G, Zeng H, He M, Wang M. Extraction of *Teucrium manghuaense* and evaluation of the bioactivity of its extract. *Int J Mol Sci.* 2009; 10: 4330-4341.
422. Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Htay HH, Tsubouchi R, Qiao SL, Li WH, Murakami K, Yokochi T. Prooxidant activity of curcumin: copper-dependent formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and induction of apoptotic cell death. *Toxicol In Vitro.* 2004; 8: 783-789.
423. Yuan L, Kaplowitz N. Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol Aspects Med.* 2009; 30: 29-41.
424. Zarena AS, Sankar KU. A study of antioxidant properties from *Garcinia mangostana* L. pericarp extract. *Acta Sci Pol Technol Aliment.* 2009; 8: 23-34.
425. Zhai W, Jeong H, Cui L, Krainc D, Tjian R. *In vitro* analysis of huntingtin-mediated transcriptional repression reveals multiple transcription factor targets. *Cell.* 2005; 7: 1241-1253.
426. Zhang HN, He JH, Yuan L, Lin ZB. *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage. *Life Sci.* 2003; 73(18): 2307-2319.
427. Zhang K, Mack P, Wong K. Glutathione-related mechanisms in cellular resistance to anticancer drugs. *Int J Oncol.* 1998; 12: 871-882.
428. Zhang K, Wong KP. Inhibition of the efflux of glutathione S-conjugates by plant polyphenols. *Biochem Pharmacol.* 1996; 52(10): 1631-1638.
429. Zhao J, Li Q, Zou B, Wang G, Li X, Kim JE, Cuff KC, Huang L, Reed E, Gardner K. *In vitro* combination characterization of the new anticancer plant drug β -elemene with taxanes against human lung carcinoma. *Int J Oncol.* 2007; 31(2): 241-252.
430. Zhao ZL, Dorje G, Wang ZT. Identification of medicinal plants used as Tibetan traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 2010; 132: 122-126.

431. Zhou J, Hu H, Long J, Wan F, Li L, Zhang S, Shi YE, Chen Y. Vitexin 6, a novel lignan, induces autophagy and apoptosis by activating the Jun N-terminal kinase pathway. *Anticancer Drugs*. 2013; 24(9): 928-936.
432. Zhou L, Jing Y, Styblo M, Chen Z, Waxman S. Glutathione-S-transferase pi inhibits As₂O₃-induced apoptosis in lymphoma cells: involvement of hydrogen peroxide catabolism. *Blood*. 2005; 105(3): 1198-1203.
433. Zhou SF, Xue CC, Yu XQ, Wang G. Metabolic activation of herbal and dietary constituents and its clinical and toxicological implications: an update. *Curr Drug Metab*. 2007; 8: 526-553.
434. Žikić RV, Štajn AŠ, Saičić ZS, Spasić MB, Milovanović SR. Toksikološki značaj zaštite od oksidacionih oštećenja. Monografija, Prirodno-matematički fakultet, Kragujevac, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Beograd, Vojnomedicinska akademija, Beograd. 2000, str. 1-150.
435. Žižić JB, Vuković NL, Jadranin MB, Anđelković BD, Tešević VV, Kacanić MM, Sukdolak SB, Marković SD. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line. *J Sci Food Agric*. 2013; 93(12): 3001-3009.
436. Žlender V. Apoptosis-programmed cell death. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2003; 54: 267-274.

Коришћене интернет странице:

http://es.wikipedia.org/wiki/Ligustrum_vulgare - Slika biljke *Ligustrum vulgare* L.

http://luirig.altervista.org/schedeit/fo/gentiana_punctata.htm - Slika biljke *Gentiana punctata* L.

<http://rsb.info.nih.gov/ij/> - ImageJ program

<http://sms-oncology.com/ema-anticancer-drug-approvals-in-2013/> - European Medicines Agency

<http://www.botanika.wendys.cz> - Slika biljke *Teucrium chamaedrys* L.

<http://www.imagines-plantarum.de/> - Slika biljke *L. vulgare* L.

<http://www.lgcstandards-atcc.org> - American Type Culture Collection.

<http://www.phe-culturecollections.org.uk/collections/ecacc.aspx> - The European Collection of Animal Cell Cultures

<http://www.vulgaris-medical.com/phytotherapie/erythrea-centaurium> - Slika biljke *Centaureum erythrea* Rafn.



VIII ПРИЛОЗИ

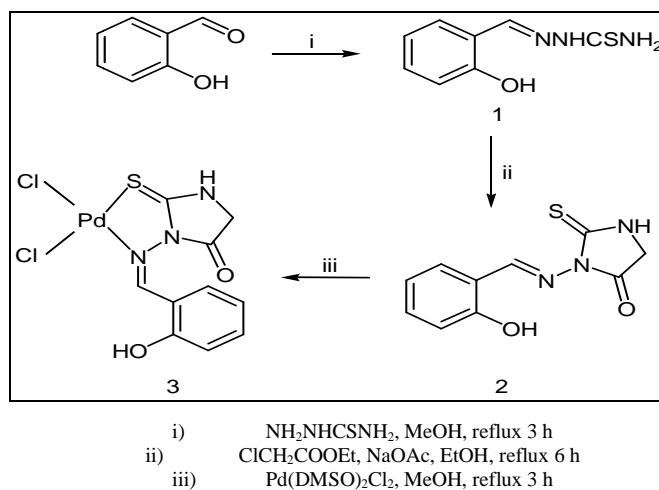
Прилог 1.

Синтеза Pd(II) комплекса

Pd(II) комплекс и лиганд 3-[(2-хидроксибензилидин)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он (3) коришћен за синтезу су добијени у кристалном стању од др Биљане Шмит, са ПМФ-а у Крагујевцу. Pd(II) комплекс је синтетисан у Институту за хемију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Полидентантни лиганд, 3-[(2-хидрокси-бензилиден)-амино]-2-тиоксо-имидазолидин-4-он, добијен је интермолекуларном циклокондензационој реакцији 2-хидроксибензалдехид тиосемикарбазона ($\text{NH}_2\text{NHCSNH}_2$) и етилхлороацетата (Слика 33).

Pd(II) комплекс је синтетисан нуклеофилном супституцијом оба DMSO лиганда из *cis*-[Pd(DMSO) $_2$ Cl $_2$] са иминским азотом и тиолактаминским сумпором из 3-[(2-хидрокси-бензилиден)-амино]-2-тиоксо-имидазолидин-4-он. Метанолни комплекс био је нехигроскопан, растворан у DMSO, умерено растворан у метанолу, етанолу и нерастворан у води.



Слика 33. Синтеза лиганда 2-тиохидантоинског типа: 3-[(2-хидроксибензилидин)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он (2) и Pd(II) комплекса са -[(2-хидроксибензилидин)амино]-2-тиоксоимидазолидин-4-он (3)

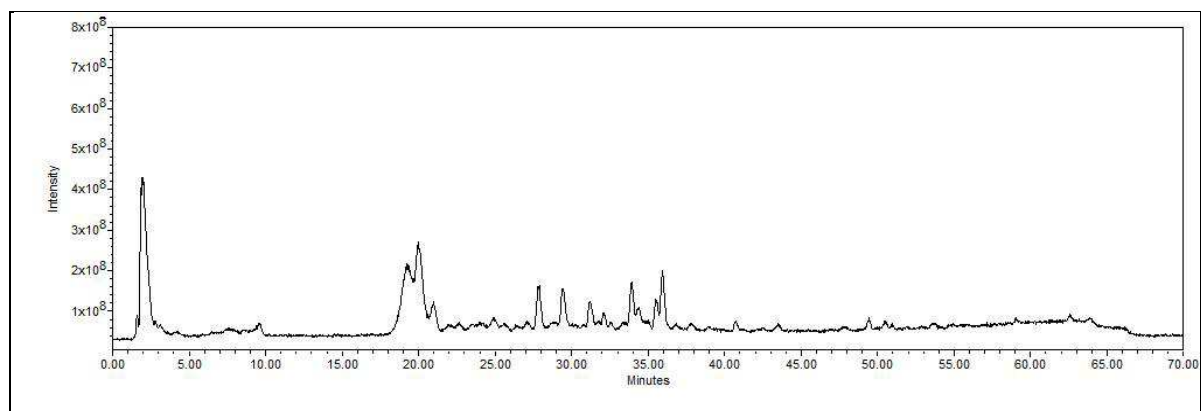
Прилог 2.***HPLC-MS (High-performance liquid chromatography mass spectrometry) анализа фенолних једињења***

Идентификацију фенолних једињења присутних у метанолним екстрактима испитиваних врста биљака урадио је др Вук Максимовић, на Институту за биолошка испитивања „Синиша Станковић” у Београду.

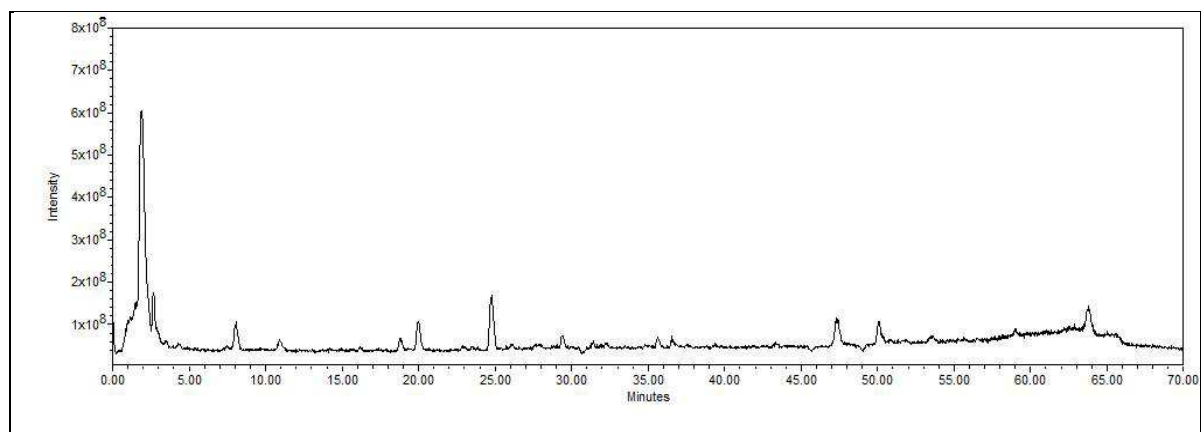
Идентификација појединачних фенолних једињења извршена је помоћу реверзне фазе HPLC-MS анализе коришћењем електро спреј јонизационе (ESI) пробе. Узорци су инјектирани у Waters HPLC систем са 1525 бинарним пумпама, термостатом и 717+ аутосемплером повезаним са Waters 2996 детектором са пољем диода (Waters, Milford, MA, USA). Хроматограми су снимљени у тродимензионом моду са извученим сигнаlima на специфичним таласним дужинама за различита једињења (370 nm, 326 nm, односно 254 nm). Сепарација фенола извршена је на колони Symmetry C-18 RP димензија 125 x 4 mm са честицама пречника 5 μm (Waters, Milford, MA, USA) везаној за одговарајућу заштитну колону. Пре ињекције узорци су филтрирани кроз филтере чије су поре промера 0.22 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Примењене су две мобилне фазе, А (0.1% фосфорна киселина) и Б (ацетонитрил), при брзини протока од 1 ml min⁻¹ са следећим профилом градијентата: првих 20 минута од 10 до 22% Б; следећих 20 минута линеарног пораста до 40% Б, а затим 5 минута реверзно до 10% Б и још 5 минута времена еквилибрације. Разделник протока иза колоне (Post column flow splitter (ASI, Richmond, CA, USA) са разделним односом 5/1 је коришћен за добијање оптималне мобилне фазе у ESI проби. За LC/MS анализе, сигнали за свако једињење екстраховани су од негативног ESI комплетног скена са следећим параметрима: капиларни напон 3.0 kV, напон конуса -20 V, напони екстрактора и RF сочива су 3.0 и 0.2 V. Извор и температуре растварања су 120 °C и 400 °C, са протоком гасовитог N₂ од 400 l/h. Прикупљање података и спектрална анализа добијених пикова извршени су применом Waters Empower 2 софтвера (Waters, Milford, MA, USA). Идентификација појединих компоненти у испитиваним метанолним екстрактима извршена је упоређивањем снимљених УВ спектра са спектрима стандарда и литературним подацима.

Слика 34 представља HPLC MS хроматограме, односно укупне јонске записе метанолних екстраката испитиваних врста биљака.

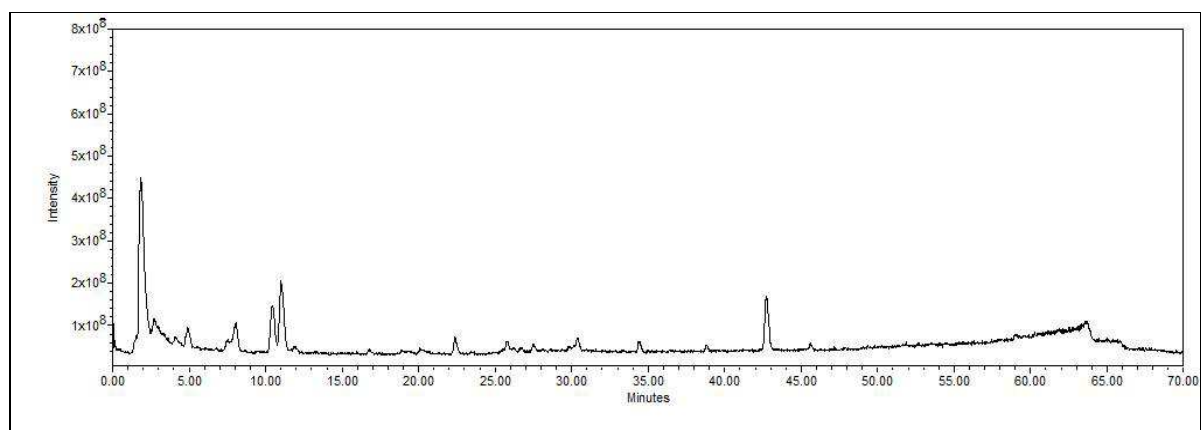
A) *T. chamaedrys*

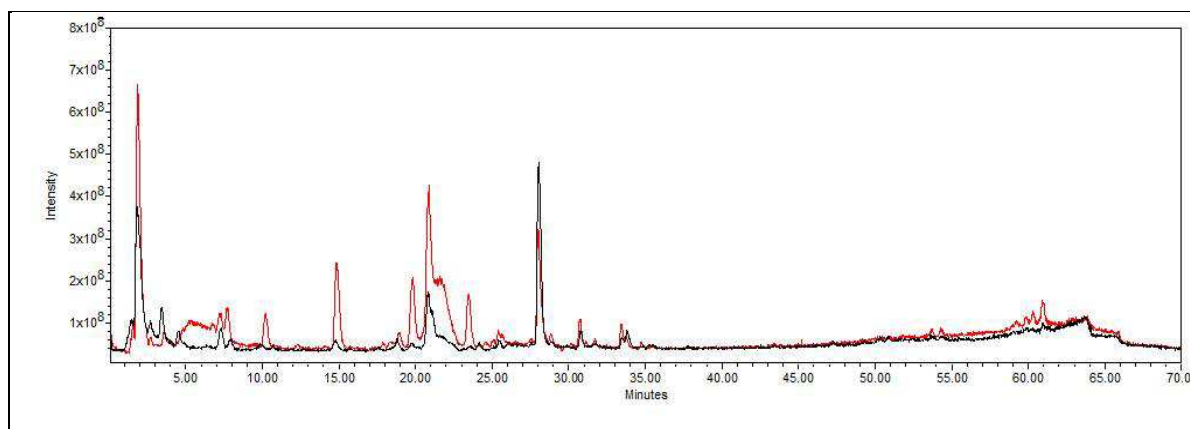


Б) *A. flavum*



В) *G. punctata*



Г) *L. vulgare* (лист - црвена боја, плод - црна боја)

Слика 34. HPLC MS укупни јонски запис метанолних екстраката испитиваних врста биљака.

Метанолни екстракт биљке *T. chamaedrys* одликује се релативно великим садржајем фенолних једињења, што се види по заступљености и висини пикова на HPLC MS хроматограму (Слика 34-А). Доминантно заступљена фенолна једињења у овом екстракту су гликозид кафеинске киселине, теукрозиди, глукозид изорхамнетин 3-О-β-D-(6-О-α-L-рамнозил) и пентозиди предходног једињења. У екстракту се још налазе и хомоориентин, теукрин G, 15,16-епокси-6-хидрокси-19-нор-нео-клеродан-20, 12-олид-18-оидна киселина као агликон са глукозом везаном на хидроксилну групу на C-6 угљенику преко аномерног угљеника.

Доминантно заступљене компоненте у метанолном екстракту биљке *A. flavum* су гликозиди кафеинске киселине, затим деривати флавонола рамнетина као што је изорамнетин гликозид и изорамнетин 3-О-гликозид-7-О-гликозид (Слика 34-Б). Остала фенолна једињења идентификована у екстракту биљке *A. flavum* су рутин, хиперозид, кверцетин, кампферол и два *Allium tuberosum* сапонина.

Метанолни екстракт биљке *G. punctata* одликује се мањим садржајем фенолних једињења, што се види из присуства малог броја пикова на HPLC MS хроматограму (Слика 34-В). Најзаступљеније компоненте су гликозид и дигликозид кафеинске киселине, а након њих изогентисин. Остала фенолна једињења идентификована у екстракту биљке *G. punctata* су логанична киселина, дериват нарингенина, дериват апигенина, квантитативно мало заступљена гална и кафеинска киселина, квантитативно мало кверцетина, кампферола и витексина.

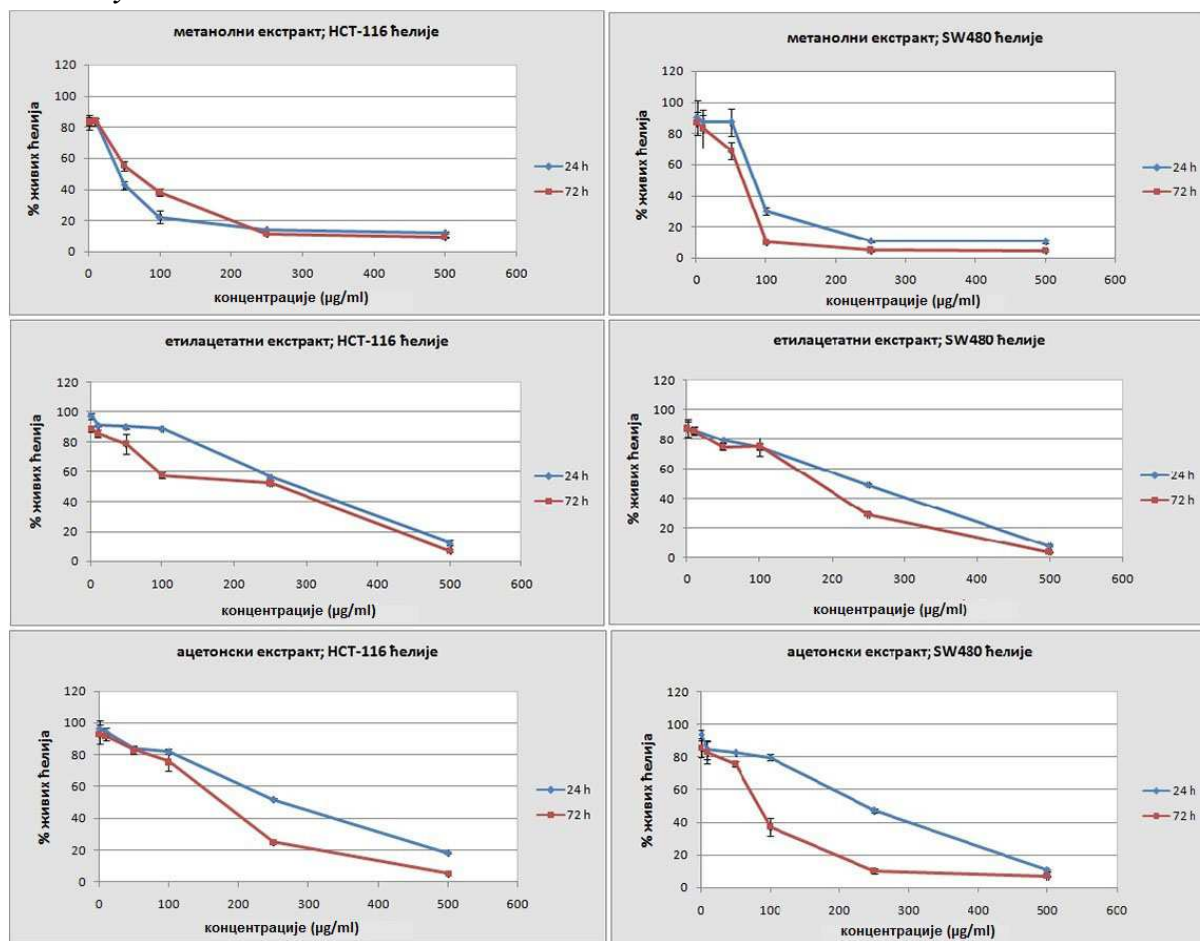
Као доминантна компонента у метанолном екстракту биљке *L. vulgare* јавља се олеуропеин и гликозид кафеинске киселине – хексозид. У екстракту су идентификовани и дериват олеозида, кафеинска киселина, рутин, гентисинска киселина, метоксилеуропин, 10 хидроксиолеуропеин гликозид, олеуропеин дигликозид, олеозид, димер метоксиплеуропина, лигстрозид, мање

концентрације хомооријентина и хиперозида. Екстракти плодова и листова садрже исти квалитативни састав фенолних једињења, али квантитативно су фенолна једињења више заступљена у екстракту листова биљке *L. vulgare*.

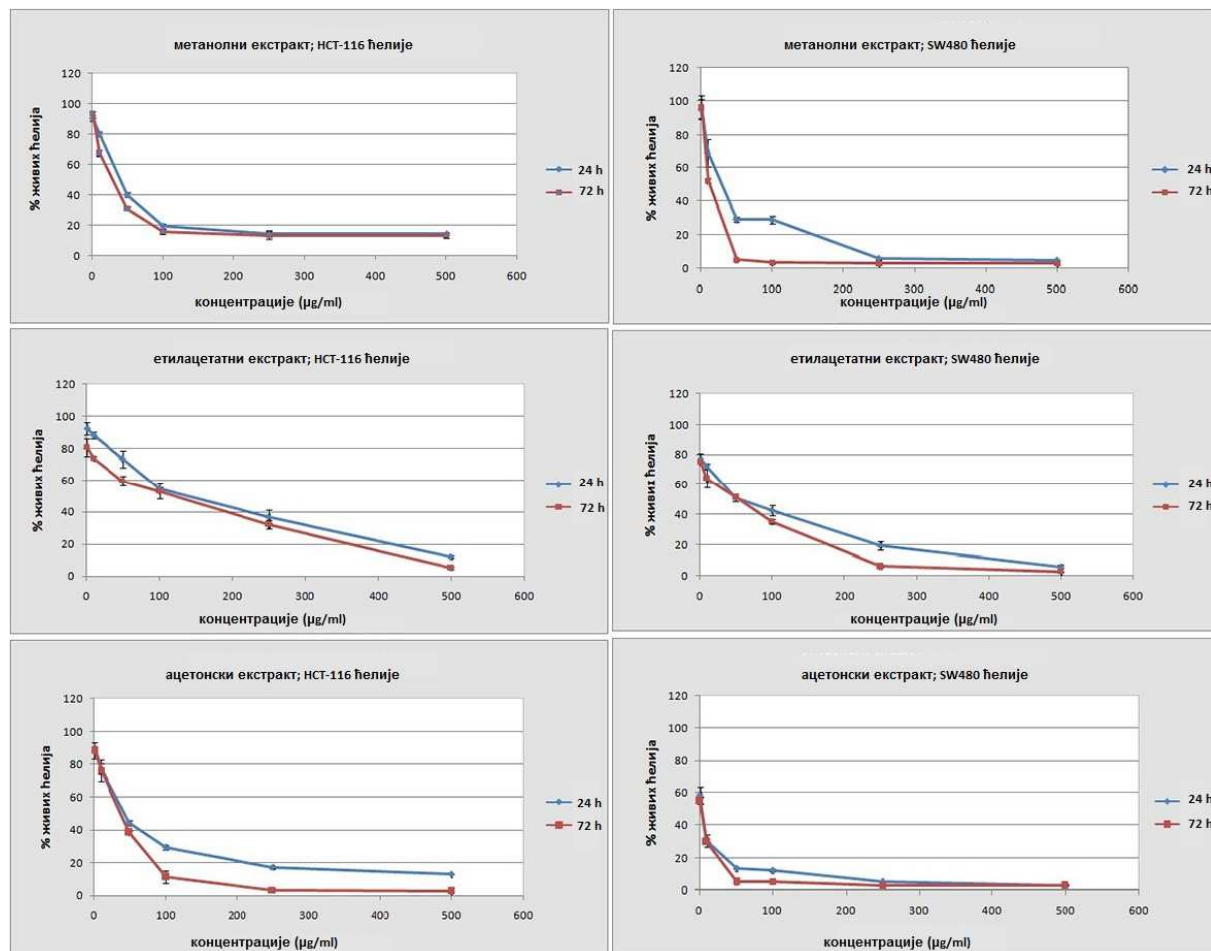
Прилог 3.

Инхибиција ћелијског раста (НСТ-116 и SW480 ћелија) у појединачним и комбинованим третманима екстракта биљака и Pd(II) комплекса.

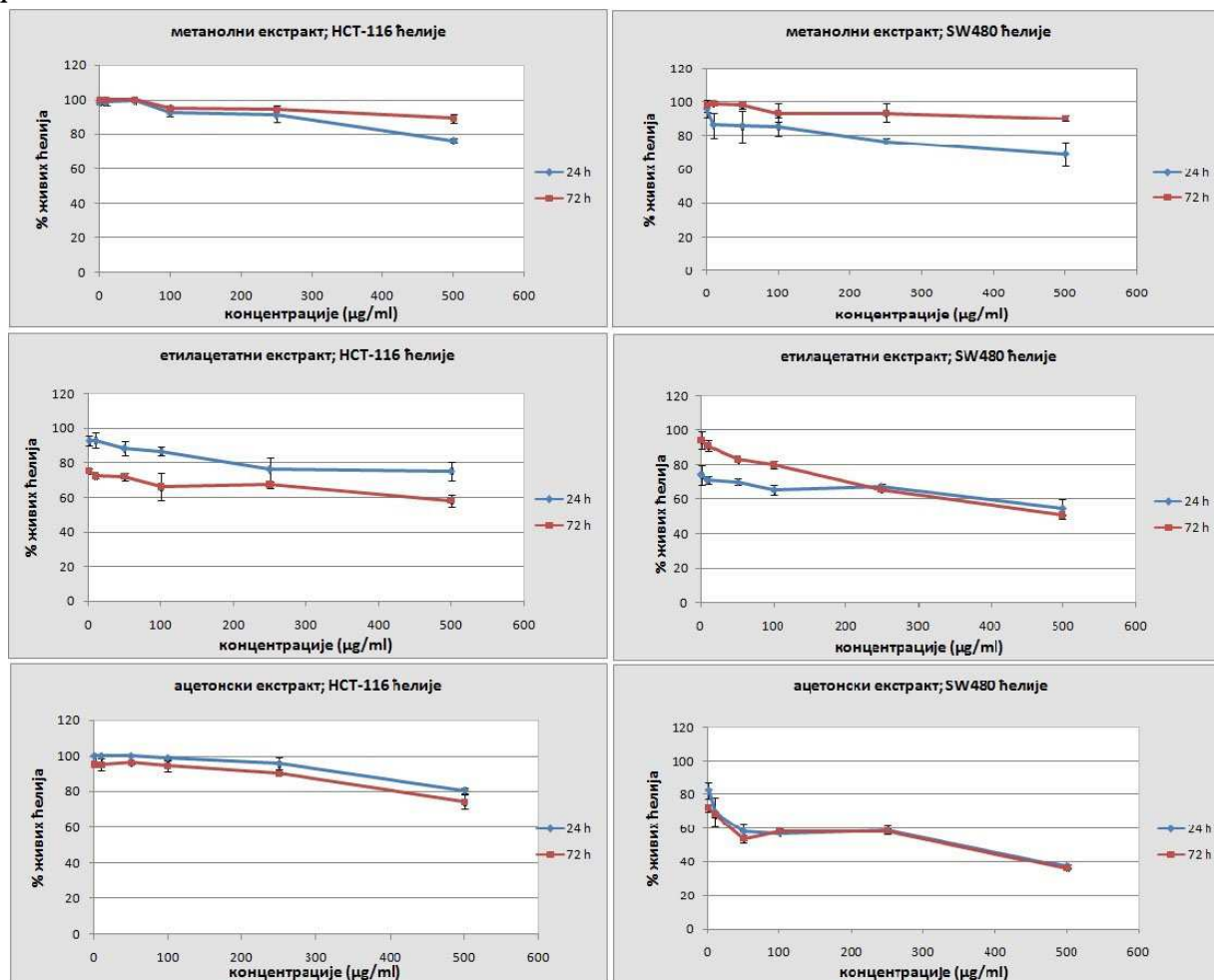
Графикон 18. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима екстрактима биљке *T. chamaedrys* након 24 и 72 сата.



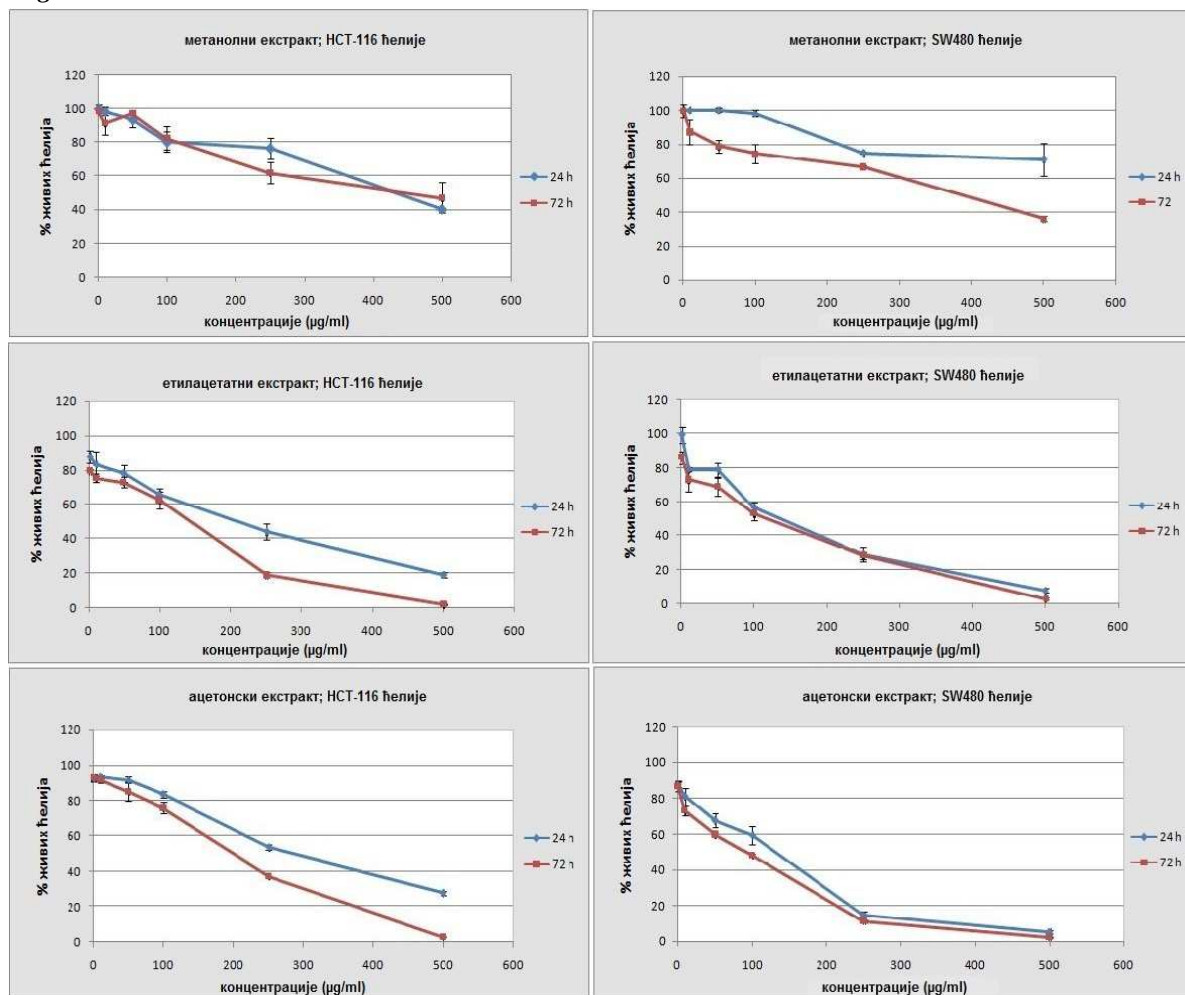
Графикон 19. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима екстрактима биљке *A. flavum* након 24 и 72 сата.



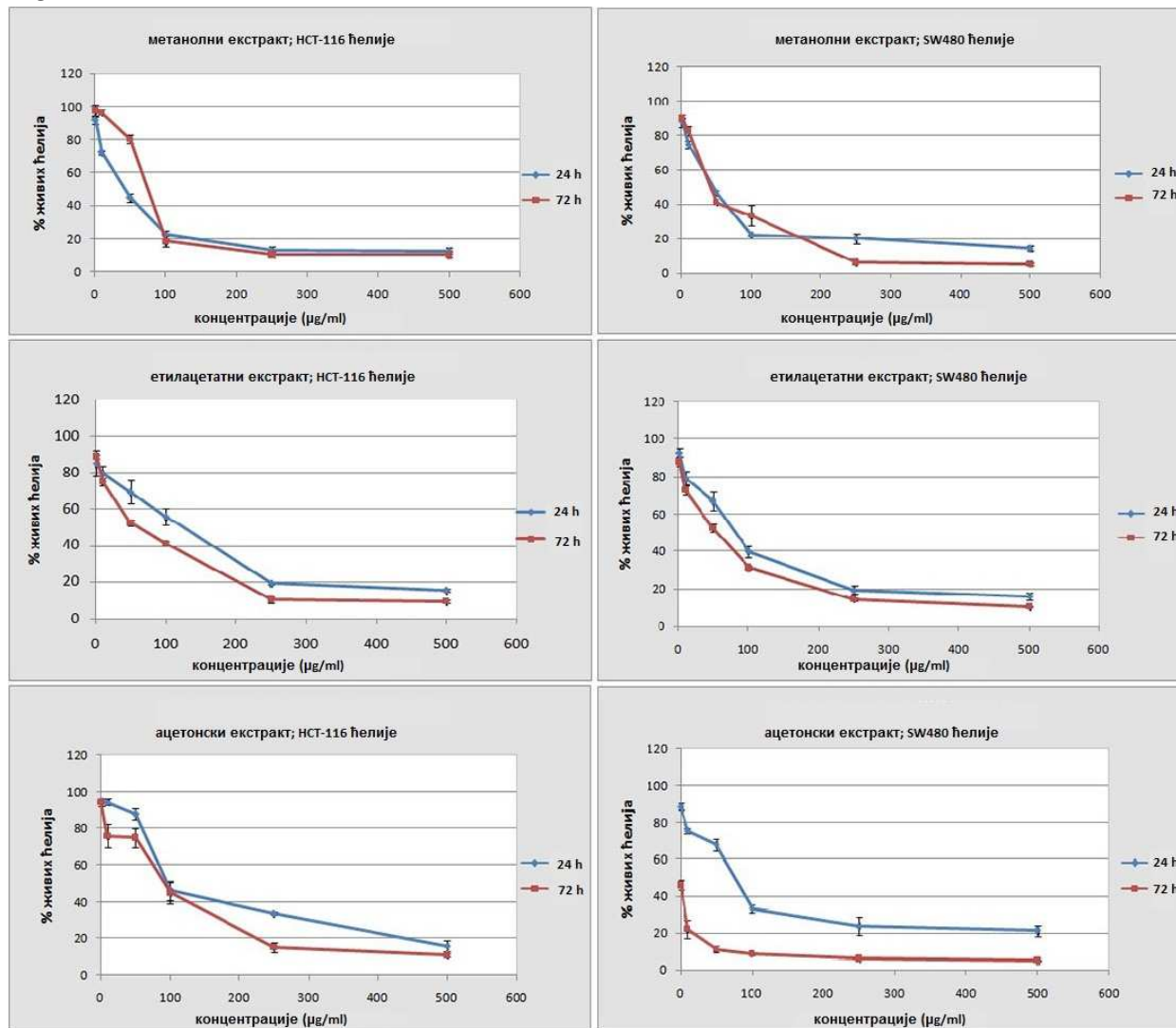
Графикон 20. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима екстрактима биљке *G. punctata* након 24 и 72 сата.



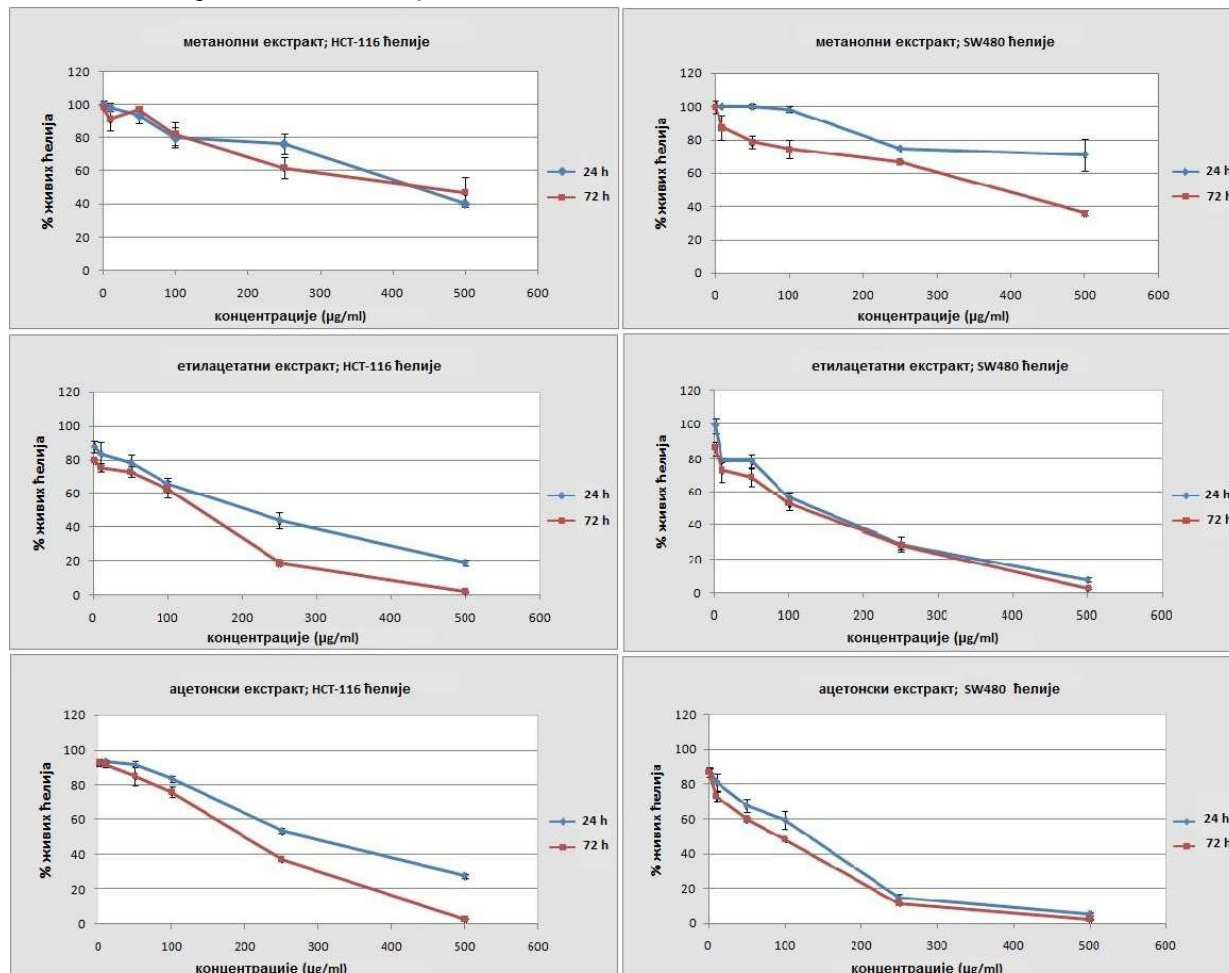
Графикон 21. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима екстрактима листова биљке *L. vulgare* након 24 и 72 сата.



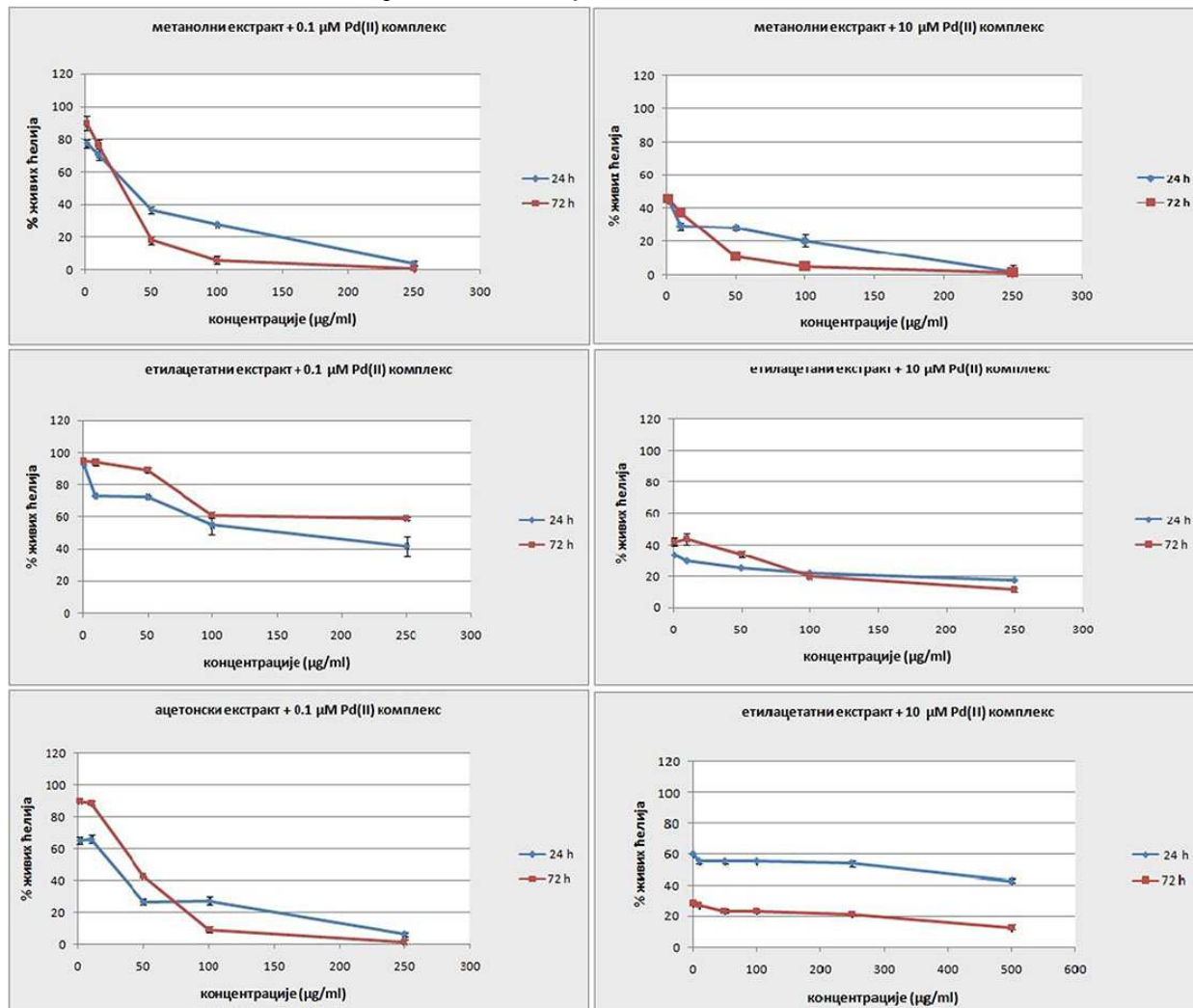
Графикон 22. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима екстрактима плодова биљке *L. vulgare* након 24 и 72 сата.



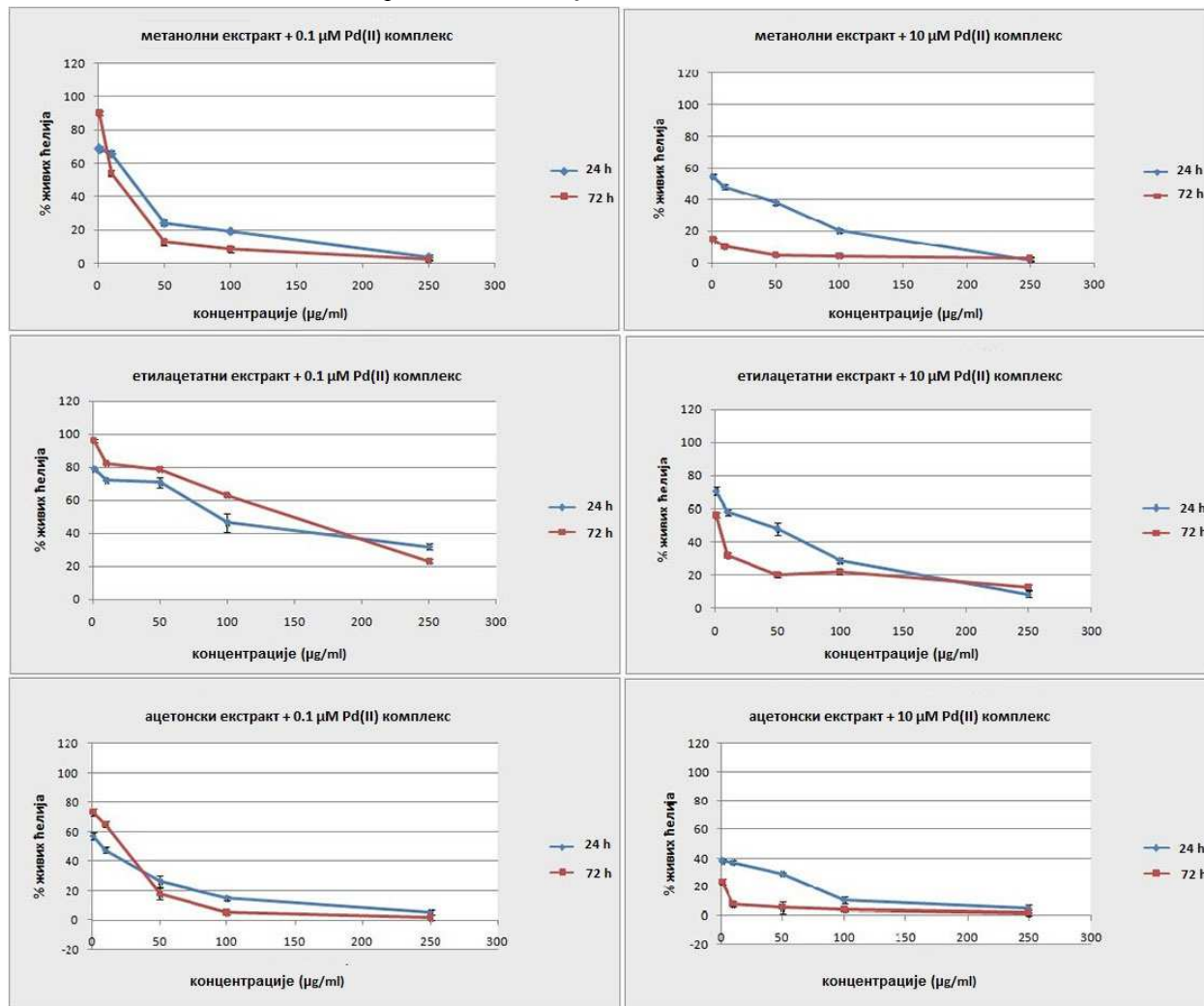
Графикон 23. Инхибиција раста НСТ-116 и SW480 ћелија у третманима метанолним, етилацетатним и ацетонским екстрактом биљке *C. erythrea* након 24 и 72 сата.



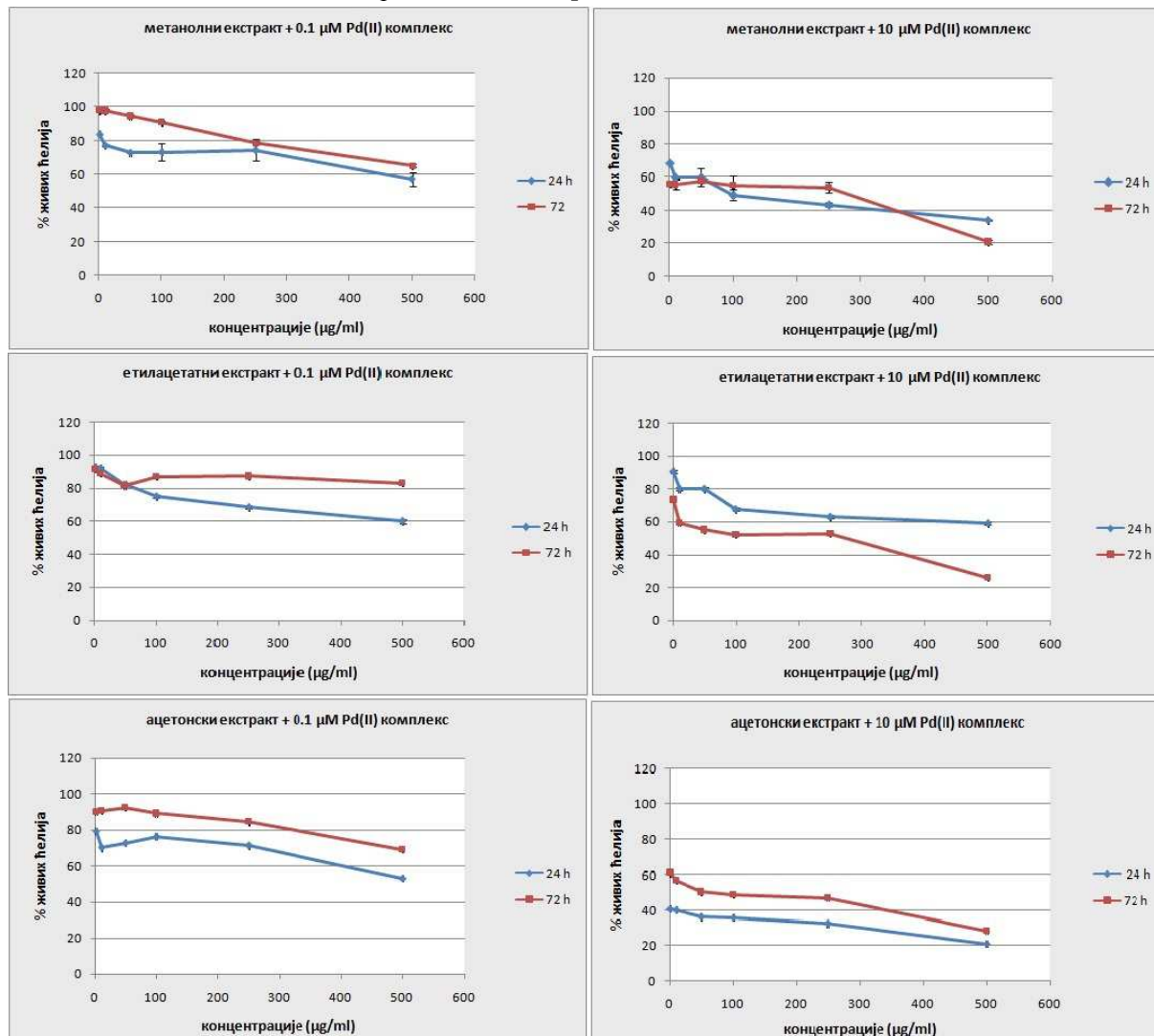
Графикон 24. Инхибиција раста НСТ-116 ћелија у комбинованим третманима метанолним, етилацетатним и ацетонским екстрактом биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекска након 24 и 72 сата.



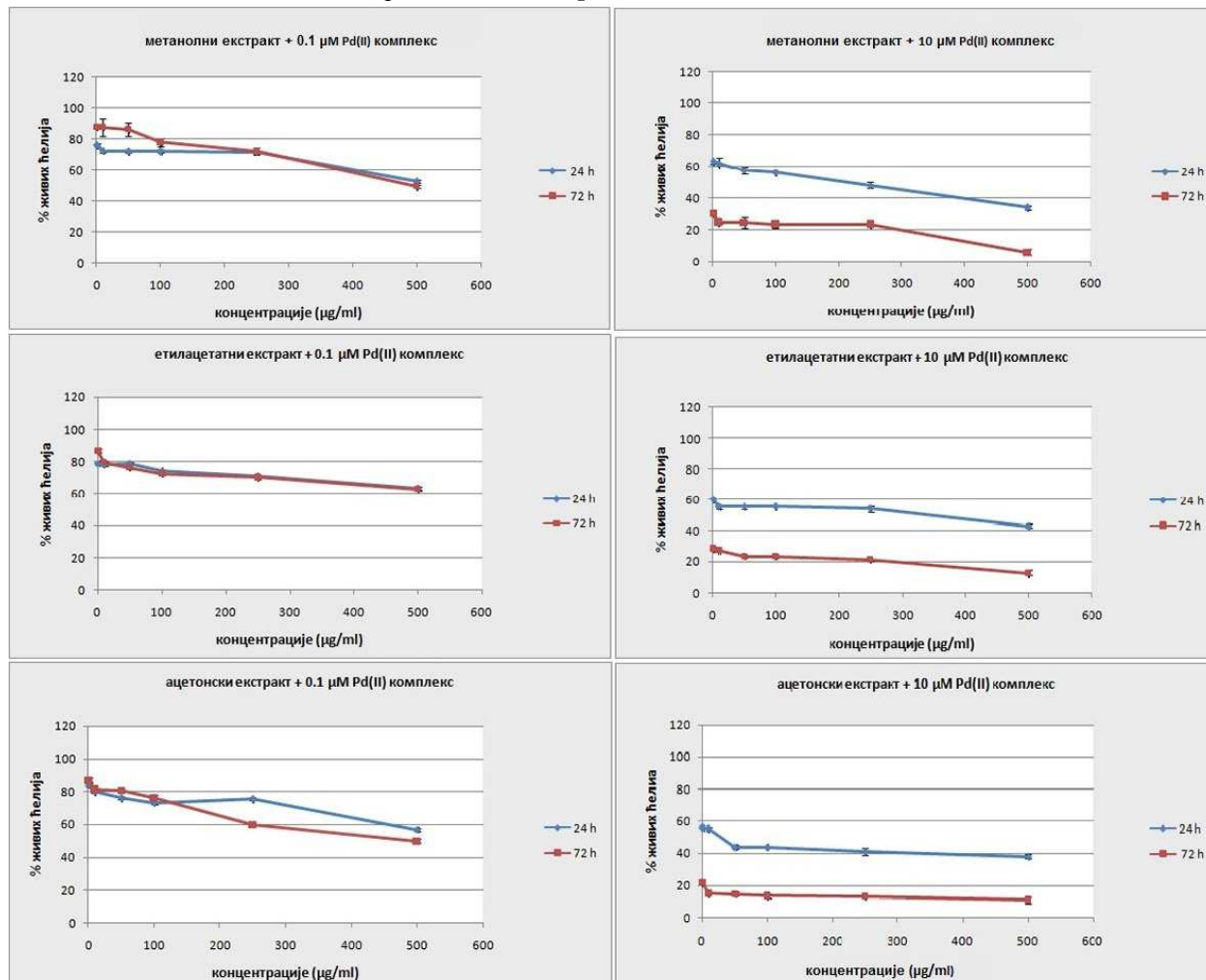
Графикон 25. Инхибиција раста SW480 ћелија у комбинованим третманима метанолним, етилацетатним и ацетонским екстрактом биљке *A. flavum* и Pd(II) комплекска након 24 и 72 сата.



Графикон 26. Инхибиција раста НСТ-116 ћелија у комбинованим третманима метанолним, етилацетатним и ацетонским екстрактом биљке *G. punctata* и Pd(II) комплексна након 24 и 72 сата.



Графикон 27. Инхибиција раста SW480 ћелија у комбинованим третманима метанолним, етилацетатним и ацетонским екстрактом биљке *G. punctata* и Pd(II) комплекса након 24 и 72 сата.



Прилог 4.

Прерачун потенцијалних синергистичких ефеката биљака (*A. flavum* и *G. punctata*) и Pd(II) комплекса у комбинованим третманима

Табела 43 приказује међусобне ефекте коришћених концентрација биљака *A. flavum* и *G. punctata* и Pd(II) комплекса на НСТ-116 ћелијској линији.

Табела 43. Међусобни ефекти на инхибицију пролиферације **НСТ-116 ћелија** између екстраката испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса.

Комбиновани третмани екстраката биљака и 0.1 μM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI	Комбиновани третмани екстраката биљака и 10 μM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI
<i>A. flavum</i> (M) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.23	<i>A. flavum</i> (M) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.52
	72 h	Синергизам	0.65		72 h	Синергизам	0.04
<i>A. flavum</i> (M) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Адитивни	1.00	<i>A. flavum</i> (M) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.23
	72 h	Антагонизам	1.85		72 h	Синергизам	0.23
<i>A. flavum</i> (M) 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.26	<i>A. flavum</i> 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.38
	72 h	Синергизам	0.34		72 h	Синергизам	0.16
<i>A. flavum</i> (M) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.41	<i>A. flavum</i> (M) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.29
	72 h	Синергизам	0.15		72 h	Синергизам	0.11
<i>A. flavum</i> (M) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.02	<i>A. flavum</i> (M) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.11
	72 h	Синергизам	0.03		72 h	Синергизам	0.05
<i>A. flavum</i> (E) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Адитивни	0.88	<i>A. flavum</i> (E) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.24
	72 h	Антагонизам	28.49		72 h	Синергизам	0.44
<i>A. flavum</i> (E) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.38	<i>A. flavum</i> (E) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.19
	72 h	Антагонизам	5.41		72 h	Синергизам	0.54
<i>A. flavum</i> (E) 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Антагонизам	1.69	<i>A. flavum</i> (E) 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.17
	72 h	Антагонизам	8.33		72 h	Синергизам	0.35
<i>A. flavum</i> (E) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Адитивни	0.83	<i>A. flavum</i> (E) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.15
	72 h	Антагонизам	3.91		72 h	Синергизам	0.11
<i>A. flavum</i> (E) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Адитивни	0.81	<i>A. flavum</i> (E) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.16
	72 h	Антагонизам	7.67		72 h	Синергизам	0.04
<i>A. flavum</i> (A) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.10	<i>A. flavum</i> (A) 1 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Антагонизам	1.32
	72 h	Синергизам	0.76		72 h	Антагонизам	3.71
<i>A. flavum</i> (A) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Адитивни	0.82	<i>A. flavum</i> (A) 10 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.24
	72 h	Антагонизам	5.62		72 h	Синергизам	0.45
<i>A. flavum</i> (A) 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.36	<i>A. flavum</i> (A) 50 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.17
	72 h	Антагонизам	4.86		72 h	Синергизам	0.42
<i>A. flavum</i> (A) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Синергизам	0.79	<i>A. flavum</i> (A) 100 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.34
	72 h	Синергизам	0.62		72 h	Синергизам	0.02
<i>A. flavum</i> (A) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 0.1 μM	24 h	Антагонизам	6.15	<i>A. flavum</i> (A) 250 $\mu\text{g/ml}$ + Pd(II) комплекс 10 μM	24 h	Синергизам	0.02
	72 h	Синергизам	0.22		72 h	Синергизам	0.11

<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.20 2.17	<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.26 1.01
<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.05 2.02	<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Адитивни	1.32 0.98
<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.03 0.58	<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	1.31 1.13
<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.03 0.29	<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Адитивни	0.68 0.97
<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.04 0.10	<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Адитивни	0.47 0.90
<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.65 0.09	<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.85 3.42
<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.21 0.12	<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	5.62 1.22
<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.33 0.18	<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Адитивни	5.88 0.95
<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.10 0.13	<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	2.11 0.79
<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.07 0.13	<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Адитивни	1.57 0.83
<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.05 0.20	<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.38 1.38
<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.05 0.22	<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.37 1.06
<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.03 0.35	<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.28 0.71
<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.04 0.17	<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.28 0.65
<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.03 0.09	<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.22 0.58

Табела 44 приказује међусобне ефекте коришћених концентрација биљака *A. flavum* и *G. punctata* и Pd(II) комплекса на SW480 ћелијској линији.

Табела 44. Међусобни ефекти на инхибицију пролиферације **SW480 ћелија** између екстраката испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса.

Комбиновани третмани екстраката биљака и 0.1 µM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI	Комбиновани третмани екстраката биљака и 10 µM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI
<i>A. flavum</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Синергизам	0.18	<i>A. flavum</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Синергизам	0.21
	72 h	Синергизам	1.28		72 h	Синергизам	0.10
<i>A. flavum</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Антагонизам	1.48	<i>A. flavum</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Синергизам	0.65
	72 h	Антагонизам	2.07		72 h	Синергизам	0.02
<i>A. flavum</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Синергизам	0.70	<i>A. flavum</i> 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам	1.66
	72 h	Синергизам	0.47		72 h	Синергизам	0.26

<i>A. flavum</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Аддитивни Аддитивни	0.95 0.90	<i>A. flavum</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.03 0.46
<i>A. flavum</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.22 0.57	<i>A. flavum</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.08 0.61
<i>A. flavum</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.57 20.21	<i>A. flavum</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.72 1.18
<i>A. flavum</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.49 9.05	<i>A. flavum</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	2.15 0.42
<i>A. flavum</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	10.65 29.60	<i>A. flavum</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	2.91 0.33
<i>A. flavum</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.21 13.79	<i>A. flavum</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.13 0.64
<i>A. flavum</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	1.41 1.36	<i>A. flavum</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.18 0.41
<i>A. flavum</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.81 3.97	<i>A. flavum</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.25 0.30
<i>A. flavum</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	3.99 14.54	<i>A. flavum</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.99 0.23
<i>A. flavum</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	3.92 3.73	<i>A. flavum</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	5.21 0.59
<i>A. flavum</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.32 1.05	<i>A. flavum</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	1.07 2.99
<i>A. flavum</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Аддитивни Синергизам	0.84 0.49	<i>A. flavum</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.55 0.53
<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.07 0.14	<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.65 0.19
<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	6.43 0.25	<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	2.36 0.13
<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	2.10 0.60	<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	7.32 0.14
<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	4.17 0.53	<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	14.61 0.14
<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	10.66 0.82	<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	6.23 0.19
<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	5.39 0.17	<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.31 0.17
<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	9.58 0.18	<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Аддитивни Синергизам	0.96 0.16
<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	80.46 0.45	<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Аддитивни Синергизам	0.97 0.11
<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	21.54 0.50	<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Аддитивни Синергизам	0.96 0.12
<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	22.78 0.89	<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Аддитивни Синергизам	0.89 0.10
<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.65 6.76	<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Аддитивни Аддитивни	1.00 1.00

<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	7.57 7.89	<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Адитивни Синергизам	0.99 0.05
<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	14.66 2.39	<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.50 0.05
<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	18.29 5.32	<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.54 0.04
<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	6.11 4.49	<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.50 0.04

Табела 45 приказује међусобне ефекте коришћених концентрација биљака *A. flavum* и *G. punctata* и Pd(II) комплекса на здравим фибробластима коже.

Табела 45. Међусобни ефекти на инхибицију пролиферације здравих фибробласта коже између екстраката испитиваних врста биљака и Pd(II) комплекса.

Комбиновани третмани екстраката биљака и 0.1 µM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI	Комбиновани третмани екстраката биљака и 10 µM концентрације Pd(II) комплекса		Интеракција	CI
<i>A. flavum</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	4.14
	72 h		4.73		72 h		5.12
<i>A. flavum</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	4.14
	72 h		4.73		72 h		2.13
<i>A. flavum</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Антагонизам Адитивни	2.01	<i>A. flavum</i> 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.56
	72 h		0.92		72 h		2.13
<i>A. flavum</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	6.87	<i>A. flavum</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	2.09
	72 h		1.65		72 h		1.98
<i>A. flavum</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Адитивни Адитивни	0.86	<i>A. flavum</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	3.24
	72 h		0.91		72 h		2.13
<i>A. flavum</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	4.14
	72 h		4.73		72 h		5.15
<i>A. flavum</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	4.14
	72 h		4.73		72 h		3.25
<i>A. flavum</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	2.76
	72 h		4.73		72 h		3.13
<i>A. flavum</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Антагонизам Адитивни	3.01	<i>A. flavum</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.65
	72 h		0.91		72 h		2.22
<i>A. flavum</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.67	<i>A. flavum</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	2.04
	72 h		3.33		72 h		4.12
<i>A. flavum</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	2.15
	72 h		4.73		72 h		2.47
<i>A. flavum</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	2.13
	72 h		4.73		72 h		8.54
<i>A. flavum</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Нема ефекта Антагонизам	-	<i>A. flavum</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.57
	72 h		4.73		72 h		6.60
<i>A. flavum</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Синергизам Антагонизам	0.31	<i>A. flavum</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.80
	72 h		1.63		72 h		4.53
<i>A. flavum</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h	Синергизам Антагонизам	0.76	<i>A. flavum</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h	Антагонизам Антагонизам	1.17
	72 h		2.10		72 h		1.90

<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.71 4.73	<i>G. punctata</i> (M) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.65 5.15
<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.51 4.73	<i>G. punctata</i> (M) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	1.98 5.15
<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.20 0.55	<i>G. punctata</i> (M) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	1.87 4.87
<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Адитивни Адитивни	0.90 0.97	<i>G. punctata</i> (M) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	3.34 2.61
<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.61 0.68	<i>G. punctata</i> (M) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Синергизам	1.72 0.75
<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Нема ефекта Антагонизам	- 4.73	<i>G. punctata</i> (E) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.14 5.15
<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Нема ефекта Антагонизам	- 4.73	<i>G. punctata</i> (E) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.14 5.15
<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Нема ефекта Антагонизам	- 4.73	<i>G. punctata</i> (E) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.14 5.15
<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.52 4.73	<i>G. punctata</i> (E) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.73 3.88
<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Адитивни	0.42 0.81	<i>G. punctata</i> (E) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	2.54 2.99
<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Нема ефекта Антагонизам	- 4.73	<i>G. punctata</i> (A) 1 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.14 5.15
<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Нема ефекта Антагонизам	- 4.73	<i>G. punctata</i> (A) 10 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	5.55 5.15
<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Антагонизам	0.56 4.73	<i>G. punctata</i> (A) 50 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.51 5.15
<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Адитивни	0.66 0.87	<i>G. punctata</i> (A) 100 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Антагонизам	4.76 5.08
<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 0.1 µM	24 h 72 h	Синергизам Синергизам	0.32 0.42	<i>G. punctata</i> (A) 250 µg/ml + Pd(II) комплекс 10 µM	24 h 72 h	Антагонизам Адитивни	5.91 0.89



БИОГРАФИЈА

Милена Г. Ђурчић рођена је 30.10.1985. године у Ивањици. Основну школу „Кирило Савић“ и Гимназију завршила је у Ивањици, као одличан ученик и као носилац посебних диплома, услед изузетног успеха на такмичењима из Биологије (освојена I места на општинским и регионалним такмичењима и три пута II место на Републичким такмичењима из биологије).

Школске 2004/2005 године уписала је Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, у Институту за биологију и екологију, смер биологију. Студије је завршила 2008. године, са просечном оценом 9,21 и положеним дипломским испитом са оценом 10. Тиме је стекла звање дипломирани биолог.

Школске 2008/2009 године уписала је докторске академске студије, за стицање звања доктор наука - биолошке науке, на ПМФ-у у Крагујевцу, на смеру „Физиологија животиња и човека и молекуларна биологија“. Од фебруара 2009. године, као стипендиста Министарства за науку и технолошки развој Републике Србије, стиче статус истраживача-приправника и распоређује се на пројекту: „Таксономска, биохемијска и молекуларна истраживања гљива и биолошки активних супстанци“ (Евиденциони број: 143041), а експериментални део истраживања обавља у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију у оквиру CPCTAS (Centre for Pre-Clinical Testing of Active Substances). И наредне, 2010. године, након анализе постигнутих резултата стиче услов за продужење стипендије и наставља са научно-истраживачким радом на поменутом пројекту.

Од јануара 2011. године, као истраживач-приправник, касније истраживач-сарадник ангажована је на пројекту финансираном од стране Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије (2011.-2015. године) "Преклиничка испитивања биоактивних супстанци - ПИБАС" (Евиденциони број: ИИИ41010), у Институту за биологију и екологију, Природно-математичког факултета у Крагујевцу.

Милена Ђурчић се успешно бави научно-истраживачким радом у Лабораторији за ћелијску и молекуларну биологију и Лабораторији за Експерименталну физиологију животиња, Института за биологију и екологију ПМФ-а у Крагујевцу, где је овладала савременим техникама и методама физиолошко-биохемијских, хематолошких и молекуларно-биолошких анализа које су заступљене у овим лабораторијама. Део метода истраживања из области ћелијске и молекуларне биологије у оквиру своје дисертације увела је у редовну лабораторијску праксу.

Током протеклих година на докторским студијама Милена Ђурчић је била ангажована у извођењу практичног дела наставе на предметима: Основи молекуларне биологије и Основи биотехнологије на основним академским студијама, као и на предметима Биологија човека и Токсикологија на мастер студијама. Од 2011. године ангажована за потребе акредитације Лабораторије за ћелијску и молекуларну биологију (SRPS ISO/IEC 17025:2006, акредитациони број 01-367) на ПМФ-у у Крагујевцу.

Током основних и докторских студија Милена Ђурчић била је активан члан и члан управног одбора Еколошко-истраживачког друштва „Младен Караман“. Као члан ЕИД-а била је координатор у учесник многобројних научно-истраживачких експедиција у оквиру пројекта које је финансирао Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије. Као члан Српског биолошког друштва „Стеван Јаковљевић“, била је један од координатора пројекта „Улога и значај биолошке разноврсности на територији града Крагујевца“ у периоду од јуна до новембра 2010. године. Од децембра 2010. године је у надзорном одбору Краљевског академског природњачког друштва "Балкан".

У априлу 2011. године била је на стручном усавршавању на Природно-математичком факултету, Одсеку за експерименталну физиологију и биохемију у Скопљу и у априлу 2014. године на обуци „Од нано до макроматеријала, примена стем ћелија у регенеративној ортопедији и стоматологији“ на Хрватском институту за истраживање мозга, Медицински факултет Свеучилишта у Загребу. Учествовала је на интернационалним и националним научним скуповима (интернационална конференција "Preclinical testing of active substances and cancer research", одржана у марту 2011. године у Крагујевцу; XVI саветовање о биотехнологији, одржано у фебруару 2011. године у Чачку; конгрес "Митохондрије и слободни радикали у биомедицини", одржан у септембру 2011. године у Београду и конгрес „Живот са слободним радикалима“, одржан у септембру 2013. године у Нишу).

Библиографски подаци:

У току научно-истраживачког рада Милена Ђурчић је публиковала 11 научних радова у међународним научним часописима са SCI листе, 2 рада у националним научним часописима, 9 радова саопштених на међународним научним скуповима штампаних у изводу, 1 рад на националном научном скупу штампан у целини и 10 радова саопштених на националним скуповима штампаних у изводу, што укупно чини 32 библиографске јединице. У оквиру истраживачког рада везаног за докторску дисертацију, Милена Ђурчић је публиковала 4 рада у међународним часописима са SCI листе (референце под редним бројевима 1, 3, 4 и 7 (напомене: (а) у публикацијама интердисциплинарних истраживања [референце 4 и 7] резултати дисертације се односе на екстракцију биљка, одређивање концентрација фенола и флавоноида и цитотоксичну активност; (б) још два рада су у процесу рецензије у часописима са SCI листе [референце 34 и 35]), 3 рада саопштена на међународним научним скуповима штампана у изводу (референце под редним бројевима 14, 15 и 22) и 4 рада саопштена на националним научним скуповима штампана у изводу (референце под редним бројевима 25, 26, 28 и 29, што укупно чини 11 публикованих библиографских јединица и две у процесу рецензије.

Радови објављени у међународним научним часописима:

1. Stanković M, Ćurčić M, Žižić J, Topuzović M, Solujić S, Marković S. *Teucrium* plant species as natural sources of novel anticancer compounds: antiproliferative, proapoptotic and antioxidant properties. *International Journal of Molecular Science*, 2011, 12: 4190-4205. IF₂₀₁₁: 2.598, M₂₁.

-
2. Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Tošić S, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić Lj, Đačić D, **Ćurčić M**, Marković M. Antioxidant, antimicrobial and antiproliferative activities of five lichen species. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(8): 5428-5448. IF₂₀₁₁: 2.598, M₂₁.
 3. **Ćurčić M**, Stanković M, Mrkalić E, Matović Z, Banković D, Cvetković D, Đačić D, Marković S. Antiproliferative and proapoptotic activities of methanolic extracts from *Ligustrum vulgare* L. as an individual treatment and in combination with palladium complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13: 2521-2534. IF₂₀₁₁: 2.598, M₂₁; IF₂₀₁₂: 2.464, M₂₂.
 4. **Ćurčić M**, Stanković M, Radojević I, Stefanović O, Čomić Lj, Topuzović M, Đačić D, Marković S. Biological effects, total phenolic content and flavonoid concentrations of fragrant yellow onion (*Allium flavum* L.). *Medicinal Chemistry*, 2012, 8(1): 46-51. IF₂₀₁₀: 1.603, M₂₂; IF₂₀₁₂: 1.373 M₂₃.
 5. Marković S, Žižić J, Đačić D, Obradović A, **Ćurčić M**, Cvetković D, Đorđević N, Ognjanović B, Štajn A. Alteration of oxidative stress parameters in red blood cells of rats after chronic *in vitro* treatment with cisplatin and selenium. *Archives of Biological Science*, 2011, 63(4): 991-999. IF₂₀₁₂: 0.791, M₂₃.
 6. Stanković M, Radojević I, **Ćurčić M**, Vasić S, Topuzović M, Čomić Lj, Marković S. Evaluation of biological activities of goldmoss stonecrop (*Sedum acre* L.). *Turkish Journal of Biology*, 2012, 36: 580-588. IF₂₀₁₂: 0.0914, M₂₃.
 7. Šmit B, Pavlović R, Radosavljević-Mihajlović A, Došen A, **Ćurčić M**, Šeklić D, Živanović M. Synthesis, characterization and cytotoxicity of palladium(II) complex of 3-[(2-hydroxy-benzylidene)-amino]-2-thioxo-imidazolidin-4-one. *Journal of Serbian Chemical Society*, 2013, 78(2): 217-227. IF₂₀₁₃: 0.889, M₂₃.
 8. Košarić J, Cvetković D, Živanović M, **Ćurčić M**, Šeklić D, Bugarčić Z, Marković S. Antioxidative and antiproliferative evaluation of 2 (phenylselenomethyl)tetrahydrofuran and 2-(phenylselenomethyl) tetrahydropyran. *Journal of BUON*, 2014, 19(1): 283-290, IF₂₀₁₃: 0.706, M₂₃.
 9. Stojković D, Jevtić V, Radić G, Đačić D, **Ćurčić M**, Marković S, Đinović V, Petrović V, Trifunović S. Stereospecific ligands and their complexes. Part XII. Synthesis, characterization and *in vitro* antiproliferative activity of platinum(IV) complexes with some O,O'-dialkyl esters of (S,S)-ethylenediamine-N,N'-di-2-propanoic acid against colon cancer (HCT-116) and breast cancer (MDA-MB-231) cell lines. *Journal of Molecular Structure*, 2014, 1062: 21-28. IF₂₀₁₃: 1.599, M₂₃.
 10. Marković S, Đorđević N, **Ćurčić M**, Štajn A, Spasić M. Biotransformation and nitroglycerin-induced effects on antioxidative defense system in rat erythrocytes and reticulocytes. *General Physiology and Biophysics*, 2014, 33(4) (In press). IF₂₀₁₃: 0.875, M₂₃.
 11. Filipović N, Djukić T, Radović M, Cvetković D, **Ćurčić M**, Marković S, Peulić A, Jeremić B. Electromagnetic field investigation on different cancer cell lines. *Cancer Cell International*, 2014 (In press). IF₂₀₁₃: 1.989, M₂₃.

Радови објављени у страном и домаћем националном часопису:

12. Grbović F, Stanković SM, **Ćurčić M**, Đorđević N, Šeklić D, Topuzović M, Marković S. *In vitro* cytotoxic activity of *Origanum vulgare* L. on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. *Plants*, 2013, 2: 371-378, M₅₃.
13. Cvjetković V, Đokić M, Arsić B, **Ćurčić M**. The ontology supported intelligent system for experiment search in the scientific research center. *Kragujevac Journal of Science*, 2014, 36: 95-110, M₅₃.

Саопштења на међународним научним скуповима штампана у изводу– кат. М34:

14. Stanković M, **Ćurčić M**, Đačić D, Topuzović M, Marković SD. Phenolic content in vitro antiproliferative and apoptotic activity of *Teucrium* species from Serbian flora on HCT-116 cell line. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p21.
15. Stanković M, **Ćurčić M**, Đačić D, Žižić J, Topuzović M, Marković S. Free-radical scavenging capacity and total phenolic content of Fragrant yellow onion (*Allium flavum L.*). Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p62.
16. **Ćurčić M**, Stanković M, Đačić D, Topuzović M, Marković S. Antioxidant, antiproliferative and apoptotic activity of different extracts of leaves and seed cones from european yew (*Taxus baccata L.*). Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p63.
17. Đačić D, Cvetković V, Stanković M, **Ćurčić M**, Mitrović T, Stamenković S, Marković S. *In vitro* antiproliferative activity of five lichens species on HCT-116 human colon cell line. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p64.
18. Đačić D, Kosanić M, **Ćurčić M**, Ranković B, Marković S. Cytotoxic activities of *Umbilicaria crustulosa*, *Parmeliopsis ambigua*, *Umbilicaria polyphylla*, *Lecanora muralis* and *Parmelia saxatilis* methanol extracts on human colon cancer cell line. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p65.
19. Žižić J, **Ćurčić M**, Đačić D, Obradović A, Stanković M, Mitrović T, Kosanić M, Ranković B, Marković S. Evaluation of redox status of HCT-116 cell line treated with various lichen and plant extracts. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p66.
20. Žižić J, **Ćurčić M**, Obradović A, Mrkalić E, Matović Z, Ćendić M, Djurdjević P, Živić D, Marković S. Evaluation of antiproliferative activity of new palladium complex and mechanism of cell death on HCT-116 and MDA-MB-231 cell lines. Scientific Conference with International Participation “Preclinical Testing of Active Substances and Cancer Research”, Kragujevac, 2011, p13.
21. Živanović M, Cvetković D, Košarić J, **Ćurčić M**, Šeklic D, Bugarčić Z, Markovic S. Antioxidative effects of novel selenium compounds. FEBS JOURNAL, 2012, 279: 197-197.
22. **Ćurčić M**, Stanković M, Šeklić D, Živanović M, Cvetković D, Marković S. Total phenolic content and in vitro antioxidant/prooxidant properties of leaves and fruits from *Ligustrum vulgare L.* FEBS JOURNAL, 2012, 279: 216-216.

Саопштења на националним научним скуповима штампана у целини– кат. М63:

23. **Ćurčić M**, Stanković M, Đačić D, Topuzović M, Marković S. Antiproliferativna aktivnost metanolnog ekstrakta biljke *Teucrium scordium L.* na HCT-116 ćelijskoj liniji. XI savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, 2011. Zbornik radova, 497-501.

Саопштења на националним научним скуповима штампана у изводу– кат. М64:

24. Đačić D, **Ćurčić M**, Žižić J, Obradović A, Đorđević N, Marković S. Cell biology techniques applied in pre-clinical testing of active substances on cell culture. The second workshop pre-clinical testing of

Active Substances on cancer and various model systems, Kragujevac, October 2009., Supplementary material P.45.

25. **Ćurčić M**, Stanković M, Mrkalić E, Matović Z, Đačić D, Cvetković D, Živanović M, Marković S. Ispitivanje antiproliferativne aktivnosti metanolnih ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji u zavisnosti od vremena izlaganja i u kotretmanu sa kompleksom paladijuma. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka, strana 72.
26. Cvetković D, **Ćurčić M**, Đačić D, Stanković M, Marković S. Ispitivanje antiproliferativnih i antioksidacionih svojstava metanolnih ekstrakata dobijenih iz listova i plodova biljke *Ligustrum vulgare* L. na HCT-116 ćelijskoj liniji. Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka, strana 48.
27. Đačić D, Stanković M, Glođović V, Radić G, Trifunović S, **Ćurčić M**, Cvetković D, Živanović M, Marković S. Sinergistička antiproliferativna aktivnost gjive *Phellinus luteus* i kompleksa platine(IV) [Pt(dp-(S,S)-eddp)] na ćelijskoj liniji humanog kolon kancera (HCT-116). Kongres "Mitohondrije i slobodni radikali", Beograd, 2011, knjiga sažetaka, strana 37.
28. **Ćurčić M**, Stanković M, Cvetković D, Živanović M, Marković S. Prooksidacioni efekat i citotoksičnost ekstrakata biljke *Ligustrum vulgare* L. na ćelije karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013. godine, knjiga sažetaka, strana 71.
29. **Ćurčić M**, Stanković M, Cvetković D, Šeklić D, Marković S. Efekti ekstrakata biljke *Teucrium chamaedrys* L. na apoptotski signalni put i redoks status ćelija karcinoma kolona. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 64.
30. Šeklić D, Mitrović T, Stamenković S, Cvetković V, Radenković J, **Ćurčić M**, Živanović M, Cvetković D, Marković S. Citotoksični i prooksidacioni efekti efekti ekstrakata lišajeva (*Pseudoevernia furfuracea* i *Platismatia glauca*) na ćelijskim linijama humanog kolon kancera (HCT-116 i SW-480). Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 53.
31. Šeklić D, Stanković M, Topuzović M, **Ćurčić M**, Živanović M, Cvetković D, Marković S. Prooksidativni i antimigratorni efekti ekstrakata medicinski značajnih glijiva u tretmanu ćelijskih linija humanog kolon kancera. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 54.
32. Živanović M, Košarić J, Šeklić D, Cvetković D, **Ćurčić M**, Sukdolak S, Marković S. Citotoksični i antioksidativni-prooksidativni efekti derivata kumarina na ćelijskoj liniji humanog kolon kancera HCT-116. Kongres "Život sa slobodnim radikalima", Niš, 2013., knjiga sažetaka, strana 68.
33. Baskić D, Popović S, Stanković M, Todorović D, **Ćurčić M**, Petrović M. Antiproliferativni efekat ekstrakata biljaka *Ligustrum vulgare*, *Teucrium pollium* i glijive *Phellinus linteus* na rast A549 ćelija karcinoma pluća u kulturi. Oktobarski zdravstveni dani, Kragujevac, 2013, strana 36-37.

Радови у процесу рецензије:

34. **Ćurčić M**, Stanković M, Cvetković D, Topuzović M, Marković S. *Ligustrum vulgare* L.: *In vitro* free radical scavenging activity and pro - oxidant properties in human colon cancer cell lines. *Turkish Journal of Biology*.
35. **Ćurčić M**, Stanković M, Cvetković D, Maksimović V, Šmit B, Pavlović R, Marković S. The molecular mechanisms of apoptosis induced by *Allium flavum* L. and synergistic effects with new-synthesized Pd(II) complex on colon cancer cells. *Journal of Food Biochemistry*.