

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana P. Valenta Šobot

**UTICAJ REFERENTNIH MONOTERPENSKIH
KOMPONENTI I EKSTRAKTA KORENA
Gentiana lutea NA AOPTOZU I NEKROPTOZU
MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE
KRVI ČOVEKA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ana P. Valenta Šobot

**THE EFFECTS OF REFERENCE
MONOTERPENE COMPOUNDS AND
Gentiana lutea ROOT EXTRACT ON
APOPTOSIS AND NECROPTOSIS IN HUMAN
PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR
CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

Mentori:

dr Dunja Drakulić, viši naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Jelena Lozo, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Iva Lakić, docent, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Jelena Filipović Tričković, naučni saradnik, Institut za nuklearne nauke „Vinča“ - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

ZAHVALNICA

Najveći deo ove doktorske disertacije urađen je u Laboratoriji za fizičku hemiju i Laboratoriji za molekularnu biologiju i endokrinologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, dok je deo eksperimenata rađen u Laboratoriji za atomsku fiziku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu i Instituta za primenu nuklearne energije - INEP, Univerziteta u Beogradu. Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije sprovedena su zahvaljujući nacionalnom projektu OI 173046 „Radiosenzitivnost humanog genoma“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Ovom prilikom želim da se zahvalim....

Mentoru dr Dunji Drakulić na pomoći, podršci, razumevanju i prenetom znanju.

Mentoru profesoru dr Goranu Brajuškoviću na dragocenim savetima i sugestijama tokom pisanja i oblikovanja teze.

Profesorki dr Gordani Matić na svim korisnim savetima tokom izrade ove doktorske disertacije.

Članovima Komisije za pregled i ocenu doktorske teze dr Jeleni Lozo, dr Ivi Lakić na odvojenom vremenu, stručnim sugestijama i savetima prilikom finalne obrade disertacije. Posebno se zahvaljujem dr Jeleni Filipović Tričković na prijateljskoj i profesionalnoj podršci u izradi teze.

Kolegama koji su svojim stručnim angažovanjem pomogli u izradi delova ove doktorske disertacije Jasmini Savić, dr Jeleni Potočnik, dr Segreju Tomiću i Marini Bekić.

Rukovodiocu projekta IO 173046 dr Gordani Joksić i mojim dragim kolegamicama dr Andreji Leskovac i dr Sandri Petrović, pod čijem okriljem je započeta izrada, kao i dr Maji Kokunešoski i dr Aleksandri Šaponjić na razumevanju u finalnim koracima izrade ove teze.

Mojim dragim kolegama iz Laboratorije za fizičku hemiju, dr Tatjani Momić, dr Tamari Lazarević-Pašti, dr Branislavu Nastasijeviću i Mirjani Dinić na prijateljskim i profesionalnim savetima i podršci.

Dragim kolegama iz Laboratorije za molekularnu biologiju i endokrinologiju, dr Snežani Pejić, dr Ani Todorović, dr Otiliji Keti, Vladani Petković, dr Ivani Grković, dr Nataši Mitrović, dr Ivani Guševac Stojanović na prijateljskoj atmosferi i razumevanju tokom rada u njihovoj laboratoriji.

Mojoj prijateljici i kolegici dr Brankici Marković Lakićević na pomoći u bitnim trenucima.

Posebnu zahvalnost na bezgraničnom razumevanju, ljubavi i podršci dugujem mojoj porodici.

Uticaj referentnih monoterpenskih komponenti i ekstrakta korena *Gentiana lutea* na apoptozu i nekroptozu mononuklearnih ćelija periferne krvi čoveka

SAŽETAK:

Gentiana lutea je lekovita biljka koja se vekovima koristi u narodnoj medicini, a njena primena je u mnogim aspektima potkrepljena naučnim podacima. S obzirom da je zapaženo da u zavisnosti od eksperimentalnih uslova osim pozitivnih može ispoljavati i citotoksični i genotoksični uticaj, cilj ove doktorske disertacije je bila procena odgovora neizmenjenih mononuklearnih ćelija periferne krvi čoveka (PBMC) i stimulisanih na deobu fitohemaglutininom (PHA-PBMC) na tretman referentnim monoterpenskim komponentama (MRK) i ekstraktom korena *Gentiana lutea* (EKG), identifikacija ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze izazvane uticajem tretmana i procena selektivne aktivacije ispitivanih tipova ćelijske smrti.

Rezultati ove doktorske disertacije pokazali su da citotoksični i genotoksični potencijal EKG zavise od koncentracije i dužine izlaganja, kao i od karakteristika ćelijske kulture. EKG sadrži značajne količine MRK, a posebno genciopikrozid (Gp), koje pojedinačno imaju veći genotoksični potencijal od samog EKG, stoga je uočeni citotoksični i genotoksični uticaj EKG verovatno uslovljen odnosima MRK i drugih sekundarnih metabolita dobijenih ekstrakcijom. Citotoksične koncentracije MRK aktiviraju kaspazno-zavisnu apoptozu usled indukovanog oštećenja molekula DNK, tako da je aktivacija apoptoze neselektivna i može biti praćena drugim tipovima ćelijske smrti. Dodatno, Gp i svertiamarin (Sm) tretmani u ćelijama mogu aktivirati i ćelijsku smrt tipa nekroptoze.

Ovim saznanjima se ne osporava blagotvorno dejstvo EKG primenjenog u manjim dozama i u kraćem vremenskom periodu, već se ukazuje da neadekvatna priprema i primena lako dostupnog biljnog materijala može imati i štetne posledice.

Ključne reči: citotoksičnost, genotoksičnost, genciopikrozid, svertiamarin, Žuta lincura

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Molekularna biomedicina

The effects of reference monoterpene compounds and *Gentiana lutea* root extract on apoptosis and necroptosis in human peripheral blood mononuclear cells

ABSTRACT:

Gentiana lutea is a medicinal plant that has been used in folk medicine for centuries, while its application is, in many aspects, scientifically proven. Since its effects vary from positive to cytotoxic and genotoxic depending on the experimental conditions, the aim of this doctoral dissertation was to evaluate the response of primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and those stimulated with phytohemagglutinin (PHA-PBMC) to reference monoterpene components (MRK) and *Gentiana lutea* root extract (EKG) treatment; to identify the type of treatment-provoked cell death (apoptosis or necroptosis) and to assess the selectivity of investigated cell death types' activation.

The obtained results indicate that the cytotoxic and genotoxic potential of EKG depends on concentration and time of exposure to EKG, as well as on the characteristics of cell culture. EKG contains significant amounts of MRK, especially gentiopicroside (Gp), which individually have a higher genotoxic potential than the EKG, so the observed cytotoxic and genotoxic effects of the EKG are probably due to the ratios of MRK and other secondary metabolites acquired after extraction. Cytotoxic concentrations of MRK activate caspase-dependent apoptosis due to treatment-induced DNA damage, indicating that activation of apoptosis is nonselective and may be accompanied by the other types of cell death. Additionally, Gp and swertiamarin (Sm) treatments can activate necroptosis-type cell death.

The findings of this study do not dispute the beneficial effects of EKG applied in smaller doses and over a shorter period of time, but they do emphasize the necessity of proper preparation and application of easily available herbal material that otherwise may have an adverse impact.

Key words: cytotoxicity, genotoxicity, gentiopicroside, swertiamarin, Yellow gentian

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Molecular biomedicine

LISTA SKRAĆENICA

| | |
|-------------------------------|---|
| EKG | ekstrakt korena <i>G. lutea</i> |
| La | loganska kiselina |
| Gp | genciopikrozid |
| Sw | sverozid |
| Sm | svertiamarina |
| (Q)SAR | kvantitativni odnos strukture-aktivnosti (eng. <i>(Quantitative) Structure-Activity Relationship</i>) |
| SAR | odnos strukture-aktivnosti (eng. <i>Structure-Activity Relationship</i>) |
| SAs | strukturna upozorenja (eng. <i>Structural Alerts</i>) |
| ADI | indeks primenljivosti domena (eng. <i>Applicability Domain Index</i>) |
| SSBs | jednolančani DNK prekidi (eng. <i>Single Strand Breaks</i>) |
| DSBs | dvolančani prekidi DNK (eng. <i>Double Strand Breaks</i>) |
| PBMC | mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>) |
| PHA | fitohemaglutinin |
| ROS | reaktivne vrste kiseonika (eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>) |
| O ₂ ⁻ | superoksid anion |
| [•] OH | hidroksilni radikal |
| H ₂ O ₂ | vodonik peroksid |
| [NAD(P)H]oksidaza | nikotin adenin dinukleotid fosfat |
| LPPs | produkti lipidne peroksidacije (eng. <i>Lipid Peroxidation Products</i>) |
| MDA | malondialdehid |
| 4-HNE | 4-hidroksinonenal |
| PUFA | polinezasićenih masnih kiselina |
| AO | antioksidativna odbrana |
| SOD | superoksid dismutaza |
| CAT | katalaza |
| GPx | glutation peroksidaza |
| Nrf 2 | eng. <i>Nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2</i> |
| ACD | slučajna ćelijska smrt usled naglih promena sredine (eng. <i>Accidental Cell Death</i>) |
| RCD | regulisana ćelijska smrt (eng. <i>Regulated Cell Death</i>) |
| PCD | programirana ćelijska smrt (eng. <i>Programmed Cell Death</i>) |
| DISC | signalni kompleks inicijacije smrti (eng. <i>Death Initiation Signalling Complex</i>) |
| Bid | eng. <i>BH3 interacting domain death agonist</i> |
| Bax | eng. <i>Bcl 2 associated X protein</i> |
| cit c | citohrom C |
| Apaf 1 | aktivirajući faktor apoptotskih proteaza-1 (eng. <i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>) |
| Bcl 2 | eng. <i>B cell lymphoma 2</i> |
| MOMP | permeabilizacija spoljašnje mitohondrijalne membrane (eng. <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>) |
| AIF | faktor aktiviranja apoptoze (eng. <i>Apoptosis Inducing Factor</i>) |
| EndoG | endonukleaza G |
| CAD | kaspazama aktivirana DNKaza (eng. <i>Caspase-Activated DNase</i>) |
| PARP 1 | poli (ADP-ribozil) polimeraza 1 (eng. <i>Poly (ADP- Ribose) Polymerase</i>) |
| Zvad-fmk | benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil keton |
| dsDNA | dvolančani segmenti DNK (eng. <i>Double Stranded DNA</i>) |
| DAMPs | molekularni obrasci povezani s oštećenjem ćelija (eng. <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>) |

| | |
|------------------|--|
| DRs | receptori smrti (eng. <i>Death Receptors</i>) |
| RIP1 | protein 1 koji je u interakciji s receptorom protein kinaze |
| RIP3 | protein 3 koji je u interakciji s receptorom protein kinaze |
| MLKL | pseudokinaze mešovitog porekla nalik kinaznom domenu (eng. <i>Mixed Lineage Kinase domain-Like protein</i>) |
| mtDNA | mitohondrijska DNK |
| HMGB1 | protein 1 grupe visoke mobilnosti (eng. <i>High Mobility Group Box1</i>) |
| IL-33 | interleukin 33 |
| IL-1 α | interleukin-1 α |
| ATP | adenozin trifosfat |
| nec | nekrostatin 1 |
| ULK1 | eng. <i>Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1</i> |
| PI3K | klasa III fosfoinozimid 3-kinaza |
| ATGs | eng. <i>Autophagy-related proteins</i> |
| LC3 | eng. <i>Microtubule-associated protein Light Chain 3</i> |
| ROCK | eng. <i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase</i> |
| Rac1 | eng. <i>Rac family small GTPase 1</i> |
| Arf6 | eng. <i>ADP ribosylation factor 6</i> |
| LAMP1 | eng. <i>Lysosomal-Associated Membrane Protein 1</i> |
| ER | endoplazmatični retikulum |
| TIMM8a/DDP | eng. <i>Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 8a</i> |
| NLRs | eng. <i>NOD-Like Receptors</i> |
| ALRs | eng. <i>AIM2-like receptors</i> |
| NOX4 | NADPH oksidaza 4 |
| PAD4 | peptidilarginin deiminaza 4 |
| TLRs | eng. <i>Toll-Like Receptors</i> |
| TCR | T ćelijski receptor (eng. <i>T-Cell Receptor</i>) |
| SAC | eng. <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> |
| IKKB | eng. <i>IκB kinase beta</i> |
| NF- κ B | eng. <i>Nuclear factor kappa-B</i> |
| KEAP1 | eng. <i>Kelch Like ECH Associated Protein 1</i> |
| PGAM5 | eng. <i>Mitochondrial serine/threonine-protein phosphatase PGAM5</i> |
| AIFM1 | eng. <i>Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated</i> |
| NAD ⁺ | nikotinamid adenin dinukleotid |
| ERK1/2 | kinaza regulisana vanćelijskim signalima (eng. <i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>) |
| CREB | eng. <i>cAMP Response Element-Binding Protein</i> |
| MRK | monoterpenske referentne komponente <i>G. lutea</i> |
| IL-1 β | interleukin-1 β |
| IL-6 | interleukin-6 |
| TNF- α | faktor nekroze tumora α |
| COX | ciklooksigenaza |
| NF- κ B | eng. <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> |
| HeLa | ćelijska linija tumora cerviksa |
| MCF-7 | ćelijska linija tumora dojke (adenokarcinom) |
| OVACR-3 | ćelijska linija tumora ovarijuma |
| RASMC | ćelijska linija glatkih mišića aorte pacova |
| A7r5 | ćelijska linija glatkih mišića aorte pacova |
| ATCC CRL-1999 | ćelijska linija humanih glatkih mišića aorte |
| HepG2 | ćelijska linija hepatocelularnog tumora |
| MMS | metil metanesulfonat, |
| SMART | eng. <i>Somatic Mutation And Recombination test</i> |

| | |
|--------------------|---|
| CHO | ćelije ovarijuma kineskog hrčka (eng. <i>Chinese Hamster Ovary</i>) |
| ddH ₂ O | dejonizovana voda |
| HRP | peroksidaza rena |
| TMB | 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| TMRE | tetrametilrodamin etil estar |
| BSA | albumin iz goveđeg seruma |
| SDS | natrijum dodecil sulfat |
| PMS | fenazinmetosulfat |
| PI | propidijum jodid |
| DAPI | guanidin hidrohlorid, 4',6-diamidino-2-fenilindol |
| TCA | trihlorsirćetna kiselina |
| ECL | supstrat za hemiluminiscenciju (eng. <i>Enhanced ChemiLuminescence</i>) |
| PVDF | poli(viniliden-fluorid) |
| FBS | fetalni goveđi serum |
| HBSS | hankov pufer |
| RPMI 1640 | medijum za ćelijsku kulturu |
| HEPES | N-2-hidroksiethylpiperazin-N-2-etan sulfonska kiselina |
| XTT | natrijumova so 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolium]-bis(4-metoksi-6-nitro) benzen sumporne kiseline |
| PMS | fenazinmetosulfat |
| LMPA | agaroz niske tačke topljenja |
| NMPA | agaroz normalne tačke topljenja |
| 8-oxodG | 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozin |
| ELISA | eng. enzyme-linked immunosorbent assay |
| FESEM | skanirajući elektronski mikroskop (eng. <i>Field Emission Scanning Electron Microscope</i>) |
| ST | sobna temperatura |
| UPLC | eng. <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i> |
| TB | tripan plava boja (eng. <i>Trypan Blue</i>) |
| OD | optička gustina (eng. <i>Optical Density</i>) |
| SMILES | eng. <i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i> |
| CBMN | citokinezis blok mikronukleusni test (eng. <i>Cytokinesis Block MicroNucleus test</i>) |
| CBPI | citokinezis blok proliferativni indeks (eng. <i>Cytokinesis Block Proliferation Index</i>) |
| HUMN | Međunarodni humani mikronukleus projekt |
| Mni | mikronukleus |
| BN | binukleusna ćelija |
| OECD | eng. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> |
| PAB | prooksidativni/antioksidativni balans |
| HK | arbitrarnim <i>Hamidi-Koliakos</i> jedinicama |
| LPO | lipidna peroksidacija (eng. <i>Lipid Peroxidation</i>) |
| TMOP | 1,1,3,3-tetrametoksipropan |
| SDS-PAGE | elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (eng. <i>Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>) |
| NFM | nemasno mleko (eng. <i>Non-Fat Milk</i>) |
| SE | standardna greška merenja |
| HA | hromozomske aberacije |
| HR | homologna rekombinacija (eng. <i>Homologous Recombination</i>) |
| NHEJ | nehomologo spajanje krajeva (eng. <i>Non-Homologous End Joining</i>) |
| ICL | unakrsne veze DNK lanaca (eng. <i>Interstrand Cross-Links</i>) |

BER
OGG 1

popravke isecanjem baza (eng. *Base Excision Repair*)
8-oxodG DNK glikozilaza (eng. *8-Oxoguanine DNA glycosylase*)

SADRŽAJ

| | | |
|-----------|---|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 1.1. | Lekovito bilje u savremenoj medicini..... | 1 |
| 1.2. | Lekovita biljka - <i>Gentiana lutea</i> | 1 |
| 1.3. | Bioaktivna jedinjenja prisutna u ekstraktu korena <i>G. lutea</i> | 2 |
| 1.4. | Analiza bioaktivnosti ksenobiotika..... | 3 |
| 1.4.1. | Ispitivanje citotoksičnosti ksenobiotika..... | 4 |
| 1.4.2. | Ispitivanje genotoksičnosti ksenobiotika..... | 5 |
| 1.4.3. | Oksidativni stres..... | 5 |
| 1.5. | Ćelijska smrt..... | 6 |
| 1.5.1. | Tipovi ćelijske smrti..... | 6 |
| 1.5.2. | Apoptoza..... | 6 |
| 1.5.3. | Nekroptoza..... | 8 |
| 1.5.4. | Druge vrste regulisane ćelijske smrti..... | 9 |
| 1.5.5. | Modulisanje puteva ćelijske smrti..... | 11 |
| 1.6. | Biološka aktivnost ekstrakta korena <i>G. lutea</i> i monoterpenskih referentnih komponenti..... | 11 |
| 1.6.1. | Citotoksični i genoksični uticaj MRK i EKG..... | 12 |
| 2. | CILJ | 13 |
| 3. | MATERIJAL I METODE | 14 |
| 3.1. | MATERIJAL..... | 14 |
| 3.2. | METODE..... | 16 |
| 3.2.1. | Priprema ekstrakta korena <i>G. lutea</i> | 16 |
| 3.2.2. | Karakterizacija EKG..... | 16 |
| 3.2.2.1. | Morfološka analiza EKG korišćenjem skanirajuće elektronske mikroskopije..... | 16 |
| 3.2.2.2. | Kvalitativna i kvantitativna analiza MRK u EKG..... | 17 |
| 3.2.2.3. | Analiza stabilnosti MRK u kompletnom medijumu RPMI..... | 17 |
| 3.2.3. | Izolovanje, kultivacija i tretmani kultura PBMC..... | 17 |
| 3.2.4. | Ispitivanje citotoksičnog uticaja tretmana EKG i MRK..... | 18 |
| 3.2.4.1. | Ispitivanje vijabilnosti ćelija procedurom po Stroberu..... | 18 |
| 3.2.4.2. | Ispitivanje vijabilnosti ćelija korišćenjem XTT testa..... | 18 |
| 3.2.4.3. | Analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije..... | 18 |
| 3.2.5. | Ispitivanje genotoksičnog uticaja tretmana EKG i MRK..... | 19 |
| 3.2.5.1. | <i>In silico</i> analiza genotoksičnosti odabranih MRK..... | 19 |
| 3.2.5.2. | Ispitivanje oštećenja u molekulu DNK korišćenjem alkalnog komet eseja..... | 19 |
| 3.2.5.3. | Detekcija mikronukleusa korišćenjem mikronukleusnog testa..... | 19 |
| 3.2.5.4. | Analiza hromozomskih aberacija korišćenjem OECD upustva za testiranje hemikalija..... | 20 |
| 3.2.6. | Ispitivanje parametara oksidativnog stresa..... | 20 |
| 3.2.6.1. | Analiza prooksidativnog/antioksidativnog balansa korišćenjem procedure Alamdari i saradnika..... | 20 |
| 3.2.6.2. | Ispitivanje parametara oksidativnog stresa korišćenjem eseja lipidne peroksidacije..... | 20 |
| 3.2.6.3. | Određivanje koncentracije 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozina..... | 21 |
| 3.2.7. | Ispitivanje tipa ćelijske smrti..... | 21 |
| 3.2.7.1. | Analiza fragmentacije molekula DNK korišćenjem kolorimetrijskog DNK fragmentacionog eseja..... | 21 |
| 3.2.7.2. | Morfološka analiza ćelija korišćenjem fluorescentnog TMRE/DAPI bojenja..... | 22 |
| 3.2.8. | Imunoblot analiza nivoa proteina ključnih za apoptozu i nekroptozu..... | 22 |
| 3.2.8.1. | Procedura pripreme uzoraka za imunobot analizu..... | 22 |
| 3.2.8.2. | Određivanje koncentracije proteina..... | 22 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.8.3. | SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza, prenos proteina na poli (viniliden-fluorid) membranu i imunoblot analiza..... | 23 |
| 3.2.9. | Statistička obrada rezultata..... | 24 |
| 4. | REZULTATI | 25 |
| 4.1. | Rezultati karakterizacije ekstrakta korena <i>G. lutea</i> | 25 |
| 4.1.1. | Rezultati morfološke analize u procesu pripreme EKG..... | 25 |
| 4.1.2. | Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize MRK iz EKG..... | 25 |
| 4.2. | Rezultati optimizacije uslova tretmana..... | 28 |
| 4.2.1. | Rezultati optimizacija dužine ekspozicije i koncentracije EKG..... | 28 |
| 4.2.2. | Rezultati optimizacija koncentracije MRK tretmana..... | 30 |
| 4.3. | Procena biološkog uticaja MRK i EKG na kulture PBMC i PHA-PBMC..... | 31 |
| 4.3.1. | Rezultati <i>in silico</i> analize kancerogenog i mutagenog potencijala odabranih MRK..... | 31 |
| 4.3.2. | Rezultati ispitivanja citotoksičnog i genotoksičnog uticaja MRK i EKG..... | 31 |
| 4.3.3. | Rezultati procene uticaja MRK i EKG na faze ćelijskog ciklusa..... | 33 |
| 4.3.4. | Rezultati uticaja MRK i EKG na parametre oksidativnog stresa..... | 34 |
| 4.3.5. | Rezultati analize morfoloških karakteristika ćelijske smrti nakon MRK i EKG tretmana..... | 35 |
| 4.4. | Rezultati imunoblot analize proteina uključenih u regulaciju ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze..... | 35 |
| 4.5. | Rezultati ispitivanja selektivnosti MRK i EKG tretmana na aktivaciju ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze..... | 39 |
| 4.5.1. | Rezultati analize ćelijskog preživljavanja nakon MRK i EKG tretmana u prisustvu nekrostatina 1 i zvad-fmk..... | 39 |
| 4.5.2. | Rezultati imunoblot analize proteina uključenih u završne korake regulacije nekroptoze i apoptoze nakon kotretmana Gp/Sm sa nec/zvad/oba inhibitora..... | 40 |
| 5. | DISKUSIJA | 43 |
| 6. | ZAKLJUČAK | 55 |
| 7. | LITERATURA | 56 |
| 8. | PRILOZI | 69 |

1. UVOD

1.1. Lekovito bilje u savremenoj medicini

Lekovito bilje i biljni proizvodi tradicionalno se koriste širom sveta u narodnoj medicini. Danas je njihova primena veoma zastupljena i u savremenoj medicini i farmaceutskoj industriji. Oko 25% lekova prepisanih širom sveta je biljnog porekla, dok farmaceutska industrija Indije, zemlje u kojoj je tradicionalno zastupljeno lečenje biljnim proizvodima, koristi oko 960 biljnih vrsta (1).

U medicinske svrhe koriste se odabrani delovi biljke (koren, list, plod, cvet ili seme) u formi standardizovanog biljnog preparata, na primer, tablete, čajevi, ekstrakti, kreme ili tinkture. Za razliku od konvencionalnih lekova, koji se obično sastoje od jednog čistog jedinjenja i često su sintetički, lekovi na biljnoj bazi mogu sadržati više jedinjenja poreklom iz jedne biljke ili su mešavine biljaka u sirovom ili prerađenom stanju (2, 3). Imajući u vidu da biljni preparati mogu ispoljavati antimikrobne, antiinflamatorne, antioksidativne, antitumorske i antidijabetičke aktivnosti, oni imaju široku primenu u tretmanima kardiovaskularnih, respiratornih, gastrointestinalnih, dermatoloških, metaboličkih oboljenja, i drugo (4).

Biljni preparati su dostupni bez recepta, relativno jeftini i najčešće se smatraju bezbednim jer su u upotrebi vekovima. Međutim, mnogobrojni su razlozi pojave širokog spektra neželjenih reakcija, uključujući i nepravilnu upotrebu u smislu načina pripreme, dužine korišćenja ili interakcije s lekovima koji se uporedo koriste, loš kvalitet i varijacije u nivoima aktivnih sastojaka u različitim delovima biljke i biljkama ubranim u različitim fazama razvoja ili na različitim lokalitetima, i slično. Takođe, može doći i do kontaminacije biljnog materijala mikroorganizmima i gljivičnim toksinima (poput aflatoksina), pesticidima i teškim metalima (5, 6).

1.2. Lekovita biljka- *Gentiana lutea*

Žuta lincura (lat. *Gentiana lutea* L., *G. lutea*) tradicionalno se koristi za olakšavanje bolova u stomaku, poboljšanje varenja i jačanje imunskog sistema (7). Pripada najbrojnijoj familiji roda *Gentiana*, familiji Gentianaceae koja broji preko 400 vrsta. Ova lekovita biljka široko je rasprostranjena na travnatim pašnjacima planinskih predela centralne i južne Evrope, na visinama od 800 do 2500 m (8, 9). Floru Republike Srbije karakteriše 11 vrsta i podvrsta roda *Gentiana* među kojima je i vrsta *G. lutea* koja se može naći na planinama: Maljen, Divčibare, Suvobor, Zlatibor, Suva planina, Golija, Prokletije i Tara (9).

Ovu višegodišnju biljku odlikuju veliki, žuti cvetovi na dugim petaljkama u mnogocvetnim zbijenim cvastima. Stablo je visine od 1 do 2 m, sa širokim elipsoidnim listovima, dužine od 10 do 30 cm i širine od 4 do 12 cm (*Slika 1*).



Slika 1. Nadzemni deo G. lutea u prirodnom staništu i sušeni koren (10).

Na bazalnoj rozeti listovi su raspoređeni jedan naspram drugog, što *G. lutea* razlikuje od veoma toksične *Veratrum album* (11). Koren kod starijih biljaka može biti zadebljao i duži od jednog metra (12). *G. lutea* je vrsta zaštićena zakonom, kojim se posebno reguliše njeno sakupljanje i izbegava njeno uništenje u prirodnom staništu (13). Da bi se zadovoljila potreba potrošača uzgaja se na plantažama, u optimalnim uslovima, radi dobijanja kvalitetnih proizvoda za komercijalnu primenu (14).

Na tržištu Republike Srbije dostupni su proizvodi poput sušenog korena lincure, kapi lincure, i drugo. Upravo, sušeni koren *G. lutea* se koristi za pravljenje čajnih mešavina, na primer za poboljšanje apetita, nadoknađivanje manjka želudačne kiseline, jačanje otpornosti i protiv upale vena. Ekstrakt korena *G. lutea* (EKG) ulazi u sastav kapi za srce, apetit i bolju cirkulaciju (15). Osim toga, delovi biljke i/ili ekstrakti se mogu naći i u različiti prehrambenim proizvodima i pićima zbog prepoznatljive gorke arome (16).

Treba istaći da se prema podacima Svetske zdravstvene organizacije u Republici Srbiji beleži kontinuirani porast prodaje biljnih lekovitih sredstava. Po poslednjem dostupnom zvaničnom izveštaju Agencije za lekove i medicinska sredstva Republike Srbije u 2019. godini profit od prodaje biljnih preparata iznosio je 1.037.593.168,99 RSD, od čega su preparati koji uključuju *G. lutea* imali udeo od preko 26 miliona RSD (17).

1.3. Bioaktivna jedinjenja prisutna u ekstraktu korena *G. lutea*

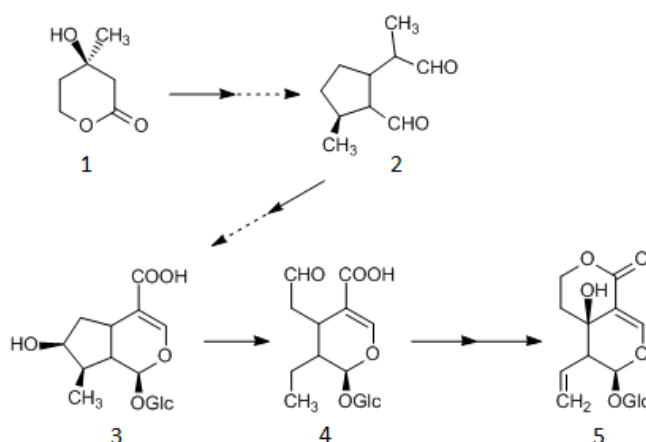
U korenu *G. lutea*, od primarnih metabolita najzastupljeniji su ugljeni hidrati i lipidi. Ugljeni hidrati čine 30 - 50% suve mase korena i najčešće su prisutni: gentianoza (trisaharid), gentiobioza i saharoza (disaharidi) i u manjem procentu glukoza i fruktoza (monosaharidi), kao i nerastvorni šećer - pektin. Lipidi čine 6 - 7% suve mase korena (11).

Sekundarni metaboliti imaju značajnu ulogu u prilagođavanju i zaštiti biljaka koje su izložene različitim uslovima životne sredine (18). Količine sekundarnih metabolita identifikovanih u korenu *G. lutea* mogu varirati u zavisnosti od podvrste, sezone ubiranja korena, nadmorske visine na kojoj je biljka rasla, starosti korena, načina sušenja i uslova ekstrakcije (19-21).

Kvalitativno i kvantitativno najzastupljeniji sekundarni metaboliti identifikovani u korenu *G. lutea* pripadaju grupi:

- ✓ iridoida i sekoiridoida,
- ✓ flavonoida i
- ✓ ksantona.

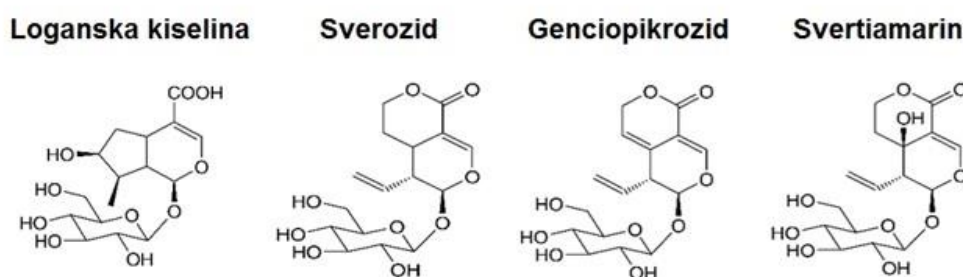
Biosintetski put iridoida i sekoiridoida prikazan je na *Slici 2*.



Slika 2. Biosintetski put sekundarnih metabolita roda *Gentiana* od iridodiala do loganske kiseline i sekoiridoida: 1 - mevalonat, 2 - iridodial, 3 - loganska kiselina, 4 - sekologanska kiselina, 5 - svertiamarin (22).

Iridoidi su monoterpeni iz grupe monoterpenida koji se sastoje iz iridanskog skeleta sa ciklopentanskim prstenom (*Slika 2.*, panel 2), najčešće kondenzovanim sa šestočlanim heterocikličnim prstenom s kiseonikom (*Slika 2.*, panel 3). Hidroksilna grupa na C1 poziciji često reaguje sa molekulom šećera, formirajući glikozide (*Slika 2.*, paneli 3, 4, 5).

Na osnovu očuvanosti ciklopentanskog prstena, razlikuju se dva tipa molekula: iridoidni glukozidi, u koje spada loganska kiselina (La) i sekoiridoidni glukozidi, poput genciopikrozida (Gp), sverozida (Sw) i svertiamarina (Sm) (*Slika 3.*) (23). Ove komponente prisutne su u EKG u visokom procentu, a pregled analiza u kojoj su identifikovane navedene komponente ukazuje na velike razlike u koncentracijama koje se mogu izolovati: Gp 1,85 - 3,97%, Sw 0,05 - 0,35%, Sm 0,08 - 0,3% i La do 0,11 - 1,3% (19). Sekoiridoidi su poznati po gorčini kojom doprinose specifičnom ukusu biljnih čajeva i tinktura EKG. Pokazano je da Gp ima indeks gorčine, izražen u arbitrarnim jedinicama do 16500, Sw do 12500, Sm do 8600. Posebno se ističe amarogencin, prisutan u tragovima, kao jedinjenje s najvećim indeksom gorčine od 58 000 000. U EKG su, osim navedenih jedinjenja, u većoj količini prisutna i jedinjenja iz grupe ksantona: magniferin, gentizin i izogentizin; kao i flavonoidi, izovitexin i isoorientin (24-27).



Slika 3. Strukturne formule najčešće identifikovanih monoterpenih komponenti u ekstraktu korena G. lutea (EKG) (28).

1.4. Analiza bioaktivnosti ksenobiotika

Savremeni trend farmakološke industrije usmeren je na identifikaciju biološki aktivnih jedinjenja prisutnih u lekovitim biljkama koja će služiti kao osnova za razvijanje sintetičkih/polusintetičkih lekova, s manjom toksičnošću i većom efikasnošću, uz mogućnost ostvarenja patentne zaštite. Proces razvoja lekova biljnog porekla uključuje korake kao što su pripremanje biljnih ekstrakata i izolaciju bioaktivnih sastojaka iz odabranih delova biljke; ispitivanje bezbednosti i bioefikasnosti primenom farmakoloških i biomedicinskih metoda, kao i dobijanje odobrenja regulatornog tela za njihovo korišćenje kao terapijskog sredstva (*Slika 4.*) (29).



Slika 4. Dijagram toka procesa razvijanja biljnih lekova (31).

Pored prethodno opisanih koraka u procesu razvoja lekova biljnog porekla, poslednjih nekoliko decenija, često se koristi i *in silico* odabir farmakološki aktivnih jedinjenja kojim se mogu dizajnirati lekovi u zavisnosti od strukture liganda i njegovog vezivnog mesta. Upravo time se pri odabiru bioaktivnih molekula može postići veća efikasnost i ubrzati dizajniranje novih lekova (30).

U analizi bioaktivnosti ksenobiotika prvi korak je, obično, *in silico* analiza, kojom se mogu testirati različiti aspekti, od specifičnih interakcija s molekulima uključenim u regulaciju ćelijskih signalnih puteva do procene sigurnosti primene na nivou organa, organizma i životne sredine. *In silico* analiza uključuje analize kvantitativnog odnosa strukture-aktivnosti (eng. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, (Q)SAR) i unakrsno čitanje (eng. *read-across*) (32). Unakrsno čitanje je metoda koja se oslanja na formiranje hemijskih kategorija, odnosno na pretpostavku da će slične strukture imati slične bioaktivnosti, a pri proceni se koristi manji broj jedinjenja za poređenje. U osnovi analize odnosa strukture-aktivnosti (eng. *Structure-Activity Relationship*, SAR), je grupisanje jedinjenja u molekulske klustere koji pokazuju sličnu toksičnost i način delovanja. SAR modeli su zasnovani na pravilima sličnosti, okarakterisanih preko strukturnih upozorenja (eng. *Structural Alert*, SA), fragmentata molekula koji se nalaze i u klasterima prethodno dokazanih toksičnih molekula sa kojima se porede. (Q)SAR analizom, u okviru kompjuterskih modela, vrši se poređenje podataka dobijenih SAR analizom s grupom jedinjenja koja su u osnovi modela da bi se dodatno dobila informacija o pouzdanosti predviđenih podataka i kao rezultat dobija se indeks domena primenljivosti modela (eng. *Applicability Domain Index*, ADI) (33).

Dalja procena bioaktivnosti jedinjenja, uključujući i ksenobiotike se vrši *in vitro* testiranjem njigove citotoksičnosti, genotoksičnosti i/ili drugih parametara koji mogu uticati na homeostazu ćelije. U zavisnosti od rezultata *in vitro* testiranja, dalje procene aktivnosti jedinjenja se rade u *in vivo* studijama (34).

1.4.1. Ispitivanje citotoksičnosti ksenobiotika

Citotoksičnost može biti uzrokovana različitim hemijskim, biološkim ili fizičkim stimulusima, i odnosi se na sposobnost agensa da izazove smrt ćelije. Citostaza je posebna kategorija citotoksičnosti, u kojoj ćelije ostaju žive, ali gube sposobnost rasta i deobe (35).

Citotoksičnost prirodnih i hemijski sintetisanih jedinjenja najčešće se izražava kao koncentracija koja smanjuje vijabilnost ćelija za 50% (IC₅₀). Međutim, smanjenje broja ćelija može nastati i usled promene u proliferaciji ćelija, kao i aktiviranjem različitih signalnih kaskada kojima se pokreće ćelijska smrt, uključujući apoptozu, ali i drugih mehanizama regulisane ćelijske smrti. Svaki od ovih procesa ima različite implikacije na procenu uticaja ispitivanog ksenobiotika na živi sistem (36).

Ćelije se mogu privremeno zaustaviti na kontrolnim tačkama ćelijskog ciklusa usled:

- ✓ nedostatka esencijalnih faktora rasta, hormona ili hranljivih materija (G1/S faza) kada se sprečava prelazak ćelije u S fazu;
- ✓ prisutva spoljašnjeg stresornog signala ili usled oštećenja u moleulu DNK i pokretanja njegove popravke (mesto provere u G2 fazi ćelijskog ciklusa pred ulazak u M fazu) kada se sprečava ulazak ćelije u mitozu (37).

Molekuli uključeni u regulaciju ćelijskog ciklusa (ciklini, ciklin-zavisne kinaze i inhibitori ciklin-zavisnih kinaza), takođe, mogu uticati na aktivaciju puteva koji vode do programirane ćelijske smrti ako se oštećenje ćelije ne može popraviti. Osim toga, neadekvatna regulacija ćelijskog ciklusa, pri kojoj ćelija nastavlja tranziciju i završava deobu u prisustvu oštećenja u molekulu DNK, može dovesti do mutacija gena, oštećenja hromozoma i aneuploidije, i na taj način doprineti tumorogenezi (38).

Rezultati eksperimentalnih radova pokazuju da i tip ćelijske smrti kojim se ćelije uklanjaju usled izlaganja ksenobiotiku, daje bitnu informaciju za procenu bezbednosti korišćenja. Ćelijska smrt tipa apoptoze ne utiče na okolne neizmenjene ćelije (39), dok ćelijska smrt različita od

apoptoze može biti praćena inflamacijom usled nekontrolisanog oslobađanja ćelijskog sadržaja kojim utiče na okolne ćelije, dodatno ih oštećujući i povećavajući stopu ćelijskog umiranja (40).

1.4.2. Ispitivanje genotoksičnosti ksenobiotika

Oštećenja u molekulu DNK mogu nastati pod uticajem egzogenih agenasa poput fizičkih (UV i jonizujuće zračenje) i/ili hemijskih (toksini, lekovi), kao i endogenim oštećenjem nastalim usled metaboličke transformacije hemijskih genotoksičnih agenasa, hidrolitičkih i oksidativnih reakcija sa reaktivnim vrstama kiseonika - ROS (eng. *Reactive oxygen species*, ROS) (41, 42). Bez obzira na poreklo, oštećenje u molekulu DNK dovodi do pokretanja niza signalnih puteva kojima se aktiviraju mehanizmi popravke oštećenja u molekulu DNK ili smrti ćelije ukoliko je oštećenje takvo da se ne može ukloniti i/ili je popravka energetski previše zahtevna (43). Oštećenja u molekulu DNK koja ipak ostanu nepopravljena, pri sledećoj deobi ćelije dovode do fiksiranja mutacija u somatskim ćelijama. Ove mutacije mogu dovesti do razvoja raznih bolesti, uključujući i maligne bolesti, ili urođenih defekata ukoliko nastanu u germinativnim ćelijama (44).

Ispitivanje genotoksičnosti je neophodna komponenta u proceni bezbednosti izlaganja različitim agensima. Ova ispitivanja rade se u cilju identifikacije jedinjenja koja dovode do nepovratnog oštećenja u molekulu DNK i prenose se na sledeću ćelijsku generaciju (mutageni), kao i jedinjenja s genotoksičnim potencijalom, koja dovode do akutnih oštećenja DNK molekula, koja mogu biti popravljena i ne moraju uzrokovati trajne izmene u strukturi ili funkciji (45). Za *in vitro* ispitivanje genotoksičnog potencijala, obično se koristi alkalni komet esej kojim se mogu analizirati jednolančani (eng. *Single Strand Breaks*, SSBs) i dvolančani prekidi u molekulu DNK (eng. *Double Strand Breaks*, DSBs) u terminalno diferenciranim ćelijama i ćelijama koje se dele (46), mikronukleusni test kojima se detektuje DNK oštećenje u interfaznim ćelijama nakon ćelijske deobe (47) i test hromozomskih aberacija na metafaznim hromozomima (48).

Mononuklearne ćelije periferne krvi (eng. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs), predstavljaju često korišćen model sistem u toksikološkim studijama. U PBMC kulturama su prisutni i T limfociti koji mogu biti aktivirani na deobu fitohemaglutininom (PHA), nakon 48 sati i na drugu deobu nakon 72 sata od stimulacije (49). S obzirom da se alkalnim komet esejem detektuju i oštećenja u molekulu DNK koja mogu biti posledica i aktivirane ćelijske smrti praćene fragmentacijom, neophodno je utvrditi granice citotoksičnosti u kojima se može razlikovati genotoksični i citotoksični uticaj ksenobiotika. Kriterijum po kojem jedinjenje može biti genotoksično, prema Storeru i saradnicima (1996), je da ono direktno ili indirektno dovodi do porasta oštećenja u molekulima DNK tri puta u uslovima preživljavanja ćelija u kulturi iznad 70% (50).

1.4.3. Oksidativni stres

Oksidativni stres nastaje usled neravnoteže između prekomerne proizvodnje i uklanjanja slobodnih radikala. Slobodni radikali su male reaktivne vrste (joni, atomi i molekuli) koji mogu biti egzogenog i/ili endogenog porekla. ROS, čine superoksid anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal ($\cdot OH$), vodonik peroksid (H_2O_2). Egzogeni ROS nastaje usled izloženosti jonizacionom zračenju, ozonu, jonima metala, kao i ksenobioticima, poput toksina iz okoline, lekova, fitohemikalija, i drugih. ROS endogenog porekla, se kontinuirano proizvode mitohondrijskim prenosom elektrona i enzimima, kao što su nikotin adenin dinukleotid fosfat [NAD(P)H] oksidaza ili ksantin oksidaza (51). Osim mitohondrija, druge subćelijske strukture ili organele, uključujući plazma membranu, endoplazmatski retikulum i peroksizome doprinose stvaranju ROS (52). Pri niskim do umerenim koncentracijama, slobodni radikali ne remete fiziološke procese ćelije i mogu biti učesnici u prenosu signala u i između ćelija (53). Biotransformacija ksenobiotika vrši se uz učešće enzima faze I i II, i rezultuje stvaranjem reaktivnih vrsta, direktnim oslobađanjem u toku transformacije, i indirektno kao posledica reaktivnosti novonastalih proizvoda (54). U visokim koncentracijama ROS interaguju s ćelijskim molekulima i dovode do štetnih modifikacija lipida, proteina i DNK (55). Produkti lipidne peroksidacije (eng. *Lipid Peroxidation Products*, LPPs), kao što je malondialdehid

(MDA) i 4-hidroksinonenal (4-HNE) široko se koriste kao indikatori oksidativnog oštećenja ćelija jer nastaju kao posledica interakcije polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i slobodnih radikala (56). Literaturni podaci ukazuju da manje povećanje nivoa MDA može imati pozitivnu ulogu usled funkcionalne promene u ćeliji aktiviranjem procesa uključenih u odbranu od oksidativnog stresa (57). S druge strane, intenzivna peroksidacija lipida može dovesti do oštećenja membrane ćelije i/ili organela i aktivirati razne vrste ćelijske smrti, poput ferroptoze, piroptoze, nekroptoze, autofagije, partanatoze (58). Reaktivni aldehidi, takođe, mogu formirati adukte sa molekulima DNK, RNK, proteinima, i negativno uticati na ćelijsku homeostazu usled strukturnih i funkcionalnih oštećenja biomolekula (59), tako da se pored direktnog oštećenja molekula nastalih delovanjem ROS, ćelije dodatno oštećuju i njihovim reaktivnim produktima. Pored toga, treba istaći da ROS indukovane modifikacije nukleotida molekula DNK, kao što je 8-hidroksi 2'-deoksiguanozin (8-oxodG), mogu da dovedu do mutacija ukoliko nisu uklonjene pre ćelijske deobe i da se intenzivno koriste kao biomarkeri oksidativnog oštećenja ćelija (60). Povećani nivo ROS, takođe može dovesti do oštećenja u molekulu DNK u vidu SSBs i DSBs prekida, koji mogu biti bilo signal za aktivaciju sistema popravke ili aktiviranje ćelijske smrti (61, 62).

Antioksidativna odbrana (AO) postiže se direktnim uklanjanjem slobodnih radikala ili posredno aktiviranjem enzima antioksidativne zaštite (63). U uslovima povećanog nivoa ROS aktiviranje AO podrazumeva povećanje aktivnosti već postojećih enzima, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation peroksidaza (GPx), ali i njihovu *de novo* sintezu koja je regulisana aktiviranjem transkripcionih regulatora poput Nrf 2 (eng. *nuclear factor-erythroid factor 2-related factor 2*) za koji je poznato da reguliše transkripciju gena *SOD* i *GPx* (64).

1.5. Ćelijska smrt

1.5.1. Tipovi ćelijske smrti

Ćelijska smrt se može okarakterisati morfološkim promenama, kao što su gubitak integriteta membrane, DNK fragmentacija, bubrenje ćelije, vakuolizacija, i drugo (65). Prvobitna, gruba, klasifikacija na osnovu morfoloških promena ćelije, deli ćelijsku smrt u tri različita oblika:

(1) ćelijska smrt tipa I (apoptoza) - praćena smanjenjem volumena ćelije, kondenzacijom hromatina, nuklearnom fragmentacijom i uvratima ćelijske membrane, što kulminira stvaranjem malih vezikula (apoptotskih tela), koje susedne ćelije efikasno uklanjaju fagocitnom aktivnošću i razgrađuju u lizozomima;

(2) ćelijska smrt tipa II (autofagija) - manifestuje se opsežnom vakuolizacijom citoplazme, i slično apoptozi, rezultira fagocitnim unosom i posledičnom degradacijom u lizozomima;

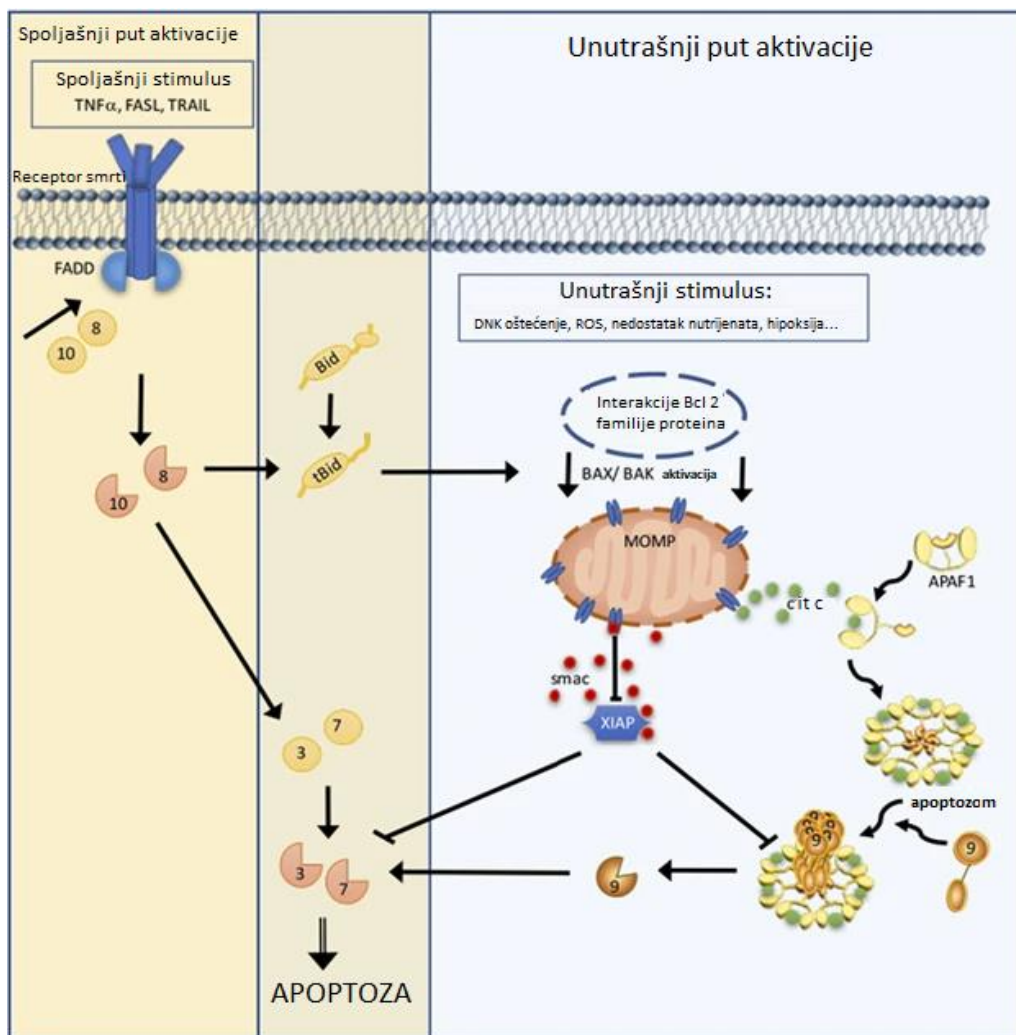
(3) ćelijska smrt tipa III (nekroza) - ne pokazuje nikakve karakteristike ćelijske smrti tipa I i/ili II, kao ni fagocitnu i lizozomsku uključenost u proces ćelijske smrti (66).

Osim navedene klasifikacije, na osnovu stepena regulacije procesa, ćelijska smrt se može podeliti i na slučajnu (eng. *Accidental Cell Death*, ACD), koja se javlja usled izlaganja ćelija naglim fizičkim, hemijskim ili mehaničkim promenama, i regulisanu (eng. *Regulated Cell Death*, RCD), koju karakteriše definisani tok u promeni molekularno regulisanog puta (67). RCD može nastati u odsustvu egzogenih stimulusa, kao ugrađeni fiziološki program pri procesima razvića i obnavljanja tkiva, kada se označava kao programirana ćelijska smrt (eng. *Programmed Cell Death*, PCD), ili usled intenzivnih poremećaja unutarćelijske ili vanćelijske mikrookoline, kada ima ulogu u uklanjanju oštećenih ćelija i omogućava održavanje tkivne homeostaze (66).

1.5.2. Apoptoza

Apoptoza je programirani tip ćelijske smrti, neophodan za održavanje homeostaze organizma. Postoje dva osnovna puta aktivacije apoptoze, spoljašnji put i unutrašnji (68).

Spoljašnji put aktivacije apoptoze je izazvan promjenama u vanćelijskoj sredini koje dovode do povećanja koncentracije liganda koji po vezivanju za receptore smrti nishodno aktiviraju kaspaze 8 i 10 (*Slika 5.*). Vezivanjem liganda, receptor se konformacijski menja čime se omogućava sastavljanje velikog multi-proteinskog kompleksa poznatog kao signalni kompleks inicijacije smrti (eng. *Death Initiation Signalling Complex, DISC*) i aktivacija kaspaze 8 (69). Ova kaspaza ima sposobnost da pokrene i unutrašnji put apoptoze, čime se putevi regulacije ćelijske smrti, pokrenuti različitim stimulansima, mogu preklopiti. Kaspaza 8 prevodi Bid (eng. *BH3 interacting domain death agonist*) u aktivnu formu koji se vezuje za Bax (eng. *Bcl 2 associated X protein*) koji se konformacijski menja i razdvaja od Bid. Bax se potom premešta u membranu mitohondrija, omogućava formiranje pora i otpuštanje citohroma C (cit c) koji u citoplazmi interaguje s aktivirajućim faktorom apoptotskih proteaza - 1 (eng. *Apoptotic protease-activating factor 1, Apaf 1*) i učestvuje u formiranju složene strukture označene kao apoptozom uključene u katalitičku aktivaciju kaspaze 9 (*Slika 5.*) (70, 71). Unutrašnji put apoptoze može biti aktiviran širokim spektrom ćelijskih signala koji dovode do promena na mitohondrijalnoj membrani i remete ravnotežu između pro- i antiapoptotskih proteina familije Bcl 2, uključujući proapoptotski Bax i antiapoptotski Bcl 2 (eng. *B cell lymphoma 2*). U odsustvu antiapoptotskog signala, a započete signalizacije apoptoze, homooligomerizacija Bax se nesmetano odvija i dovodi do narušavanja integriteta spoljašnje mitohondrijalne membrane formiranjem pora i permeabilizacije (eng. *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization, MOMP*), i oslobađanje cit c (72, 73). Permeabilizacijom mitohondrijalne membrane oslobađa se i druga grupa proapoptotskih proteina, AIF (eng. *Apoptosis Inducing Factor*), endonukleaza G (EndoG) i CAD (eng. *Caspase-Activated DNase*) (74).



Slika 5. Signalna kaskada puteva spoljašnjim i unutrašnjim signalima aktivirane apoptoze (75).

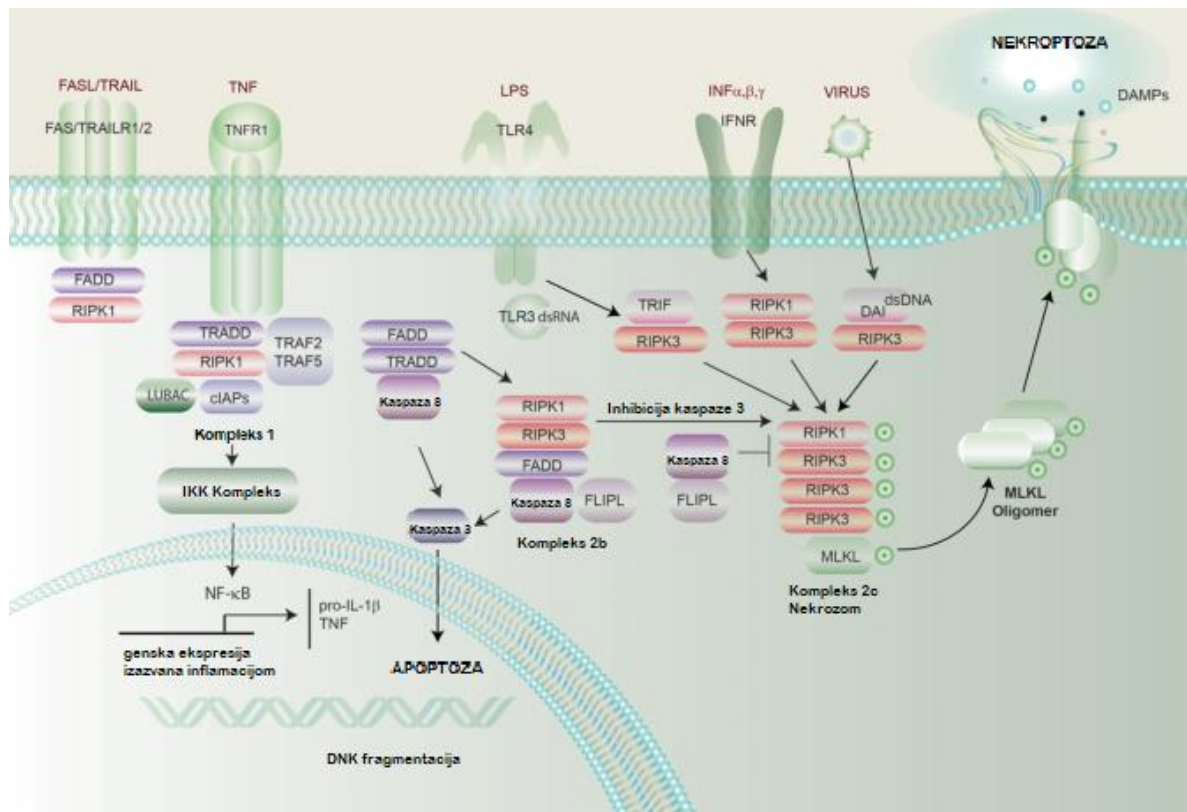
Nezavisno od početnog signala koji u ćeliji pokreće grupu inicijatorskih kaspaza 8, 9 i 10, one dalje aktiviraju nizvodne centralne regulatore apoptoze, efektorske molekule, kaspazu 3, 6 i 7. Efektorske kaspaze pripadaju porodici cisteinskih proteaza, koje razgrađuju proteine ključne za preživljavanje ćelije, što uvodi ćeliju u proces dezintegracije (76). Jedan od targeta aktivirane kaspaze 3 je i protein poli (ADP-ribozil) polimeraza 1 (eng. *Poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP 1), molekulske mase 116 kDa, koji je uključen u procese transkripcije, rekombinacije i popravke oštećenja u molekulu DNK (77). U fazi rane apoptoze PARP 1 seče se specifično od strane aktivirane kaspaze 3 na fragmente PARP 1 molekulske mase 89 i 24 kDa (78).

Treba istaći da je aktivacija kaspaza neophodna za izvršenje ćelijske smrti apoptozom, kao i da specifično blokiranje njihove aktivnosti može zaustaviti, odnosno odložiti ćelijsku smrt. Literaturni podaci, tako na primer, ukazuju da Zvad-fmk (Benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil keton) inhibira aktivnosti više kaspaza ireverzibilnim vezivanjem za njihovo katalitičko mesto, čime blokira različite biološke procese uključujući i aktivaciju inflamazoma što dovodi do povećanog preživljavanja ćelija (79).

1.5.3. Nekroptoza

Nekroza je definisana kao nagli, neprogramirani oblik ćelijske smrti koji se javlja kao odgovor na intenzivnu hemijsku ili fizičku povredu. Krajnje tačke nekroze uključuju bubrenje i pucanje nekrotičnih ćelija, čiji se sadržaj oslobađa u okolni prostor i time dovodi do inflamacije. Iako se ranije smatralo da je nekroza pasivna i neprogramirana, 2005. godine potvrđen je proces ćelijske smrti, nezavisan od aktiviranja kaspaza, koji podseća na nekrozu u pogledu morfologije ćelije u umiranju, ali je praćen definisanim sledom događaja u ćeliji (80). Signalna aktivacija tog regulisanog oblika nekroze, nekroptoza, može biti postignuta nespecifičnim vanćelijskim signalima kao što su segment dvolančanih molekula DNK (eng. *double stranded DNA*, dsDNA), molekularni obrasci povezani s oštećenjem ćelija (eng. *Damage-Associated Molecular Patterns*, DAMPs), specifičnom aktivacijom receptora smrti (eng. *Death Receptors*, DRs), kao i usled unutarćelijskih promena (nizak energetski nivo) (81).

Pojedini regulatorni molekuli učestvuju u signalnim kaskadama kako apoptoze tako i nekroptoze (**Slika 6.**) (82). Naime, pored sličnih stimulusa koji mogu započeti signalnu kaskadu, i unutrašnji prenos signala može uključivati iste molekule, a njegov smer zavisi od ostvarenih interakcija s drugim molekulima i formiranja specifičnih kompleksa. Aktivacija proteina 1 koji interaguje s receptorom (eng. *Receptor-Interacting Protein kinase 1*, RIP 1) presudna je za formiranje više različitih molekulskih kompleksa uključenih u regulaciju inflamacije (**Slika 6.**, kompleks 1), apoptoze (**Slika 6.**, kompleks 2b) i nekroptoze (**Slika 6.**, kompleks 2c). Inaktivna kaspaza 8 i deubikvitinacija RIP 1 preduslovi su za aktiviranje nekroptoze (83). Fosforilacijom aktivirani RIP 1 dalje fosforiliše na Ser²²⁷ protein 3 koji interaguje s receptorom (eng. *Receptor-Interacting Protein 3*, RIP 3), što je potrebno za aktivaciju pseudokinaze mešovitog porekla nalik kinaznom domenu (eng. *Mixed Lineage Kinase domain-Like protein*, MLKL), efekorskog proteina koji deluje nishodno od RIP 1 i RIP 3. Fosforilacija MLKL je signal za njegovu oligomerizaciju i prelazak u citoplazmatsku membranu. Za finalni korak nekroptoze neophodno je da se dostigne dovoljan broj blisko lokalizovanih MLKL oligomera u membrani što omogućava stvaranje pora i ulazak katjona (84, 85). Kao rezultat smrti ćelije nekroptozom, dolazi do oslobađanja DAMPs, kao što je mitohondrijska DNK (eng. *Mitochondrial DNA*, mtDNA), protein 1 grupe visoke mobilnosti (eng. *High Mobility Group Box1*, HMGB1), interleukin 33 (IL-33), interleukin-1 α (IL-1 α) i ATP (82).



Slika 6. Signalne kaskade puteva apoptoze i nekroptoze (82).

S obzirom da je nekroptoza tip regulisane ćelijske smrti, njen tok može biti modulisan aktivacijom/inhibicijom regulatornih molekula signalne kaskade. Tako na primer, nekrostatin 1 (nec), vezivanjem za hidrofobni džep u kinaznom domenu RIP 1 proteina, blokira njegovu aktivnost zadržavajući ga u neaktivnoj formi, i odlaže dalje korake nekroptoze (86).

1.5.4. Druge vrste regulisane ćelijske smrti

Pored prvobitne podele ćelijske smrti na osnovu morfoloških karakteristika ćelije, molekularna analiza signalnih kaskada koje dovode do ćelijske smrti, dovela je i do definisanja različitih vidova regulisane ćelijske smrti u koje mogu biti uključeni raznovrsni molekuli (**Tabela 1.**) (87). Molekuli koji su označeni kao ključni u regulaciji određenog tipa ćelijske smrti, mogu interagovati i sa signalnim molekulima različitih tipova RCD. Tako na primer, iako uključen u put apoptoze, nakon premeštanja u jedro, AIF može biti uključen i u izvršenje ćelijske smrti tipa partanaptoza (eng. *parthanatos*), koje ne zahteva posredovanje kaspaza za izvršenje, a uzrokovano je prisustvom PAR (poli (ADP-riboza)) usled PARP 1 hiperaktivacije (88). Partanaptoza može biti i AIF-nezavisna, kada nastaje usled iscrpljivanja NAD⁺ i ATP, takođe, usled hiperaktivacije PARP 1 (89, 90). Između ostalog, pokazano je i da kinaza regulisana vanćelijskim signalima (eng. *Extracellular-signal-Regulated Kinase*, ERK1/2) može uticati na modulaciju signalnog puta apoptoze, jer pored opšte poznate uloge u ERK/Creb/Bcl 2 putu koji utiče na preživljavanje ćelija (91), ERK1/2 može biti uključen i u proces signalne aktivacije apoptoze izazvane oksidativnim stresom (92), i/ili agensima koji dovode do oštećenja u molekulu DNK (93). Sem uticaja na molekule uključene u regulaciju apoptoze, aktivacija ERK1/2 može biti ključna i u regulaciju partanatoze, kao i drugih tipova ćelijske smrti (94, 95).

Tabela 1. Tipovi regulisane ćelijske smrti, ključni molekuli uključeni u njihovu regulaciju i morfološke karakteristike ćelija karakteristične za tip ćelijske smrti.

| Tip ćelijske smrti | Ključni molekuli | Ćelijska morfologija |
|-------------------------------|--|--|
| Autofagija | ULK1, PI3KIII, ATGs, LC3 | Uvrati na ćelijkoj membrani; uvećane organele; gubitak citoplazmatskih organela |
| Entoza | RhoA, ROCKI/II, E-kadherin, α -katenin, aktomiozin, LC3, ATGs | Internalizacija ćelije u citoplazmu susedne ćelije (formiranje ćelije u ćeliji) |
| Metuoza | Ras, Rac1, Arf6, LAMP1, Rab7 | Formiranje membranskih vakuola; gubitak integriteta membrane bez jedarne fragmentacije |
| Paraptoza | Nerazjašnjeni | Akumulacija velikih membranskih vakuola; širenje ER ili mitohondrija |
| Mitoptoza | Bax, Bak, Drp1, TIMM8a(DDP) | Raspadanje mitohondrijskog retikuluma na male sferne organele |
| Partanatoza | PARP 1, AIF | Ruptura membrane; MOMP; kondenzacija hromatina; fragmentacija DNK |
| MPT regulisana nekroza | ciklofilin D-zavisani proces | Bubrenje mitohondrija i ćelije |
| Feroptoza | gubitak aktivnosti GPX4; akumulacija lipidnih ROS | Mitohondrije smanjenog volumena i narušen integritet membrane |
| Piroptoza | NLRs, ALRs, kaspaza1, kaspaza11 | Bubrenje ćelija; ruptura membrane; DNK fragmentacija i kondenzacija hromatina |
| NEToza | NOX4, PAD4 | Dekondenzacija hromatina; vakuolizacija citoplazme |
| Nekroptoza | DRs, TLRs, TCR, RIPKs, MLKL | Bubrenje ćelija; ruptura membrane; bubrenje mitohondrija |
| Mitotička katastrofa | kaspaza2; aktivacija P53, produžena SAC signalizacija | Mikro i multinukleacija; apoptotične i/ili nekrotične karakteristike |
| Mitotička smrt (84) | SAC kompleks; APC/C-CDC20 | Morfologija slična apoptozi |
| Alkaliptoza (85) | IKBKB; NF- κ B | Morfologija slična nekrozi; intracelularna alkalinizacija |
| Okseiptoza (85) | KEAP1; PGAM5; AIFM1 | Morfologija slična apoptozi |

Skraćenice: ULK1 (eng. *Unc-51 Like autophagy activating Kinase 1*); PI3K - klasa III fosfoinozimid 3-kinaza; ATGs (eng. *autophagy-related proteins*); LC3 (eng. *microtubule-associated protein Light Chain 3*); ROCK (eng. *Rho associated coiled-coil containing protein kinase*); Rac1 (eng. *Rac family small GTPase 1*); Arf6 (eng. *ADP ribosylation factor 6*); LAMP1 (eng. *lysosomal-associated membrane protein 1*); ER - endoplazmatični retikulum; TIMM8a/DDP (eng. *Translocase of Inner Mitochondrial Membrane 8a*); NLRs (eng. *NOD-Like Receptors*); ALRs (eng. *AIM2-like receptors*); NOX4 - NADPH oksidaza 4; PAD4 peptidilarginin deiminaza 4; TLRs (eng. *Toll-Like Receptors*); TCR-T ćelijski receptor (eng. *T-Cell Receptor*); SAC (eng. *Spindle Assembly Checkpoint*); APC/C-CDC20; IKBKB (eng. *IkappaB kinase beta*); NF- κ B (eng. *nuclear factor kappa-B*); KEAP1 (eng. *Kelch Like ECH Associated Protein 1*); PGAM5 (eng. *Mitochondrial serine/threonine-protein phosphatase PGAM5*); AIFM1 (eng. *Apoptosis Inducing Factor Mitochondria Associated 1*).

1.5.5. Modulisanje puteva ćelijske smrti

Molekuli sa selektivnim uticajem na aktivaciju/inhibiciju jednog od mehanizama ćelijske smrti, bez značajnog uticaja na druge tipove ćelijske smrti, mogu biti značajni u procesima razvijanja terapeutika. Inhibitori kaspaza, na primer, mogu imati ulogu u tretmanu patoloških stanja povezanim sa akutnim povredama tkiva koje karakteriše prekomerna apoptoza, kao što su moždani udar i infarkt miokarda (96). S druge strane, aktivacija kaspaze 3 ili učesnika u regulatornoj kaskadi apoptoze mogla bi naći primenu i u terapiji malignih bolesti kod kojih je usled mutacija ili aberantne ekspresije regulatornih molekula blokirana mogućnost aktivacije apoptoze (97). Međutim, selektivnost tretmana ograničena je složenom signalizacijom u regulaciji ćelijske smrti, koja se odvija uz učešće istih molekula uključenih u regulaciju različitih tipova ćelijske smrti. Ukrštanje regulatornih kaskada otvara mogućnost prelaska sa jednog na drugi tip ćelijske smrti kada je jedan od signalnih puteva blokirani. Ovakav način modulisanja ćelijske smrti, takođe, može imati terapijsku primenu. Aktivacija nekroptoze može imati bitnu fiziološku ulogu u patološkim stanjima kao što su tumori rezistentni na apoptozu, kada ovaj tip ćelijske smrti sem uklanjanja transformisanih ćelija, može oslobađanjem DAMPs aktivirati imuni sistem i promovisati suzbijanje tumora (81).

1.6. Biološka aktivnost ekstrakta korena *G. lutea* i monoterpenskih referentnih komponenti

Lekovita svojstva EKG i biljaka koje sintetišu slične sekundarne metabolite pripisuju se gorkim sekoiridoidima, kao i flavonoidima i ksantonima, koji imaju antimikrobno (98, 99), antidiabetično (100, 101), hepato- (102), kardio- (103) i neuroprotektivno (104), dejstvo. Naučna ispitivanja su u mnogim aspektima potvrdila osnovanost tradicionalne primene preparata *G. lutea*. Naime, pokazano je da EKG, štiti mukozu želuca od lezija izazvane etanolom i aspirinom (105), kao i da ispoljava inhibitorni efekat na gram-negativne sojeve bakterija *Helicobacter pylori* koja je osnovni etiološki faktor nastanka gastritisa i čira (106). Pokazano je i da utiče na vaskularni tonus krvnih sudova digestivnog trakta (107), da smanjuje akumulaciju lipida na zidovima krvnih sudova i utiče na faktore uključene u aterosklerozu, štiteći na taj način krvne sudove (103). EKG utiče i na sintezu lipida i ceramida u keratinocitima, smanjuje edeme kože i omogućava brže zaceljenje rana (108-110).

U *in vitro* i *in vivo* studijama pokazano je da monoterpenske referentne komponente *G. lutea* (MRK), primenjene kao pretretman ili kotretman s toksičnim agensima, svoje pozitivne efekte ostvaruju svojim antioksidativnim i antiinflamatornim dejstvom. Tako na primer, *in vitro* tretman HepG2 ćelija ekstraktima korena i lista *G. lutea*, kao i tretman sa jednom od najzastupljenijih MRK u EKG, Gp, utiče na povećanje nivoa ekspresije gena *Nrf2* (111). Slično, Sw dozno-zavisno utiče na smanjenje intenziteta oksidativnog stresa, smanjenje nivoa ROS i MDA, paralelno povećavajući aktivnost komponenti antioksidativne zaštite poput SOD i GPx (112). Kotretman pacova s hepatotoksinom CCl₄ i Sm povećava količinu enzima SOD i GPx i snižava nivo MDA (113). Antioksidativni uticaj La usled smanjenja ROS je uočen u *in vitro* uslovima, na PBMC kulturama izloženim teškim metalima, kao i sprečavanje nastanka superoksidnog radikala u aktiviranim neutrofilima (114, 115). Gp (116), Sw (112), La (117) i Sm (118) tretmani ispoljavaju antiinflamatorni uticaj smanjenjem lučenja inflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) i interleukin-6 (IL-6). Osim toga, pokazano je i da prethodno navedeni monoterpeni mogu inhibirati ciklooksigenazu-1 i -2 (COX-1, -2), čija je uloga u sintezi prostaglandina, koji, takođe, posreduju u procesu inflamacije (119, 120). Literaturni podaci ukazuju i da Gp (121), Sw (122) i Sm (123) smanjuju inflamaciju inhibirajući regulatorni protein transkripcije NF- κ B (eng. *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) koji reguliše ekspresiju gena čiji produkti učestvuju u njenoj aktivaciji (124).

1.6.1. Citotoksični i genotoksični uticaj MRK i EKG

Citotoksičnost EKG i MRK je, do sada, najčešće ispitivana na tumorskim ćelijskim linijama. Literaturni podaci ukazuju da EKG ispoljava citotoksičan uticaj na tumorskim ćelijskim linijama HeLa i MCF-7 sa maksimalnom inhibicijom rasta pri koncentraciji 500 µg/mL (125). Osim toga, pokazano je i da ekstrakt nadzemnih delova *G. lutea*, u kom su, takođe, identifikovani sekoiridoidi, ispoljava citotoksične efekte prema HeLa ćelijama (IC₅₀) pri izlaganju koncentraciji 41,1 µg/mL, dok je u istoj ćelijskoj liniji 5,7 µg/mL Gp tretman smanjio broj ćelija za 50% (126). Navedeno istraživanje ukazuje da izdvojene komponente mogu imati intenzivniji uticaj na smanjenje ćelijskog preživljavanja u odnosu na ekstrakt u istim eksperimentalnim uslovima. Dužina ekspozicije tretmanima, takođe, može značajno uticati na stepen citotoksičnosti, kao što je detektovano u ćelijskoj liniji karcinoma ovarijuma (OVACR-3), u kojoj je 22,4 µM Gp tretman (22,4 µM) nakon 24 sata smanjio stopu ćelijskog preživljavanja u istoj meri (IC₅₀) kao i manja koncentracija (8,2 µM) nakon 48 sati (127).

Pokazano je da MRK antitumorski uticaj promovira aktiviranjem kaspazno-zavisne apoptoze (127-130). Tako na primer, *in silico* analiza energije vezivanja, ukazala je na postojanje mogućnosti interakcije Gp, Sw i Sm sa proteinom Bcl 2, što je potvrđeno i u *in vitro* eksperimentima, (128). Takođe, uočeno je da tretman Gp, pored smanjenja nivoa Bcl², utiče i na povećanje nivoa cit c, kaspaze 3 i PARP 1 89 kDa fragmenta (127). Sm ispoljava antitumorsko dejstvo na HeLa ćelije pokretanjem signalne kaskade apoptoze, i nakon 48 sati tretmana dovodi do smanjenja broja ćelija na 20% od početne (129). Pored aktiviranja apoptoze pomeranjem balansa ka proapoptotским molekulima, Sw, svoj antitumorski uticaj u ćelijskim linijama humane leukemije ispoljava zaustavljanjem ćelijskog ciklusa na samom kraju S ili pri prelasku iz G₂ u M fazu (130).

Podaci o citotoksičnom uticaju MRK i EKG tretmana na primarnim ćelijskim linijama su malobrojni. U prethodno navedenom istraživanju, Sw tretman koji je nakon 24 sata ispoljio antitumorski efekat, nije značajno smanjio ćelijsko preživljavanje u nekoliko različitih netransformisanih ćelijskih linija uključujući i PBMC, ali je ipak uočen trend smanjenja broja ćelija sa povećanjem doze tretmana (130). Kesavan i saradnici (2013) su na primarnim ćelijskim linijama pokazali da EKG inhibira proliferaciju ćelija (IC₅₀) glatkih mišića aorte pacova (RASMC i A7r5), kao i u analognoj humanoј ćelijskoj liniji ATCC CRL-1999 u koncentracijama 2,22 mg/mL, 2,7 i 3,43 mg/mL, redom (131).

Genotoksičnost MRK i EKG najčešće je testirana kao pretretman ili u kotretmanu sa toksičnim agensom. Tako je uočen dualni uticaj ekstrakata biljke *G. lutea*, koji u velikoj meri zavisi od ispitivane doze. Naime, primenjeni tretmani u visokim dozama u ćelijskim linijama hepatocelularnog karcinoma (HepG2) ispoljavaju genotoksični potencijal, dok u nižim koncentracijama, u prisustvu mutagena, imaju genoprotektivni uticaj (132). *In vivo* istraživanje na larvi *D. Melanogaster*, ukazalo je da ko- i post-tretman EKG sa DNK alkilirajućim agensom (metil metanesulfonatom, MMS), ima sinergistički mutageni uticaj usled povećanja učestalosti mutiranih klonova detektovanih SMART testom (eng. *Somatic Mutation And Recombination*) (133). Takođe, pokazano je i da Gp primenjen u koncentracijama od 5 do 50 µg/mL u ćelijama ovarijuma kineskog hrčka (eng. *Chinese Hamster Ovary*, CHO) ispoljava genotoksični potencijal (134).

2. CILJ

Lekovito bilje se koristi za proizvodnju lekovitih proizvoda, koji zbog antimikrobnih, antiinflamatornih, antioksidativnih, antitumorskih i antidijabetičkih karakteristika imaju široku primenu u lečenju različitih bolesti. Osim toga, biljni ekstrakti su i izvor bioaktivnih supstanci koje se mogu koristiti u proizvodnji novih sintetičkih i polusintetičkih lekova s manjom toksičnošću i većom efikasnošću. Iako su zbog prirodnog porekla i dugogodišnje primene u tradicionalnoj medicini smatrani bezbednim za korišćenje, konzumacija biljnih lekovitih proizvoda može dovesti do neželjenih dejstva, pored ostalog, i usled neadekvatnog načina pripreme i primene. Brojna istraživanja ukazala su na pozitivan uticaj EKG i/ili prisutnih komponenti u EKG kada su korišćeni u prisustvu toksičnog agensa, kao i na njihove antitumorske uticaje usled aktivacije apoptoze, dok je mali broj studija bio usmeren na proučavanje njihovih uticaja u neizmenjenim ćelijama.

S obzirom na široku primenu *G. lutea* u patološkim stanjima i na oskudnost literaturnih podataka o odgovoru neizmenjenih ćelija na MRK i EKG, kao i na naznake da svoj uticaj mogu ispoljiti selektivnom aktivacijom apoptoze, osnovni cilj ove doktorske disertacije je bila procena odgovora PBMC i PHA-PBMC kultura pri izlaganju citotoksičnim koncentracijama MRK i EKG, identifikacija ćelijske smrti apoptoze i nekroptoze izazvane uticajem tretmana i procena selektive aktivacije ispitivanih tipova ćelijske smrti.

U skladu s navedenim osnovnim ciljem, definisani su pojedinačni ciljevi:

- 1) priprema EKG; kvalitativna i kvantitativna analiza MRK u EKG i provera stabilnosti MRK i EKG u *in vitro* uslovima;
- 2) optimizacija dužine trajanja i koncentracije EKG tretmana koji utiču na stopu ćelijskog preživljavanja;
- 3) *in silico* procena bioaktivnosti MRK;
- 4) *in vitro* procena genotoksičnog uticaja MRK i EKG tretmana;
- 5) provera uticaja MRK i EKG tretmana na odabrane parametre oksidativnog stresa;
- 6) ispitivanje morfoloških karakteristika ćelija nakon tretmana, kao i nivoa proteina uključenih u regulaciju ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze;
- 7) procena uticaja tretmana na selektivno aktiviranje ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze u prisustvu specifičnih inhibitora.

S obzirom da biljni ekstrakti i njihove aktivne komponente mogu modulirati unutarćelijske procese u patološkim stanjima, identifikacija komponenti koje mogu uticati na mehanizam regulisane ćelijske smrti u neoštećenim ćelijama može biti od velike važnosti u proceni bezbednosti njihove primene, kao i kreiranju potencijalnih fitofarmaceutika.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MATERIJAL

Studija je sprovedena uz odobrenje Etičkog komiteta (1109/1) Instituta za nuklearne nauke „Vinča” - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, i pisanu saglasnost svih ispitanika. Uzorci periferne krvi tri zdrava davaoca, starosti od 20 do 40 godina sakupljeni su u Li-heparin vakutajnerima u tri nezavisna uzorkovanja u periodu ne dužem od tri meseca.

Hemikalije korišćene u eksperimentalnoj postavci ove doktorske disertacije, prikazane su u **Tabeli 2.**, dok su primarna i sekundarna antitela za imunoblot analizu predstavljena u **Tabeli 3.** Za pripremu rastvora korišćena je dejonizovana voda (ddH₂O), 18 Ω kvaliteta (*Purite, Suez, Velika Britanija*). Rastvarači korišćeni za ekstrakciju, tečnu hromatografiju i kolorimetrijske eseje su bili p.a. kvaliteta.

Tabela 2. Hemikalije, reagensi i enzimi korišćeni u eksperimentalnoj postavci.

| Proizvođač | Materijal |
|---|---|
| Sartorius, Nemačka | 0,2 µm Minisart filter |
| Sigma-Aldrich Co., Sjedinjene Američke Države | Mravlja kiselina, Whatman filter br. 4, citohalazin B, gimza, kolhicin, peroksidaza rena (HRP), 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB), glicerol, dimetilsulfoksid (DMSO), hloramin T, 1-metil-2-fenilindol, tris, acetonitril, triton X-100, metansulfonska kiselinom, acetaldehid, Tetrametilrodamin etil estar (TMRE), hloroform, albumin iz goveđeg seruma (BSA), Folin-Ciocalteu reagens, β-merkaptioetanol, natrijum dodecil sulfat (SDS), Tween-20, akrilamid, ribonukleaza A, fenazinmetosulfat (PMS), propidijum jodid (PI), guanidin hidrohlorid, 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), vodonik peroksid, mokraćna kiselina |
| Zorka farma, Republika Srbija | Methanol, etanol, glacijalna sirćetna kiselina |
| ChemFaces, Narodna republika Kina | Loganska kiselina (La), sverozid (Sw), genciopikrozid (Gp), svertiamarin (Sm) |
| VWR, Sjedinjene Američke Države | Sumporna kiselina, Na-K-tartarat, bakarsultat, natrijum bikarbonat, natrijum hidroksid, hlorovodonična kiselina, natrijum hlorid, kalijum hlorid, natrijum citrat, trihlorsirćetna kiselina (TCA) |
| Santa Cruz Biotechnology, Sjedinjene Američke Države | Suvo bezmasno mleko, Marker™Molecular Weight Standards (250 kDa, 130 kDa, 95 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 36 kDa, 28 kDa, 17 kDa i 11 kDa) |
| Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države | Supstrat za hemiluminiscenciju (ECL), Ficoll™ medijum, polivinil difluoridna (PVDF) membrana |
| Invitrogen, Sjedinjene Američke Države | TRIZol reagens |
| Capricorn scientific, Nemačka | Medijum RPMI 1640, fitohemaglutinin (PHA), fetalni goveđi serum (FBS), penicilin-streptomycin, Hankov pufer (HBSS) |
| Stemcell Technologies, Velika Britanija | Tripan plava, HEPES pufer |
| Serva, Nemačka | Natrijumova so 3'- [1- (fenilaminokarbonil)- 3,4- tetrazolium]-bis (4-metoksi-6-nitro) benzen sumporne kiseline (XTT), fenazinmetosulfat (PMS), agaroza niske tačke topljenja (LMPA), agaroza normalne tačke topljenja (NMPA) |
| Vector Laboratories, Velika Britanija | Vectashield |
| Trevigen, Nemačka | 8-oxodG ELISA komplet (DNazaI, alkalna fosfataza, anti-8-oxodG monoklonsko antitelo, sekundarno antitelo i supstrat) |
| Roche, Švajcarska | Proteazni inhibitori (cOmplete™) |
| Selleckchem, Velika Britanija | Benziloksikarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil keton (Z-vad-fmk, zvad), nekrostatin 1 (nec) |

Tabela 3. Antitela korišćena u imunoblot analizi.

| *Proizvođač | Antitelo | Kataloški broj | Karakteristike | Razblaženja |
|--|----------------------------|----------------|-----------------------------|-------------|
| <i>Sigma-Aldrich Co.</i> | MLKL/pMLKL (Ser358) ab Set | 17-10400 | primarno zečije poliklonsko | 1:500 |
| <i>Cell Signaling Technology</i> | PARP | 9542 | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| | tErk1/2 | 9101 | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| | pErk1/2 | 9102 | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| | sečena kaspaza 3 | 9661S | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| <i>Thermo Scientific™</i> | β-aktin | PA1-21167 | primarno zečije poliklonsko | 1:5000 |
| <i>Santa Cruz Biotechnology Inc.</i> | prokaspaza 3 | sc-7148 | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| | Bcl 2 | sc-492 | primarno zečije poliklonsko | 1:1000 |
| | Bax | sc-7480 | primarno mišije monoklonsko | 1:1000 |
| | anti-zečije IgG | sc-2030 | sekundarno kozje | 1:5000 |
| | anti-mišije IgG | sc-2318 | sekundarno magareće | 1:5000 |
| * Sve kompanije čija su antitela korišćena u ovoj studiji su iz Sjedinjenih Američkih Država | | | | |

3.2. METODE

3.2.1. Priprema ekstrakta korena *G. lutea*

Koren *G. lutea*, korišćen u pripremi EKG, je komercijalno dostupan proizvod Instituta za ispitivanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić”, Republika Srbija. Pre procesa ekstrakcije, koren je dodatno usitnjen ručnim mlinom (*Bosch*, Nemačka). EKG je pripremljen zagrevanjem usitnjenog korena u ddH₂O, 10 minuta, u odnosu 1 : 5 (m/V). Nakon hlađenja, EKG je filtriran pomoću papira preko bihnerovog levka, uvedenom vakuumu i centrifugiran 20 minuta na 10000 g, na sobnoj temperaturi (ST) (*Minispin*, *Eppendorf AG*, Nemačka), da bi se odvojile nerastvorljive čestice. Dobijeni supernatant je u akrilnim komorama (25 mL) čuvan na -20°C, 24 sata, nakon čega je vakuumski liofilizovan pod pritiskom od 400 Pa tokom 48 sati. Dobijeni liofilizat je čuvan u tubama u eksikatoru na 4°C do upotrebe.

Liofilizat rastvoren u 50% etanolu u koncentraciji 50 mg/mL, propušten je kroz 0,2 μm filter i korišćen u daljim eksperimentima kao osnovni rastvor.

3.2.2. Karakterizacija EKG

3.2.2.1. Morfološka analiza EKG korišćenjem skanirajuće elektronske mikroskopije

Posle svake faze pripreme EKG analizirane su čestice praha, liofilizata i rastvorenog liofilizata pomoću skanirajuće elektronske mikroskopije (*FESEM*, *FEI SCIOS 2*, *Thermo Fisher Scientific FEI*, Japan). Snimanje je vršeno na uvećanju od 350 x, a veličina čestica je određena pomoću softvera *SemAfore 5.2* (*Insinooritoimisto Rimppi Oi*, Finska).

3.2.2.2. Kvalitativna i kvantitativna analiza MRK u EKG

Apsorpcioni spektri EKG i standardnih rastvora monoterpenskih komponenti (La, Sw, Gp i Sm) u 50% etanolu snimljeni su na spektrofotometru (*Perkin Elmer Lambda 35 UV-Vis*, Sjedinjene Američke Države).

Hromatografsko razdvajanje komponenti EKG urađeno je sistemom Waters ACQUITY UPLC sa PDA detektorom (*Malvern Panalytical Ltd*, Velika Britanija), korišćenjem kolone LUNA 3u, C18(2), 3 μm , 100 mm \times 2 mm (*Phenomenex*, Sjedinjene Američke Države) kao stacionarne faze. Sve analize rađene su pod gradijentnim uslovima, a mobilna faza sastojala se od rastvarača A (0,1% vodenog rastvora mravlje kiseline) i rastvarača B (0,1% rastvora mravlje kiseline u metanolu). Brzina protoka mobilne faze bila je 0,3 mL/min, a temperatura odeljka za kolonu iznosila je 35 °C.

UPLC hromatogrami snimani su u intervalu talasnih dužina od 210 do 500 nm. Pored njih, snimani su i 2D hromatogrami na talasnim dužinama od 245 nm i 271 nm. Analiza je trajala 6 minuta, dok je injekciona zapremina svih ispitivanih rastvora iznosila 6 μL . Procenat mobilne faze B kretao se od 5 do 55% tokom 5 minuta, a zatim je vraćen na početni nivo do završetka rada. Osnovni rastvori referentnih jedinjenja, La, Sw, Gp i Sm, koncentracije 5 mM pripremljeni su rastvaranjem u 50% etanolu. Serijskim razblaživanjem osnovnih rastvora 50% etanolom pravljene su radni rastvori koncentracija u opsegu od 25 do 50 μM i korišćeni za konstruisanje kalibracionih pravih. Potom su pojedinačne monoterenske komponente kvantifikovane u rastvoru EKG koncentracije 1 mg/mL u 50% etanolu.

3.2.2.3. Analiza stabilnosti MRK u kompletnom medijumu RPMI

U cilju analize stabilnosti MRK u ispitivanim eksperimentalnim uslovima, urađena je UPLC analiza pojedinačnih MRK, kao i MRK u EKG, u kompletnom medijumu RPMI (RPMI medijum sa serumom) pre i nakon gajenja PBMC kultura u njemu, tokom 72 sata inkubacije na 37 °C. U obe grupe eksperimenata analizirani su hromatogrami MRK snimljeni na 245 nm pre početka i nakon 48 i 72 sata inkubacije. UPLC analiza urađena je pod istim uslovima opisanim u prethodnom odeljku, s razlikom da je analiza u ovim eksperimentima trajala 9 minuta, dok se procenat mobilne faze B kretao od 5 do 55% tokom 8 minuta, a zatim je vraćen na početni nivo do završetka rada. Za potrebe hromatografske analize uzoraka iz kompletnog medijuma serumski proteini su prethodno staloženi 0,3% rastvorom HCl (pH 4,0). Zatim su uzorci centrifugirani 10 minuta na 8000 g, 4 °C (*Eppendorf 5417R*, Nemačka), a supernatanti su analizirani snimanjem apsorpcionih spektara i hromatograma. Ovako zakišljenim uzorcima pH vrednost je prilagođena pomoću 10 mM rastvora NaOH na 7,3, a zatim su oni analizirani na prethodno opisani način.

3.2.3. Izolovanje, kultivacija i tretmani kultura PBMC

Iz pune periferene krvi ispitanika, PBMC izolovane su u Ficoll TM medijumu, po uputstvu proizvođača i resuspendovane u medijumu RPMI 1640, dopunjenim s 1% penicilin-streptomycin rastvorom i 10% FBS, u koncentraciji 1×10^6 ćelija/mL. Deo izolovanih ćelija dodatno je stimulisan sa 3% PHA, koji je stimulisao ćelije na deobu.

U eksperimentima optimizacije kulture PBMC tretirane su serijom rastvora EKG koncentracije od 0,5, 1 i 2 mg/mL u trajanju od 48 i 72 sata, dok su za određivanje uniformne koncentracije MRK, kulture PBMC tretirane serijom rastvora koncentracija 20, 50, 100 i 130 μM . Nakon odabira vremena ekspozicije i koncentracije za dalje eksperimente kulture PBMC i PHA-PBMC tretirane su sa MRK u finalnoj koncentraciji 50 μM odnosno 1 mg/mL EKG u trajanju od 48 sati, na temperaturi od 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂ (*Haeraus*, Nemačka).

Dodatno, za proveru selektivnog uticaja tretmana na tip ćelijske smrti, kulture PBMC i PHA-PBMC izložene su MRK/EKG kotretmanu s inhibitorom nekroptoze, nekrostatinom 1 (nec)

(20 μ M), odnosno inhibitorom apoptoze, zvad-fmk (zvad) (20 μ M), kao i s oba inhibitora (**Tabela 4.**).

Tabela 4. Grupe tretmana kultura PBMC i PHA-PBMC sa 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG) u kotretmanu sa 20 μ M nekrostatinom I (nec), 20 μ M zvad-fmk (zvad), i oba inhibitora (nec+zvad). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin.

| | nec | | zvad | | nec+zvad | |
|------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------------|---------------------|
| | PBMC | PHA-PBMC | PBMC | PHA-PBMC | PBMC | PHA-PBMC |
| K | K + nec | K + nec | K + zvad | K + zvad | K + nec + zvad | K + nec + zvad |
| La | La + nec | La + nec | La + zvad | La + zvad | La + nec + zvad | La + nec + zvad |
| Sw | Sw + nec | Sw + nec | Sw + zvad | Sw + zvad | Sw + nec + zvad | Sw + nec + zvad |
| Gp | Gp + nec | Gp + nec | Gp + zvad | Gp + zvad | Gp + nec + zvad | Gp + nec + zvad |
| Sm | Sm + nec | Sm + nec | Sm + zvad | Sm + zvad | Sm + nec + zvad | Sm + nec + zvad |
| EKG | EKG + nec | EKG + nec | EKG + zvad | EKG + zvad | EKG + nec + zvad | EKG + nec + zvad |

3.2.4. Ispitivanje citotoksičnog uticaja tretmana EKG i MRK

3.2.4.1. Ispitivanje vijabilnosti ćelija procedurom po Stroberu

Tripan plava (eng. *Trypan Blue*, TB) boja korišćena je za procenu vijabilnosti ćelija prema Stroberovoj proceduri (135). Ukratko, pomešane su jednake zapremine PBMC suspenzije i 0,4% tripan plave boje i nanete u hemocitometar (*Cambridge Instruments Inc.*, Sjedinjene Američke Države). Žive, nebojene ćelije brojane su pod svetlosnim mikroskopom (*Optech*, Nemačka) na uveličanju 400 x. Broj živih ćelija u mL uzorka predstavlja srednju vrednost brojanja 4 x u 16 kvadrata, pomnoženu s faktorom korekcije zapremine koji iznosi 10^4 , kao i faktorom korekcije za razblaženje uzorka bojom, 2.

3.2.4.2. Ispitivanje vijabilnosti ćelija korišćenjem XTT testa

U cilju provere broja ćelija, njihova vijabilnost određivana je i XTT metodom (136). Ukratko, po isteku tretmana, u 100 μ L alikvota kultura PBMC i PHA-PBMC, prethodno ispranih HBSS dodavano je 50 μ L radnog reagensa XTT (1 mg/mL) aktiviranog s PMS (20 μ M), po bunaru mikrotitar ploče. Mikrotitar ploče su potom inkubirane na 37 °C, 2 sata do razvijanja boje. Optička gustina (eng. *Optical Density*, OD) novonastalog formazena očitana je na kolorimetrijskom čitaču (*Sunrise, Tecan Group Ltd*, Švajcarska) na 470 nm i referentnoj talasnoj dužini na 660 nm. Očitana OD direktno je srazmerna broju živih ćelija.

3.2.4.3. Analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citofluorimetrije

Distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa praćena je metodom protočne citofluorimetrije (137).

Postupak: nakon 48 sati trajanja MRK/EKG tretmana, PHA-stimulisane kulture PBMC (PHA-PBMC), isprane su u fosfatnom puferu (PBS) i taložene centrifugiranjem tokom 10 minuta na 300 g, ST (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). Talozi su resuspendovani u 200 μ L hipotoničnog rastvora (PI 50 μ g/mL u 0,1% natrijum citratu, 0,1% TritonX-100, 100 μ g/mL ribonukleaze A). Suspenzije ćelija inkubirane su 20 minuta, u mraku na 37°C i dodatno su razblažene sa 500 μ L PBS. Analizirano je najmanje 10000 ćelija iz pripremljenih ćelijskih suspenzija uz korišćenje citofluorimetra (*Sysmex Partec GmbH*, Nemačka), a podaci su obrađeni korišćenjem programa FCS Express (*De Novo Software*, Sjedinjene Američke Države).

3.2.5. Ispitivanje genotoksičnog uticaja tretmana EKG i MRK

3.2.5.1. *In silico* analiza genotoksičnosti odabranih MRK

In silico analiza odabranih MRK, kao najčešće prisutnih komponenti EKG, rađena je programom *VEGA-QSAR*. U odabrani model analize za procenu mutagenosti i kancerogenosti jedinjenja, unošene su hemijske strukture jedinjenja od interesa u obliku pojednostavljenog sistema za unos molekularnih struktura (eng. *Simplified Molecular-Input Line-Entry System*, SMILES). Program *VEGA-QSAR* dao je procenu mutagenog i kancerogenog uticaja ispitivanih MRK na osnovu analogije u hemijskoj strukturi sa poznatim kancerogenim i mutagenim hemikalijama u dostupnim bazama podataka, iskazanu kao SA. Pored toga, njegov programski algoritam dao je i procenu pouzdanosti predviđanja kao vrednost ADI. Vrednosti $ADI > 0,5$, su korišćene kao pokazatelji nivoa pouzdanosti procene potencijalnog genotoksičnog uticaja: nizak ($0,5 < ADI < 0,6$), srednji ($0,6 < ADI < 0,8$) i visok ($0,8 < ADI < 1$).

3.2.5.2. Ispitivanje oštećenja u molekulu DNK korišćenjem alkalnog komet eseja

Alkalni komet esej, rađen je po proceduri Singh i saradnika (138). Nakon 48 sati MRK i EKG tretmana, kulture PBMC isprane su sa $1 \times$ PBS, staložene centrifugiranjem 10 minuta, na 300 g, ST (*Minispin, Eppendorf AG*, Nemačka), a zatim su resuspendovane u $100 \mu\text{L}$ 1% agaroze niske tačke topljenja (eng. *Low Melting Point Agarose*, LMPA), na 37°C . Suspenzija je nanošena na osušenu mikroskopsku pločicu prethodno obloženu sa 1% agarozom normalne tačke topljenja (eng. *Normal Melting Point Agarose*, NMPA). Nakon 10 minuta na 4°C , kada je agarozna očvrsla, pločice su uronjene u rastvor za lizu (2,5 M NaCl, 100 mM NaEDTA, 10 mM Tris, NaOH do pH 10 i 1% Triton X-100) i inkubirane 1 sat, na 4°C . Zatim su stavljene u sistem za horizontalnu gel elektroforezu (*Bio-Rad Laboratories*, Sjedinjene Američke Države) i držane u hladnom rastvoru (0,3 M NaOH i 1 mM NaEDTA, pH > 13), tokom 20 minuta u cilju denaturacije genomske DNK. Nakon završene faze denaturacije, započeta je elektroforeza, koja je trajala 20 minuta, pri konstatnom naponu od 25 V (1 V/cm, 300 mA) i temperaturi od 4°C . Pločice su ispirane neutrališućim puferom (0,4 M Tris-HCl, pH 7.4), osušene i obojene DAPI bojom sa *Vectashield* ($5 \mu\text{g/mL}$). Na svakom uzorku analiziran je procenat DNK u repu komete na najmanje 300 ćelija, primenom *Zeiss-Axioimager A2* (*Carl Zeiss*, Nemačka), automatizovanog mikroskopa sa *Metafer CometScan* programom (*MetaSystem*, Nemačka).

3.2.5.3. Detekcija mikronukleusa korišćenjem mikronukleusnog testa

Citokinezis blok mikronukleusnim testom (eng. *Cytokinesis Block MicroNucleus test*, CBMN) po Fenechu (139), omogućena je detekcija gubitka hromozoma i/ili delova hromozoma nastalih usled hromozomskih prekida, koji se uočavaju u formi mikronukleusa u binukleusnim ćelijama koje su prošle kariokinezu, a kojima je blokirana deoba citoplazme, citokineza.

Ukratko, nakon 48 sati tretmana, kulturama PHA-PBMC dodat je citohalazin B do finalne koncentracije od $4 \mu\text{g/mL}$, koji je blokirao citokinezu i time omogućio dodatno praćenje kinetike ćelijske deobe preko proliferativnog indeksa (eng. *Cytokinesis Block Proliferation Index*, CBPI). Kulture su gajene dodatnih 24 sata, a zatim isprane blagim hipotoničnim rastvorom (0,56% KCl : 0,9% NaCl, 1 : 1) i centrifigirane 10 minuta na 600 g, ST (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). Talog je 1 sat fiksiran u *McCarnoy* fiksativu (metanol : glacijalna sirćetna kiselina = 3 : 1). Dodatna kratkotrajna ispiranja u *McCarnoy* fiksativu, praćena centrifugiranjem u istim uslovima i dekantovanjem supernatanta, rađena su do obezbojavanja suspenzije. Preparati su pravljani nakapavanjem ćelijske suspenzije na mikroskopske pločice, koje su potom sušene na vazduhu i bojene 10% rastvorom Gimze. Analiza je rađena svetlosnom mikroskopijom, korišćenjem *Zeiss-Axioimager A1* (*Carl Zeiss*, Nemačka), pod uveličanjem 400 x, prateći kriterijume Međunarodnog Humanog Mikronukleus Projekta (HUMN) (140). U svakom uzorku je procenjena frekvencija mikronukleusa na 1000 binukleusnih ćelija (MNI-BN) i CBPI.

$$\text{CBPI} = \frac{[\text{MI} + 2\text{MII} + 3(\text{MIII} + \text{MIV})]}{N}$$

gde su MI-MIV broj ćelija s jednim do četiri jedara, a N ukupan broj ćelija. Ćelije koje su prošle jednu deobu uočavane su kao binukleusne ćelije, dok su ćelije kod kojih se desila dodatna deoba, bile s tri i/ili četiri jedra.

3.2.5.4. Analiza hromozomskih aberacija korišćenjem OECD uputstva za testiranje hemikalija

Analiza hromozomskih aberacija rađena je po OECD (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) uputstvu za testiranje hemikalija (48).

Naime, PHA-PBMC su podvrgnute tretmanu sa 0,5, 1 i 2 mg/mL EKG u trajanju od 48 i 72 sata. Tri sata pre pripreme za analizu ćelijama je dodat kolhicin, u konačnoj koncentraciji od 2,5 µg/mL, radi zaustavljanja ćelijskog ciklusa u metafazi. Ćelijske kulture su zatim centrifugirane 10 minuta na 600 g, ST (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). Nakon uklanjanja medijuma, ćelije su tretirane hipotoničnim 0,56% KCl rastvorom na 37 °C, 20 minuta. Nakon centrifugiranja u istim uslovima, supernatant je uklonjen, a ćelije su fiksirane kao što je opisano u CBMN testu. Nakon nanošenja ćelijske suspenzije na mikroskopske pločice i sušenja na plamenu, preparati su dehidratirani u rastućim koncentracijama etanola (70, 95 i 100%), obojeni s DAPI rastvorom u *Vectashield*-u i analizirani mikroskopom *Zeiss-Axioimager A1*, korišćenjem programskog paketa za obradu slika *ISIS (MetaSystems Hard & Software GmbH, Nemačka)*. Najmanje 200 kompletnih metafaza po uzorku analizirano je na pokazatelje oštećenja hromozoma, uključujući prisustvo prekida hromatida/hromozoma, dicentričnih i prstenastih hromozoma, acentričnih fragmenata i radijalnih figura.

3.2.6. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa

3.2.6.1. Analiza prooksidativnog/antioksidativnog balansa korišćenjem procedure Alamdari i saradnika

Analiza prooksidativnog/antioksidativnog balansa (PAB) rađena je po proceduri Alamdari i saradnika (141). Standardni rastvor pripremljen je mešanjem različitih proporcija (0 - 100%) 1 mM H₂O₂ s 6 mM mokračne kiseline u 10 mM NaOH. Za pripremu radnog rastvora bilo je potrebno napraviti sledeće rastvove:

- TMB I rastvor: rastvor TMB u DMSO koncentracije 6 mg/mL;
- TMB katjon: dobijen je rastvaranjem 0,1 mL TMB I u 5 mL acetatnog pufera (0,05 M, pH 4,5), uz dodatak 17,5 µL sveže pripremljenog rastvora hloramina T (100 mM). Rastvor je dobro promešan i inkubiran 1 sat na 37 °C, na tamnom mestu uz stalno mešanje. Nakon inkubacije ovoj smeši je dodato 2,5 U enzima HRP;
- TMB rastvor II: napravljen je mešanjem 0,1 mL TMB I rastvora i 5 mL acetatnog pufera (0,05 M, pH 5,6).

U analizi je korišćen radni rastvor koga čine 0,5 mL TMB katjona i 5 mL TMB rastvora II, koji su mešani 6 minuta na ST u mraku.

Postupak: u svakom bunaru mikrotitar ploče, 10 µL ćelijskog lizata/standarda/slepe probe pomešano je s 180 µL prethodno pripremljenog radnog rastvora. Nakon inkubacije u trajanju od 12 minuta, u mraku, na 37°C, reakcija je zaustavljena dodavanjem 60 µL 2 N HCl u svaki bunar. Razlika između paralelnih reakcija oksidacije i redukcije, izmerena je na 450 nm, s referentnom talasnom dužinom od 570 nm na kolorimetrijskom čitaču. Vrednosti PAB izračunate su iz standardne krive koja predstavlja procenat vodonik-peroksida u standardnom rastvoru, predstavljenom u arbitrarnim *Hamidi-Koliakos* (HK) jedinicama.

3.2.6.2. Ispitivanje parametara oksidativnog stresa korišćenjem eseja lipidne peroksidacije

Esej lipidne peroksidacije (eng. *Lipid Peroxidation (LPO) Assay*) rađen je po proceduri Tsikas i saradnika (142).

Radni rastvor dobijen je mešanjem tri volumena 20 mM 1-metil-2-fenilindola i jednog volumena 34 μ M FeCl₃, oba rastvorena u smeši acetonitril : metanol u odnosu 3 : 1. U 140 μ L standarda (u rasponu koncentracija od 0 do 20 μ M)/uzoraka/blanka sipano je 455 μ L reagensa, a reakcija započeta dodavanjem 105 μ L koncentrovane metansulfonske kiseline. Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su 1 sat na 45°C, a zatim centrifugirani 10 minuta na 5000 g, 4 °C (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). U bunare mikrotitar ploče sipano je 140 μ L supernatanta, OD merena je na 586 nm na prethodno opisanom kolorimetrijskom čitaču. Vrednosti LPP u uzorcima izračunate su na osnovu standardne prave konstruisane razblaženjem standarda 1,1,3,3-tetrametoksipropana (TMOP) i izražene u odnosu na koncentraciju proteina u uzorku.

3.2.6.3. Određivanje koncentracije 8-oxo-7,8-dihidro-2-deoksiguanozina

Genomska DNK za analizu 8-oxodG izolovana je korišćenjem TRIzol reagensa, po uputstvu proizvođača. Čelijske kulture su staložene i ispirane sa PBS 10 minuta na 300 g, ST (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). Talog je resuspendovan u TRIzol reagensu (1 mL), i ostavljen preko noći na 4 °C. Izolacija genomske DNK nastavljena je dodavanjem 200 μ L hloroforma na 1 mL TRIzol reagensa, snažnim mešanjem i nakon 15 minuta na ST, smeša je centrifugirana 15 minuta na 12000 g, 4 °C (*Eppendorf 5417R*, Nemačka). U donju fazu je dodato 300 μ L apsolutnog etanola da bi se staložila genomska DNK. Nakon centrifugiranja 5 minuta na 2000 g, na 4 °C, i odvajanja supernatanta, talogu koji sadrži genomsku DNK dodat je 1 mL 0,1 M natrijum citrata u 10% etanolu, pH 8,5. Nakon 30 minuta inkubiranja, smeša je ponovno staložena, kao i u prethodnom koraku, i isprana dva puta. Talog dobijen završnim ispiranjem resuspendovan je u 1,5 mL 75% etanola u trajanju od 10 minuta, nakon čega je sledilo ponovno taloženje pod istim uslovima. Nakon odbacivanja supernatanta, talog je osušen na vazduhu, rastvoren u 100 mL 8 mM NaOH, centrifugiran 12000 g, 10 minuta, na 4 °C, a dobijeni supernatant prebačen je u nove tube i neutralizovan dodavanjem HEPES pufera. Kvantifikacija genomske DNK urađena je spektrofotometrijski na 260 nm (*Nanodrop ND-1000*, *Thermo Scientific*, Sjedinjene Američke Države). Uzorci sa uravnoteženim koncentracijama korišćeni su za dalju analizu.

8-oxodG kvantifikacija rađena je 8-oxodG ELISA kompletom, prema uputstvima proizvođača. Ukratko, uzorci su razloženi delovanjem DNaze I tokom sat vremena, na 37°C, a zatim pod istim uslovima, tretirani alkalnom fosfatazom i naneti u bunar mikrotitar ploče koja je bila obložena sa 8-oxodG. Zatim je dodato anti-8-oxodG monoklonsko antitelo koje se vezuje za 8-oxodG iz uzorka u kompetitivnoj reakciji sa imobilizovanim 8-oxodG, tokom 1 sat na ST. U mikrotitar ploču koja je prethodno isprana sa PBST (1% Tween 20 u PBS), dodato je sekundarno antitelo koje je inkubirano 1 sat na ST. Nakon isteka inkubacije i ponovnog ispiranja s PBST, u cilju detekcije dodata je TACS-Safir boja, koja je sa uzorkom inkubirana tokom 15 minuta u mraku na ST. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 0,2 M HCl. OD je očitana na 450 nm za 8-oxodG standard u rasponu koncentracija 0-200 nM, a vrednosti su korišćene za izračunavanje standardne prave. Očitana OD 8-oxodG ispitivanih uzoraka je preračunata na osnovu standardne prave (nM) i izražena u odnosu na količinu dodate DNK (μ g).

3.2.7. Ispitivanje tipa ćelijske smrti

3.2.7.1. Analiza fragmentacije molekula DNK korišćenjem kolorimetrijskog DNK fragmentacionog eseja

Analiza fragmentacije molekula DNK kao markera programirane ćelijske smrti, apoptoze, rađena je prema metodi Boraschi i Maurizi (143).

Naime, posle 48 sati trajanja tretmana, ćelijske kulture su centrifugirane 10 minuta na 600 g, ST (*Eppendorf 5417R*, Nemačka) i supernatant je odbačen. Liza ćelija i oslobađanje fragmentiranog hromatina iz jedara postignuti su dodavanjem 1 mL TTE rastvora (0,2% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,4). Uzorci su zatim energično promešani i centrifugirani 20 minuta na 20000 g, 4 °C (*Eppendorf 5417R*, Nemačka), da bi se razdvojio intaktni hromatin iz taloga od fragmentisane DNK u supernatantu. Supernatant je odvojen, a u talog je dodato 1 mL

TTE rastvora. Zatim je dodato po 1 mL 25% trihlorsirćetne kiseline (TCA), koja taloži molekule DNK, i tube su ostavljene preko noći na 4°C. Posle inkubacije, molekuli DNK iz gore opisanog rastvora oboreni su centrifugiranjem na 20000 g, 10 minuta, 4 °C. Supernatanti su odbačeni, a talog sa molekulima DNK je hidrolizovan dodavanjem 160 mL 5% TCA u svaku tubu i zagrevanjem 15 minuta, na 90°C. Kao slepa proba korišćen je 5% TCA. Sveži rastvor difenileamina pripreman je dodavanjem 150 mg od 10 mL koncentrovane sirćetne kiseline do potpunog rastvaranja, a zatim dodavanjem 150 µL koncentrovane sumporne kiseline i 50 µL acetaldehida. Rastvor je dodavan u svaku epruvetu (320 µL), energično promešan i ostavljen preko noći na ST da bi se razvila boja. OD je merena na 600 nm na kolorimetrijskom čitaču. Nivo fragmentirane DNK izračunat je kao procenat fragmentisane DNK (tube sa supernatantom) od ukupne DNK (tube sa supernatantom i talogom):

$$\% \text{DNA fragmentisana} = T_{\text{supernatant}} / (T_{\text{supernatant}} + T_{\text{talog}}) \times 100$$

3.2.7.2. Morfološka analiza ćelija korišćenjem fluorescentnog TMRE/DAPI bojenja

Fluorescentna TMRE crveno-narandžasta boja korišćena je za obeležavanje aktivnih mitohondrija u živim ćelijama (144), dok je DAPI boja, koja ne ulazi u ćelije sa očuvanim integritetom membrane, korišćena u ovoj eksperimentalnoj postavci za detekciju morfoloških promena ćelija koje karakteriše fragmentacija jedra i/ili kondenzacija hromatina (145).

Nakon isteka tretmana, ćelije (~10⁵ ćelija/mL) su ispirane u medijumu za gajenje, a zatim je ćelijskim suspenzijama dodavan radni rastvor za fluorescentno bojenje, finalne koncentracije 150 nM TMRE i 1 µg/mL DAPI. Ćelije su izlagane rastvoru za bojenje tokom 10 minuta, na 37 °C, u vlažnoj atmosferi s 5% CO₂. Boja je zatim isprana dodavanjem medijuma i nakon taloženja ćelija 5 minuta na 300 g, ST (*Minispin, Eppendorf, Nemačka*), supernatant je uklonjen, a ćelijske suspenzije su nanete na mikroskopske pločice, pokrivene pokrovnim staklima i u vremenskom intervalu, ne dužem od 10 minuta, analizirane. Analiza preparata rađena je na *Zeiss-Axiomager A1* mikroskopu korišćenjem programskog paketa za obradu slika (*MetaSystems, Nemačka*).

3.2.8. Imunoblot analiza nivoa proteina ključnih za apoptozu i nekroptozu

3.2.8.1. Procedura pripreme uzoraka za imunoblot analizu

Nakon 48 sati tretmana sa utvrđenim koncentracijama MRK/ EKG, kao i nakon kotretmana sa 20 µM inhibitorima (zvad/nec/oba inhibitora istovremeno), kulture PBMC i PHA-PBMC staložene su na 300 g, 10 minuta, ST (*Eppendorf 5417R, Nemačka*). Talog je ispran sa 1 x PBS, staložen pod istim uslovima, resuspendovan u TRIZOL reagensu (1 mL) i ostavljen preko noći na 4 °C.

Dalja izolacija proteina je rađena po uputstvu proizvođača za izolaciju TRIZOL reagensom. Naime, iz prethodno opisane metode izolacije genomske DNK dobijeni supernatant je prebačen u nove tube u kojima su dodavanjem 1 mL acetona u cilju taloženja proteini. Inkubacija je vršena u trajanju od 10 minuta na ST. Nakon centrifugiranja 10 minuta na 12000 g, 4 °C, proteini su dodatno isprani dva puta rastvorom za ispiranje (300 mM guanidin hidrohlorid u 95% etanolu s 2,5% glicerolom), centrifugirani 5 minuta na 8000 g, na 4 °C, i dodatno ispirani pre završnog taloženja u etanolu sa 2,5% glicerolom. Dobijeni supernatant je odlivan, talog je osušen na ST, a zatim rastvoren u 1% SDS.

3.2.8.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorcima određivana je po *Lowry*-jevoj metodi (146), korišćenjem albumina iz goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumine, BSA*), u koncentracijama 0,1 - 1 mg/mL, kao standarda.

Korišćeni su sledeći reagensi:

Rastvor 1: 2% Na₂CO₃ u 0,1 M NaOH + 1% SDS;

Rastvor 2: 1% CuSO₄ x 5 H₂O;

Rastvor 3: 2% Na-K-tartarat;

Reagens C: 100 mL se sastoji od 98 mL rastvora 1 i po 1 mL rastvora 2 i 3;

Reagens D: *Folin-Ciocalteu* reagens razblažen u ddH₂O u odnosu 1 : 1.

Zapremine su prilagođene mikrotitar ploči tako da je u 10 μL uzoraka/standarda dodavano 150 μL reagensa C, a nakon 15 minuta 30 μL reagensa D. Po isteku 30 minuta, potrebnih za razvijanje boje, merena je OD na 660 nm, na kolorimetrijskom čitaču. Na osnovu očitanih vrednosti poznatih koncentracija BSA, konstruisana je prava, i sa nje je određivana koncentracija proteina u uzorku na osnovu pročitane OD za uzorak.

3.2.8.3. SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza, prenos proteina na poli(viniliden-fluorid) membranu i imunoblot analiza

Razdvajanje proteina na osnovu molekulskih masa rađeno je elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) na sistemu Mini Protean II (*Bio-Rad*, Sjedinjene Američke Države) po metodi *Laemmli*-ja (147).

Neposredno pred upotrebu, alikvoti proteina mešani su sa 2 x koncentrovanim puferom za pripremu uzoraka (20% glicerol, 4% SDS, 10% β-merkaptotanol u 125 mM Tris, pH 6,8), zagrevani 5 minuta na 100 °C, ohlađeni i nanošeni na 8 - 12% SDS-poliakrilamid gel, u finalnoj koncentraciji od 30 μg. Pored uzoraka na gel je nanošeno po 4 μL markera za molekulsku masu (*MarkerTM Molecular Weight Standards*). Proteini su razdvojeni elektroforezom u trajanju od 90 minuta pri konstantnom naponu od 100 V na ST.

Poli(viniliden-fluorid) (PVDF) membrana aktivirana je 15 sekundi u 100% metanolu, 2 minuta ispirana u ddH₂O i zatim prebačena u transfer pufer (192 mM glicerol, 20% metanol u 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). Prenos proteina sa gelova na aktivirane PVDF membrane vršen je polusuvim transferom tokom 20 minuta, na struji jačine 320 mA, na ST (*Trans-blot SD transfer cell*, *Bio-Rad*, Sjedinjene Američke Države).

Nakon transfera membrane su inkubirane u puferu za blokiranje nespecifičnog vezivanja (za fosfo forme proteina u 5% BSA u TBST (150 mM NaCl, 0,1% Tween-20, 50 mM Tris-HCl pH 7,4), dok za ostale proteine u 5% nemasnom mleku (eng. *Non-Fat Milk*, NFM) rastvorenom u TBST), 1 - 2 sata, na ST s blagim prelivanjem. Nakon ispiranja u TBST, membrane su inkubirane preko noći s odgovarajućim primarnim antitelima na 4 °C (**Tabela 3.**). Potom su ispirane 5 x po 5 minuta s TBST na ST s blagim prelivanjem i inkubirane 1,5 sat s odgovarajućim sekundarnim antitelom (**Tabela 3.**). Membrane su ispirane 5 x po 5 minuta s TBST na ST sa blagim prelivanjem, i na njih je nanošen supstrat za hemiluminiscenciju (eng. *Enhanced ChemiLuminescence*, ECL). Nakon isteka 5 minuta, višak supstrata je uklonjen, membrane su pokrivene tankom folijom i postavljane u kasete za razvijanje filmova. Vizuelizacija proteina je rađena na rendgen filmovima (*Fuji*, Japan), sa dužinom ekspozicije između 1 i 5 minuta.

Nakon detekcije, vezana antitela uklonjena su pomoću rastvora za stripovanje (2% SDS, 0,7% β-merkaptotanol, 0,1 M Tris-HCl, pH 6,95) inkubacijom na 50 °C, tokom 25 minuta. Membrane su potom ispirane u TBST, ponovo blokirane odgovarajućim puferom za blokiranje, inkubirane s narednim primarnim i odgovarajućim sekundarnim antitelom i ponovljen je postupak vizuelizacije na filmu. Densitometrijska analiza proteina izvršena je pomoću softvera *ImageJ* (*Nationa Institutes of Health*, Sjedinjene Američke Države) i normalizovana u odnosu na β-aktin kao pozitivu kontrolu korišćene metode za analizu proteina.

3.2.9. Statistička obrada rezultata

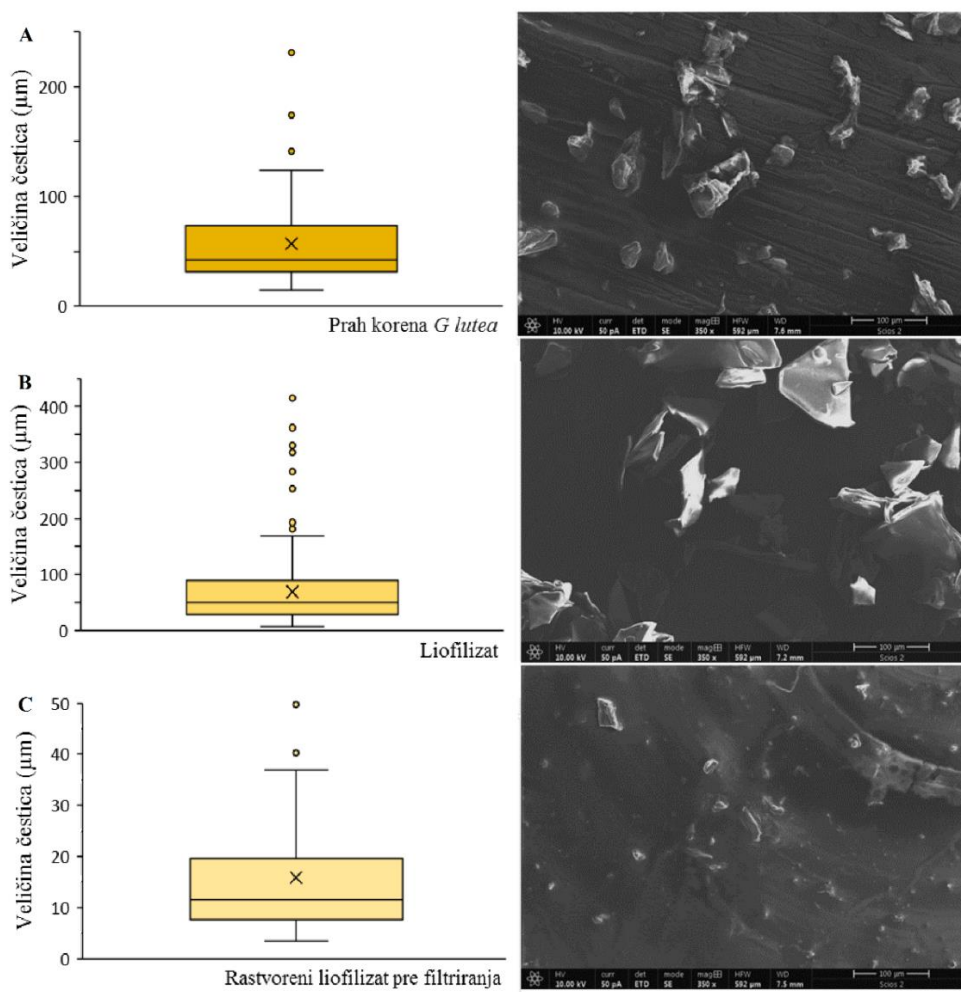
Sve analize rađene su na tri nezavisna uzorka u duplikatu a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška merenja (SE), i kao relativne vrednosti izražene u odnosu na odgovarajuću kontrolu, kojoj je dodeljena arbitrarna vrednost 100. Obrada rezultata rađena je u programu SPSS 10 (IBM, Sjedinjene Američke Države). Statistički značajne razlike u odnosu na odgovarajuće kontrole tretmana određivane su jednofaktorijalnom analizom varijanse (*one-way ANOVA*), praćene *Tuckey post hoc* testom. S obzirom da distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa ne podleže normalnoj raspodeli, statistička analiza ovog parametra rađena je *Mann-Whithney* testom. Pragovi značajnosti definisani su vrednostima: $p < 0,05$; $p < 0,01$ i $p < 0,001$.

4. REZULTATI

4.1. Rezultati karakterizacije ekstrakta korena *G. lutea*

4.1.1. Rezultati morfološke analize u procesu pripreme EKG

U ovoj eksperimentalnoj postavci, pre svake faze pripreme EKG, rađena je karakterizacija veličine čestica metodom skanirajuće elektronske mikroskopije. Komercijalno dostupni koren *G. lutea* je fino usitnjen u prah veličine čestica od $53,9 \pm 2,95 \mu\text{m}$ (*Slika 7., A*). Zatim je vodenom ekstrakcijom i filtracijom dobijeni ekstrakt, koji je dodatno koncentrovan liofilizacijom. Liofilizat je bio u formi pločastih struktura dimenzija $68,4 \pm 3,6 \mu\text{m}$ (*Slika 7., B*). U liofilizatu koji je rastvoren u 50% etanolu i pre završnog filtriranja detektovane su čestice dimenzija $15,8 \pm 1,3 \mu\text{m}$ (*Slika 7., C*).



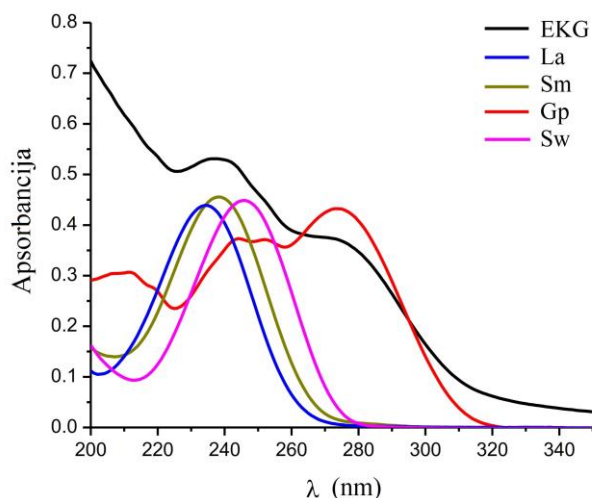
Slika 7. Distribucija čestica po veličini u pripremi ekstrakta korena *G. lutea*. Grafici i reprezentativne fotomikrografije disperzije usitnjenog korena pre ekstrakcije (A); liofilizata (B) i rastvorenog liofilizata koncentracije 50 mg/mL (C) (uveličanje 350 x, skala 100 μm).

4.1.2. Rezultati kvalitativne i kvantitativne analize MRK iz EKG

Kvalitativna i kvantitativna karakterizacija EKG urađena je spektrofotometrijski i UPLC analizom. Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu monoterpenskih komponenti prisutnih u EKG (La, Sw, Gp i Sm) korišćeni su njihovi referentni standardi.

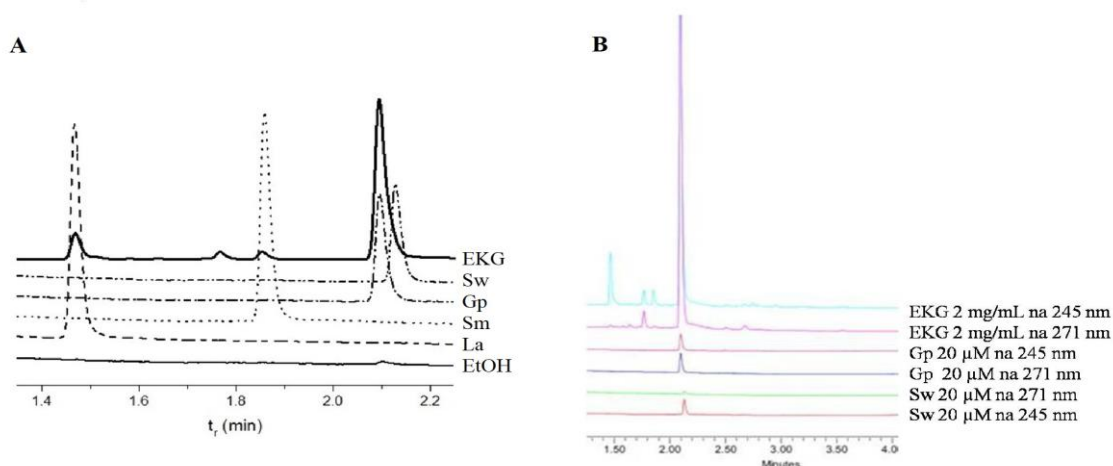
Apsorpcioni spektri EKG, kao i rastvora standarda monoterpenskih komponenti u 50% etanolu, snimljeni su spektrofotometrijski u opsegu od 200 do 350 nm. Na apsorpcionom spektru

EKG uočavaju se dva široko definisana apsorpciona maksimuma. Maksimumi apsorpcionih spektara pojedinačnih monoterpena La, Sw, Gp i Sm, grupisani su u oblasti od 234 do 250 nm, dok Gp ima dodatni apsorpcioni maksimum na 271 nm (*Slika 8.*). Uzimajući u obzir apsorpcione maksimume EKG i pojedinačnih monoterpena, talasna dužina od 245 nm izabrana je kao optimalna talasna dužina maksimalne apsorpcije za sva ispitivana jedinjenja i korišćena je u daljem radu.



Slika 8. Apsorpcioni spektri 0,1 mg/mL ekstrakta korena *G. lutea* (EKG) i 50 μ M rastvora standardnih monoterpenskih komponenti u 50% etanolu. EKG - ekstrakt korena *G. lutea*, La - loganska kiselina (plava linija); Sm - svertiamarin (zelena linija), Gp - genciopikrozid (crvena linija) i Sw - sverozid (roze linija).

Naredni korak u karakterizaciji EKG bila je UPLC analiza. Za identifikaciju MRK u EKG korišćeni su standardni rastvori pojedinačnih MRK. Hromatogrami rastvora EKG i standardnih rastvora MRK u 50% etanolu snimljeni su na 245 nm i predstavljeni na *Slici 9. A.* Na hromatogramu EKG uočavaju se tri pika na retencionim vremenima 1,5; 1,9 i 2,1 minuta. Analiza hromatograma standardnih MRK pokazuje najkraće retenciono vreme za La, koje iznosi 1,5 minuta, a zatim slede, redom, Sm s 1,9 minuta, kao i Gp i Sw s istim retencionim vremenima od 2,1 minut (*Slika 9., A*). U cilju pojedinačne identifikacije Gp i Sw, dodatno su snimljeni njihovi hromatogrami, kao i hromatogram EKG na 271 nm, s obzirom na postojanje dodatnog apsorpcionog maksimuma Gp na toj talasnoj dužini (*Slika 9., B*). Kao što je prikazano na *Slici 9. B*, pik na retencionom vremenu 2,1 minut pojavljuje se samo na hromatogramima EKG i Gp, čime je potvrđeno prisustvo sve četiri MRK u EKG.



Slika 9. UPLC hromatogrami 1 mg/mL ekstrakt korena *G. lutea* (EKG) i 50 μ M monoterpenskih referentnih komponenti rastvoreni u 50% etanolu, snimljeni na 245 nm (A) i 2 mg/mL EKG i 20 μ M Gp i Sw rastvoreni u 50% etanolu, snimljeni na 245 i 271 nm (B). La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid i Sm - svertiamarin.

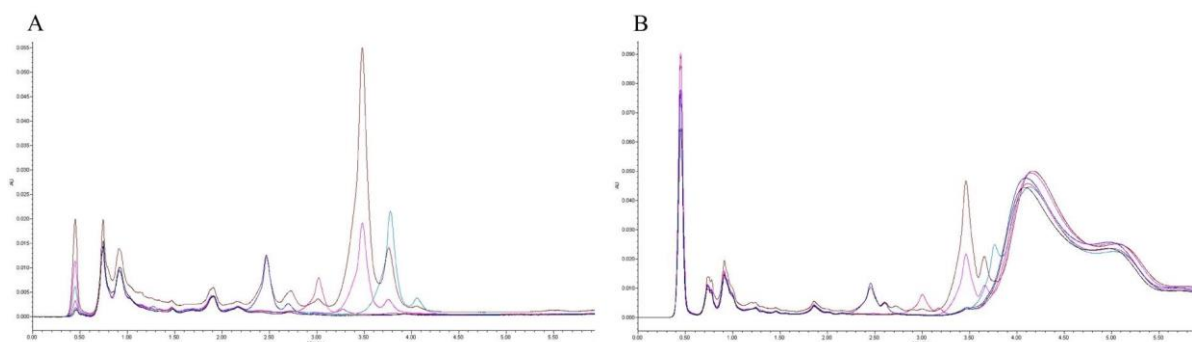
U cilju kvantifikacije MRK u EKG snimljeni su hromatogrami pojedinačnih standardnih rastvora MRK koncentracija u opsegu od 25 do 50 μM u 50% etanolu (na 245 nm za Sw, La i Sm i na 271 nm za Gp). Određene su površine dobijenih pikova i upotrebljene za konstruisanje kalibracionih pravih, na osnovu kojih su izračunavane nepoznate koncentracije MRK u EKG korišćenjem površine pikova prethodno snimljenih hromatograma EKG na 245 i 271 nm. Izračunate koncentracije MRK u EKG predstavljene su u **Tabeli 5**. Dobijeni rezultati ukazuju da je, od svih analiziranih MRK, Gp s koncentracijom od 501,9 μM najzastupljenija ispitivana MRK u EKG.

Tabela 5. Retenciona vremena i koncentracije monoterpenskih referentnih komponenti ekstrakta korena *G. lutea* (MRK) rastvorenih u 50% etanolu. La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE.

| MRK | Retenciono vreme (minut) | Koncentracija (μM) | Koncentracija ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----|--------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| La | 1,5 \pm 0,1 | 64,1 \pm 3,4 | 22,1 \pm 1,2 |
| Sw | 2,1 \pm 0,1 | 78,5 \pm 4,0 | 29,4 \pm 1,5 |
| Gp | 2,1 \pm 0,1 | 501,9 \pm 22,6 | 178,8 \pm 8,1 |
| Sm | 1,9 \pm 0,1 | 17,4 \pm 0,6 | 6,2 \pm 0,2 |

Dodatno je ispitana stabilnost EKG i MRK u *in vitro* uslovima u kojima su gajene PBMC kulture u kompletnom RPMI medijumu (RPMI medijum s serumom), tokom 72 sata inkubacije na 37 °C. Za potrebe hromatografske analize ovih uzoraka, prethodno su serumski proteini iz medijuma uklonjeni taloženjem pomoću 0,3% rastvora HCl i centrifugiranjem u trajanju od 10 minuta. S obzirom da je u fiziološkim uslovima u kojima se gaji kultura PBMC pH medijuma 7,3, bilo je potrebno proveriti stabilnosti MRK u uslovima kisele sredine tokom 10 minuta, stoga su MRK i EKG tretirani 0,3% rastvorom HCl i centrifugirani, a potom neutralisani dodavanjem 10 mM rastvora NaOH. Snimanjem apsorpcionih spektara i hromatograma pokazano je da se koncentracija i retenciona vremena pojedinačnih standardnih MRK i MRK iz ekstrakta ne menjaju značajno nakon primenjenog postupka neutralizacije, čime je potvrđena pouzdanost ovakve pripreme uzoraka za UPLC analizu.

Kao parametri stabilnosti tretmana u *in vitro* uslovima, određivana su retenciona vremena i koncentracija MRK u EKG snimanjem hromatograma. Ti podaci poređeni su s istim parametrima pojedinačnih MRK pre početka inkubacije, kao i nakon 48 i 72 sata inkubacije. Analiza hromatograma snimljenih na 245 nm ukazuje da se pikovi pojedinačnih MRK ne preklapaju (**Slika 10**).



Slika 10. UPLC hromatogrami monoterpenskih referentnih komponenti i ekstrakta korena *G. lutea* nakon 72 sata inkubacije. Hromatogrami kompletnog medijuma (A) i hromatogrami medijuma nakon tretmana PBMC kultura (B) snimljeni na 245 nm. Kontrola – crna linija; Loganska kiselina - tamno plava linija; svertiamarin - crvena linija; genciopikrozid - roze linija; sverozid - plava linija i ekstrakta korena *G. lutea* - braon linija.

Retenciona vremena pojedinačnih MRK u ekstraktu ista su kao i retenciona vremena MRK standarda, i nisu se menjala tokom ispitivanih vremenskih intervala. Rezultati kvantifikacije MRK u EKG u medijumu, predstavljeni su u **Tabeli 6**. Predstavljeni rezultati ukazuju da retenciona vremena zavise od rastvarača (sredine), dok su detektovane koncentracije MRK u EKG, sličnih vrednosti u oba rastvarača (sredine).

Tabela 6. Retenciona vremena i koncentracije monoterpenskih referentnih komponenti ekstrakta korena *G. lutea* (MRK) u kompletnom RPMI medijumu nakon 48 sata inkubacijena na 37 °C. La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE.

| MRK | Retenciono vreme (minut) | Koncentracija (μ M) | Koncentracija (μ g/mL) |
|-----|--------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| La | 2,4 \pm 0,1 | 57,6 \pm 2,4 | 21,7 \pm 0,9 |
| Sw | 3,7 \pm 0,1 | 85,9 \pm 3,4 | 30,8 \pm 1,3 |
| Gp | 3,5 \pm 0,1 | 521,9 \pm 20,8 | 185,9 \pm 7,4 |
| Sm | 3,0 \pm 0,1 | 16,1 \pm 0,6 | 5,8 \pm 0,2 |

Kvalitativnom i kvantitativnom karakterizacijom EKG potvrđeno je prisustvo ispitivanih monoterpena: La, Sw, Gp i Sm, od kojih je Gp u EKG prisutan u najvećoj koncentraciji. Takođe, utvrđeno je da su sve ispitivane MRK stabilne u kompletnom RPMI medijumu u uslovima *in vitro* kulture.

4.2. Rezultati optimizacije uslova tretmana

4.2.1. Rezultati optimizacije dužine ekspozicije i koncentracije EKG

S obzirom da previše intenzivno ćelijsko umiranje može biti praćeno sekundarnom nekrozom, i time uticati na molekule primarno uključene u regulaciju ćelijske smrti, eksperimentalni uslovi u ovoj doktorskoj disertaciji zahtevali su odabir vremena i koncentracije tretmana kojima su ćelije bile izložene, a u kojima se ne smanjuje broj ćelija za više od 30%. Stoga, ispitan je uticaj koncentracije EKG: 0,5, 1 i 2 mg/mL, na PBMC, u dva vremenska intervala, 48 i 72 sata, i analiziran je citotoksični uticaj, praćenjem stope preživljavanja ćelija. Kao što je prikazano u **Tabeli 7.**, najniža ispitivana koncentracija nije dovela do značajnog smanjenja stope preživljavanja u oba ispitivana intervala.

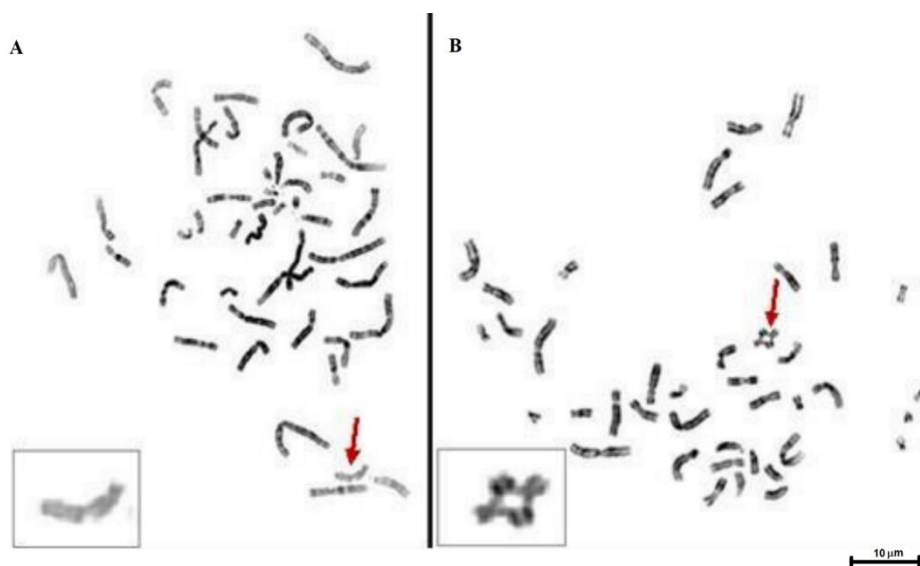
Značajno smanjenje broja ćelija u poređenju sa kontrolom zapaženo je nakon tretmanim sa 1 i 2 mg/mL EKG u oba vremenska intervala: 48 sati ($p < 0,05$ i $p < 0,01$, redom) i 72 sati ($p < 0,01$ i $p < 0,001$, redom) (**Tabela 7.**). Razlika u stopi preživljavanja ćelija u kulturama PBMC nakon EKG tretmana od 1 mg/mL između dva intervala manja je od 1%, dok je koncentracija EKG od 2 mg/mL smanjila stopu preživljavanja ćelija u kulturama PBMC za skoro 20% produžavanjem ekspozicije s 48 na 72 sata.

Tabela 7. Uticaj koncentracije i dužine trajanja tretmana ekstraktom korena *G. lutea* na ćelijsko preživljavanje kultura PBMC i učestalost hromozomskih aberacija u kulturama PHA-PBMC u odnosu na kontrolu - K. Statistički značajne razlike za vrednosti ćelijskog preživljavanja su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

| Tretman | Ćelijsko preživljavanje (% od kontrole) | | Učestalost hromozomskih abercija/broj analiziranih ćelija | |
|-----------|--|---------------------|--|-----------------|
| | 48 sati | 72 sata | 48 sati | 72 sata |
| K | 100 \pm 1,09 | 100 \pm 2,15 | 0 | 0 |
| 0,5 mg/mL | 91,84 \pm 2,17 | 91,33 \pm 2,15 | 0,8 \pm 0,06 | 0 |
| 1 mg/mL | 85,20 \pm 3,88* | 84,89 \pm 2,73** | 3,33 \pm 0,005 | 0,93 \pm 0,01 |
| 2 mg/mL | 79,08 \pm 4,76*** | 59,54 \pm 4,14*** | 8,11 \pm 0,06 | 5,13 \pm 0,12 |

Manja razlika u stopi ćelijskog preživljavanja, nakon EKG tretmana od 1 mg/mL, u dva vremenska intervala, može biti posledica aktiviranja mehanizama popravke oštećenih molekula DNK koji dovode do oporavka ćelija. S obzirom da PHA stimulisane ćelije nakon 48 sati prolaze jednu deobu, a nakon 72 sata od stimulacije i drugu, genotoksični potencijal i procena oporavka ćelija od oštećenja u molekulu DNK analizirana je preko učestalosti hromozomskih aberacija (HA), u oba vremenska intervala. Rezultati HA analize predstavljeni su u **Tabeli 7**. Učestalost HA raste sa porastom koncentracije EKG, s obzirom da je nakon 48 sati tretmana povećana učestalost HA od 0,8% nakon tretmana sa 0,5 mg/mL EKG do 8,11% za 2 mg/mL. Pri produženom tretmanu učestalost HA se smanjuje, tako da nakon 72 sata tretmana najnižom koncentracijom EKG, HA nisu detektovane, dok su više koncentracije EKG povećale učestalost HA (0,93% nakon tretmana sa 1 mg/mL, odnosno 5,13% nakon 2 mg/mL) (**Tabela 7**). Na **Slici 11**, prikazane su reprezentativne fotomikrografije hromatidnog prekida (**Slici 11. A**), kao i formiranih radijalnih struktura između homologih hromozoma pri tretmanu koncentracijom od 2 mg/mL i ekspozicijom od 72 sata (**Slici 11. B**), što ukazuje na aktiviranje mehanizama popravke dvolančanih oštećenja (DSBs) u molekulu DNK.

Treba istaći da je nakon 72 sata tretman sa 2 mg/mL EKG smanjio stopu preživljavanja ćelija u kulturama PBMC koja je van definisanog opsega od 30%, dok je 1 mg/mL EKG, iako u okviru definisanih uslova za ćelijsko preživljavanje, smanjio učestalost HA aktiviranjem mehanizama popravke molekula DNK u preživelim ćelijama (**Tabela 7**). S obzirom da je ispitivani parametar, pored genotoksičnog potencijala EKG, ukazao i na mogućnost oporavka ćelija pri dužem izlaganju koji može uticati na veći stepen preživljavanja ćelija, vreme ekspozicije od 48 sati odabrano je za dalje tretmane.



Slika 11. Reprezentativna fotomikrografija metafaznih hromozoma nakon 72 sata ekspozicije ekstraktu korenu *G. lutea* u koncentraciji 2 mg/mL. Strelice označavaju hromatidni prekid (A) i radijalnu strukturu između dva homologa hromozoma (17q) (B) (skala 10 μ m).

Dalje je nakon 48 sati na kulturama PBMC, praćen i uticaj EKG koncentracija 0,5, 1 i 2 mg/mL na parametre oksidativnog (PAB i LPP) i genotoksičnog (% DNK u repu komete) stresa. Kao što je prikazano u **Tabeli 8**, nivoi PAB i LPP su značajno povišeni nakon izlaganja najnižoj koncentraciji ($p < 0,001$), dok su nakon EKG tretmana koncentracijama od 1 i 2 mg/mL bili u nivou kontrolnih vrednosti. Iako su u poređenju s kontrolom svi EKG tretmani povećali % DNK u repu komete, statistički značajno povećanje, od čak četiri puta, uočeno je nakon izlaganja kultura PBMC koncentraciji od 1 mg/mL ($p < 0,001$), odnosno za oko pet puta za 2 mg/mL ($p < 0,001$) (**Tabela 8**).

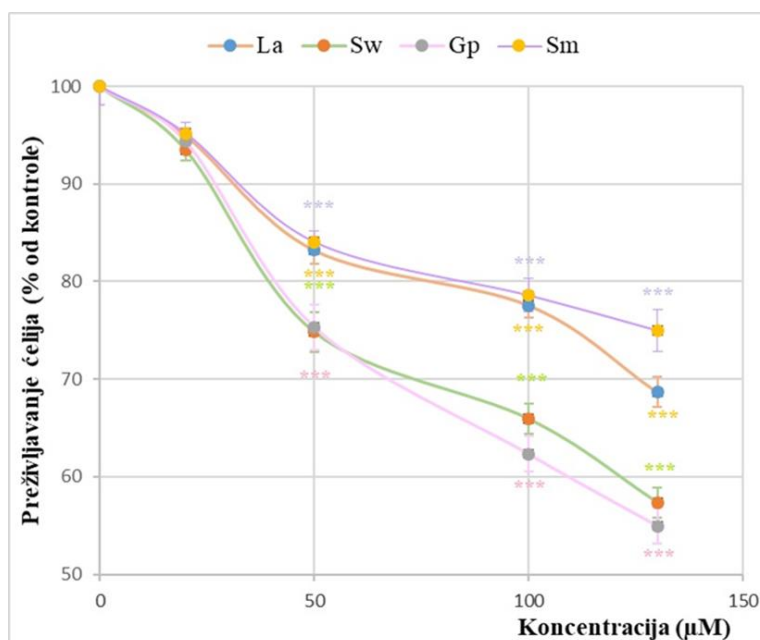
Tabela 8. Uticaj koncentracije ekstrakta korena *G. lutea* na parametre oksidativnog stresa (prooksidativni balans (PAB), produkte lipidne peroksidacije (LPP) i DNK oštećenja u kulturama PBMC nakon 48 sati tretmana. K - kontrola. Rezultati su predstavljani kao srednje vrednosti \pm SE. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (***) $p < 0,001$).

| | PAB (HK jedinice) | LPP (nmol/mg proteina) | % DNK u repu komete |
|------------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| K | 28,86 \pm 0,74 | 1,18 \pm 0,05 | 6,41 \pm 0,65 |
| 0,5 mg/mL | 67,9 \pm 0,95*** | 1,79 \pm 0,06*** | 12,41 \pm 0,92 |
| 1 mg/mL | 26,86 \pm 0,79 | 1,24 \pm 0,05 | 25,62 \pm 2,87*** |
| 2 mg/mL | 27,03 \pm 0,76 | 1,17 \pm 0,05 | 32,98 \pm 2,07*** |

Na osnovu dobijenih rezultata može se uočiti da je nakon 48 sati EKG tretmana koncentracijama od 1 i 2 mg/mL u ćelijama PBMC kultura uspostavljena redoks homeostaza, dok je značajno povećano oštećenje molekula DNK ukazalo na genotoksični potencijal koji može uticati na aktiviranje ćelijske smrti. S obzirom da je EKG tretman od 2 mg/mL značajno povećao nivo oštećenja u molekulima DNK ćelija u kulturama PBMC (**Tabela 8.**) i PHA-PBMC (**Tabela 7.**) nakon 48 sati tretmana, da bi se izbegao uticaj povećane genotoksičnosti na naknadno ispitivane parametre, u daljim eksperimentima korišćena je koncentracija od 1 mg/mL EKG.

4.2.2. Rezultati optimizacije koncentracije MRK tretmana

U cilju utvrđivanja uniformne koncentracije MRK koja uzrokuje smanjenje stope ćelijskog preživljavanja do 30% u odnosu na kontrolnu vrednost, ispitivan je citotoksični uticaj pojedinačnih MRK u koncentracijama 20, 50, 100 i 130 μ M na kulture PBMC, nakon 48 sati tretmana. **Slika 12.** ilustruje značajno smanjenje stope ćelijskog preživljavanja nakon svih MRK tretmana koncentracija 50, 100 i 130 μ M ($p < 0,001$). Sm i La su ispoljili manji citotoksični uticaj na kulture PBMC, u odnosu na Gp i Sw tretmane, pri izlaganju istim koncentracijama. S obzirom da više koncentracije od 50 μ M Gp i Sw, smanjuju stope ćelijskog preživljavanja više od 30%, za dalje analize uticaja MRK koje su značajne za ispitivanje aktivacije signalne kaskade ćelijske smrti, odabrana je koncentracija od 50 μ M.

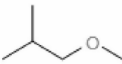
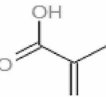
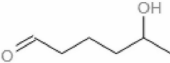
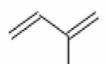
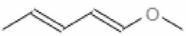


Slika 12. Preživljavanje ćelija kultura PBMC u zavisnosti od koncentracije monoterpenke referentne komponente: K - kontrola; La - loganska kiselina (žuta linija); Sm - svertiamarin (ljubičasta linija), Gp - genciopikrozid (zelena linija) i Sw - sverozid (roze linija). Rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (***) $p < 0,001$).

4.3. Procena uticaja MRK i EKG na kulture PBMC i PHA-PBMC

4.3.1. In silico analiza kancerogenog i mutagenog potencijala odabranih MRK

Za *in silico* procenu kancerogenog i mutagenog potencijala korišćena je VEGA-QSAR platforma. Dobijeni rezultati za sve ispitivane MRK (La, Sw, Gp, Sm) pokazali su da u njima postoje SA 29 i 76, povezani s kancerogenim potencijalom. Dodatno, La pokazao je sličnosti sa poznatim kancerogenima koji sadrže SA 106 i Gp s dodatnim SA 13, kao i SM 55 koji predstavlja segment sličnosti s analiziranim poznatim mutagenima (*Slika 13.*).

| | SA No. | SMILES nizovi | Molekularni fragment | La | Sw | Gp | Sm |
|---------------|--------|---------------|---|----|----|----|----|
| Kancerogenost | 29 | C(OC)C(C)C |  | + | + | + | + |
| | 76 | CC(=C)C(O)=O |  | + | + | + | + |
| | 106 | CC(O)CCCC=O |  | + | - | - | - |
| | 13 | C=C(C=C)C |  | - | - | + | - |
| Mutagenost | SM55 | COC=CC=CC |  | - | - | + | - |

Slika 13. Strukturna upozorenja (SA) monoterpenskih referentnih komponenti označeni VEGA-QSAR modelima za predikciju kancerogenosti i mutagenosti. La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid i Sm - svertiamarin.

Od pet modela za procenu mutagenosti VEGA-QSAR platforme samo je CAESAR 2.1.13 model označio jednu ispitivanu MRK komponentu, La, kao mutagenu sa pouzdanošću predikcije izražene kao indeks primenjivosti domena (ADI > 0,8), dok ostali korišćeni modeli za ostale ispitivane komponente nisu dali preciznu procenu jer su vrednosti bile van pouzdane procene (ADI < 0,5) (*Tabela 9.*). Od četiri korišćena modela za procenu kancerogenosti, dva su dala srednje do visoke vrednosti za pouzdanost procene (*Tabela 9.*).

Tabela 9. Pouzdanost predikcije i mutagenosti monoterpenskih referentnih komponenti, VEGA-QSAR platforma izražene kao indeks primenljivosti domena (ADI) vrednosti. * označava: * - niska pouzdanost, ** - srednja pouzdanost, *** - visoka pouzdanost

| VEGA-QSAR platforma za predikciju | ADI vrednosti | | | |
|---|---------------|----------|----------|---------|
| | La | Sw | Gp | Sm |
| Mutagenost (CAESAR) 2.1.13 | 0,818*** | - | - | - |
| Mutagenost (SarPy/IRFMN) 1.0.7 | - | - | 0,519* | - |
| Kancerogenost (IRFMN/Antares) 1.0.0 | 0,744** | 0,616** | 0,612** | 0,521* |
| Kancerogenost (IRFMN/ISSCAN-CGX) 1.0.0 | 0,797** | 0,802*** | 0,802*** | 0,798** |

4.3.2. Rezultati ispitivanja citotoksičnog i genotoksičnog uticaja MRK i EKG

Nakon eksperimenata optimizacije uslova EKG i MRK tretmana na kulturama PBMC u kojima su definisani uslovi dužine ekspozicije i koncentracije, pristupilo se paralelnoj analizi citotoksičnog i genotoksičnog uticaja 50 µM MRK i 1 mg/mL EKG u kulturama PBMC i PHA-PBMC nakon 48 sati.

Kao što je prikazano u *Tabeli 10.*, u kulturama PBMC nakon svih tretmana uočeno je značajno smanjenje broja ćelija u poređenju s kontrolom ($p < 0,001$). Stopa preživljavanja nakon EKG i Sm tretmana smanjena je za oko 15% ($p < 0,001$), La za 16,5% ($p < 0,001$), dok su je Gp i Sw smanjili za 25% ($p < 0,001$). Paralelno, MRK tretmani kultura PHA-PBMC su, u poređenju s

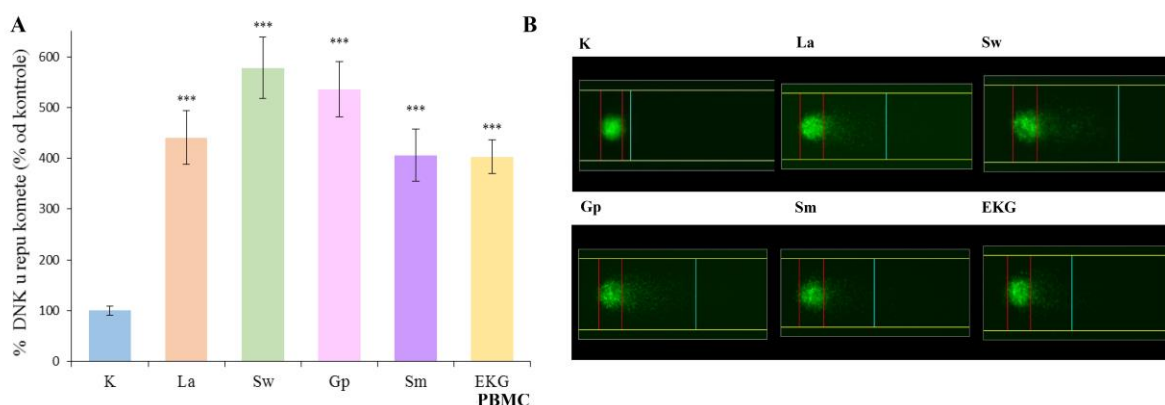
kontrolom, značajno smanjili stopu preživljavanja u rasponu od 13 do 16%: La, Sw i Gp ($p < 0,001$) i Sm ($p < 0,01$), dok je EKG tretman nije promenio (**Tabela 10.**).

S obzirom na prethodno uočeni genotoksični potencijal EKG i rezultate *in silico* analize genotoksičnog potencijala MRK, dalje je analiziran stepen fragmentacije molekula DNK u prethodno definisanim eksperimentalnim uslovima. Značajan stepen fragmentacije molekula DNK uočen je u obe kulture nakon svih 50 μM MRK ($p < 0,001$) i 1 mg/mL EKG tretmana ($p < 0,01$) (**Tabela 10.**).

Tabela 10. Ćelijsko preživljavanje i DNK fragmentacija u kulturama PBMC i PHA-PBMC nakon 48 sati tretmana s 50 μM monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea*. K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin i EKG - ekstrakt korena *G. lutea*. Rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

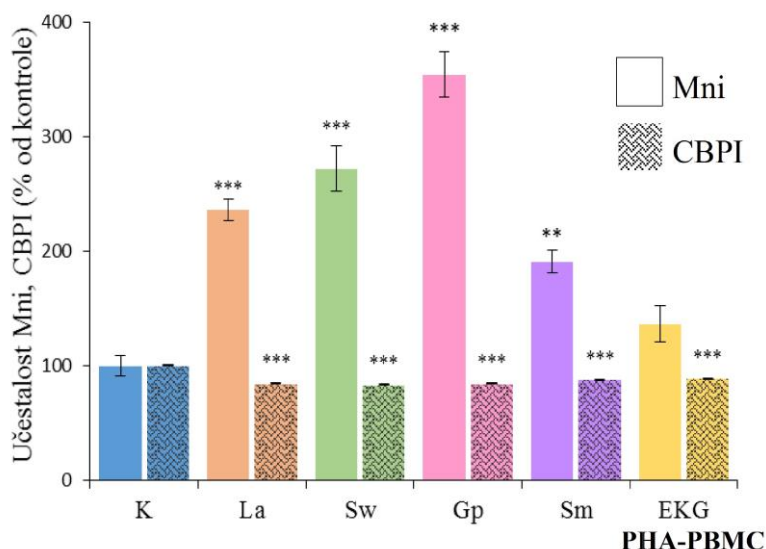
| | Ćelijsko preživljavanje (% od kontrole) | | DNK fragmentacija (%) | |
|------------|---|---------------------|-----------------------|----------------------|
| | PBMC | PHA-PBMC | PBMC | PHA-PBMC |
| K | 100 \pm 0,74 | 100 \pm 1,96 | 100 \pm 9,15 | 100 \pm 3,4 |
| La | 83,44 \pm 1,64*** | 84,98 \pm 1,42*** | 309,47 \pm 18,77*** | 149,86 \pm 6,8*** |
| Sw | 74,55 \pm 1,86*** | 84,42 \pm 2,25*** | 357,45 \pm 8,63*** | 199,03 \pm 2,72*** |
| Gp | 75,06 \pm 1,93*** | 85,18 \pm 1,36*** | 391,03 \pm 10,78*** | 172,95 \pm 3,11*** |
| Sm | 84,43 \pm 2,29*** | 86,67 \pm 1,13** | 323,05 \pm 23,37*** | 165,21 \pm 5,4*** |
| EKG | 86,67 \pm 3,56*** | 92,38 \pm 2,92 | 242,78 \pm 13,02** | 143,07 \pm 1,33** |

Kako je fragmentacionim esejem detektovana ne samo fragmentacija molekula DNK koja prati ćelijsku smrt tipa apoptoze, već i jednolančani i dvolančani prekidi molekula DNK nastalih genotoksičnim uticajem primenjenih tretmana, dalje je ispitivan genotoksični uticaj primenjenih tretmana. Gentoksičnost je ispitivana komet esejem na kulturama PBMC, dok je mikronukleusni test korišćen za procenu genotoksičnosti PHA stimulisanih kultura. U kulturama PBMC nakon 48 sati 50 μM MRK i 1 mg/mL EKG tretmana, u poređenju s kontrolom, % DNK u repu komete bio je povećan pet do šest puta nakon Sw i Gp tretmana, dok su Sm i EKG tretmani povećali oštećenje molekula DNK četiri puta ($p < 0,001$) (**Slika 14.**).



Slika 14. Oštećenje molekula DNK nakon 48 sati tretmana s 50 μM monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG) u kulturama PBMC: % DNK u repu komete (A), reprezentativne fotomikrografije oštećenja molekula DNK kultura PBMC dobijene komet esejem (B). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. U panelu A, rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Paralelno, u kulturama PHA-PBMC uočeno je značajno povećanje učestalosti mikronukleusa od dva i po do tri puta puta nakon tretmana La, Sw i Gp ($p < 0,001$), kao i od skoro dva puta nakon Sm tretmana ($p < 0,01$). EKG tretman kultura PHA-PBMC nije značajno promenio učestalosti mikronukleusa (Mni), dok je indeks proliferacije (CBPI) značajno smanjen nakon svih tretmana ($p < 0,001$), i to u opsegu od 16% za Sw tretman do 11% za EKG (*Slika 15.*).

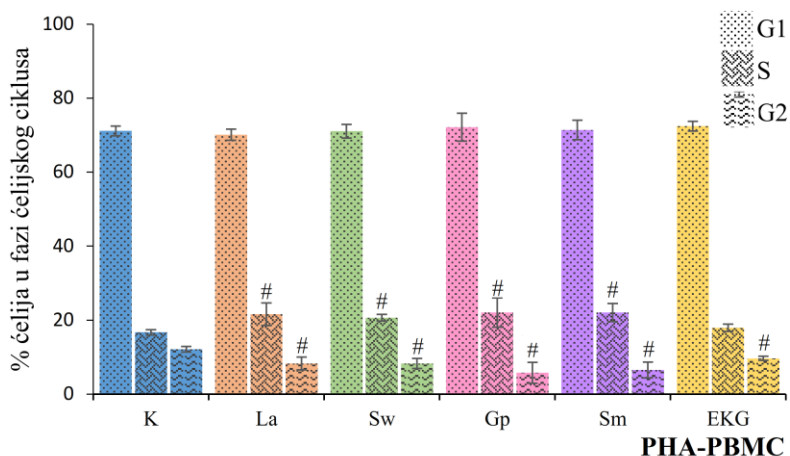


Slika 15. Učestalost mikronukleusa i proliferacioni indeks u kulturama PHA-PBMC nakon 48 sati tretmana s 50 μM monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Rezultati ćelijskog preživljavanja i genotoksičnog potencijala, ukazuju na odsustvo pojave genotoksičnog stresa nakon 1 mg/mL EKG tretmana kultura PHA-PBMC. Uočeno povećanje fragmentacije molekula DNK detektovano nakon ovog tretmana, može biti posledica ukupno detektovanih prekida u molekulu DNK usled genotoksičnog uticaja i pokretanja mehanizama ćelijske smrti. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da nakon 48 sati kod kultura PBMC, tretmani sa 50 μM MRK i 1 mg/mL EKG, kao i 50 μM MRK kod kultura PHA-PBMC, ispoljavaju genotoksični i citotoksični potencijal s naznakama pokrenute kaspazno-zavisne apoptoze.

4.3.3. Rezultati procene uticaja MRK i EKG na faze ćelijskog ciklusa

S obzirom da je proliferativni indeks ukazao na smanjenje proliferacije, kao i da smanjenje broja ćelija detektovano u kulturama u kojima se populacija ćelija deli može zavisiti i od uticaja tretmana na distribuciju ćelija u fazama ćelijskog ciklusa, protočnom citometrijom je ispitivan uticaj primenjenih tretmana na ćelijski ciklus. Na *Slici 16.* ilustrovano je produženje S faze ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu nakon 50 μM MRK tretmana ($p < 0,05$), dok je manji broj ćelija uočeno u G₂ fazi ćelijskog ciklusa nakon svih tretmana ($p < 0,05$). Predstavljani rezultati ispitivanja citotoksičnog uticaja i raspodele ćelija u fazama ćelijskog ciklusa, nakon 50 μM MRK i 1 mg/mL EKG tretmana, ukazuju da smanjeni broj ćelija u kulturama PHA-PBMC nakon MRK tretmana, nije posledica samo ćelijske smrti, već i uticaja na ćelijski ciklus usled povećanja broja ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa.



Slika 16. Distribucija ćelija stimuliranih na deobu u kulturama PHA-PBMC po fazama ćelijskog ciklusa nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE. Statistički značajne razlike su određivane Mann-Whitney testom; #označavaju statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($\#p < 0,05$).

4.3.4. Rezultati uticaja MRK i EKG na parametre oksidativnog stresa

S obzirom da oksidativni stres može dovesti do poremećaja homeostaze i citotoksičnih i/ili genotoksičnih oštećenja ćelija, u ovoj eksperimentalnoj postavci u oba tipa kultura ispitan je uticaj tretmana na parametre oksidativnog stresa, PAB i LPP, kao i na nivo oksidativnog oštećenja u molekulu DNK izraženog preko parametra 8-oxodG. Kao što je prikazano u **Tabeli 11.**, nakon Gp tretmana kultura PBMC u odnosu na kontrolu detektovano je povećanje nivoa PAB ($p < 0,01$) i LPP ($p < 0,05$), dok je nivo 8-oxodG bio značajno manji nakon svih tretmana: La ($p < 0,05$), Sw ($p < 0,01$), Gp, Sm i EKG ($p < 0,001$). U kulturama PHA-PBMC, u odnosu na kontrolnu vrednost, nivo 8-oxodG je značajno manji nakon svih MRK tretmana: Sw ($p < 0,01$), La, Gp i Sm ($p < 0,001$), dok je nakon EKG tretmana vrednost 8-oxodG bila u nivou kontrolne.

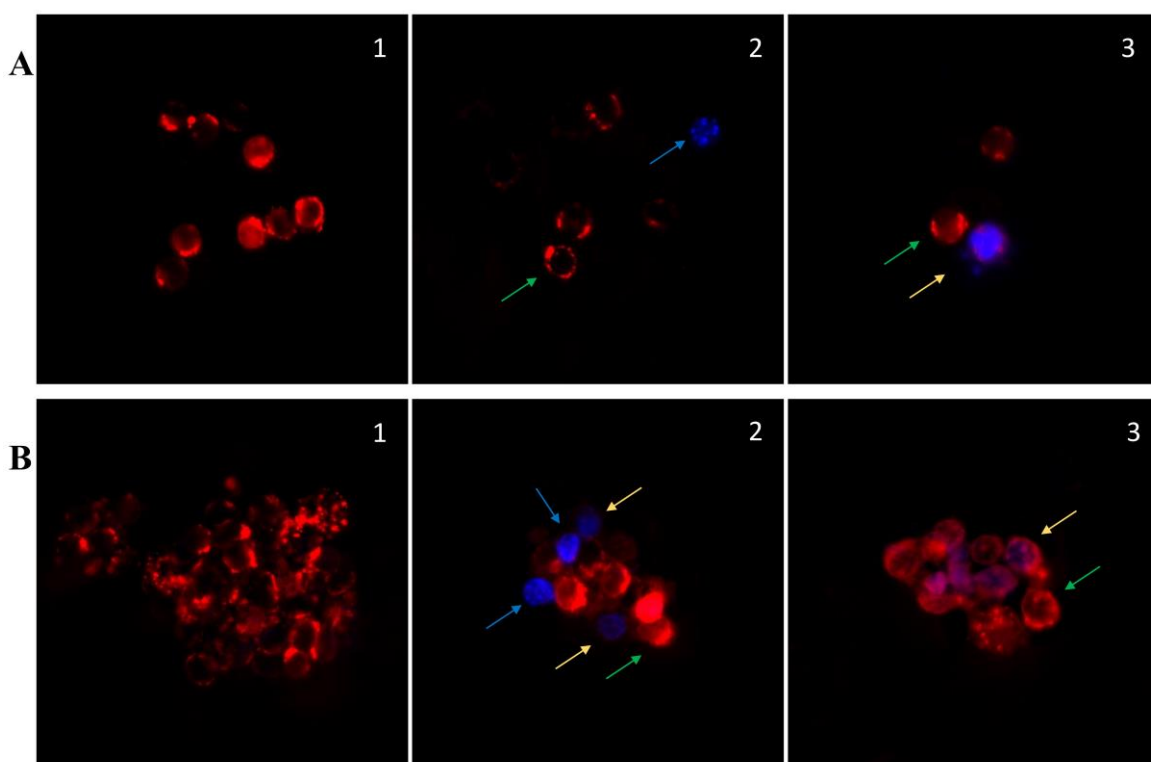
Tabela 11. Vrednosti parametara oksidativnog stresa, PAB; LPP i 8-oxodG, u kulturama PBMC i PHA-PBMC nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao srednje vrednosti \pm SE. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$; $***p < 0,001$).

| | PAB (HK jedinice) | | LPP (nmol/mg proteina) | | 8-oxodG (nM/ μ DNK) | |
|------------|--------------------|------------------|------------------------|-----------------|-------------------------|--------------------|
| | PBMC | PHA-PBMC | PBMC | PHA-PBMC | PBMC | PHA-PBMC |
| K | 28,91 \pm 0,7 | 27,79 \pm 0,56 | 1,18 \pm 0,04 | 1,12 \pm 0,02 | 1,12 \pm 0,02 | 1,05 \pm 0,04 |
| La | 30,77 \pm 0,87 | 26,70 \pm 0,7 | 1,25 \pm 0,04 | 1,09 \pm 0,03 | 0,94 \pm 0,04* | 0,76 \pm 0,05*** |
| Sw | 30,96 \pm 0,49 | 26,89 \pm 0,35 | 1,32 \pm 0,06 | 1,14 \pm 0,02 | 0,89 \pm 0,05** | 0,84 \pm 0,03** |
| Gp | 32,56 \pm 0,37** | 27,18 \pm 0,65 | 1,42 \pm 0,07* | 1,12 \pm 0,02 | 0,85 \pm 0,05*** | 0,75 \pm 0,04*** |
| Sm | 29,47 \pm 0,31 | 26,23 \pm 0,35 | 1,24 \pm 0,03 | 1,1 \pm 0,04 | 0,69 \pm 0,02*** | 0,73 \pm 0,01*** |
| EKG | 27,02 \pm 0,72 | 25,55 \pm 0,89 | 1,24 \pm 0,04 | 1,06 \pm 0,03 | 0,63 \pm 0,04*** | 1,08 \pm 0,05 |

Izuzev za kulture PBMC nakon Gp tretmana, dobijeni rezultati ukazuju na nepromenjenu redoks homeostazu ćelija obe kulture. Značajno smanjenje vrednosti 8-oxodG nakon primenjenih tretmana (osim nakon EKG tretmana kultura PHA-PBMC), može biti posledica aktiviranja mehanizma popravke oštećenja u molekulu DNK, ali suguriše i na nedovršen proces popravke, koji dovodi do formiranja SSBs u molekulu DNK i utiče na pokretanje ćelijske smrti.

4.3.5. Rezultati analize morfoloških karakteristika ćelijske smrti nakon MRK i EKG tretmana

TMRE/DAPI bojenjem analizirana su morfološke karakteristike ćelija kultura PBMC i PHA-PBMC nakon 48 sati tretmana s 50 μ M MRK i 1 mg/mL EKG. Reprezentativne fotomikrografije predstavljene su na *Slici 17*. U kontrolama detektovane su metabolički aktivne ćelije s crveno obojenim mitohondrijama (*Slika 17.*, panel *A1, B1*), dok se nakon svih tretmana u analiziranim kulturama, dodatno uočavaju ćelije sa morfološkim karakteristikama kasne apoptoze, poput fragmentisanog jedra i formiranih apoptotskih tela (*Slika 17.*, panel *A2, B2*), kao i ćelije sa narušenim integritetom membrane, usled čega je DAPI boja ušla u ćeliju i vezala se za hromatin (*Slika 17.*, panel *A3, B2 i 3*). Dodatno su detektovane i ćelije čije morfološke karakteristike odgovaraju nekroptozu, kao što je bubrenje ćelije i izmenjena morfologija jedra (*Slika 17.*, panel *A3*). Osim toga uočene su i ćelije s obojenim mitohondrijama i blago obojenim jedrima (*Slika 17.*, panel *B3*), što ukazuje na početnu fazu ćelijske smrti koja je različita od apoptoze.

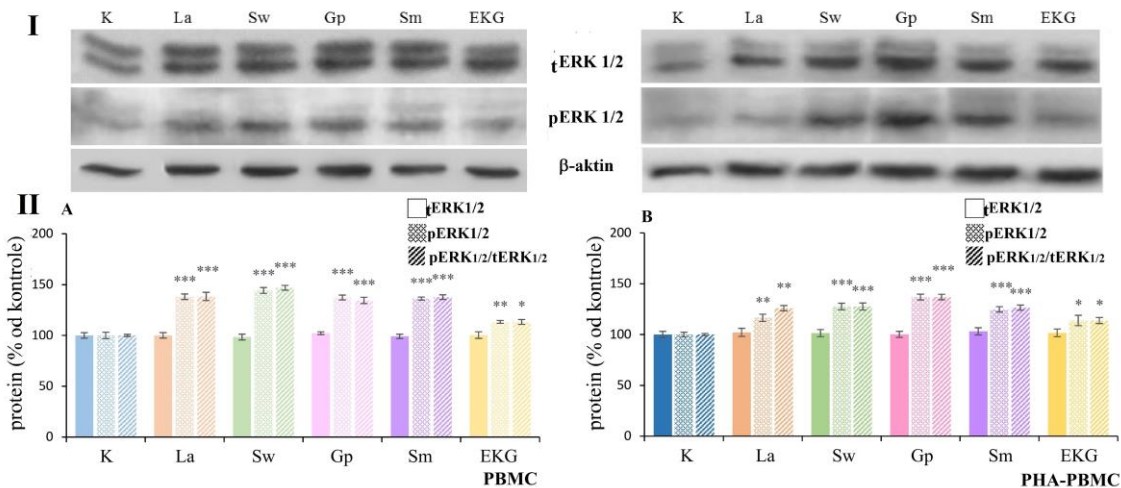


Slika 17. Morfološke karakteristike ćelija analizirane TMRE/DAPI bojenjem nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* kultura PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprezentativne fotomikrografije 1 - kontrolne; 2 - ćelije s morfološkim karakteristikama apoptoze; 3 - ćelije s morfološkim karakteristikama nekroze/nekroptoze. Zelenom strelicom označene su metabolički aktivne, žive ćelije; plavom strelicom označene su ćelije s morfološkim karakteristikama apoptoze; žutom strelicom označene su ćelije s morfološkim karakteristikama nekroze/nekroptoze.

4.4. Rezultati imunoblot analize proteina uključenih u regulaciju ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze

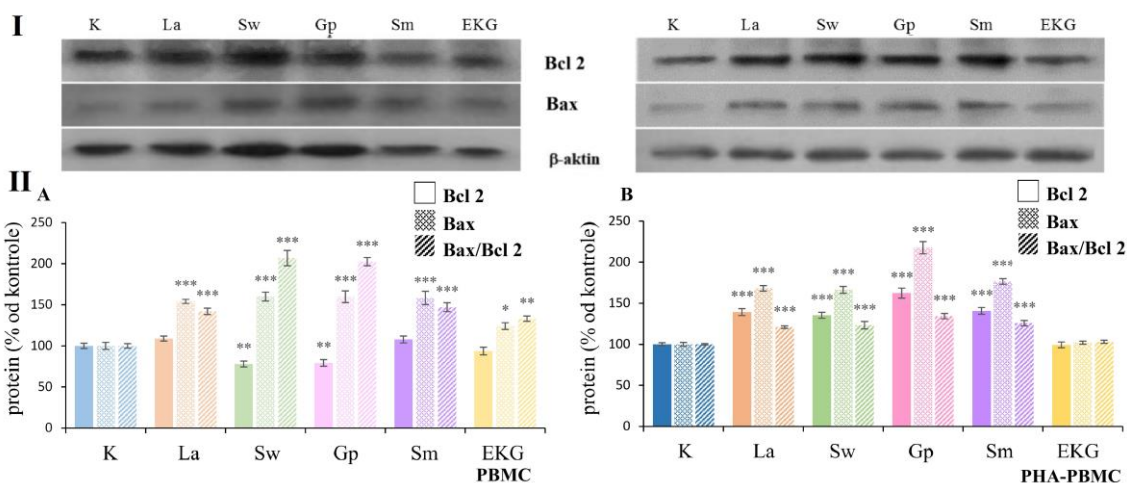
S obzirom da su primenjeni tretmani u obe kulture ispoljili citotoksične efekte, praćene morfološkim promenama karakterističnim za apoptozu, kao i nespecifičnim morfološkim promenama koje mogu ukazivati na nekrozu/nekroptozu, dalje je imunoblot analizom praćena ekspresija/nivo proteina uključenih u regulaciju ovih tipova ćelijske smrti, kao i njihove posttranslacione modifikacije.

Na *Slici 18.*, prikazan je nivo totalne i fosforilisane forme ERK1/2, kao i njihov relativni odnos koji ukazuje na nivo aktivacije ispitivanog molekula. U kulturama PBMC nivo fosforilisanih formi ERK1/2 (pERK1/2) bio je značajno povećan nakon MRK tretmana ($p < 0,001$) odnosno EKG tretmana ($p < 0,01$) (*Slika 18., II A*). Sličan odgovor je uočen i u kulturama PHA-PBMC, s obzirom da je povećanje pERK1/2 uslovalo povećanje odnosa pERK / tERK1/2 nakon svih tretmana (EKG ($p < 0,05$), La ($p < 0,01$) i Sw, Gp i Sm ($p < 0,001$)) (*Slika 18.II, B*).



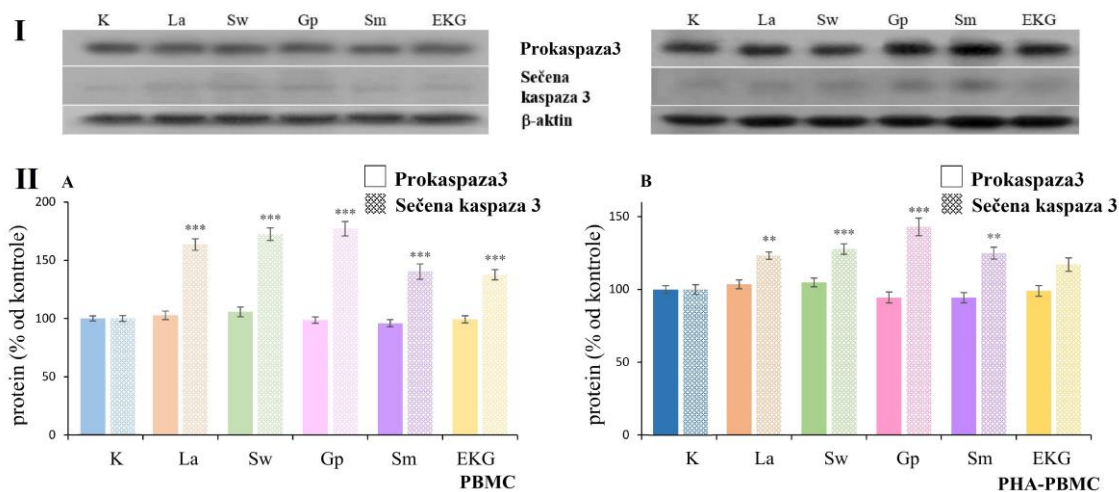
Slika 18. Nivo totalne ERK1/2 (tERK1/2) i fosforilisane forme ERK1/2 (pERK1/2) proteina nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG) u kulturama PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprerativni imunoblotovi tERK1/2, pERK1/2 i β -aktin (I). Relativna kvantifikacija nivoa tERK1/2 i pERK1/2 i njihov odnos pERK1/2 / tERK1/2 (II K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin). Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$).

Literaturni podaci ukazuju da aktivirani ERK1/2, između ostalog, može regulisati preživljavanje ćelija preko nivoa proapoptotskog proteina Bcl 2, čime se menja odnos Bax/Bcl 2 (148). Stoga su dalje u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivani nivoi proteina Bcl 2 i Bax, kao i njihov međusobni odnos. Kod kultura PBMC nakon Sw i Gp tretmana detektovano je značajno smanjenje nivoa proteina Bcl 2 ($p < 0,01$), dok je njegova ekspresija nakon La, Sm i EKG tretmana u nivou kontrole (*Slika 19.*). S druge strane, u odnosu na kontrolu nivo ekspresije proteina Bax značajno je povećan nakon EKG ($p < 0,05$) i svih MRK tretmana ($p < 0,001$), što je uslovalo i porast odnosa Bax/Bcl 2 nakon EKG ($p < 0,01$) i MRK tretmana ($p < 0,001$), i pomeranje fino kontrolisane ravnoteže ka proapoptotskim molekulima (*Slika 19.I, II A*). Paralelno, u kulturama PHA-PBMC, u odnosu na kontrolu, nivoi ekspresije proteina Bcl 2 i Bax značajno su porasli nakon svih MRK tretmana ($p < 0,001$) (*Slika 19. I, II B*), kao i odnos Bax/Bcl 2 ($p < 0,001$). što ukazuje da se i kod kultura PHA-PBMC 50 μ M MRK nivo regulatornih molekula apoptoze menja usled uticaja tretmana. Uočena promena odnosa Bax/Bcl 2 u kulturama PBMC nakon svih tretmana, kao i u kulturama PHA-PBMC, nakon MRK tretmana, ukazuje da je promena u nivou pro- i antiapoptotskih proteina usmerena ka pokretanju apoptotske kaskade. Kao što je prikazano na *Slici 19. II B*, u kulturama PHA-PBMC, u odnosu na kontrolu, nivoi ispitivanih molekula Bcl 2 familije proteina bili su nepromenjeni nakon EKG tretmana.



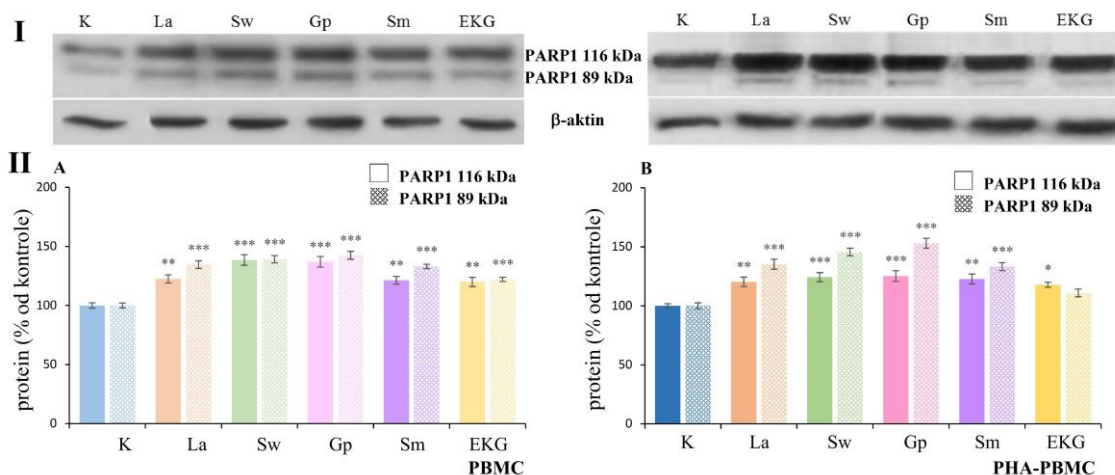
Slika 19. Nivoi ekspresije proteina Bax i Bcl 2 nakon 48 sati tretmana s $50 \mu\text{M}$ monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* u kulturama (EKG) PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprerzentativni imunoblotovi Bax, Bcl 2 i β -aktina (I). Relativna kvantifikacija nivoa proteina Bax i Bcl 2 i njihov odnos Bax/Bcl 2 (II): K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin i EKG. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

S obzirom da je aktiviranje kaspaze 3 odlučujući korak u pokretanju apoptotske kaskade i da je ovaj protein odgovoran za degradaciju velikog broja proteina, uključujući i PARP 1, dalje je u ovoj eksperimentalnoj postavci, ispitivan nivo prokaspaze 3 i subjedinica aktivirane forme ovog enzima molekulske mase 17 kDa (sečena kaspaza 3). Kao što je prikazano na **Slici 20.** nivo prokaspaze 3 je, nakon tretmana u obe ćelijske culture, bio nepromenjen u odnosu na kontrolu. Detektovana sečena kaspaza 3 ukazuje na aktiviranje apoptoze u kulturama PBMC nakon svih tretmana ($p < 0,001$), kao i u kulturama PHA-PBMC nakon La i Sm ($p < 0,01$), odnosno Sw i Gp ($p < 0,001$) (**Slika 20.**).



Slika 20. Nivo prokaspaze 3 i sečene kaspaze 3 nakon 48 sati tretmana s $50 \mu\text{M}$ monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* u kulturama (EKG) PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprerzentativni imunoblotovi kaspaze 3, sečene kaspaze 3 i β -aktina (I). Relativna kvantifikacija nivoa prokaspaze 3 i sečene kaspaze 3 (II): K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

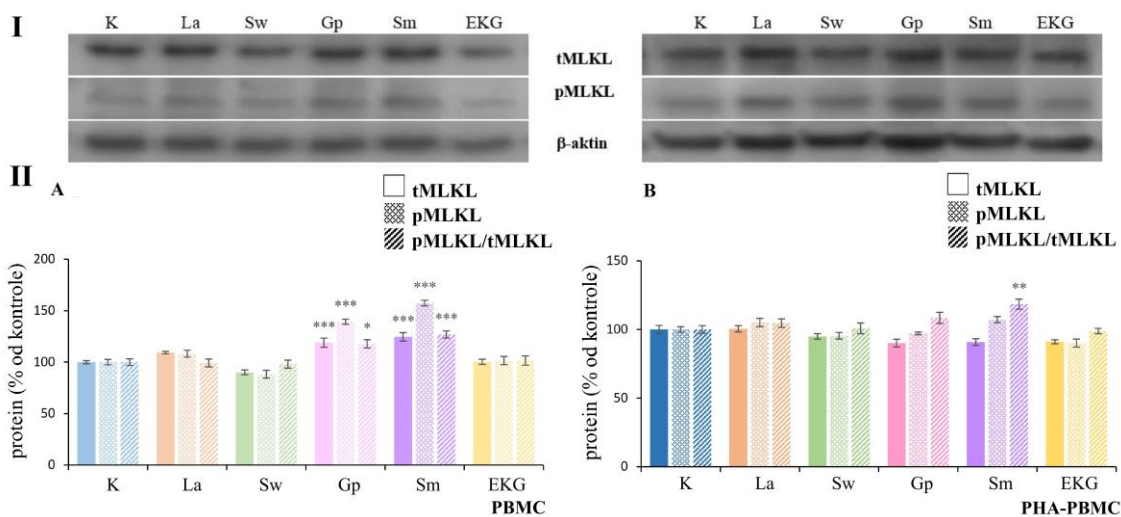
Dodatno je aktivacija kaspaze 3 potvrđena detekcijom PARP 1 fragmenta molekulske težine od 89 kDa (PARP 1 89 kDa) nastalog proteolitičkim sečenjem PARP 1 molekulske mase 116 kDa (PARP 1 116 kDa). Nivo PARP 1 89 kDa bio je značajno povećan u kulturama PBMC nakon svih tretmana ($p < 0,001$), kao i u PHA-PBMC kulturama nakon MRK tretmana ($p < 0,001$), dok nakon EKG tretmana nije značajno promenjen (*Slika 21.*). Osim toga, detektovan je i povećan nivo PARP 1 116 kDa u obe kulture nakon svih MRK tretmana (La, Sm ($p < 0,01$) i Sw, Gp ($p < 0,001$)), kao i nakon EKG tretmana PBMC ($p < 0,01$) i PHA-PBMC ($p < 0,05$) kultura.



Slika 21. Nivo PARP 1 (116 kDa i 89 kDa) nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG) u kulturama PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprezentativni imunoblotovi PARP 1 116 kDa, PARP 1 89 kDa i β -aktina (I). Relativna kvantifikacija nivoa PARP 1 116 kDa i 89 kDa proteina (II): K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Predstavljeni rezultati nivoa analiziranih proteina i njihovih posttranslacionih modifikacija, nakon svih primenjenih tretmana u ovoj eksperimentalnoj postavci, ukazuju na trend aktivacije apoptoze.

S obzirom da su TMRE/DAPI bojenjem pokazane promene u permeabilnosti ćelijske membrane, što je morfološka odlika procesa nekroze/nekroptoze, dalje su analizirani nivo ekspresije i nivo fosforilacije proteina MLKL, ključne komponente završnog koraka aktivacije nekroptoze. U ovoj studiji je u kulturama PBMC tretiranim s Gp i Sm uočeno povećanje tMLKL ($p < 0,001$), praćeno povećanjem nivoa pMLKL ($p < 0,001$) i relativnog odnosa pMLKL/tMLKL (nakon Gp ($p < 0,05$) i Sm ($p < 0,001$)), (*Slika 22., II, A*). U kulturama PHA-PBMC jedino je Sm tretman značajno povećao relativni odnos pMLKL/tMLKL ($p < 0,01$), iako su nivoi ispitivanih izoformi proteina MLKL bili nepromenjeni usled trenda paralelnog smanjenja zastupljenosti tMLKL i povećanja pMLKL (*Slika 22., II, B*).



Slika 22. Nivo totalne (tMLKL) i fosforilisane forme (pMLKL) nakon 48 sati tretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama i 1 mg/mL ekstraktom korena *G. lutea* (EKG) u kulturama PBMC (A) i PHA-PBMC (B). Reprerzentativni imunoblotovi tMLKL, pMLKL i β -aktina (I). Relativna kvantifikacija nivoa tMLKL i pMLKL i njihov odnos pMLKL/tMLKL (II): K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin. Rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da u ovoj eksperimentalnoj postavci svi tretmani mogu uticati na aktiviranje apoptotske signalne kaskade, dok Sm i Gp tretman u kulturama PBMC, kao i Sm tretman u kulturama PHA-PBMC, stvaraju uslove u kojima se može pokrenuti nekroptoza.

4.5. Rezultati ispitivanja selektivnosti MRK i EKG tretmana na aktivaciju ćelijske smrti tipa apoptoze i nekroptoze

4.5.1 Rezultati ćelijskog preživljavanja nakon MRK i EKG tretmana u prisustvu nekrostatina 1 i zvad-fmk

Uticao tretman na selektivnu aktivaciju ćelijske smrti apoptozom/nekroptozom u ovoj doktorskoj disertaciji ispitan je praćenjem stope ćelijskog preživljavanja kultura PBMC i PHA-PBMC nakon 48 sati kotretmana MRK/EKG s 20 μ M inhibitorima apoptoze i nekroptoze - zvad/nec/oba inhibitora istovremeno. U poređenju sa kontrolom tretiranom odgovarajućim inhibitorom, u svim zadatim uslovima, u obe kulture MRK tretmani, su značajno smanjili stopu ćelijskog preživljavanja ($p < 0,001$) (**Tabela 12., 13**). U istim uslovima, EKG tretman u kulturama PBMC, takođe, je u poređenju s odgovarajućom kontrolom, smanjio stopu ćelijskog preživljavanja ($p < 0,001$), dok u kulturama PHA-PBMC, slično kao i u tretmanima bez inhibitora, nije uticao na ispitivani parametar (**Tabela 10.**).

Tabela 12. Čelijsko preživljavanje kultura PBMC nakon 48 sati kotretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama/ekstraktom korena *G. lutea* (1 mg/mL) i sa 20 μ M nekrostatinom 1 (nec)/zvad-fmk (zvad)/oba inhibitora (nec+zvad). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin i EKG - ekstrakt korena *G. lutea*. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; *** $p < 0,001$ označava statistički značajnu razliku u odnosu odgovarajuću kontrolu, dok ^x označava statistički značajnu razliku u odnosu na čelijsko preživljavanje pri istom tretman bez inhibitora (^{xx} $p < 0,01$; ^{xxx} $p < 0,001$).

| | nec | zvad | nec+zvad |
|------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| | PBMC | PBMC | PBMC |
| K | 100 \pm 0,4 | 100 \pm 0,5 | 100 \pm 0,5 |
| La | 82,9 \pm 1,0*** | 86,6 \pm 0,9*** | 86,4 \pm 0,9*** |
| Sw | 75,7 \pm 0,9*** | 79,3 \pm 1,1*** | 78,9 \pm 1,1*** |
| Gp | 76,2 \pm 0,7*** | 77,2 \pm 1,0*** | 86,6 \pm 0,6*** ^{xxx} |
| Sm | 86,7 \pm 0,7*** | 84,6 \pm 0,8*** | 92,9 \pm 0,5*** ^{xx} |
| EKG | 86,2 \pm 0,8*** | 89,8 \pm 0,8*** | 90,6 \pm 0,6*** |

Tabela 13. Čelijsko preživljavanje kultura PHA-PBMC nakon 48 sati kotretmana s 50 μ M monoterpenskim referentnim komponentama/ekstraktom korena *G. lutea* (1 mg/mL) i sa 20 μ M nekrostatinom 1 (nec)/zvad-fmk (zvad)/oba inhibitora (nec+zvad). K - kontrola; La - loganska kiselina; Sw - sverozid; Gp - genciopikrozid; Sm - svertiamarin i EKG - ekstrakt korena *G. lutea*. Rezultati su predstavljeni kao relativne vrednosti u odnosu na kontrolu. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; *** $p < 0,001$ označava statistički značajnu razliku u odnosu odgovarajuću kontrolu, dok ^x označava statistički značajnu razliku u odnosu na čelijsko preživljavanje pri istom tretman bez inhibitora (^{xx} $p < 0,01$; ^{xxx} $p < 0,001$).

| | nec | zvad | nec+zvad |
|------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| | PHA-PBMC | PHA-PBMC | PHA-PBMC |
| K | 100 \pm 1,8 | 100 \pm 1,5 | 100 \pm 1,4 |
| La | 84,9 \pm 1,3*** | 87,3 \pm 1,2*** | 86,9 \pm 0,8*** |
| Sw | 83,8 \pm 1,6*** | 86,4 \pm 1,2*** | 85,7 \pm 1,1*** |
| Gp | 84,8 \pm 1,5*** | 86,8 \pm 1,2*** | 91,7 \pm 0,8*** ^{xxx} |
| Sm | 88,9 \pm 1,3*** | 87,1 \pm 1,3*** | 93,45 \pm 1,1*** ^{xx} |
| EKG | 93,1 \pm 2,7 | 95,5 \pm 1,9 | 96,2 \pm 0,9 |

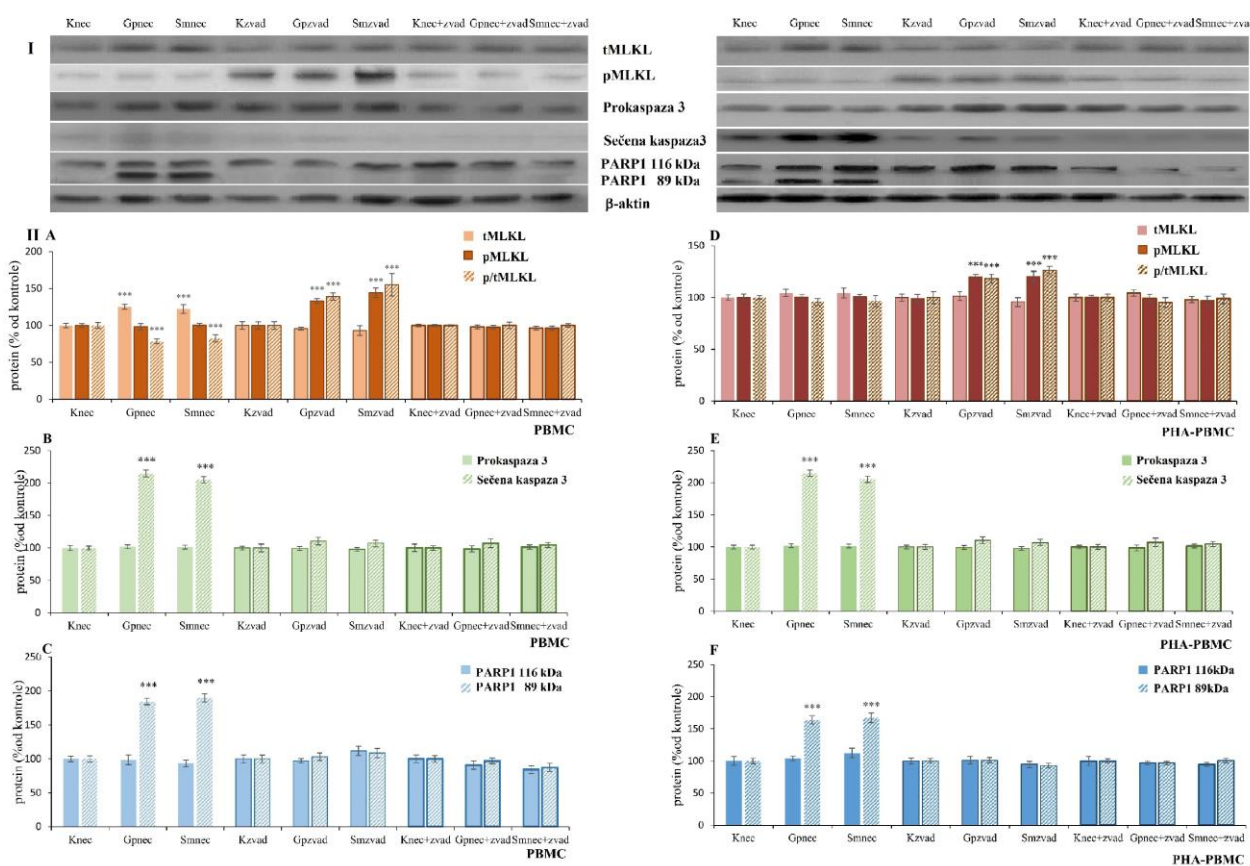
Rezultati prikazani u **Tabela 12.** i **13.**, ukazuju da verovatno ne postoji specifična interakcija MRK i EKG sa nekim od signalnih molekula uključenih u regulaciju apoptoze i nekroptoze koji bi uticao na njihovu selektivnu aktivaciju, već da su oštećene ćelije uklonjene drugim tipom ćelijske smrti koji nije blokiran.

Poređenjem stope ćelijskog preživljavanja oba tipa ćelijskih kultura nakon kotretmana s inhibitorima (**Tabela 12** i **Tabela 13.**), u odnosu na odgovarajući tretman bez inhibitora (**Tabela 10**), uočeno je povećanje stope ćelijskog preživljavanja u grupama Gp_{nec+zvad} ($p < 0,001$) i Sm_{nec+zvad} ($p < 0,01$), u odnosu na Gp, odnosno Sm tretman.

4.5.2. Rezultati imunoblot analize nivoa ekspresije proteina uključenih u završne korake regulacije nekroptoze i apoptoze nakon kotretmana Gp/Sm s nec/zvad/oba inhibitora

Kako su ovi tretmani u kulturama PBMC uticali na stvaranje uslova za aktivaciju oba tipa ćelijske smrti, da bi se pokazalo da li u prisustvu inhibitora dolazi do aktivacije neblokiranog puta ćelijske smrti, dalje su ispitivane promene u nivou ekspresije proteina uključenih u završne korake regulacije ćelijske smrti tipa nekroptoze i apoptoze (MLKL, kaspaza 3, PARP 1), u kotretmanima

Gp/Sm s nec/zvad/oba inhibitora. Tako je, u kulturama PBMC nakon kotretmana Gp/Sm s nec, povećanje nivoa tMLKL ($p < 0,001$) praćeno značajnim smanjenjem odnosa pMLKL/tMLKL ($p < 0,001$) (*Slika 23. I, II A*), povećanjem nivoa sečene kaspaze 3 ($p < 0,001$) (*Slika 23. I, II B*), kao i nivoa PARP 1 89 kDa ($p < 0,001$) (*Slika 23. I, II C*). U istim eksperimentalnim uslovima, u prisustvu inhibitora apoptoze, zvad, zabeleženo je povećanje nivoa pMLKL ($p < 0,001$), koje je praćeno značajnim povećanjem odnosa pMLKL/tMLKL ($p < 0,001$), dok je nivo sečene kaspaze 3 i PARP 1 89 kDa, bio nepromenjen u odnosu na odgovarajuću kontrolu (*Slika 23. IIB, C*). Kao što je prikazano na *Slici 23. (I, II A, B, C)* u kotretmanu s oba inhibitora nije uočena promena nivoa ispitivanih proteina. S druge strane, u kulturama PHA-PBMC, u odnosu na odgovarajuću kontrolu (Knec), uočen je sličan odgovor na kotretmane Gp/Sm s inhibitorima. Naime, nakon kotretmana Gp/Sm sa inhibitorom signalnog puta nekroptoze, nec, nivoi obe ispitivane izoforme MLKL bili su nepromenjeni, dok su nivoi ekspresije sečene kaspaze 3 i PARP 1 89 kDa bili povećani ($p < 0,001$) (*Slika 23. I, II E, F*). Nakon kotretmana Gp/Sm s inhibitorom apoptoze, zvad, detektovano je povećanje nivoa pMLKL ($p < 0,001$), dok su ostali ispitivani proteini bili u nivou odgovarajuće kontrole (*Slika 23. I, II E, F*). U kotretmanu s oba inhibitora, u odnosu na odgovarajuću kontrolu, nije zabeležena promena nivoa ispitivanih molekula (*Slika 23. I, IID, E, F*).



Slika 23. Nivoi ekspresije proteina MLKL, kaspaze 3 i PARP 1 nakon 48 sati kotretmana genciopikrozidom (Gp) ($50 \mu\text{M}$)/svertiamarinom (Sm) ($50 \mu\text{M}$) i nekrostatinom 1 (nec) ($20 \mu\text{M}$)/zvad-fmk(zvad) ($20 \mu\text{M}$) / oba inhibitora (nec+zvad) u kulturama PBMC (A, B, C) i PHA-PBMC (D, E, F). Reprezentativni imunoblotovi tMLKL, pMLKL, prokaspaza 3, sečena kaspaza 3, PARP 1 (116 kDa i 89 kDa) i β -aktina (I). Relativna kvantifikacija nivoa ispitivanih proteina (II). Rezultati su predstavljani kao relativne vrednosti u odnosu na odgovarajuću kontrolu s inhibitorom i normalizovani u odnosu na β -aktin. Statistički značajne razlike su određivane testovima one-way ANOVA i post hoc Tukey; * označava statistički značajnu razliku u odnosu na odgovarajuću kontrolu (***) $p < 0,001$).

Analiza nivoa ekspresije ispitivanih proteina nakon 48 sati tretmana kultura PBMC i PHA-PBMC, ukazala je da primena inhibitora nekroptoze u kotretmanu sa Gp/Sm ne samo da

dovodi do gašenja signalizacije puta ove vrste ćelijske smrti već i povećanja nivoa ekspresije proteina koji regulišu aktiviranje apoptoze. Takođe, u uslovima blokirane apoptoze, povećava se nivo ekspresije proteina koji imaju ulogu u završnim koracima ćelijske smrti nekroptozom. Detektovani nivoi proteina uključenih u završne korake regulacije apoptoze/nekroptoze, ukazuju da su Gp/Sm tretmani u obe ćelijske kulture stvorili uslove za aktivaciju apoptoze i nekroptoze, dok prisustvo inhibitora favorizuje ćelijsku smrt koja nije blokirana.

Na osnovu predstavljenih rezultata, s obzirom da je stopa preživljavanja ćelija obe kulture nakon Gp/Sm tretmana s oba inhibitora, smanjena u odnosu na odgovarajuće kontrole, može se pretpostaviti da Gp/Sm tretmani svoj citotoksični uticaj ispoljavaju, u određenoj meri, aktivacijom i drugih tipova ćelijske smrti koji nisu bili predmet ispitivanja ove doktorske disertacije.

5. DISKUSIJA

G. lutea je lekovita biljka čiji koren se vekovima koristi u tradicionalnoj medicini za pravljenje čajnih mešavina za poboljšanje apetita, jačanje otpornosti, poboljšanje cirkulacije, i drugo (149). Brojne studije ukazale su na izuzetnu bioaktivnost EKG (105, 106, 108-110) u kom su MRK detektovane u visokom udelu (20, 150). Takođe istraživanja koja su se bavila pojedinačnim MRK pokazala su da njihov biološki uticaj može biti sličan, u smislu smanjenja inflamacije, aktiviranja antioksidativne odbrane, kao i protektivnog uticaja na ćelijsko preživljavanje u prisustvu toksičnih agenasa (112, 113, 119). Pored navedenih pozitivnih uticaja, potvrđeno je da EKG i Gp mogu ispoljiti i citotoksični i genotoksični uticaj, bez dostupnih podataka o mogućem genotoksičnom uticaju ostalih ispitivanih MRK (133, 134). Citotoksični uticaj Gp, Sw i Sm dokazan je na tumorskim ćelijskim linijama uz aktivaciju kaspazno-zavisne apoptoze, pomeranjem ćelijskog balansa ka proapoptotskim molekulima (127-129). Takođe, Wu i saradnici (2021) su *in silico* analizom pokazali da se između proteina Bcl 2 i Gp, Sw i Sm mogu formirati kompleksi koji utiču na smanjenje nivoa ovog antiapoptotskog proteina (128). Time je ukazano i na mogućnost direktne interakcije sa molekulima uključenim u regulaciju apoptoze koja bi mogla usloviti njeno selektivno aktiviranje. S obzirom na pokazane uticaje MRK i EKG u patološkim stanjima, ali i oskudne informacije o uticaju na neizmenjene ćelije koje su paralelno izložene pri antitumorskoj terapiji, u ovoj doktorskoj disertaciji ispitivan je uticaj MRK i EKG na aktiviranje apoptoze i nekroptoze u kulturama PBMC i PHA-PMBC. Analizirana je selektivnost odgovora na odabrane tretmane praćenjem nivoa regulatornih molekula nekroptoze i kaspazno-zavisne apoptoze u prisustvu inhibitora.

Do sada objavljeni podaci kvalitativne i kvantitativne analize sekundarnih metabolita EKG pokazuju da su monoterpeneske komponente ispitivane u ovoj studiji, prisutne u visokom udelu (19, 150, 151). Uočeno je da koncentracija sekundarnih metabolita zavisi od načina ekstrakcije (26, 152). U cilju dobijanja adekvatanog prinosa MRK u procesu ekstrakcije koren *G. lutea* dodatno je usitnjen čime je povećana dostupnost rastvaraču. Iridoidni i sekoiridoidni glikozidi dobro su rastvorljivi u vodi (153). Takođe, vodenom ekstrakcijom dobija se visok sadržaj suve materije, tako da je ekstrakcija rađena u vodi kao rastvaraču (154). Da bi se izbegla moguća degradacija prisutnih komponenti rađena je ekstrakcija bez dodatnog zagrevanja nakon dostizanja tačke ključanja, a kao način koncentrovanja dobijenog vodenog ekstrakta odabrana je liofilizacija koji omogućava očuvanje i zadržavanje bioaktivnih komponenti (155, 156).

U svakoj fazi pripreme EKG utvrđene su veličine čestica, pri čemu je primećeno da se nakon liofilizacije formiraju agregati pločaste strukture većih dimenzija. Smanjenje veličine čestica nakon rastvaranja liofilizata ukazalo je na visoku rastvorljivost agregata kristalne strukture. Odabrani uslovi ekstrakcije omogućili su dobijanje monoterpena u očekivanim odnosima, s obzirom da je kvantitativnom analizom potvrđeno prisustvo svih ispitivanih MRK, od kojih se kao najzastupljeniji izdvojio Gp (501,9 μ M) što je u skladu s drugim studijama (19, 157). Prethodno su Aberham i saradnici (2011) ispitivanjem hemijske stabilnosti alkoholnih rastvora Sm i Gp pokazali da su ova jedinjenja stabilna na niskim temperaturama, dok je nakon mesec dana izlaganja uslovima povišene temperature od 40 °C i vlažnosti 75% koncentracija Sm smanjena za 5%, a Gp za čak 18% (25). Stoga je, u ovoj doktorskoj disertaciji, dodatno u cilju provere stabilnosti tretmana, urađena i kvantitativna analiza rastvaranjem EKG u medijumu za gajenje ćelijske kulture koji je izložen uslovima kratkotrajne *in vitro* ćelijske kulture. Praćenjem stabilnosti u vremenskim intervalima od 48 i 72 sata izlaganja temperaturi od 37 °C u uslovima povećane vlažnosti 95%, nije uočena promena koncentracije ispitivanih MRK u EKG, i time je potvrđena je stabilnost koncentracije ispitivanih komponenti u eksperimentalnim uslovima korišćenim u izradi ove doktorske disertacije.

Literaturni podaci ukazuju da karakteristike ekstrakta korena zavise od njegovog sastava (158), na koji utiču brojni faktori kao što su starost biljke, odnosno veličina korena, karakteristika staništa u kojima je biljka rasla (159), kao i od načina sušenja korena (20). Takođe, biološki odgovor izazvan tretmanima *in vitro*, u istim eksperimentalnim uslovima, može zavisiti i od tipa

ćelija na kojima se istraživanje sprovodi, na šta je ukazalo istraživanje Rodrigues i saradnika (2019), koji su pokazali da su HeLa ćelije bile manje osetljive na etanolne i vodene rastvore EKG, u poređenju s paralelno ispitivanom ćelijskom linijom adenokarcinoma MCF-7 (125). Treba istaći da su prethodna *in vitro* ispitivanja EKG, rađena s različitim koncentracijama ekstrakta u rasponu od 1,25 µg/mL do 5 mg/mL (126, 132), u više model sistema (keratinociti, humane ćelijske linije karcinoma, glatke mišićne ćelije, i druge) (108, 109, 125, 126, 131) i vremena ekspozicije najčešće 24 sata (131, 132) i 72 sata (125, 126). Najznačajnije razlike u ćelijskom odgovoru na tretmane EKG uočene su vezano za primenjenu koncentraciju i vreme izlaganja tretmanu. Visoka neusaglašenost podataka vezanih za ćelijske odgovore uslovljene tretmanima, ukazala je na neophodnost definisanja uslova koncentracije i vremena izlaganja tretmanu EKG u eksperimentalnoj postavci ove doktorske disertacije. Produžena ekspozicija i/ili veća koncentracija tretmana može intenzivirati ćelijsku smrt i dovesti do sekundarne nekroze, koja nastaje usled prisustva ostataka ćelija (160). S obzirom da su literaturni podaci ukazali na genotoksični potencijal EKG i Gp (133, 134), kao i da genotoksični stres može usloviti aktivaciju ćelijske smrti (161), za razumevanje procesa pokrenutih uticajem ispitivanih komponenti značajno je ispitati oba ishoda. Istraživanje Storer i saradnika (1996), pokazalo je da je za razlikovanje genotoksičnog i citotoksičnog uticaja tretmana potrebno koristiti eksperimentalne uslove u kojima se preživljavanje ćelija u kulturi ne smanjuje za više od 30% (50). U uslovima ograničene citotoksičnosti omogućeno je praćenje genotoksičnog uticaja uz marginalizovanje sekundarne nekroze. To je razlog zašto je važan kriterijum tokom kreiranja eksperimentalnog dizajna u ovoj doktorskoj disertaciji bio odabir vremena i koncentracije tretmana koji ne dovodi do smanjenja broja ćelija za više od 30%. U cilju definisanja eksperimentalnih uslova praćen je uticaj koncentracija - 0,5, 1 i 2 mg/mL EKG na kulture PBMC, u dva vremenska intervala, 48 i 72 sata. Dobijeni rezultati ukazuju na zavisnost ćelijskog preživljavanja od koncentracije EKG i vremenskog intervala izlaganja tretmanu. Prva značajna razlika u stepenu preživljavanja se uočava nakon 48 sati tretmana s 1 mg/mL EKG, i po vrednosti je bliska istom tretmanu na 72 sata. Najviša koncentracija je dovela do dodatnog smanjenja preživljavanja nakon 48 sati, dok je nakon 72 sata smanjila preživljavanje ispod 70%, što ukazuje i moguću aktivaciju sekundarne nekroze. Zanimljiva razlika u ćelijskom preživljavanju nakon tretmana sa 1 mg/mL EKG u odnosu na vreme ekspozicije može nastati i usled aktivacije mehanizama za popravku oštećenja u molekulu DNK koja dovodi do oporavka ćelija (162). U ovoj eksperimentalnoj postavci, da bi se ispitaio genotoksični uticaji i potencijalna aktivacija mehanizama za popravku oštećenja u molekulu DNK pri produženoj ekspoziciji EKG, analizirane su učestalosti hromozomskih aberacija (HA) u kulturama PHA-PBMC, u oba vremenska intervala.

Rezultati HA analize nakon 48 sati tretmana s 0,5, 1 i 2 mg/mL EKG pokazali su genotoksični uticaj zavisan od koncentracije, koji je uočen i pri tretmanu najmanjom koncentracijom koja ne ispoljava značajan citotoksični uticaj. Takođe, uočena je i smanjena učestalost HA sa produženjem ekspozicije nakon svih tretmana. Smanjena učestalost HA pri produženoj ekspoziciji tretmanima, može nastati usled aktivacije sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK i zaustavljanja ćelijskog ciklusa, kao i usled aktiviranja ćelijske smrti u ćelijama sa genomskom DNK koja je pretrpela oštećenja. Upravo, na osnovu dobijenih rezultata može se pretpostaviti da se u kulturama usled uticaja tretmana dešavaju oba procesa: smanjeno preživljavanje koje se vezuje sa aktiviranjem ćelijske smrti, i paralelna sa aktivacijom sistema za popravku DSBs homolognom rekombinacijom (eng. *Homologous Recombination*, HR) 72 sata nakon tretmana sa 2 mg/mL. DSBs se HR mehanizmom popravljaju u S fazi ćelijskog ciklusa, odnosno stvaranjem intermedijarnih holidejevih struktura između oštećenog DNK lanca i lanca s homologom sekvencom koji služi kao matrica za popravku oštećenja (163). Dobijeni rezultati su u skladu s rezultatima Patenković i saradnika (2013) koji su kod *D. melanogaster* uočili blago povećanje mitotičke rekombinacije u kotretmanu EKG s alkilirajućim agensom MMS (133). DSBs se pored HR mehanizma, koji je veoma precizan i tačan proces, mogu popravljati i nehomologim spajanjem krajeva (eng. *Non-Homologous End Joining*, NHEJ), manje preciznim mehanizmom koji može generisati hromozomske rearanžmane po tipu delecija, insercija i translokacija (164). Takve hromozomske aberacije izazivaju velike promene genomskih sekvenci u potomstvu preživelih

ćelija, i mogu prouzrokovati genomsku nestabilnost, koja se često detektuje u neoplastično transformisanim ćelijama (165). Prethodno je pokazano da u kulturama humanih fibroblasta (166), kao i u leukemijskim ćelijskim linijama (167), NHEJ predstavlja dominantni način popravke DSBs i da se odvija paralelno s HR. Uzimajući u obzir rezoluciju HA metode kojom se detektuju promene veće od nekoliko megabaza (168), iako u ovoj doktorskoj disertaciji nisu detektovani hromozomski rearanžmani koji bi direktno ukazali na aktivirani NHEJ mehanizam popravke, ne može se isključiti da i oni ipak mogu biti aktivirani uticajem tretmana. Uočene HA kao i radijalne strukture koje i pored aktiviranih mehanizama popravke oštećenja u molekulu DNK ostaju nepopravljene, mogu predstavljati signale za aktivaciju ćelijske smrti (62, 169). Stoga, da bi se isključio uticaj produžene ekspozicije i aktiviranih mehanizama popravke oštećenja u molekulu DNK na ćelijsko preživljavanje, kao vreme izlaganja tretmanima u ovoj eksperimentalnoj postavci odabran je tretman od 48 sati.

Genotoksični potencijal EKG na kulturama PBMC ispitan je alkalnim komet esejem kojim se detektuju oštećenja u molekulu DNK u terminalno diferenciranim ćelijama. Pokazano je danakon 48 sati EKG tretmana u koncentracijama 1 i 2 mg/mL dolazi do značajnog oštećenja u molekul DNK, što je u skladu s rezultatima primenjenom analizom HA. Hartmann i saradnici (2003) pokazali su da rezultati genotoksičnog uticaja dobijeni alkalnim komet esejem i HA korelišu, i ne zavise od vrste ćelija na kojima je rađeno ispitivanje (170).

ROS može biti uzrok oštećenja u molekulu DNK direktnim narušavanjem fosfoestarske veze nukleotida i formiranjem SSBs (171), kao i reakcijama sa azotnim bazama (172). Takođe, i produkti nastali lipidnom peroksidacijom, kao što je MDA, mogu interagovati sa molekulom DNK (173). S obzirom da oksidativni stres može dovesti do oštećenja u molekulu DNK, dalje je praćen uticaj prethodno primenjenih koncentracija EKG na promenu parametara oksidativnog stresa PAB i LPP u kulturama PBMC nakon 48 sati tretmana. Tretman najnižom koncentracijom, koji je ispoljio najslabiji genotoksični uticaj i nije uticao na promenu stope preživljavanja ćelija u kulturi PBMC, značajno je povećavao vrednosti ispitivanih parametara oksidativnog stresa, dok je promena PAB i LPP izostala nakon tretmana višim koncentracijama. Izostanak uticaja viših koncentracija na ispitivane parametre oksidativnog stresa može se objasniti aktiviranjem komponenti antioksidativne odbrane u smislu povećanja efikasnosti i/ili *de novo* sinteze enzima uključenih u uklanjanje ROS koje se javljaju kada se dostigne određeni stepen oštećenja, odnosno biološkim odgovorom ćelija, ali i usled sastava EKG koji antioksidativni potencijal može iskazati tek pri višim koncentracijama (64, 111, 174). Tako na primer, pokazano je da tretmani ekstraktima korena i lista *G. lutea*, kao i Gp tretman, utiču na povećanje ekspresije gena *Nrf 2* (111), koji daje informaciju za regulatorni protein transkripcije gena za *SOD* i *GPx*, čiji produkti uklanjaju $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , redom (64). S druge strane, Kusšar i saradnici (2006) pokazali su da EKG ispoljava antioksidativni potencijal, ali tek kada je primenjen u visokim koncentracijama 10-20 mg/mL, kao i da ekstrakti lista *G. lutea* zbog veće koncentracije ksantona i flavonoida imaju intenzivniji antioksidativni potencijal u odnosu na EKG (174). S obzirom da je najniža testirana koncentracija, koja nije ispoljila citotoksični uticaj, jedina uticala na povećanje vrednosti parametara oksidativnog stresa PAB i LPP, pretpostavljeno je da se u kulturama PBMC nakon 48 sati tretmana koncentracijama 1 i 2 mg/mL ponovo uspostavlja redoks homeostaza i da se oksidativni stres ne može direktno povezati s citotoksičnim uticajem ovih tretmana. Stoga, smanjenje stope preživljavanja pri višim koncentracijama EKG tretmana može biti posledica oštećenja ili uticaja na druge biološki važne molekule. Osim toga, treba istaći da i H_2O_2 prisutan u ćeliji u niskoj koncentraciji, koja ne dovodi do disbalansa redoks homeostaze, može indukovati oštećenja u molekulima DNK i formiranja DSBs (175).

Na osnovu predstavljenih rezultata može se zaključiti da je nivo citotoksičnosti i genotoksičnosti EKG uslovljen koncentracijom i vremenom ekspozicije tretmanu, dok se sa produženjem ekspozicije u PHA stimulisanim kulturama zapaža uticaj popravke oštećenja u molekulu DNK, koji na nižim koncentracijama može uticati na višu stopu ćelijskog preživljavanja. Uslovi koji su odabrani za dalje eksperimente stoga su bili koncentracija EKG od 1 mg/mL i vreme ekspozicije od 48 sati. U daljim eksperimentima, odabrana je i optimalna koncentracija od 50 μ M

za sve testirane MRK, koja je značajno indukovala ćelijsku smrt u kulturama PBMC, nakon 48 sati i nije smanjila broj ćelija za više od 30%, a koja je u skladu sa literaturnim podacima o citotoksičnom efektu MRK tretmana primenjenim u opsegu koncentracija od 3 μ M do 1 mM (130, 176-178).

In silico modeli VEGA-QSAR platforme za procenu mutagenog i kancerogenog potencijala odabranih MRK ukazali su da razlike u njihovoj strukturi mogu uticati na stepen njihove bioaktivnosti. Sve analizirane MRK u svojoj strukturi imaju SA 29 i 76, molekulske fragmente koje karakterišu molekule sa prethodno dokazanim kancerogenim uticajem. Osim toga, dobijeni rezultati ukazali su i na dodatne sličnosti s poznatim kancerogenima kod La koji sadrži i SA 106, kao i Gp s dodatnim SA 13. Dodatno, Gp sadrži i SM 55 koji predstavlja segment sličnosti sa poznatim analiziranim mutagenima.

Osnova genotoksičnog potencijala SA prisutnih u analiziranim MRK je njihova elektrofilnost, koja omogućava interakciju s nukleofilnim regionima nukleotida (179). SA 76 i SA 13 imaju dva elektrofilna centra koji mogu dovesti i do formiranja unakrsnih veza između lanaca DNK (eng. *Interstrand Cross-Links*, ICL) u interakciji sa dva naspramna nukleotida u molekulu DNK (172). S obzirom da su nakon EKG tretmana (2 mg/mL, 72 sata), HA analizom uočene radikalne strukture koje mogu nastati u procesu popravke unakrsnih ICLs, struktura ovih SA je dodatno ukazala na interakcije kojim bi MRK mogle da ispolje svoj genotoksični potencijal (180). Treba istaći da je mutageni potencijal La i Gp u dva modela VEGA-QSAR platforme označen oprečno: Model CAESAR 2.1.13, označio je La kao potencijalnog mutagena s visokom pouzdanošću (ADI > 0,8), dok program SARpy, nije predvideo mutageni uticaj. Razlike u predviđanju javile su se metodološke prirode i uzrokovane su različitim pristupom analizi, kao i zbog razlika u grupama podataka koje ovi programi koriste. Naime, SARpy koristi skup podataka izdvojenih iz CAESAR modela koji uključuju ukupno 112 različitih SA za mutagenost i dodatno analizira 93 molekulske fragmente koji nisu vezani za mutageni uticaj (33, 181). Stoga, s obzirom na sličnosti strukture La sa fragmentima koji ukazuju na nemutageni uticaj, izostalo je predviđanje njenog mutagenog potencijala pri SARpy analizi. Iako je u molekulu Gp identifikovan SM 55 segment koji je povezan sa mutagenim potencijalom, niska SarPy/IRFMN procena pouzdanosti njegovog mutagenog potencijala javila se zbog dodatno identifikovanih segmenta sa nemutagenim potencijalom. Ipak, treba istaći da niska pouzdanost *in silico* procene nije nužno povezana sa uticajem koji može biti detektovan eksperimentalno. U prilog tome ide i činjenica da su rezultati prethodnih eksperimentalnih studija potvrdili da Gp može imati mutageni uticaj (134). Dodatno, model za procenu kancerogenosti IRFMN/ISSCAN-CGX, koji koristi veći broj baza kancerogenih molekula u odnosu na druge modele (33) i koga karakterišu visoka preciznost (75%) i senzitivnost (82,6%) (182), kao i model IRFMN/Antares, ukazali su na potencijalnu kancerogenost svih ispitivanih MRK, što je u skladu sa SA identifikovanim u svim molekulima. Model IRFMN/ISSCAN-CGX dao je veću pouzdanost procene kancerogenog uticaja, i označio La i Sm kao potencijalne kancerogene sa umerenom pouzdanošću, dok je kancerogeni potencijal Gp i Sw označio s visokom pouzdanošću.

In silico analiza ukazala je na dodatne SA prisutne u molekulima La i Gp, što je sugerisalo da MRK mogu izazvati različiti nivo genotoksičnog uticaja. Treba imati u vidu i činjenicu da razlike u strukturi molekula MRK mogu odraziti i na druge vidove bioaktivnosti. Osim toga, rezultati *in silico* analize ukazali su da je genotoksični potencijal koji je ispoljio EKG u testiranim koncentracijama možda uslovljen prisustvom MRK. Stoga je dalje analiza citotoksičnog i genotoksičnog uticaja MRK i EKG u odabranim eksperimentalnim uslovima, rađena na oba tipa ćelijski kultura.

Praćenje ćelijskog preživljavanja u kulturama PBMC i PHA-PBMC nakon primenjenih tretmana, pokazalo je da su MRK tretmani, koji su značajno smanjili preživljavanje PBMC, takođe, ispoljili citotoksični uticaj i na kulture PHA-PBMC. Nasuprot njima, EKG tretman koji je bio značajno citotoksičan za PBMC, u kulturama PHA-PBMC nije značajno uticao na promenu stope ćelijskog preživljavanja. Blaži uticaj EKG u odnosu na MRK, koji se uočava poređenjem ćelijskog

preživljavanja u dve različite kulture verovatno je posledica prisustva i drugih sekundarnih metabolita u EKG sem detektovanih MRK. Izraženiji toksični uticaj pojedinačnih komponenti uočen je i u studiji Balijagić i saradnika (2012), koji na osnovu rezultata svoga rada pokazali da se kod HeLa ćelija isti nivo citotoksičnosti postiže nakon tretmana EKG (41,1 µg/mL), kao i pri višestruko nižim koncentracijama Gp (5,7 µg/mL), sugerišući da ova razlika nastaje usled prisustva različitih sekundarnih metabolita u biljnim ekstraktima koji mogu ublažiti toksične efekte jedne komponente (126).

Razlika u ćelijskom preživljavanju u kulturama PBMC i PHA-PBMC nakon EKG tretmana, ukazuje da odgovor ćelija na tretman zavisi i od karakteristika ćelijske kulture. Naime sličan odgovor PHA stimulisanih ćelija u odnosu na nestimulisane kulture PBMC uočili su i Menković i saradnici (2010), pri izlaganju toksičnom agensu u prisustvu EKG (183). Bolje preživljavanje PHA stimulisanih ćelija u odnosu na nestimulisane kulture može nastati usled činjenice da su kulture PBMC skup terminalno diferenciranih ćelija, dok PHA stimuliše T ćelije prisutne u kulturama na deobu, čime se deo ćelija uklonjen delovanjem toksičnog agensa nadoknađuje, što se ogleda kao bolje preživljavanje. Istraživanje Carloni i saradnika (2001), pokazalo je da PHA stimulacija ćelija ne utiče samo na deobu i time na povećanje stope ćelijskog preživljavanja u odnosu na nestimulisane kulture PBMC, već je uočen i niži stepen aktiviranja procesa apoptoze u odnosu na nestimulisane kulture (184).

S obzirom da je intenzivna fragmentacija molekula DNK karakteristika ćelija u apoptozi (185), dalje je ispitivan njen nivo nakon izlaganja oba tipa kultura odabranom koncentracijom MRK i EKG. Povećana fragmentacija molekula DNK nakon svih tretmana u oba tipa ćelijskih kultura ukazala je na mogućnost aktiviranja ćelijske smrti tipa apoptoze. Fragmentacija molekula DNK intenzivnija je u kulturama PBMC u odnosu na PHA stimulisane, što je u skladu sa prethodno navedenim istraživanjem Carloni i saradnika (2001) (184). S druge strane, iako EKG tretman kultura PHA-PBMC nije značajno uticao na stopu ćelijskog preživljavanja, uočen je povećan nivo fragmentacije molekula DNK, koja je verovatno posledica pokretanja procesa apoptoze u manjem broju ćelija, ali i pojave oštećenja u molekulu DNK u ćelijama koje nisu ušle u proces apoptoze.

Kolorimetrijskom detekcijom fragmentacije molekula DNK detektuju se SSBs, DSBs nastali usled genotoksičnog uticaja, kao i oni nastali delovanjem endonukleaza u procesu degradacije molekula DNK koji prati apoptozu. Da bi se procenio doprinos genotoksičnog oštećenja izazvanog MRK tretmanima, dalje je ispitivan genotoksični potencijal MRK i EKG na kulturama PBMC alkalnim komet esejem, odnosno mikronukleusnim testom na kulturama PHA-PBMC. Tretman svim ispitivanim MRK ispoljio je značajan genotoksični potencijal u oba tipa ćelijskih kultura, dok je slično kao u testovima ćelijskog preživljavanja nakon EKG tretmana kultura PHA-PBMC genotoksični uticaj izostao. Manji stepen oštećenja u molekulu DNK, kao i bolje ćelijsko preživljavanje u kulturama PHA-PBMC koje je uočeno nakon EKG tretmana može nastati i usled razlike u sposobnosti popravke oštećenja u molekulu DNK terminalno diferenciranih i ćelija stimulisanih na deobu. Literaturni podaci ukazuju da PHA aktivira transkripciju gena uključenih u regulaciju ćelijskog ciklusa i u sisteme za popravku oštećenja u molekulu DNK (186). Naime, ispitivanje razlike nivoa transkripcije 45 gena između diferenciranih i limfocita stimulisanih na deobu, pokazalo je da je dvostruko povećan nivo transkripta za 12 gena, a među njima su geni koji kodiraju enzime za popravku DSBs, Ku70 i Ku80, kao i PARP i AP-endonukleaza, koji su uključeni u put popravke isecanjem baza (eng. *Base Excision Repair*, BER) i jednolančanih prekida u molekulu DNK (186). Osim toga, Hu i saradnici (2018), pokazali su da su terminalno diferencirani limfociti osetljiviji na oštećenja u molekulu DNK, jer nakon izlaganja toksičnom agensu i istog vremena oporavka, zadržavaju 40% više oštećenja od kontrolnih ćelija. Istovremeno, stimulisane ćelije nakon istog tretmana uspevaju da poprave nastala oštećenja (187). Mikronukleusnim testom ne mogu se detektovati oštećenja u molekulu DNK u ćelijama koje nisu završile deobni ciklus, tako da izostanak značajnog genotoksičnog uticaja EKG na PHA stimulisane ćelija može biti registrovan i usled zaostajanja ćelija u deobi. U PHA stimulisanim kulturama uočeno je smanjenje proliferativnog indeksa (CBPI), nakon svih tretmana uključujući i EKG

tretman. CBPI je parametar koji istovremeno ukazuje na smanjenje broja ćelija usled ćelijske smrti, kao i ćelija kod kojih je zaustavljen/produžen ćelijski ciklus (188). Smanjenje CBPI nakon svih primenjenih tretmana ukazuje na to da svi primenjeni tretmani imaju citotoksični i/ili antiproliferativni uticaja. Stoga je dalje protočnom citometrijom praćena distribucija ćelija po fazama ćelijskog ciklusa u kulturi PHA-PBMC nakon MRK i EKG tretmana. U kulturama PHA-PBMC nakon tretmana sa MRK povećava se distribucija ćelija u S fazi ćelijskog ciklusa u odnosu na kontrolu, što je praćeno smanjenjem udela ćelija u G₂ fazi nakon svih tretmana, što ukazuje na produženje S faze ćelijskog ciklusa. Prema literaturnim podacima, produženje S faze nastaje kao odgovor na oštećenja u molekulu DNK koje utiče na replikaciju dovodeći do sporijeg formiranja novih replikacionih viljušaka, kao i smanjenja brzine napredovanja formiranih replikacionih viljušaka, što dovodi do produžavanja S faze ćelijskog ciklusa (189). U S fazi ćelijskog ciklusa vrši se popravka DSBs mehanizmom HR, koji zahteva sekvencu DNK homologe sestrinske hromatide kao matricu za reparacionu sintezu (190). Aktiviranje HR zapaženo je u eksperimentima optimizacije uslova tretmana. Kako i nastanak mikronukleusa može biti posledica DBSs, moguće da je produženje S faze, nastalo usled aktiviranja sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK.

Praćenje distribucije ćelija u fazama ćeliskog ciklusa nakon 48 sati EKG tretmana, pokazalo je da iako postoji trend povećanja distribucije ćelija u S fazi, nema znaćajne razlike u odnosu na kontrolu, što je u skladu sa CBMN rezultatima mikronukleus testa. S druge strane EKG tretman kao i svi MRK tretmani utiče na manji broj ćelija u G₂ fazi, stoga je znaćajna promena CBPI verovatno odraz ukupanog smanjenja broja ćelija usled ćelijske smrti i manjeg broja ćelija koje su završile ćelijski ciklus. Literaturni podaci ukazuju da EKG i MRK tretmani mogu uticati na zaustavljanje ćelijskog ciklusa neoplastićno transformisanih ćelija (130, 177). Tako, Gp zaustavlja HeLa ćelije u taćki prelaska iz G₂ u M fazu ćelijskog ciklusa uz aktivaciju apoptoze (177). Sw u leukemijskim ćelijama dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklusa u S fazi i u taćki prelaska iz G₂ u M fazu i pokretanja apoptoze (130). S obzirom da 48 sati nakon PHA stimulacije ćelije završavaju prvu deobu (49), kao i da tretmani utiće na produženje S faze ćelijskog ciklusa, zaustavljanje ćelija u G₂ fazi ćelijskog ciklusa nije uoćeno u ovoj doktorskoj disertaciji.

MRK tretmani su ispoljili intenzivniji citotoksićni i genotoksićni uticaj u odnosu na EKG tretman, iako je kvantitativnom analizom EKG pokazano da ekstrakt sadri sve ispitivane MRK, pri ćemu je koncentracija Gp veća ćak 10 puta od odabrane za tretman u ovoj eksperimentalnoj postavci. Literaturni podaci takoće pokazuju da pojedinaćno primenjeni Gp ispoljava intenzivniji antitumorski uticaj u odnosu na ekstrakt lista *G. lutea* na HeLa ćelije, kod kojih pet puta manja koncentracija Gp postiće IC₅₀ vrednost u odnosu na ekstrakt *G. lutea*. U navedenom istraćivanju je u ekstraktu *G. lutea* identifikovana visoka koncentracija ksantona magniferina (126). Blaći uticaj EKG moće, upravo biti posledica i antagonistićkog delovanja komponenti kada su prisutne u smeši (191). Naime, pokazano je da pojedine komponente EKG poput ksantona i flavonoida ispoljavaju znatno veću antioksidativnu aktivnost i u odnosu na iridoide i sekoiridoide u koje spadaju ispitivane prisutne MRK (192, 193). Olennikov i saradnici (2019) ukazali su na izuzetnu sposobnost ksantona da neutrališu slobodne radikale u kompleksnim smešama kakvi su biljni ekstrakti u poređenju s monoterpenima. Naime, rezultati eksperimentalne studije pokazali su da Gp i La pokazuju nekoliko stotina puta manju aktivnost u odnosu na ksantone - izoorijentin i mangiferin (194). Magniferin je i u drugim istraćivanjima pokazao višestruko veću aktivnost u direktnom uklanjanju slobodnih radikala u odnosu na ispitivane MRK (111, 195). Stoga, s obzirom na izuzetnu sposobnost uklanjanja slobodnih radikala ostalih aktivnih komponenti EKG, moće se pretpostaviti da upravo one, ublaćavaju negativni uticaj Gp koji je prisutan u visokoj koncentraciji u EKG.

Dalje su uticaji tretmana na parametre oksidativnog stresa ispitivani u oba tipa ćelijskih kultura. Vrednosti PAB i LPP bile su znaćajno povećane jedino u kulturama PBMC nakon Gp tretmana, dok je nakon tretmana ostalim MRK uoćen trend povećanja ovih parametara, ali bez znaćajne razlike u odnosu na kontrolu. Prethodno navedeni literaturni podaci ukazuju da ispitivane MRK nemaju znaćajan kapacitet za direktno uklanjanje slobodnih radikala (174, 194), ali s druge

strane, mogu uticati na količinu i aktivnost enzima antioksidativne odbrane (113, 196, 197). Tako na primer, u *in vivo* eksperimentima Sm ispoljava hepatoprotektivni efekat u kotretmanu s toksinom CCl₄ smanjenjem nivoa MDA koji se ostvaruje aktiviranjem regulatornog proteina transkripcije Nrf 2, i posledičnom transkripcijom gena uključenih u antioksidativnu odbranu (113). S druge strane, pokazano je da frakcija ekstrakta plodova žute drenjine, koja sadrži La, reguliše antioksidativni status povećanjem aktivnosti CAT, GPx i GR u leukocitima pacova sa dijabetesom (196), dok u ćelijama kvasca, *Saccharomyces cerevisiae*, Gp povećava aktivnost CAT, SOD i GP_x, smanjuje nivo MDA i aktivira autofagiju i mitofagiju (197). Osim Gp tretmana kultura PBMC, ostali tretmani nisu uticali na promenu redoks homeostaze. Potvrda da li oksidativni stres u zadatim eksperimentalnim uslovima nije izazvan tretmanima ili je ublažen aktiviranjem antioksidativne odbrane zahteva dodatna istraživanja.

Duthie i saradnici (1997) pokazali su da osetljivost molekula DNK na oksidativna oštećenja nije jednosmerno povezana sa vrednostima nivoa antioksidativnih enzima, kao ni redoks statusom u ispitivanim ćelijama. Na ovaj zaključak navodi činjenica da su autori ovog rada detektovali maksimalnu vrednost glutationa (GSH), unutarćelijskog reduktanta, u vreme kada su ćelije pokazale najviši stepen oštećenja u molekulu DNK (198). Stoga, iako drugi ispitivani parametri oksidativnog stesa nisu bili bitnije izmenjeni, da bi se ispitao uticaj tretmana i na oksidativna oštećenja u molekulu DNK, praćene su vrednosti parametra oksidativnog oštećenja - 8-oxodG. Nakon svih tretmana u obe kulture 8-oxodG bio je značajno smanjen u odnosu na kontrolu, sa izuzetkom kulture PHA-PBMC nakon EKG tretmana kod koje je 8-oxodG bio u nivou kontrole. Uočeno smanjenje 8-oxodG u ovoj eksperimentalnoj postavci, može nastati usled aktiviranja 8-oxodG DNK glikozilaze (eng. *8-Oxoguanine DNA Glycosylase*, OGG 1), s obzirom da je ovaj enzim uključen u procese bazne ekscizije reparacije (199). Iako je aktivacija OGG 1 povezivana sa oksidativnim stresom ćelije (200), u njegovu aktivaciju mogu biti uključeni i drugi signali. Pokazano je da je u prisustvu MMS nivo ekspresije gena *OGG 1* veći nego u prisustvu peroksida kao oksidativnog agensa (201). Rezultati *in silico* analize ukazali su da MRK poseduju grupe koje mogu biti uključene u alkiliranje baza, što može predstavljati signal za aktivaciju OGG 1 i smanjenja 8-oxodG koje je uočeno u ovoj eksperimentalnoj postavci. Takođe, Von der Lippen i saradnici (2015) su pokazali da PHA stimulisane kulture imaju povećan nivo ekspresije gena *OGG 1* već šest sati nakon stimulacije, što bi moglo uticati na veću prisutnost enzima koji uklanja 8-oxodG (202). S obzirom na prethodno detektovani citotoksični uticaj tretmana, potencijalna aktivacija OGG 1, može biti povezana i sa dodatnim oštećenjem ćelija, posebno uzimajući u obzir da EKG tretman u PHA-PBMC koji nije pokazao citotoksičan uticaj, takođe, ne utiče na smanjenje nivoa 8-oxodG. Naime, OGG 1 svojim delovanjem ostavlja apurinsko/apirimidinsko mesto (AP) koje aktivnošću AP-endonuleaze biva pretvoreno u jednolančani prekid molekula DNK (203). Ukoliko se proces popravke modifikovanih baza ne dovrši, što može nastati usled energetskog iscrpljivanja ćelije, ove promene mogu predstavljati signal za aktiviranje ćelijske smrti (204, 205).

Na osnovu promena ispitivanih parametara nastalih usled uticaja MRK i EKG tretmana u kulturama PBMC i PHA-PBMC može se zaključiti da svi MRK tretmani u oba tipa ćelijske kulture utiču na povećanje genotoksičnog stresa. Visok nivo fragmentacije molekula DNK nakon primenjenih tretmana ukazao je da oni svoj citotoksični uticaj mogu ispoljavati aktiviranjem ćelijske smrti tipa apoptoze. *In silico* analiza ukazala je na grupu istih SA koji se javljaju u svim ispitivanim MRK, koji su verovatno odgovorni za genotoksične uticaje, usled mogućnosti da interaguju s nukleofilnim centrima molekula DNK shodno svojim elektrofilnim osobinama. Gp, koji u odnosu na ostale MRK poseduje dodatne SA 13 i SM 55, pokazao je viši genotoksični potencijal i jedini je uticao na promenu redoks homeostaze kultura PBMC. Sw koji nije imao dodatne SA, a koji je bio procenjen s visokom sigurnošću kao kancerogen je, takođe, uticao značajno na citotoksičnost i genotoksičnost u poređenju sa La i Sm. Primenjeni tretmani aktivirali su sisteme za popravku oštećenja u molekulu DNK, od kojih je direktno potvrđena HR nakon EKG tretmana u eksperimentima optimizacije uslova tretmana. Takođe, uočeno je indirektno aktiviranje BER, usled smanjenja nivoa 8-oxodG nakon svih tretmana u kulturama PBMC i MRK tretmana u

kulturama PHA-PBMC. Uticaji tretmana bili su intenzivnije ispoljeni u terminalno diferenciranim kulturama PBMC. Takođe je uočen blaži uticaj EKG tretmana na promenu ispitivanih parametara u poređenju s uticajem koji ispoljavaju MRK. Razlika u uticaju EKG u odnosu na MRK tretmane posebno se ogleda u intenzitetu bioloških odgovora kultura PBMC i PHA-PBMC izloženim EKG tretmanu čiji se uticaj nije značajano odrazio na većinu ispitivanih parametara u kulturama PHA-PBMC, verovatno usled aktivnosti drugih sekundarnih metabolita koji mogu biti prisutni u EKG.

Mehanizam kojim se ćelije štite od oštećenja u molekulu DNK u uslovima genotoksičnog stresa, pored aktiviranja mehanizama za njihovu popravku, uključuje i aktiviranje ćelijske smrti kada se oštećene ćelije uklanjaju apoptozom ili drugim tipova regulisane ćelijske smrti, koje su za razliku od apoptoze praćene inflamacijom i negativanim uticajem na neizmenjene ćelije (41, 206). Dalje je, stoga, ispitan tip ćelijske smrti kojim se uklanjaju oštećene ćelije nakon MRK i EKG tretmana.

Dualnim fluorescentnim bojenjem mitohondrija u živim, kao i jedara u ćelijama koje su u procesu umiranja, kod ćelija oba tipa kultura nakon MRK i EKG tretmana, pored metabolički aktivnih ćelija, uočeno je prisustvo ćelija sa morfološkim karakteristikama apoptoze, kao što su kondenzacija hromatina i fragmentisana jedra. Takođe, detektovane su i ćelije sa narušenom permeabilnošću membrane koja može dovesti do smrti ćelija različite od apoptoze. Promene morfoloških karakteristika ćelija nakon MRK i EKG tretmana ukazale su da tretmani ne aktiviraju selektivno apoptozu, već da postoje i naznake drugih tipova ćelijske smrti, poput nekroze/nekroptoze. Da bi se potvrdilo da su uočene morfološke promene nastale aktivacijom apoptoze, kao i da li nekrotični fenotip nastaje usled aktivacije regulisane smrti tipa nekroptoze, ispitan su nivoi proteina koji uključeni u regulaciju ovih tipova ćelijske smrti. Uzimajući u obzir eksperimentalno dokazanu činjenicu o postojanju relacije ERK1/2 i proteina Bcl 2 (148), kao i da oslobađanje proteina Bax iz heterodimera sa proteinom Bcl 2 omogućava formiranje oligomera u mitohondrijalnoj membrani i pokretanje kaspazno-zavisne apoptoze (207), analiziran je nivo ERK1/2, Bax i Bcl2 nakon tretmana MRK i EKG u oba tipa kultura.

U ovoj doktorskoj disertaciji pokazano je da svi tretmani u oba tipa ćelijskih kultura povećavaju nivo pERK1/2, koji je intenzivniji u kulturama PBMC u kojima su tretmani ispoljili viši nivo citotoksičnosti u odnosu na kulture PHA-PBMC. Takođe, nivo pERK1/2 nakon MRK tretmana u obe kulture bio je povećan u odnosu na EKG tretman, koji je takođe ispoljio manju citotoksičnost. Iako je uloga ERK1/2 prevashodno povezana s ćelijskim preživljavanjem kroz aktivaciju antiapoptotskih proteina, pre svega Bcl 2 (208), u određenim uslovima ERK1/2 aktivacija može aktivirati ćelijsku smrt tipa apoptoze, autofagije ili dovesti do senescencije (209). Uloga ERK1/2 u aktivaciji ćelijske smrti objašnjena je uticajem na promenu permeabilnosti mitohondrijalne membrane i oslobađanje cit c (210, 211). Sipieter i saradnici (2021) pokazali su da u fibroblastima u kojima je aktivirana TNF-posredovana nekroptoza, ERK1/2 pospešuje ovaj tip ćelijske smrti aktiviranjem sinteze IL-6, dok u uslovima hFasL-posredovane apoptoze, odlaže ćelijsku smrt (212). Ovi rezultati ukazuju da aktivirani ERK može ispoljiti dualni uticaj u zavisnosti od već pokrenutih procesa u ćeliji. Takođe, pokazano je da ERK1/2, paralelno sa drugim regulacionim mehanizmima u uslovima kada je ćelija izložena genotoksičnom stresu, ima ulogu u zaustavljenju ćelijskog ciklusa pri umerenim oštećenjima, dok pri intenzivnim oštećenjima u molekulu DNK ima sposobnost da aktivira i proces apoptoze (93). Primećeno je da nivo njegove aktivne forme, zavisi od nivoa oštećenja u molekulu DNK (93). Nakon primenjenih MRK tretmana koji su imali izraženiji citotoksični uticaj u odnosu na EKG, uočena je intenzivnija fosforilacija ERK1/2. Takođe, nivo pERK1/2 bio je viši u kulturama PBMC u odnosu na kulture PHA-PBMC, u kojima su svi tretmani u većoj meri smanjili stopu ćelijskog preživljavanja. Na kraju, aktivacija ERK1/2 prati obrazac koji je pokazan u literaturnim podacima kada su kulture izložene jačem genotoksičnom agensu.

Na stvaranje uslova za aktivaciju kaspazno-zavisne apoptoze ukazuju i promene odnosa ispitivanih pro- i antiapoptotskih proteina. Naime u kulturama PBMC nakon tretmana s La, Sm i EKG, nivo proteina Bcl 2 nije bio promenjen u odnosu na kontrolu, dok je nakon Gp i Sw tretmana, koji su ispoljili intenzivniji citoksični uticaj bio značajno niži. Nivo ekspresije protein Bax je nakon svih tretmana bio značajno povišen u odnosu na kontrolu što je uslovalo porast odnosa Bax/Bcl 2 nakon svih tretmana kultura PBMC. Nakon MRK tretmana kultura PHA-PBMC, nivo proteina Bcl 2 značajno raste, ali istovremeno raste i nivo proteina Bax, kao i odnos Bax/Bcl 2. Ovakav obrazac ekspresije proteina Bcl 2 i Bax ukazuje da je i kod ovih kultura aktivirana apoptototska kaskada. Uočeni odnos proapoptotskih i antiapoptotskih proteina Bcl2 familije proteina sugerise da se u kulturama u kojima su tretmani ispoljili citotoksični uticaj, signalna regulacija apoptoze odvija preko promene na mitohondrijalnoj membrani, dok je blago povećanje nivoa proteina Bcl 2, verovatno, posledica manje osetljivosti ovih ćelija na aktiviranje apoptoze, što je prethodno pokazano u studiji Carloni i saradnika (184). Literaturni podaci o *in vitro* antitumorskom efektu MRK tretmana, ukazuju da pojedine ispitivane MRK, usled promene nivoa proteina Bax i Bcl 2 aktiviraju apoptozu. Tako je pokazano da Gp tretman povećava nivo proteina Bax i smanjuje nivo proteina Bcl 2 u ćelijskim kulturama tumora jajnika i kolona (176, 213), dok Sw indukuje apoptozu u ćelijama glioblastoma (214). Treba istaći da EKG tretman kulture PHA-PBMC nije doveo do promene nivoa ispitivanih proteina Bcl 2 familije, kao ni do promene njihovog odnosa, što ide u prilog pretpostavci da jedinjenja različita od ispitivanih MRK, koja su takođe prisutna u ekstraktu, ispoljavaju protektivni uticaj.

Poznato je da povećanje nivoa ekspresije proteina Bax, kao i pomeranje Bax/Bcl 2 ravnoteže ukazuje na aktiviranje apoptoze, stoga je dalje analiziran nivo prokaspaze 3 i fragmenta koji nastaju pri formiranju aktivne forme ovog enzima (sečena kaspaza 3). Detektovan je nepromenjen nivo prokaspaze 3, dok je nakon svih tretmana u kulturama PBMC zabeleženo značajno povećanje količine njenih sečenih fragmenata, ukazujući da je citotoksičnost MRK i EKG tretmana nastala usled aktiviranja kaspazno-zavisne apoptoze. U kulturama PHA-PBMC nakon MRK tretmana su, takođe, detektovani sečeni fragmenti kaspaze 3, izuzev EKG tretmana, što je u skladu sa detektovanom stopom ćelijskog preživljavanja. Kako u ranoj fazi apoptoze, aktivirana kaspaza 3 seče PARP 1 (116 kDa) na fragmente od 89 kDa i 24 kDa (215, 216), detektovani fragment od 89 kDa predstavlja dodatnu potvrdu da se ćelijska smrt, aktivirana tretmanima korišćenim u eksperimentalnoj postavci ove doktorske disertacije, odvija na kaspazno-zavisan način.

Osim toga, uočeno je i povećanje nivoa proteina PARP 1 molekulske mase 116 kDa nakon svih primenjenih tretmana. Los i saradnici (2002) degradaciju PARP 1 delovanjem kaspaze 3 objasnili su kao proces kojim ćelija omogućava zadržavanje nivoa ATP koji je neophodan za izvršenje apoptoze. Povećana aktivnost PARP 1 dovodi do deplecije NAD^+ i ATP i može se smatrati uslovom opredeljenja ćelije u načinu umiranja (217, 218). Povećana aktivnost proteina PARP 1 povećava sintezu poli (ADP-riboza) - PAR, čime stvara uslove za translokaciju AIF u jedro i pokreće regulisanu ćelijsku smrt tipa partanatoze (eng. *parthanatos*), koja je nezavisna od aktivacije kaspaza. Osim toga pokazano je i da je protein PARP 1 uključen u puteve popravke oštećenja u molekulu DNK (219, 220). U ovoj eksperimentalnoj postavci povećana aktivnost proteina PARP 1 može biti povezana sa sa uočenim smanjenjem nivoa 8-oxodG nakon MRK i EKG tretmana. Takođe, pokazano je da aktivirani OGG 1 u direktnoj interakciji sa proteinom PARP 1 može da stimuliše njegovu poli(ADP-ribozil)acionu aktivnost (221). Objašnjenje za promene nivoa 8-oxodG i proteina PARP 1 (116 kDa), dato je u rezultatima studije Wang i saradnika (2018), koji su pokazali da aktivirani OGG 1-BER dovodi do prekomerne aktivacije PARP 1 i smrti ćelije po tipu partanatoze (222). Morfološke karakteristike partanatoze, kao što su kondenzacija hromatina, fragmentacija jedarne DNK velikih razmera, nedostatak apoptotskih tela i malih fragmenata DNK, gubitak integriteta membrane (223), uočene su nakon primenjenih tretmana pri analizi TMRE/DAPI obojenih ćelija. Stoga deo prethodno detektovanih promena u kulturama nakon primenjenih tretmana, uključujući i povećanje nivoa proteina PARP 1 molekulske mase 116 kDa nakon svih

primenjenih tretmana, indirektno ukazuje na mogućnost aktiviranja ćelijske smrti partanatoze, ali se bez dodatnih ispitivanja ne može pouzdano zaključiti da li se radi o ćelijama koje su u ranim stadijumima apoptoze ili partanatoze.

Tokom izrade ove doktorske disertacije osim ćelija s apoptotskim karakteristikama uočene su i ćelije sa nekrotičnim/nekroptičnim fenotipom. Stoga je dalje bio ispitivan uticaj tretmana na promenu nivoa proteina MLKL za koji je prethodno pokazano da učestvuje u završnom koraku regulacije nekroptoze. Pokazano je da, oligomeri fosforilisanog MLKL nakon premeštanja u citoplazmatsku membranu omogućavaju formiranje pora, depolarizaciju i smrt ćelije (82). Naime, u PBMC kulturama nakon Gp/Sm tretmana uočen je povećani nivo fosforilisane forme MLKL, kao i povećanje odnosa pMLKL/tMLKL, koje ukazuje na značajnu aktivaciju ispitivanog proteina. S druge strane, u kulturama PHA-PBMC nakon Sm tretmana, smanjen nivo tMLKL, praćen manjim povećanjem pMLKL, iako pojedinačno statistički neznačajni, uticali su na povećanje odnosa pMLKL/tMLKL. Promena odnosa pMLKL/tMLKL ukazala je da je aktivacija i propagacija nekroptoze, u zadatim eksperimentalnim uslovima, moguća. Nekroptoza, generalno, može biti pokrenuta raznim stimulusima uključujući TNF α (224), Fas ligand (225), dvolančane molekule RNK (dsRNA) (226), interferon- γ (IFN- γ) (227), nizak nivo NAD⁺ (228), oslobađanje DAMPs (81) i druge. S obzirom na odabrane eksperimentalne uslove u ovoj eksperimentalnoj postavci, signal za pokretanje nekroptoze je verovatno nizak nivo NAD⁺, koji može pratiti izlaganje ćelija toksičnom agensu (229, 230). Pored očekivano niskog nivoa NAD⁺ u ćelijama izloženim genotoksičnom stresu, kulture PBMC su usled Gp tretmana izložene i dodatnom oksidativnom stresu, koji je takođe identifikovan kao mogući signal za pokretanje nekroptoze (231, 232). Uočene nekroptične promene nakon tretmana, mogu se objasniti i aktivacijom ERK1/2 i njime posredovanom stimulacijom ćelija da luče IL-6 čime se dodatno aktivira nekroptoza u ćelijama kod kojih je već pokrenut ovaj tip ćelijske smrti (212). Treba istaći da je Sm tretman, nasuprot Gp tretmanu, manje citotoksičan, genotoksičan i nije uticao na promenu PAB vrednosti, i stoga se može pretpostaviti da je uočeno povećanje pMLKL u najvećoj meri posledica niskog nivoa NAD⁺, kojim se favorizuje nekroptoza u ćelijama koje nemaju dovoljni energetska nivo za pokretanje apoptoze (217).

Predstavljeni rezultati nivoa proteina uključenih u regulaciju apoptoze ukazuju da tretmani pokreću narušavanje permeabilnosti mitohondrijalne membrane, pomeraju fino regulisanu reostat ravnotežu između pro- i antiapoptotskih članova Bcl 2 familije proteina ka proapoptotskim, kao i da proces započet promenama na mitohondrijalnoj membrani završava kaspazno-zavisnom apoptozom. To je potvrđeno uočenim povećanjem nivoa sečene kaspaze 3 i PARP 1 89 kDa. Paralelno, detektovani nekrotični/nekroptični fenotip ćelija i povećan nivo proteina pMLKL detektovan nakon Gp/Sm tretmana ukazuju da ovi tretmani u kulturama PBMC, u određenoj meri, mogu aktivirati i signalni put nekroptoze verovatno usled niskog nivoa NAD⁺ i uočene aktivacije ERK1/2 koja može dodatno propagirati nekroptozu. Sumarno, dobijeni rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na aktiviranu kaspazno-zavisnu apoptozu nakon svih primenjenih tretmana koji su ispoljili citotoksični uticaj, kao i da Gp/Sm tretmani aktiviraju nekroptozu. To je razlog što je poslednjoj grupi eksperimenata ispitivana selektivnost odgovora ćelija obe kulture na odabrane tretmane praćenjem nivoa regulatornih molekula nekroptoze i kaspazno-zavisne apoptoze u prisustvu inhibitora ispitivanih tipova ćelijske smrti.

Praćenje ćelijskog preživljavanja u kotretmanu MRK/EKG u prisustvu inhibitora nekroptoze (nec), apoptoze (zvad) i oba inhibitora, u odnosu na odgovarajuću kontrolu pokazalo je da su tretmani zadržali citotoksični uticaj koji je prethodno uočen i bez prisustva inhibitora. Viši stepen ćelijskog preživljavanja u prisustvu inhibitora prethodno je pokazan u uslovima kada ispitivana jedinjenja na specifičan način aktiviraju ili inhibiraju molekule uključene u regulaciju ćelijske smrti (97, 233). Iako literaturni podaci sugerišu da MRK mogu da interaguju sa proteinom Bcl 2 i da na taj način usmeravaju ćeliju ka apoptozi (128), takav uticaj može samo doprineti apoptozi koja je pre svega uzokovana oštećenjima u molekulu DNK, i ne predstavlja faktor koji bi uslovio selektivnost procesa apoptoze. Uočeni obrazac ćelijskog preživljavanja nakon MRK i EKG kotretmana sa inhibitorima apoptoze i nekroptoze ukazao je da je aktivirani tip ćelijske smrti

neselektivan, odnosno da su oštećene ćelije uklonjene tipom ćelijske smrti koji nije blokiran. Značajno viša stopa ćelijskog preživljavanja uočena nakon Gp/Sm kotretmana sa oba inhibitora u odnosu na tretmane bez inhibitora, ukazala je na mogućnost promene tipa ćelijske smrti u slučaju blokiranja primarno aktiviranog, odnosno da se blokiranjem nekroptozne signalizacije, aktivira signalizacija karakteristična za apoptozu, i obratno. Upotreba inhibitora za određeni tip ćelijske smrti može doprineti potenciranju drugog tipa ćelijske smrti, kao što je pokazano u drugim studijama (234, 235). Stoga je dalje uticaj inhibitora ćelijske smrti na zamenu jednog tipa ćelijske smrti drugim, analiziran praćenjem nivoa proteina uključenih u regulaciju apoptozne i nekroptozne kaskade u Gp/Sm kotretmanu s inhibitorima. Kotretman Gp/Sm sa nec, u kulturama PBMC paralelno je povećao nivo tMLKL i smanjio pMLKL koji su odgovorni za uočeno smanjenje pMLKL/tMLKL odnosa. Paralelno, ovaj tretman uzokovao je i povećanje nivoa kako sečene kaspaze 3, tako i PARP 1 89 kDa. S obzirom da su nivoi sečenih fragmenata kaspaze 3 i sečene forme PARP 1 bili povećani, a da se nije povećalo preživljavanje ćelija nakon Gp/Sm+nec tretmana, može se pretpostaviti da je upravo, u zadatim eksperimentalnim uslovima u ovoj doktorskoj disertaciji, kaspazno-zavisna apoptoza mehanizam kojim se uklanjaju oštećene ćelije. Što se tiče promene nivoa proteina tMLKL, može se pretpostaviti da on u ovim uslovima ostvaruje ulogu nezavisnu od regulacije nekroptoze. Literaturni podaci ukazuju da MLKL može učestvovati u endozomalnom transportu, kao i formiranju ekstracelularnih vezikula čiji je transport olakšan aktivnošću RIP 3 kinaze (236). S obzirom da je pokazano da nekrostatin 1 stabilizuje RIP 1 u neaktivnoj konformaciji vezivanjem u regionu aktivacione petlje (86), i time sprečava nishodni prenos signala i aktiviranje RIP 3 (237), moguće je da deo formiranih vezikula ostaje zarobljen u ćeliji i da na taj način dovodi do povećanja tMLKL. S druge strane, nakon Gp/Sm kotretmana sa inhibitorom apoptoze, zvad, uočeno je povećanje nivoa pMLKL, kao i pMLKL/tMLKL odnosa, a paralelno je izostala promena nivoa sečene kaspaze 3, kao i PARP 1 89 kDa, što ukazuje na postojanje uslova za pokretanje procesa nekroptoze i zaustavljenje kaspazno-zavisne apoptoze. Poznato je da zvad inhibira kaspazu 8, što je događaj koji je neophodan za RIP 1-posredovano formiranje nekroptozoma, kao i da pospešuje autokrinu sekreciju TNF- α kao dodatnog signala za aktivaciju signalnog puta nekroptoze (226, 238), čime se mogu objasniti uočene promene u eksperimentalnoj postavci ove doktorske disertacije. Kotretman Gp/Sm sa oba inhibitora ne menja nivo ispitivanih proteina uključenih u regulaciju apoptoze i nekroptoze. Iako su primenjeni inhibitori pojedinačno uticali na promenu tipa ćelijske smrti promovišući aktivaciju one koja nije blokirana, u prisustvu oba inhibitora uočeno je povećanje ćelijskog preživljavanja u odnosu na tretmane bez inhibitora, što ukazuje da su primenjeni Gp/Sm tretmani u aktivirali ova dva tipa ćelijske smrti. S druge strane kako u ovom kotretmanu preživljavanje ćelija nije bilo značajno više u odnosu na odgovarajuću kontrolu (K nec+zvad), može se zaključiti da Gp i Sm tretmani ne ispoljavaju selektivni uticaj na aktiviranje ćelijske smrti i da se u oštećenim ćelijama aktivira i neki drugi tip regulisane smrti. Paralelno, u kulturama PHA-PBMC nakon Gp/Sm kotretmana sa nec, zabeležen je sličan obrazac promene nivoa proteina uključenih u regulaciju ćelijske smrti kao u kulturama PBMC uz odsustvo promene nivoa MLKL proteina, što ukazuje da se i u ovoj kulturi ćelije umiru kaspazno-zavisnom apoptozom. U tretmanima bez inhibitora, nivo proteina PARP 1 116 kDa bio je viši u odnosu na kontrolu u oba tipa ćelijskih kultura dok je u prisustvu inhibitora apoptoze i nekroptoze nije uočena promena u odnosu na kontrolu. Pokazano je da inhibitori nec i zvad mogu uticati i na smanjenje aktivacije PARP 1 (235), kao što je uočeno i u ovoj disertaciji.

Predstavljenih rezultati zastupljenosti proteina uključenih u regulaciju ćelijske smrti apoptozom i nekroptozom u prisustvu inhibitora ova dva tipa ćelijske smrti ukazuju da Gp/Sm tretmani ispoljavaju citotoksični uticaj aktivirajući kaspazno-zavisnu apoptozu i nekroptozu, koje su praćene i drugim tipom ćelijske smrti. Prisustvo inhibitora jednog tipa ćelijske smrti promovise neblokirani tip ćelijskog umiranja izazvanog tretmanom.

Dobijeni rezultati uticaja MRK i EKG tretmana praćenjem ćelijskog preživljavanja u prisustvu inhibitora pokazali su odsustvo selektivne aktivacije ispitivanih tipova ćelijske smrti. Nakon svih tretmana oštećene ćelije se uklanjaju neblokiranim tipom ćelijske smrti kao što je

pokazano analizom nivoa proteina nakon Gp/Sm tretmana u prisustvu inhibitora, ali i mogućim pokretanjem drugih tipova regulisane ćelijske smrti koji nisu praćeni u ovoj eksperimentalnoj postavci. S obzirom na uočeni genotoksični potencijal tretmana, kao i moguće aktiviranje ćelijske smrti koja je praćena inflamacijom, primena MRK u visokim koncentracijama kao fitofarmaceutika uticala bi paralelno i na oštećenje neizmenjenih ćelija. Opravdana upotreba MRK, stoga zahteva procenu odnosa korist/šteta ili primenu kod stanja u kojima ćelije sa patološkim promenama ispoljavaju povećanu senzitivnost prema tretmanu u odnosu na zdrave ćelije. Mogućnost aktivacije nekroptoze razmatra se kao vid alternativnog tretmana neoplastično transformisanih ćelija kod kojih je blokirana mogućnost aktivacije kaspaza. Povećanje selektivnosti tretmana može se postići kombinovanom terapijom s drugim lekovima, koji bi propagirali aktivaciju nekroptoze (239). Iako EKG tretman ispoljava citotoksični i genotoksični potencijal u zavisnosti od doze i vremena izlaganja u kulturama PBMC, on takođe aktivira mehanizme popravke oštećenja u molekulu DNK i indukuje ćelijsku smrt. Stoga u literaturi opisani protektivni uticaj EKG može biti rezultat aktiviranih sistema za popravku oštećenja u molekulu DNK kao i uklanjanja ćelija čija oštećenja prevazilaze kapacitete popravke. S obzirom da su ispitivane MRK ispoljile intenzivniji uticaj od EKG tretmana, trebalo bi ispitati da li obogaćivanje EKG ksantonima i flavonoidima pri procesu ekstrakcije može uticati na postizanje veće sigurnosti i efikasnosti primene EKG. Neophodno je istaći da rezultati ove doktorske disertacije ne osporavaju blagotvorno dejstvo EKG primenjenog u manjim dozama i u kraćem vremenskom periodu, već da neadekvatna priprema i primena lako dostupnog biljnog preparata može imati i štetne posledice.

6. ZAKLJUČAK

Razumevanje regulacije i mogućnosti promene tipa programirane na regulisanu ćelijsku smrt usled ukrštenih puteva regulacije, uočene nakon tretmana primarnih humanih ćelija sa MRK i EKG, može obezbediti dodatna saznanja o mogućim rizicima pri njihovoj primeni, ali i otvoriti mogućnosti njihovog korišćenja u novim terapijskim pristupima.

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske disertacije i dobijenim rezultatima izvedeni su sledeći zaključci:

1. Step en citotoksičnosti i genotoksičnosti EKG zavisi od koncentracije i vremena ekspozicije tretmanu, kao i od karakteristika ćelijske kulture.
2. Citotoksični uticaj MRK nastaje usled genotoksičnih oštećenja i promene dinamike ćelijskog ciklusa.
3. Morfološke promene karakteristične za proces apoptoze u oba tipa ćelijskih kultura nakon MRK tretmana, kao i EKG tretmana u kulturi PBMC, mogu se povezati s povećanim nivoom fragmentacije molekula DNK, kao i sa promenama u nivoima ekspresije ispitivanih proteina uključenih u regulaciju kaspazno-zavisne apoptotske kaskade. Dodatno, kod pojedinih ćelija uočeni gubitak permeabilnosti membrane može se povezati i sa pokretanjem drugih tipova regulisane ćelijske smrti, uključujući i nekroptozu koja je u zadatim eksperimentalnim uslovima indikovana povećanjem pMLKL nakon Gp i Sm tretmana kultura PBMC.
4. Obrazac ćelijskog preživljavanja nakon MRK/EKG kotretmana sa inhibitorima apoptoze i nekroptoze ukazuje na neselektivnost ćelijske smrti, odnosno da oštećene ćelije umiru tipom ćelijske smrti koji nije blokiran. Nivo ispitivanih proteina ključnih za završne korake apoptoze i nekroptoze, potvrdili su da Gp/Sm tretmani u prisustvu inhibitora apoptoze i nekroptoze zadržavaju citotoksični potencijal usled opredeljenja ćelija za neblokiran tip ćelijske smrti.

7. LITERATURA

1. Goraya G, Ved D. Medicinal plants in India: an assessment of their demand and supply. Dehradun: Ministry of AYUSH. 2017.
2. Organization WH. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019: World Health Organization; 2019.
3. Saad B, Zaid H, Shanak S, Kadan S. Introduction to medicinal plant safety and efficacy. Anti-diabetes and anti-obesity medicinal plants and phytochemicals: Springer; 2017. p. 21-55.
4. Tapsell LC, Hemphill I, Cobiac L, Sullivan DR, Fenech M, Patch CS, et al. Health benefits of herbs and spices: the past, the present, the future. 2006.
5. Abualhasan M, Jaradat N, Sawaftah Z, Mohsen H, Najjar D, Zareer W. Evaluation of heavy metals and microbiological contamination of selected herbals from Palestine. Open Life Sciences. 2019;14(1):448-53.
6. Rai V, Kakkar P, Singh J, Misra C, Kumar S, Mehrotra S. Toxic metals and organochlorine pesticides residue in single herbal drugs used in important ayurvedic formulation–‘Dashmoola’. Environmental monitoring and assessment. 2008;143(1):273-7.
7. Jarić S, Mačukanović-Jocić M, Djurdjević L, Mitrović M, Kostić O, Karadžić B, et al. An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). Journal of ethnopharmacology. 2015;175:93-108.
8. Rossi M, Fisogni A, Galloni M. Biosystematic studies on the mountain plant *Gentiana lutea* L. reveal variability in reproductive traits among subspecies. Plant Ecology & Diversity. 2016;9(1):97-104.
9. Stevanović V, Jakovljević K. Distribution, Ecology, and Some Taxonomical Notes of the Genera *Gentiana* L. and *Gentianella* Moench (*Gentianaceae*) in the Balkans. The *Gentianaceae*-Volume 1: Characterization and Ecology: Springer; 2014. p. 169-200.
10. HEALTH BENEFITS TIMES. Gentian. Dostupno na URI: <https://www.healthbenefitstimes.com/gentian/>
11. Vienna C, Graz R, Hoheheim R, Milano D, Trieste A, Wien K. Assessment of plants/herbs, plant/herb extracts and their naturally or synthetically produced components as “additives” for use in animal production. CFT/EFSA/FEEDAP; 2005.
12. Akbar S. *Gentiana lutea* L.(*Gentianaceae*). Handbook of 200 Medicinal Plants: Springer; 2020. p. 955-62.
13. Stevanović V. Crvena knjiga flore Srbije 1. Isčezli i krajnje ugroženi taksoni–Ministarstvo za životnu sredinu republike Srbije, Beograd. 1999:380-2.
14. Radanović D, Marković T, Antić-Mladenović S. Production of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) nursery plants suitable for transplanting and cultivation under dry farming conditions in mountain region of Serbia. Ratarstvo i povrtarstvo. 2013;50(3):13-21.
15. INSTITUT "DR JOSIF PANČIĆ". LINCURA (*Gentiana lutea* L.). Dostupno na URL: <https://www.mocbilja.rs/lincura-gentiana-lutea/>
16. Biehlmann M, Nazaryan S, Krauss E, Ardeza MI, Flahaut S, Figueredo G, et al. How Chemical and Sensorial Markers Reflect Gentian Geographic Origin in Chardonnay Wine Macerated with *Gentiana lutea* Roots? Foods. 2020;9(8):1061.
17. Vukajlović I, Bogdanović M. Promet i potrošnja gotovih lekova za humanu upotrebu u Republici Srbiji u 2019. godini. Beograd: Agencija za lekove i medicinska sredstva Republike Srbije. 2020. (Dostupno na URL: https://www.alims.gov.rs/ciril/files/2021/07/PPL_2019.pdf)
18. Bhattacharya A. High-temperature stress and metabolism of secondary metabolites in plants. Effect of High Temperature on Crop Productivity and Metabolism of Macro Molecules; Elsevier: London, UK. 2019:391-484.
19. Xu Y, Li Y, Maffucci KG, Huang L, Zeng R. Analytical methods of phytochemicals from the genus *Gentiana*. Molecules. 2017;22(12):2080.
20. Carnat A, Fraisse D, Carnat AP, Felgines C, Chaud D, Lamaison JL. Influence of drying mode on iridoid bitter constituent levels in gentian root. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2005;85(4):598-602.

21. Mudrić J, Janković T, Šavikin K, Bigović D, Đukić-Ćosić D, Ibrić S, et al. Optimization and modelling of gentiopicroside, isogentisin and total phenolics extraction from *Gentiana lutea* L. roots. *Industrial Crops and Products*. 2020;155:112767.
22. TCI CHEMICALS. Application. Dostupno na URL: <https://www.tcichemicals.com/AT/en/support-download/tcimail/application/161-18>
23. Wang C, Gong X, Bo A, Zhang L, Zhang M, Zang E, et al. Iridoids: research advances in their phytochemistry, biological activities, and pharmacokinetics. *Molecules*. 2020;25(2):287.
24. Wu S, Ning Y, Zhao Y, Sun W, Thorimbert S, Dechoux L, et al. Research Progress of Natural Product Gentiopicroside-a Secoiridoid Compound. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2017;17(1):62-77.
25. Aberham A, Pieri V, Croom Jr EM, Ellmerer E, Stuppner H. Analysis of iridoids, secoiridoids and xanthenes in *Centaurium erythraea*, *Frasera caroliniensis* and *Gentiana lutea* using LC-MS and RP-HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;54(3):517-25.
26. Mustafa AM, Caprioli G, Ricciutelli M, Maggi F, Marín R, Vittori S, et al. Comparative HPLC/ESI-MS and HPLC/DAD study of different populations of cultivated, wild and commercial *Gentiana lutea* L. *Food chemistry*. 2015;174:426-33.
27. Olennikov DN, Kashchenko NI, Chirikova NK, Koryakina LP, Vladimirov LN. Bitter gentian teas: Nutritional and phytochemical profiles, polysaccharide characterisation and bioactivity. *Molecules*. 2015;20(11):20014-30.
28. Pan Y, Zhang J, Zhao Y-L, Wang Y-Z, Huang H-Y. Investigation of metabolites accumulation in medical plant *Gentiana rigescens* during different growing stage using LC-MS/MS and FT-IR. *Botanical studies*. 2015;56(1):1-9.
29. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental health perspectives*. 2001;109(suppl 1):69-75.
30. Pan S-Y, Zhou S-F, Gao S-H, Yu Z-L, Zhang S-F, Tang M-K, et al. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013.
31. Shukla AC. *The Herbal Drugs*. *Advances in Pharmaceutical Biotechnology*—Springer, Singapore. 2020:69-75.
32. Hemmerich J, Ecker GF. In silico toxicology: From structure–activity relationships towards deep learning and adverse outcome pathways. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*. 2020;10(4):e1475.
33. Benfenati E, Manganaro A, Gini GC, editors. *VEGA-QSAR: AI Inside a Platform for Predictive Toxicology*. PAI@ AI* IA; 2013.
34. Radhika P, Jyothi Y. A review on genotoxicity, its molecular mechanisms, regulatory testing in drug development process. *International journal of pharmaceutical science and research (IJPSR)*. 2019;10(9):4054-69.
35. Çelik TA. *Introductory Chapter: Cytotoxicity*. Chapter. 2018;1:1-5.
36. Vaijanathappa J, Puttaswamygowda J, Bevanhalli R, Dixit S, Prabhakaran P. Molecular docking, antiproliferative and anticonvulsant activities of swertiamarin isolated from *Enicostemma axillare*. *Bioorganic chemistry*. 2020;94:103428.
37. Johnson D, Walker C. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1999;39.
38. Pietsenpol J, Stewart Z. Cell cycle checkpoint signaling:: Cell cycle arrest versus apoptosis. *toxicology*. 2002;181:475-81.
39. Haanen C, Vermes I. Apoptosis and inflammation. *Mediators of inflammation*. 1995;4(1):5-15.
40. Vénéreau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from cell death to new life. *Frontiers in immunology*. 2015;6:422.
41. Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis*. 2017;58(5):235-63.

42. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*. 2009;361(15):1475-85.
43. Graziano MJ, Jacobson-Kram D. *Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals*: Springer; 2015.
44. Basu AK. DNA damage, mutagenesis and cancer. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(4):970.
45. OECD. Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines. OECD Workgroup of National Coordinators for Test 42 Guidelines (WNT). 2015.
46. Bausinger J, Speit G. Induction and repair of DNA damage measured by the comet assay in human T lymphocytes separated by immunomagnetic cell sorting. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;769:42-8.
47. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1993;285(1):35-44.
48. économiques Odcedd. Test No. 473: In Vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test: OECD Publishing; 2016.
49. Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei SA, Azargashb E. The significance application of indigenous phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*. 2011;10(4):895.
50. Storer RD, McKelvey TW, Kraynak AR, Elia MC, Barnum JE, Harmon LS, et al. Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutation research/genetic toxicology*. 1996;368(2):59-101.
51. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*. 2012;5(1):9-19.
52. Klotz L-O, Steinbrenner H. Cellular adaptation to xenobiotics: Interplay between xenosensors, reactive oxygen species and FOXO transcription factors. *Redox biology*. 2017;13:646-54.
53. Reczek CR, Chandel NS. ROS-dependent signal transduction. *Current opinion in cell biology*. 2015;33:8-13.
54. Henkler F, Brinkmann J, Luch A. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers*. 2010;2(2):376-96.
55. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*. 2015;30(1):11-26.
56. Keller JN, Mattson MP. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Reviews in the Neurosciences*. 1998;9(2):105-16.
57. Morales M, Munné-Bosch S. Malondialdehyde: facts and artifacts. *Plant physiology*. 2019;180(3):1246-50.
58. Su L-J, Zhang J-H, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019;2019.
59. Singh S, Brocker C, Koppaka V, Chen Y, Jackson BC, Matsumoto A, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free radical biology and medicine*. 2013;56:89-101.
60. Poetsch AR. The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2020;18:207-19.
61. Kang M, So E, Simons A, Spitz D, Ouchi T. DNA damage induces reactive oxygen species generation through the H2AX-Nox1/Rac1 pathway. *Cell death & disease*. 2012;3(1):e249-e.
62. Surova O, Zhitovovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97.

63. Kurutas EB. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition journal*. 2015;15(1):1-22.
64. Banning A, Deubel S, Kluth D, Zhou Z, Brigelius-Flohé R. The GI-GPx gene is a target for Nrf2. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(12):4914-23.
65. Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *Physiology*. 2004;19(3):124-8.
66. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(3):486-541.
67. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73(11):2405-10.
68. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
69. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants—past, present and future. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014;25(4):453-72.
70. Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The EMBO journal*. 2004;23(10):2134-45.
71. Kantari C, Walczak H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2011;1813(4):558-63.
72. Levine B, Sinha SC, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*. 2008;4(5):600-6.
73. Subburaj Y, Cosentino K, Axmann M, Pedrueza-Villalmanzo E, Hermann E, Bleicken S, et al. Bax monomers form dimer units in the membrane that further self-assemble into multiple oligomeric species. *Nature communications*. 2015;6(1):1-11.
74. Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, et al. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*. 2001;410(6828):549-54.
75. Kalkavan H, Green DR. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death & Differentiation*. 2018;25(1):46-55.
76. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(8):1380-9.
77. Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. 2014;24(1).
78. Soldani C, Scovassi AI. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis*. 2002;7(4):321-8.
79. Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFARLANE M, Nicholson DW, COHEN GM. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochemical Journal*. 1996;315(1):21-4.
80. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology*. 2005;1(2):112-9.
81. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23.
82. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AM. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI insight*. 2019;4(15).
83. de Almagro MC, Goncharov T, Izrael-Tomasevic A, Duttler S, Kist M, Varfolomeev E, et al. Coordinated ubiquitination and phosphorylation of RIP1 regulates necroptotic cell death. *Cell Death & Differentiation*. 2017;24(1):26-37.

84. Samson AL, Zhang Y, Geoghegan ND, Gavin XJ, Davies KA, Mlodzianoski MJ, et al. MLKL trafficking and accumulation at the plasma membrane control the kinetics and threshold for necroptosis. *Nature communications*. 2020;11(1):1-17.
85. Xia B, Fang S, Chen X, Hu H, Chen P, Wang H, et al. MLKL forms cation channels. *Cell research*. 2016;26(5):517-28.
86. Xie T, Peng W, Liu Y, Yan C, Maki J, Degterev A, et al. Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure*. 2013;21(3):493-9.
87. Yan G, Elbadawi M, Efferth T. Multiple cell death modalities and their key features. *World Academy of Sciences Journal*. 2020;2(2):39-48.
88. Zhang F, Xie R, Munoz FM, Lau SS, Monks TJ. PARP-1 hyperactivation and reciprocal elevations in intracellular Ca²⁺ during ROS-induced nonapoptotic cell death. *Toxicological Sciences*. 2014;140(1):118-34.
89. Huang C-T, Huang D-Y, Hu C-J, Wu D, Lin W-W. Energy adaptive response during parthanatos is enhanced by PD98059 and involves mitochondrial function but not autophagy induction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2014;1843(3):531-43.
90. Luan Y, Cao X-p, Zhang L, Peng Y-q, Li Y-y, Yin C-h. STING Modulates CD4 T Cell Necroptosis via Activation of PARP-1/PAR Following Acute Systemic Inflammation. 2021.
91. Fu X, Feng Y, Shao B, Zhang Y. Activation of the ERK/Creb/Bcl-2 pathway protects periodontal ligament stem cells against hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *Molecular medicine reports*. 2019;19(5):3649-57.
92. Lee Y-J, Cho H-N, Soh J-W, Jhon GJ, Cho C-K, Chung H-Y, et al. Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. *Experimental cell research*. 2003;291(1):251-66.
93. Tang D, Wu D, Hirao A, Lahti JM, Liu L, Mazza B, et al. ERK Activation Mediates Cell Cycle Arrest and Apoptosis after DNA Damage Independently of p53*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(15):12710-7.
94. Akhiani AA, Werlenius O, Aurelius J, Movitz C, Martner A, Hellstrand K, et al. Role of the ERK pathway for oxidant-induced parthanatos in human lymphocytes. *PloS one*. 2014;9(2):e89646.
95. Zhuang S, Kinsey GR, Yan Y, Han J, Schnellmann RG. Extracellular signal-regulated kinase activation mediates mitochondrial dysfunction and necrosis induced by hydrogen peroxide in renal proximal tubular cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2008;325(3):732-40.
96. Faubel S, Edelstein C. Caspases as drug targets in ischemic organ injury. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*. 2005;5(3):269-87.
97. Putt KS, Chen GW, Pearson JM, Sandhorst JS, Hoagland MS, Kwon J-T, et al. Small-molecule activation of procaspase-3 to caspase-3 as a personalized anticancer strategy. *Nature chemical biology*. 2006;2(10):543-50.
98. Šiler B, Mišić D, Nestorović J, Banjanac T, Glamočlija J, Soković M, et al. Antibacterial and antifungal screening of *Centaurium pulchellum* crude extracts and main secoiridoid compounds. *Natural product communications*. 2010;5(10):1934578X1000501001.
99. Cvetković SD. Antimikrobni i antigenotoksični efekat ekstrakata lincure (*Gentiana lutea* L.) gajene u plantažnim i laboratorijskim uslovima: Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet; 2021.
100. Joksić G, Tričković JF, Joksić I. Potential of *Gentiana lutea* for the Treatment of Obesity-associated Diseases. *Current pharmaceutical design*. 2019;25(18):2071-6.
101. Jaishree V, Narsimha S. Swertiamarin and quercetin combination ameliorates hyperglycemia, hyperlipidemia and oxidative stress in streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus in wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2020;130:110561.
102. Mihailović V, Mihailović M, Uskoković A, Arambašić J, Mišić D, Stanković V, et al. Hepatoprotective effects of *Gentiana asclepiadea* L. extracts against carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Food and chemical toxicology*. 2013;52:83-90.
103. Kesavan R, Chandel S, Upadhyay S, Bendre R, Ganugula R, Potunuru U, et al. *Gentiana lutea* exerts anti-atherosclerotic effects by preventing endothelial inflammation and smooth muscle cell migration. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 2016;26(4):293-301.

104. Mustafa AM, Caprioli G, Dikmen M, Kaya E, Maggi F, Sagratini G, et al. Evaluation of neuritogenic activity of cultivated, wild and commercial roots of *Gentiana lutea* L. *Journal of Functional Foods*. 2015;19:164-73.
105. Niiho Y, Yamazaki T, Nakajima Y, Yamamoto T, Ando H, Hirai Y, et al. Gastroprotective effects of bitter principles isolated from *Gentian* root and *Swertia* herb on experimentally-induced gastric lesions in rats. *Journal of Natural Medicines*. 2006;60(1):82-8.
106. Mahady GB, Pendland SL, Stoia A, Hamill FA, Fabricant D, Dietz BM, et al. In vitro susceptibility of *Helicobacter pylori* to botanical extracts used traditionally for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2005;19(11):988-91.
107. McMullen MK, Whitehouse JM, Towell A. Bitters: time for a new paradigm. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2015;2015.
108. Wölfle U, Haarhaus B, Seiwerth J, Cawelius A, Schwabe K, Quirin K-W, et al. The herbal bitter drug *gentiana lutea* modulates lipid synthesis in human keratinocytes in vitro and in vivo. *International journal of molecular sciences*. 2017;18(8):1814.
109. Gendrisch F, Nováčková A, Sochorová M, Haarhaus B, Vávrová K, Schempp CM, et al. *Gentiana lutea* Extract Modulates Ceramide Synthesis in Primary and Psoriasis-Like Keratinocytes. *Molecules*. 2020;25(8):1832.
110. Mathew A, Taranalli A, Torgal S. Evaluation of anti-inflammatory and wound healing activity of *Gentiana lutea* rhizome extracts in animals. *Pharmaceutical Biology*. 2004;42(1):8-12.
111. Cvetković S, Nastasijević B, Mitić-Ćulafić D, Đukanović S, Tenji D, Knežević-Vukčević J, et al. New insight into the antigenotoxic activity of *Gentiana lutea* extracts—Protective effect against food borne mutagens. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2020;858:503251.
112. Li J, Zhao C, Zhu Q, Wang Y, Li G, Li X, et al. Sweroside Protects Against Myocardial Ischemia–Reperfusion Injury by Inhibiting Oxidative Stress and Pyroptosis Partially via Modulation of the Keap1/Nrf2 Axis. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2021;8.
113. Wu T, Li J, Li Y, Song H. Antioxidant and hepatoprotective effect of swertiamarin on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via the Nrf2/HO-1 pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017;41(6):2242-54.
114. Wei S, Chi H, Kodama H, Chen G. Anti-inflammatory effect of three iridoids in human neutrophils. *Natural Product Research*. 2013;27(10):911-5.
115. Abirami A, Sinsinwar S, Rajalakshmi P, Brindha P, Rajesh YB, Vadivel V. Antioxidant and cytoprotective properties of loganic acid isolated from seeds of *Strychnos potatorum* L. against heavy metal induced toxicity in PBMC model. *Drug and chemical toxicology*. 2019:1-11.
116. Wan Z, Li H, Wu X, Zhao H, Wang R, Li M, et al. Hepatoprotective effect of gentiopicroside in combination with leflunomide and/or methotrexate in arthritic rats. *Life Sciences*. 2021;265:118689.
117. Sozański T, Kucharska AZ, Rapak A, Szumny D, Trocha M, Merwid-Łąd A, et al. Iridoid–loganic acid versus anthocyanins from the *Cornus mas* fruits (cornelian cherry): common and different effects on diet-induced atherosclerosis, PPARs expression and inflammation. *Atherosclerosis*. 2016;254:151-60.
118. Saravanan S, Islam VH, Thirugnanasambantham K, Pazhanivel N, Raghuraman N, Paulraj MG, et al. Swertiamarin ameliorates inflammation and osteoclastogenesis intermediates in IL-1 β induced rat fibroblast-like synoviocytes. *Inflammation Research*. 2014;63(6):451-62.
119. Viljoen A, Mncwani N, Vermaak I. Anti-inflammatory iridoids of botanical origin. *Current medicinal chemistry*. 2012;19(14):2104-27.
120. Danielewski M, Matuszewska A, Nowak B, Kucharska AZ, Sozański T. The effects of natural iridoids and anthocyanins on selected parameters of liver and cardiovascular system functions. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.

121. Zhang X, Shi E, Yang L, Fu W, Hu F, Zhou X. Gentiopicroside attenuates diabetic retinopathy by inhibiting inflammation, oxidative stress, and NF- κ B activation in rat model. *European Journal of Inflammation*. 2019;17:2058739219847837.
122. Wang R, Dong Z, Lan X, Liao Z, Chen M. Sweroside alleviated LPS-induced inflammation via SIRT1 mediating NF- κ B and FOXO1 signaling pathways in RAW264. 7 cells. *Molecules*. 2019;24(5):872.
123. Saravanan S, Islam VH, Babu NP, Pandikumar P, Thirugnanasambantham K, Chellappandian M, et al. Swertiamarin attenuates inflammation mediators via modulating NF- κ B/ κ B and JAK2/STAT3 transcription factors in adjuvant induced arthritis. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2014;56:70-86.
124. Smith EM, Gregg M, Hashemi F, Schott L, Hughes TK. Corticotropin Releasing Factor (CRF) activation of NF- κ B-directed transcription in leukocytes. *Cellular and molecular neurobiology*. 2006;26(4-6):1019-34.
125. Rodrigues C, Karmali A, Machado J. The extracts of *Gentiana lutea* with potential cytotoxic effects on human carcinoma cell lines: A preliminary study. *European Journal of Integrative Medicine*. 2019;27:34-8.
126. Balijagić J, Janković T, Zdunić G, Bošković J, Šavikin K, Gočevac D, et al. Chemical profile, radical scavenging and cytotoxic activity of yellow gentian leaves (*Genitaneae luteae folium*) grown in northern regions of Montenegro. *Natural product communications*. 2012;7(11):1934578X1200701119.
127. Tian H, Liu L, Yang T-J, Wang Y-Q. Gentiopicroside inhibits cancer cell growth in OVCAR-3 ovary cancer cells through the mediation of apoptosis, loss of mitochondrial transmembrane potential and NF- κ B signalling pathway. 2016.
128. Wu C, Wei Y, Ge S, Gao H-Q. Effect of swertiamarin, gentiopicrosin and sweroside on cell apoptosis and expression of Bcl-2 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*. 2021;46(2):406-11.
129. Wang X, Wang T. Swertiamarin exerts anticancer effects on human cervical cancer cells via induction of apoptosis, inhibition of cell migration and targeting of MEK-ERK pathway. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2021;20(1):75-81.
130. Han X-L, Li J-D, Wang W-L, Yang C, Li Z-Y. Sweroside eradicated leukemia cells and attenuated pathogenic processes in mice by inducing apoptosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2017;95:477-86.
131. Kesavan R, Potunuru UR, Nastasijević B, Avaneesh T, Joksić G, Dixit M. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by *Gentiana lutea* root extracts. *PLoS One*. 2013;8(4):e61393.
132. Cvetković S, Todorović S, Nastasijević B, Mitić-Ćulafić D, Đukanović S, Knežević-Vukčević J, et al. Assessment of genoprotective effects of *Gentiana lutea* extracts prepared from plants grown in field and in vitro. *Industrial Crops and Products*. 2020;154:112690.
133. Patenković A, Stamenković-Radak M, Nikolić D, Marković T, Anđelković M. Synergistic effect of *Gentiana lutea* L. on methyl methanesulfonate genotoxicity in the *Drosophila* wing spot test. *Journal of ethnopharmacology*. 2013;146(2):632-6.
134. Mustafayeva K, Di Giorgio C, Elias R, Kerimov Y, Ollivier E, De Méo M. DNA-damaging, mutagenic, and clastogenic activities of gentiopicroside isolated from *Cephalaria kotschy* roots. *Journal of natural products*. 2010;73(2):99-103.
135. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Current protocols in immunology*. 2015;111:A3.b.1-a3.b.
136. Roehm NW, Rodgers GH, Hatfield SM, Glasebrook AL. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*. 1991;142(2):257-65.
137. Darzynkiewicz Z, Juan G. DNA content measurement for DNA ploidy and cell cycle analysis. *Current protocols in cytometry*. 2001;Chapter 7:Unit 7.5.

138. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*. 1988;175(1):184-91.
139. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2000;455(1-2):81-95.
140. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2003;534(1-2):65-75.
141. Alamdari DH, Paletas K, Pegiou T, Sarigianni M, Befani C, Koliakos G. A novel assay for the evaluation of the prooxidant-antioxidant balance, before and after antioxidant vitamin administration in type II diabetes patients. *Clinical biochemistry*. 2007;40(3-4):248-54.
142. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical biochemistry*. 2017;524:13-30.
143. Boraschi D, Maurizi G. Quantitation of DNA fragmentation with diphenylamine. *Apoptosis-a laboratory manual of experimental methods*. 1998:153-61.
144. Johnson S, Rabinovitch P. Ex vivo imaging of excised tissue using vital dyes and confocal microscopy. *Current protocols in cytometry*. 2012;Chapter 9:Unit 9.39.
145. Sauvat A, Wang Y, Segura F, Spaggiari S, Müller K, Zhou H, et al. Quantification of cellular viability by automated microscopy and flow cytometry. *Oncotarget*. 2015;6(11):9467.
146. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*. 1951;193:265-75.
147. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970;227(5259):680-5.
148. Subramanian M, Shaha C. Up-regulation of Bcl-2 through ERK phosphorylation is associated with human macrophage survival in an estrogen microenvironment. *The Journal of Immunology*. 2007;179(4):2330-8.
149. Prakash O, Singh R, Kumar S, Srivastava S, Ved A. *Gentiana lutea* Linn.(Yellow Gentian): A comprehensive. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine*. 2017;3(3):175-81.
150. Menković N, Šavikin-Fodulović K, Momčilović I, Grubišić D. Quantitative determination of secoiridoid and γ -pyrone compounds in *Gentiana lutea* cultured in vitro. *Planta medica*. 2000;66(01):96-8.
151. Aberham A, Schwaiger S, Stuppner H, Ganzera M. Quantitative analysis of iridoids, secoiridoids, xanthenes and xanthone glycosides in *Gentiana lutea* L. roots by RP-HPLC and LC-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2007;45(3):437-42.
152. Wang L, Weller CL. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*. 2006;17(6):300-12.
153. Seigler DS. Iridoid monoterpenes. *Plant Secondary Metabolism: Springer*; 1998. p. 353-66.
154. Pham HNT, Nguyen VT, Vuong QV, Bowyer MC, Scarlett CJ. Effect of extraction solvents and drying methods on the physicochemical and antioxidant properties of *Helicteres hirsuta* Lour. leaves. *Technologies*. 2015;3(4):285-301.
155. Jimenez-Garcia SN, Vazquez-Cruz MA, Ramirez-Gomez XS, Beltran-Campos V, Contreras-Medina LM, Garcia-Trejo JF, et al. Changes in the Content of Phenolic Compounds and Biological Activity in Traditional Mexican Herbal Infusions with Different Drying Methods. *Molecules*. 2020;25(7):1601.
156. Bhatta S, Stevanovic Janezic T, Ratti C. Freeze-drying of plant-based foods. *Foods*. 2020;9(1):87.
157. Chen B, Peng Y, Wang X, Li Z, Sun Y. Preparative separation and purification of four glycosides from *Gentianae radix* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their anti-NO production effects. *Molecules*. 2017;22(11):2002.

158. Mihailovic V, Matic S, Mišić D, Solujic S, Stanic S, Katanic J, et al. Chemical composition, antioxidant and antigenotoxic activities of different fractions of *Gentiana asclepiadea* L. roots extract. *EXCLI journal*. 2013;12:807.
159. González-López Ó, Pinto CG, Casquero PA. Secoiridoids glycosides and root development in *Gentiana lutea* L. subsp. *aurantiaca* M. Lainz from the Northwest of the Iberian Peninsula. *Industrial Crops and Products*. 2015;77:932-9.
160. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay and drug development technologies*. 2004;2(1):51-62.
161. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends in molecular medicine*. 2006;12(9):440-50.
162. Wang JY, Cho SK. Coordination of repair, checkpoint, and cell death responses to DNA damage. *Advances in protein chemistry*. 2004;69:101-35.
163. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell cycle*. 2008;7(18):2902-6.
164. Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, Utsumi H, et al. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *The EMBO journal*. 1998;17(18):5497-508.
165. Boffetta P, Van Der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, et al. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *American journal of epidemiology*. 2007;165(1):36-43.
166. Mao Z, Bozzella M, Seluanov A, Gorbunova V. Comparison of nonhomologous end joining and homologous recombination in human cells. *DNA repair*. 2008;7(10):1765-71.
167. Al-Aamri HM, Irving HR, Meehan-Andrews T, Bradley C. Determination of the DNA repair pathways utilised by acute lymphoblastic leukaemia cells following daunorubicin treatment. *BMC Research Notes*. 2019;12(1):1-5.
168. Lepage CC, Morden CR, Palmer MC, Nachtigal MW, McManus KJ. Detecting chromosome instability in cancer: approaches to resolve cell-to-cell heterogeneity. *Cancers*. 2019;11(2):226.
169. Chan YW, Fugger K, West SC. Unresolved recombination intermediates lead to ultra-fine anaphase bridges, chromosome breaks and aberrations. *Nature cell biology*. 2018;20(1):92-103.
170. Hartmann A, Plappert U, Poetter F, Suter W. Comparative study with the alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. *Mutation Research/Genetic toxicology and environmental mutagenesis*. 2003;536(1-2):27-38.
171. Pogozelski WK, Tullius TD. Oxidative strand scission of nucleic acids: routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. *Chemical reviews*. 1998;98(3):1089-108.
172. Gates KS. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chemical research in toxicology*. 2009;22(11):1747-60.
173. Ma B, Villalta PW, Balbo S, Stepanov I. Analysis of a malondialdehyde–deoxyguanosine adduct in human leukocyte DNA by liquid chromatography nano-electrospray–high-resolution tandem mass spectrometry. *Chemical research in toxicology*. 2014;27(10):1829-36.
174. Kusšar A, Zupančič A, Šentjerc M, Baričević D. Free radical scavenging activities of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) measured by electron spin resonance. *Human & experimental toxicology*. 2006;25(10):599-604.
175. Sharma V, Collins LB, Chen T-h, Herr N, Takeda S, Sun W, et al. Oxidative stress at low levels can induce clustered DNA lesions leading to NHEJ mediated mutations. *Oncotarget*. 2016;7(18):25377.
176. Li X, Yang C, Shen H. Gentiopicroside exerts convincing antitumor effects in human ovarian carcinoma cells (SKOV3) by inducing cell cycle arrest, mitochondrial mediated apoptosis and inhibition of cell migration. *J BUON*. 2019;24(1):280-4.

177. Hu Z, Wang H, Fu Y, Ma K, Ma X, Wang J. Gentiopicroside inhibits cell growth and migration on cervical cancer via the reciprocal MAPK/Akt signaling pathways. *Nutrition and Cancer*. 2020;1-12.
178. Tang H, Ke Y, Ren Z, Lei X, Xiao S, Bao T, et al. Bioinformatics analysis of differentially expressed genes in hepatocellular carcinoma cells exposed to Swertiamarin. *Journal of Cancer*. 2019;10(26):6526.
179. Stachowicz-Kuśnierz A, Korchowiec J. Nucleophilic properties of purine bases: inherent reactivity versus reaction conditions. *Structural Chemistry*. 2016;27(2):543-55.
180. Newell AH, Hemphill A, Akkari YM, Hejna J, Moses RE, Olson SB. Loss of homologous recombination or non-homologous end-joining leads to radial formation following DNA interstrand crosslink damage. *Cytogenetic and genome research*. 2008;121(3-4):174-80.
181. Manganelli S, Benfenati E, Manganaro A, Kulkarni S, Barton-Maclaren TS, Honma M. New quantitative structure–activity relationship models improve predictability of Ames mutagenicity for aromatic azo compounds. *Toxicological Sciences*. 2016;153(2):316-26.
182. Zhang L, Ai H, Chen W, Yin Z, Hu H, Zhu J, et al. CarcinoPred-EL: novel models for predicting the carcinogenicity of chemicals using molecular fingerprints and ensemble learning methods. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-14.
183. Menkovic N, Juranic Z, Stanojkovic T, Raonic-Stevanovic T, Šavikin K, Zdunić G, et al. Radioprotective activity of *Gentiana lutea* extract and mangiferin. *Phytotherapy research*. 2010;24(11):1693-6.
184. Carloni M, Meschini R, Ovidi L, Palitti F. PHA-induced cell proliferation rescues human peripheral blood lymphocytes from X-ray-induced apoptosis. *Mutagenesis*. 2001;16(2):115-20.
185. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997;45(7):923-34.
186. Mayer C, Popanda O, Zelezny O, von Brevern M-C, Bach A, Bartsch H, et al. DNA repair capacity after γ -irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes. *DNA repair*. 2002;1(3):237-50.
187. Hu Q, Xie Y, Ge Y, Nie X, Tao J, Zhao Y. Resting T cells are hypersensitive to DNA damage due to defective DNA repair pathway. *Cell death & disease*. 2018;9(6):1-11.
188. Lorge E, Hayashi M, Albertini S, Kirkland D. Comparison of different methods for an accurate assessment of cytotoxicity in the in vitro micronucleus test: I. Theoretical aspects. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2008;655(1-2):1-3.
189. Willis N, Rhind N. Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. *Cell division*. 2009;4(1):1-10.
190. Krejci L, Altmannova V, Spirek M, Zhao X. Homologous recombination and its regulation. *Nucleic acids research*. 2012;40(13):5795-818.
191. Caesar LK, Cech NB. Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1+ 1 does not equal 2. *Natural product reports*. 2019;36(6):869-88.
192. Panche A, Diwan A, Chandra S. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 2016;5.
193. Salman Z, Yu-Qing J, Bin L, Cai-Yun P, Iqbal CM, Atta-ur R, et al. Antioxidant Nature Adds Further Therapeutic Value: An Updated Review on Natural Xanthenes and Their Glycosides. *Digital Chinese Medicine*. 2019;2(3):166-92.
194. Olennikov DN, Gadimli AI, Isaev JI, Kashchenko NI, Prokopyev AS, Kataeva TN, et al. Caucasian *Gentiana* species: Untargeted LC-MS metabolic profiling, antioxidant and digestive enzyme inhibiting activity of six plants. *Metabolites*. 2019;9(11):271.
195. Hudecová A, Kusznierewicz B, Hašplová K, Huk A, Magdolenová Z, Miadoková E, et al. *Gentiana asclepiadea* exerts antioxidant activity and enhances DNA repair of hydrogen peroxide- and silver nanoparticles-induced DNA damage. *Food and chemical toxicology*. 2012;50(9):3352-9.
196. Dzydzan O, Brodyak I, Sokół-Łętowska A, Kucharska AZ, Sybirna N. Loganic Acid, an Iridoid Glycoside Extracted from *Cornus mas* L. Fruits, Reduces of Carbonyl/Oxidative Stress

- Biomarkers in Plasma and Restores Antioxidant Balance in Leukocytes of Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes Mellitus. *Life*. 2020;10(12):349.
197. Liu Q, Cheng L, Matsuura A, Xiang L, Qi J. Gentiopicroside, a Secoiridoid Glycoside from *Gentiana rigescens* Franch, Extends the Lifespan of Yeast via Inducing Mitophagy and Antioxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2020;2020.
198. Duthie SJ, Collins AR. The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free radical biology and Medicine*. 1997;22(4):717-24.
199. Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(15):8010-5.
200. Sweasy JB, Lang T, DiMaio D. Is base excision repair a tumor suppressor mechanism? *Cell cycle*. 2006;5(3):250-9.
201. Lee M-R, Kim S-H, Cho H-J, Lee K-Y, Moon AR, Jeong HG, et al. Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(11):9857-66.
202. von der Lippen C, Sahu S, Seifermann M, Tiwari VK, Epe B. The repair of oxidized purines in the DNA of human lymphocytes requires an activation involving NF-YA-mediated upregulation of OGG1. *DNA repair*. 2015;25:1-8.
203. Dianov GL, Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. *Nucleic acids research*. 2013;41(6):3483-90.
204. Saville KM, Clark J, Wilk A, Rogers GD, Andrews JF, Koczor CA, et al. NAD⁺-mediated regulation of mammalian base excision repair. *DNA repair*. 2020;93:102930.
205. Tang J-b, Goellner EM, Wang X-h, Trivedi RN, St Croix CM, Jelezcova E, et al. Bioenergetic metabolites regulate base excision repair-dependent cell death in response to DNA damage. *Molecular Cancer Research*. 2010;8(1):67-79.
206. Westman J, Grinstein S, Marques PE. Phagocytosis of necrotic debris at sites of injury and inflammation. *Frontiers in immunology*. 2020;10:3030.
207. Murphy K, Ranganathan V, Farnsworth M, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death & Differentiation*. 2000;7(1):102-11.
208. Lavoie H, Gagnon J, Therrien M. ERK signalling: A master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2020;21(10):607-32.
209. Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *The FEBS journal*. 2010;277(1):2-21.
210. Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, et al. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*. 2005;25(5):374-82.
211. Nowak G, Clifton GL, Godwin ML, Bakajsova D. Activation of ERK1/2 pathway mediates oxidant-induced decreases in mitochondrial function in renal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2006;291(4):F840-F55.
212. Sipieter F, Cappe B, Leray A, De Schutter E, Bridelance J, Hulpiau P, et al. Characteristic ERK1/2 signaling dynamics distinguishes necroptosis from apoptosis. *Iscience*. 2021;24(9):103074.
213. Yang Y, He J, Jin S, Chen L. Bax/Bcl-2 and caspase 3 pathway-mediated apoptosis induced by gentiopicroside in human colorectal cancer cells. *American Society of Clinical Oncology*; 2018.
214. Ouyang Z, Xu G. Antitumor effects of Sweroside in human glioblastoma: its effects on mitochondrial mediated apoptosis, activation of different caspases, G0/G1 cell cycle arrest and targeting JNK/p38 MAPK signal pathways. *J BUON*. 2019;24:2141.
215. Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME. Involvement of PARP and poly (ADP-ribosyl) ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *ADP-Ribosylation Reactions: From Bacterial Pathogenesis to Cancer*: Springer; 1999. p. 137-48.

216. Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Apoptosis and cancer*. 2008;13-21.
217. Los M, Mozoluk M, Ferrari D, Stepczynska A, Stroh C, Renz A, et al. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(3):978-88.
218. Murata MM, Kong X, Moncada E, Chen Y, Imamura H, Wang P, et al. NAD⁺ consumption by PARP1 in response to DNA damage triggers metabolic shift critical for damaged cell survival. *Molecular biology of the cell*. 2019;30(20):2584-97.
219. Kim MY, Zhang T, Kraus WL. Poly (ADP-ribosyl) ation by PARP-1:PAR-laying'NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes & development*. 2005;19(17):1951-67.
220. Wei H, Yu X. Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics, proteomics & bioinformatics*. 2016;14(3):131-9.
221. Hooten NN, Kompaniez K, Barnes J, Lohani A, Evans MK. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(52):44679-90.
222. Wang R, Li C, Qiao P, Xue Y, Zheng X, Chen H, et al. OGG1-initiated base excision repair exacerbates oxidative stress-induced parthanatos. *Cell death & disease*. 2018;9(6):1-15.
223. Tang D, Kang R, Berghe TV, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*. 2019;29(5):347-64.
224. Ye Y-C, Wang H-J, Yu L, Tashiro S-I, Onodera S, Ikejima T. RIP1-mediated mitochondrial dysfunction and ROS production contributed to tumor necrosis factor alpha-induced L929 cell necroptosis and autophagy. *International immunopharmacology*. 2012;14(4):674-82.
225. Zhu Y, Cui H, Lv J, Li G, Li X, Ye F, et al. Angiotensin II triggers RIPK3-MLKL-mediated necroptosis by activating the Fas/FasL signaling pathway in renal tubular cells. *Plos one*. 2020;15(3):e0228385.
226. Wang W, Wang W-H, Azadzo KM, Su N, Dai P, Sun J, et al. Activation of innate antiviral immune response via double-stranded RNA-dependent RLR receptor-mediated necroptosis. *Scientific Reports*. 2016;6(1):1-14.
227. Thapa RJ, Basagoudanavar SH, Nogusa S, Irrinki K, Mallilankaraman K, Slifker MJ, et al. NF- κ B protects cells from gamma interferon-induced RIP1-dependent necroptosis. *Molecular and cellular biology*. 2011;31(14):2934-46.
228. Preyat N, Rossi M, Kers J, Chen L, Bertin J, Gough P, et al. Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide promotes TNF-induced necroptosis in a sirtuin-dependent manner. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(1):29-40.
229. Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, et al. NAD⁺ metabolism: Pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2020;5(1):1-37.
230. Yang H, Yang T, Baur JA, Perez E, Matsui T, Carmona JJ, et al. Nutrient-sensitive mitochondrial NAD⁺ levels dictate cell survival. *Cell*. 2007;130(6):1095-107.
231. Zhang Y, Su SS, Zhao S, Yang Z, Zhong C-Q, Chen X, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome. *Nature communications*. 2017;8(1):1-14.
232. Han C, Guan Z, Zhang P, Fang H, Li L, Zhang H, et al. Oxidative stress induced necroptosis activation is involved in the pathogenesis of hyperoxic acute lung injury. *Biochemical and biophysical research communications*. 2018;495(3):2178-83.
233. Zinzalla G, Thurston DE. Targeting protein-protein interactions for therapeutic intervention: a challenge for the future. 2009.
234. Chen S, Tian Q, Shang C, Yang L, Wei N, Shang G, et al. Synergistic Utilization of Necrostatin-1 and Z-VAD-FMK Efficiently Promotes the Survival of Compression-Induced Nucleus Pulposus Cells via Alleviating Mitochondrial Dysfunction. *BioMed Research International*. 2020;2020.

235. Bergamaschi D, Vossenkamper A, Lee W, Wang P, Bochukova E, Warnes G. Simultaneous polychromatic flow cytometric detection of multiple forms of regulated cell death. *Apoptosis*. 2019;24(5):453-64.
236. Yoon S, Kovalenko A, Bogdanov K, Wallach D. MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation. *Immunity*. 2017;47(1):51-65. e7.
237. Liu Y, Liu T, Lei T, Zhang D, Du S, Girani L, et al. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy. *International journal of molecular medicine*. 2019;44(3):771-86.
238. Wu Y, Tan H, Huang Q, Sun X, Zhu X, Shen H. zVAD-induced necroptosis in L929 cells depends on autocrine production of TNF α mediated by the PKC–MAPKs–AP-1 pathway. *Cell Death & Differentiation*. 2011;18(1):26-37.
239. Su Z, Yang Z, Xie L, DeWitt J, Chen Y. Cancer therapy in the necroptosis era. *Cell Death & Differentiation*. 2016;23(5):748-56.

8. PRILOZI

BIOGRAFIJA

Ana Valenta Šobot je rođena 25.10.1974. u Nišu, Republika Srbija, gde je završila osnovnu i srednju školu. Modul Molekularna biologija i fiziologija upisala je Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu školske 1993/1994 i diplomirala 2010. godine sa prosečnom ocenom 8,9. Školske 2010/11 godine upisala je doktorske akademske studije na Univerzitetu u Beogradu - Biološkom fakultetu, modul Molekularna biologija eukariota. Novembra 2010. godine zaposlena je u Institutu za nuklearne nauke „Vinča”, Univerziteta u Beogradu.

Učešće u projektima MPNTR:

2010 - 2018 „Radiosenzitivnost humanog genoma”, OI 173046,

2019 - 2020 „Ispitivanje i verifikacija metoda za multidisciplinarne forenzičke analize u funkciji neproliferacije oružja za masovno uništenje, TP 37021.

Dodatno je učestvovala na projektima:

2014 - 2015 „Preventions of oral lesions caused by smokeless tobacco”, Sweedish Match AB, Stokholm, Švedska,

2015 - 2016 „Chromosomal breakpoints in different Fanconi anemia complementation groups”, DAAD, Institut za humanu genetiku, Univerzitet u Jeni, Jena, Nemačka,

2020 - 2021 „Zelena sinteza nanočestica srebra za prevenciju i tretmane periodontalne bolesti”, 5490, Fond za inovacionu delatnost.

Dobitnik je stipendija za stručno usavršavanje:

2015 DAAD, Institut za humanu genetiku, Univerzitet u Jeni, Jena, Nemačka,

2019 Evropsko društvo za humanu genetiku (ESHG), Figueira de Foz, Portugalija.

Ana Valenta Šobot je član Srpskog društva genetičara i Evropskog društva za mutagenezu životne sredine i genomiku (European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, EEMGS). Do sada je objavila 15 naučnih radova u M20 kategorije. Na naučnim skupovima u zemlji i inostranstvu učestvovala je sa 6 saopštenja štampanih u celosti i 9 saopštenja štampanih u izvodu.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Ана П. Валента Шобот

број индекса Б3059/2010_____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу мононуклеарних ћелија периферне крви човека

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2022.

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана П. Валента Шобот

Број индекса Б3059/2010

Студијски програм Молекуларна биологија

Наслов рада Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу мононуклеарних ћелија периферне крви човека

Ментор др Дуња Дракулић и др Горан Брајушковић

Потписани/а Ана П. Валента Шобот

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2022.

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај референтних монотерпенских компоненти и екстракта корена *Gentiana lutea* на апоптозу и некроптозу мононуклеарних ћелија периферне крви човека

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 11.04.2022.

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.